

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420845

研究課題名(和文) CpGオリゴヌクレオチド刺激による抗原特異的抗体産生活性化機構の解明

研究課題名(英文) Potentiation of antigen-specific antibody production by peptides and CpG oligonucleotide

研究代表者

羽生 義郎 (HANYU, YOSHIRO)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：20357792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、免疫系を効率的に活性化するペプチド及び手法を見出した。免疫時に抗原と共にペプチド等の免疫活性化物質を投与する事により、抗原特異的に抗体産生細胞を活性化することに成功した。これにより、抗原特異性及び親和性が高い抗体、すなわち抗原の検出において有用性の高い抗体の生産が可能となった。この免疫活性化法を用いたインビトロ免疫法においては、抗原親和性の高いIgG1抗体が作製可能となり、モノクローナル抗体作製法として期待される。

研究成果の概要(英文)：To generate high-titer monoclonal antibodies, strong immuno-stimulation must be used for eliciting an intense cellular immune response. Here, we report that antigen-specific antibody production was potentiated by CpG oligonucleotide and Peptide-25 derived from Ag85B of Mycobacterium tuberculosis, and that the production of antigen-specific IgG1 in particular was markedly potentiated; specifically, this occurred because the use of Peptide-25 resulted in an increase in the number of antigen-specific antibody-producing cells. We studied the activation of T cells by the peptide by examining gene expression. The observed expression pattern of GATA-3 and T-bet suggests that the peptide modulates the Th1/Th2 balance during immunization. This potentiation, which was remarkably high in BALB/c mice, could be applied in the immunization performed for monoclonal antibody production in vivo and in vitro.

研究分野：生物学

キーワード：抗体 免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノム解析やプロテオーム解析で得られる膨大なデータを産業や医療へ有効に応用する為には、タンパク質の量的・質的变化の検出システムが必要不可欠であり、このシステムの構築はポストプロテオーム研究の重要課題であった。このためのツールとしては、モノクローナル抗体が最も有用と考えられていた。モノクローナル抗体の作製技術は一応確立されているが、思い通りの抗体を確実に作製することは困難であった。この問題を解決するには、抗体産生、B細胞分化、親和性成熟、細胞間相互作用等の免疫現象の基礎過程を解明することが欠かせなかった。その知見を生かし、免疫法の改良、スクリーニング法の開発、免疫細胞の制御技術等の技術開発を行ない、望む親和性・特異性を持つモノクローナル抗体を作製できる技術を確認することが望まれていた。有用なプローブとなりうる抗体が供給されることにより、生命現象の基礎過程の解明は一層進展すると期待されていた。

(2) 研究開発当初、望む性質を持つ抗体を確実に樹立するのは、困難であった。動物に抗原を免疫することにより抗体を作製するので、抗原に毒性があったり、抗原量が限られていたり、自己のタンパク質と相同性の高い抗原に対しては、抗体を作製するのが困難であった。一方、インビトロ免疫法は、免疫細胞を体外で抗原に感作させて抗原特異的抗体を分泌するB細胞を誘導した後、細胞融合によりハイブリドマを作製し、抗原特異的モノクローナル抗体を産生する手法であり、インビボ免疫法に比べ必要な抗原量が少なく、免疫刺激期間が短いという利点と共に、個体にとって有害な抗原でも抗体作製が可能であるという大きな利点があった。そのため、ヒトリンパ球に適用すればキメラ抗体、ヒト化抗体などの煩雑な工程を経ることなくヒト抗体を得ることができる。しかしながら、インビトロ免疫の場合は、体内のような抗体産生細胞の活性化を促進する機構が働かないため、どうしても抗原特異性の高い抗体産生細胞を十分な量で取得することはできず、クラススイッチがうまく働かず、産生される抗体のクラスの大半が扱いにくいIgMである点が大きなネックとなっていた。そのため、その大きな有用性に注目されながらも未だに広く利用されていない。したがって、インビトロ免疫法において、確実に抗原特異的IgG抗体を高効率で産生できる技術の開発が強く望まれていた。

