

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成14年度採択研究代表者

阪口 薫雄

(熊本大学大学院医学薬学研究部 感染・免疫学講座免疫学分野 教授)

「獲得免疫における高親和性抗体の産生機構と感染症防御への応用」

1. 研究実施の概要

免疫システムは異物、病原体、がん等の悪性新生物を識別し、排除することができる。この機能はこれまで人類に感染症予防において優れた恩恵を与えてきた。本研究では「抗原に特異的な抗体の親和性の亢進による免疫効果の向上」に焦点をあて、その機構を明らかにするとともに、リンパ細胞の高親和性抗体産生機能の飛躍的な上昇を企図した新しい分子治療戦略を展開する。具体的には、末梢のリンパ組織において発現するGANP分子が高親和性抗体産生に及ぼす分子機構を明らかにし、現在、重篤で難治とされているさまざまな感染症から我々を防御する方策を明示する。