2. 研究の目的

マウス脾臓細胞を用いたインビトロ免疫系に於いて、CpGオリゴヌクレオチド刺激等により、抗原特異的IgG産生細胞の効率的

誘導に成功した (*Journal of Immunological Methods*, 386 60-69 2012) 更に当該刺激により、抗体産生細胞のミエロマ細胞との融合効率が上昇し、ハイブリドマ形成効率が大きく向上することを見いだした (*Journal of Immunological Methods*, 373 102-110 2011) この両者の効果には、CpGオリゴヌクレオチドの直接的なB細胞活性化のみではなく、T細胞等との細胞間相互作用が必須であった。本研究では、この抗体産生細胞活性化のメカニズムを遺伝子発現を指標に解明することを目的とした。また同様の抗体産生細胞の活性化能を持つペプチド等を同定していく。産生される抗体の抗原特異性・親和性の評価のために、抗体遺伝子から単鎖抗体を効率的に再構成する技術の開発を目指した。CpGオリゴヌクレオチド等による抗原特異的抗体産生細胞の活性化メカニズムを解明し、効率的な抗体作製技術の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 抗体産生細胞の作り出す抗体の抗原に対する親和性・特異性を測定することを目的に、抗体産生細胞からRNAを精製する。RNAから、逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。抗体のフレーム領域の配列を用いたプライマーを作成し、これを用いて重鎖及び軽鎖の抗体遺伝子をPCRにて増幅・精製する。この抗体遺伝子から、単鎖抗体遺伝子を構成し単鎖抗体を発現することによって、抗体の抗原に対する親和性・特異性を測定する。単鎖抗体遺伝子を構成する新しい手法を分子生物学的手法を用いて確立する。

(2) より良いモノクローナル抗体、すなわち抗原特異性が高く、かつ抗原親和性が高い抗体を樹立するには、広く抗体産生細胞を活性化するのではなく、抗原特異的な抗体産生細胞を選択的に活性化することが重要である。この抗体産生細胞の活性化のメカニズム解明を行った。免疫刺激能を持つと期待されるペプチド及びそのアナログを合成し、抗原と共にマウスに投与し、抗原特異的抗体産生細胞の活性化を、抗原特異的抗体産生細胞の変化、遺伝子発現の変化を調べる。またこのペプチドとCpGオリゴヌクレオチドを共に投与することによる活性化についても調べる。遺伝子発現の変化は、リアルタイムPCRを用いて遺伝子発現量の変化を測定する。免疫したマウスから脾臓細胞を取り出し、CpGオリゴヌクレオチドを加え、一定期間培養後、その後にT細胞、B細胞及び樹状細胞を精製する。この細胞からRNAを精製し、逆転写反応によりcDNAを作製し、リアルタイムPCR解析により、各細胞での遺伝子発現パターンを明らかにし、活性化シグナルの変化を明らかにする。転写因子としてT-bet、GATA-3、Blimp-1遺伝子のプライマーを設計し合成する。これらのプライマーを用いて

のリアルタイムPCR解析により、各遺伝子の発現を定量的に測定する。

(3) インビトロ免疫における免疫活性化ペプチドや CpG オリゴヌクレオチドの抗体産生細胞の活性化メカニズムについて調べる。免疫していないマウスから脾臓細胞を取り出し、B細胞のみを精製・培養し、培養液中に抗原と本研究で明らかになった抗体産生細胞を刺激するペプチド等を加え、インビトロ系に於いて免疫刺激を加え、抗原特異的抗体産生細胞の誘導を試みる。T細胞、B細胞及び樹状細胞間の細胞間相互作用を見るために、各種細胞を混合比率し、抗原特異的抗体産生細胞の誘導を調べる。T細胞、B細胞及び樹状細胞の最適比率・細胞濃度、加える免疫活性化ペプチドや CpG オリゴヌクレオチドの最適濃度・投与タイミングを決定し、より効率的な免疫刺激法を確立する。タンパク質抗原に対して、インビトロ免疫法と本免疫刺激法を組み合わせ、ポジティブ・クローン数の大幅な増加を目指す。このインビトロ免疫法を用いて、モノクローナル抗体を樹立し、その抗原に対する特異性・親和性を評価し、本法の従来法に対する有利性の実証を目指す。

4. 研究成果

(1) 抗体産生細胞活性化の定量的評価には、作られる抗体の機能の正確な測定が必須である。このため、抗体産生細胞から抗体遺伝子を単離・再構成し、抗体を発現させ、その特異性・親和性を解析する手法の確立を行った。従来は、抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子を単離後、PCR法により、二つを連結し単鎖抗体を作成し、その結合活性を解析していた。この方法は、PCR法による増幅反応を用いるので、遺伝子の欠失・挿入・置換が起こりやすく、また抗原認識部位の大きな多様性のために、均質なPCRが阻害され、特定の遺伝子のみが増幅され、抗体ライブラリーの大きさが著しく縮小する欠点があった。

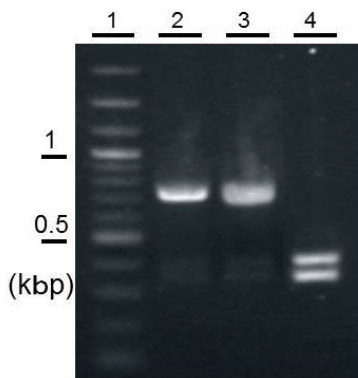


図1 単鎖抗体遺伝子の作製
1: マーカー、2: 単鎖抗体遺伝子、3: 単鎖抗体遺伝子 (S化DNAを含む場合)、4: 重鎖遺伝子と軽鎖遺伝子

正しい単鎖抗体を得るためには、PCR法を用いることなく、反応中に一本鎖DNAとしてむき出しになる領域をなるべく短く、かつ一本鎖DNAが生じる時間をできるだけ短くして、2つの遺伝子フラグメントを結合させる手法を開発した。免疫したマウスから脾臓細胞を取り出し、CpGオリゴヌクレオチドを加え、一定時間培養し、抗体産生細胞を特異的に増殖させたのち、RNAを分離し、cDNAを合成し、抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子をPCR法により増幅する際に、連結部分のプライマー配列にリンカー配列を付加し、その5'端にリン酸を付加した。得られた2種類のDNA断片のそれぞれ5'リン酸化末端をエキソヌクレアーゼで消化して、リンカー部分を一本鎖化させて連結させた後、BstDNAポリメラーゼにより、3'方向に残っている相補鎖を剥がしつつ、新たな相補鎖を合成させて(鎖置換反応)、リンカーでつながれた抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子の完全な二本鎖DNAの作製に成功した(図1)。本手法により、それぞれの抗体産生細胞が作成する抗体の機能を効率的に測定することが可能となり、抗体産生細胞の活性化を定量的に評価できるようになった。

(2) *Mycobacterium tuberculosis* 中のタンパク質である Ag85B の中から、25 残基のペプチドを選抜し、合成した (peptide25)。免疫時にこのペプチドを抗原と共に与えることにより、抗原特異的抗体産生細胞が活性化、また増殖することを見出した。活性化が確認された抗体のサブクラスは、主に IgG1 であった。この活性化時の免疫細胞の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法を用いて調べた。peptide25 を加えて免疫した場合は加えなかった場合に比べて、Th2 への分化誘導を示す GATA-3 の発現が 2.2 倍増加した。また B 細胞の活性化を示す Blimp-1 の発現は、は 4.8 倍増加した (図2)。ヘルパー T 細胞が Th2 へと分化誘導され、抗体産生細胞が活性化さ

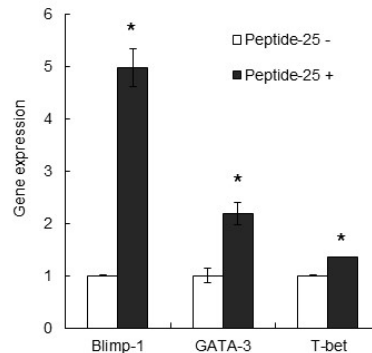


図2 ペプチド添加による各種遺伝子の発現の変化

peptide25 と CpG オリゴヌクレオチドを

同時に抗原と共に投与することにより、より強力に抗体産生細胞が誘導されることがわかった。インビボ免疫法において、この同時投与が抗原特異的な抗体産生細胞の活性化をもたらすことを確認した。

(3) インビトロ免疫における本研究で同定した免疫系活性化ペプチド (peptide25) と CpG オリゴヌクレオチドの抗体産生細胞の活性化メカニズムについて調べた。また peptide25 と CpG オリゴヌクレオチドにより活性化される細胞の産生する抗体が、抗原に対する高い特異性・親和性を持つ抗体であることを明らかにした。その抗体のサブタイプは、抗原親和性の低い IgM ではなく、より抗原特異性・親和性が高い IgG1 であった(図3)

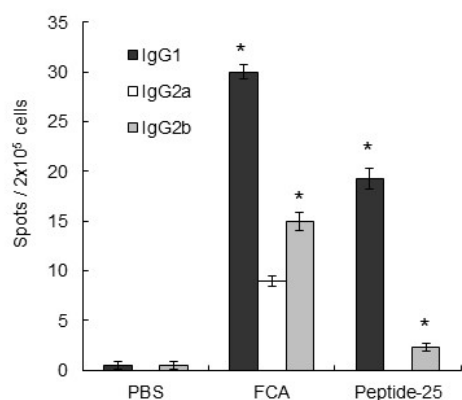


図3 peptide25 を加え免疫を行った場合の各種 IgG サブタイプの発現

PBS: コントロール、FCA: フロイントコンプリートアジュバンドを用いて免疫、Peptide-25: ペプチドを加え免疫

インビトロ免疫法は、微量の抗原で免疫が可能である、免疫期間がインビボ法に比べて格段に短い等の利点がありながら、有効な有効な免疫活性化の方法がなく、誘導される抗体のサブタイプは特異性の低い IgM であり、大きな問題であった。本法はこの問題を解決することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Mieko Kato and Yoshiro Hanyu Construction of an scFv library by enzymatic assembly of V_L and V_H genes *Journal of Immunological Methods* 査読有 396 15-22, 2013 10.1016/j.jim2013.07.003.

Mieko Kato and Yoshiro Hanyu Potentiation of

antigen-specific antibody production by peptides derived from Ag85B of *Mycobacterium tuberculosis* *Journal of Immunological Methods* 査読有 417 45-51, 2015 10.1016/j.jim2014.12.005.

Mieko Kato and Yoshiro Hanyu Screening technologies for recombinant antibody libraries *Medical Research Archives* 査読有 Vol 2, No 7 1-14, 2015 10.18103/mra.v2i7.427 <http://www.journals.ke-i.org/index.php/mra/article/view/427>

[図書](計1件)

羽生 義郎 神経細胞が示すカオス応答 研究者が教える動物実験 p73-76 2015 共立出版

[産業財産権]

出願状況(計2件)

名称: 細菌による機能性外来タンパク質の製造方法

発明者: 羽生 義郎、加藤 三恵子

権利者: 国立研究開発法人産業技術総合研究所、株式会社バイオピーク

種類: 特許

番号: 特願 2013-240294

出願年月日: 2013/11/20

国内外の別: 国内

名称: ターゲットを認識するタンパク質の発現スクリーニング法

発明者: 羽生 義郎、加藤 三恵子

権利者: 株式会社バイオピーク、国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2015-202488

出願年月日: 2015/10/13

国内外の別: 国内

6. 研究組織

研究代表者

羽生 義郎 (Yoshiro HANYU)

国立研究開発法人 産業技術総合研究所
バイオメディカル研究部門 主任研究員
研究者番号: 20357792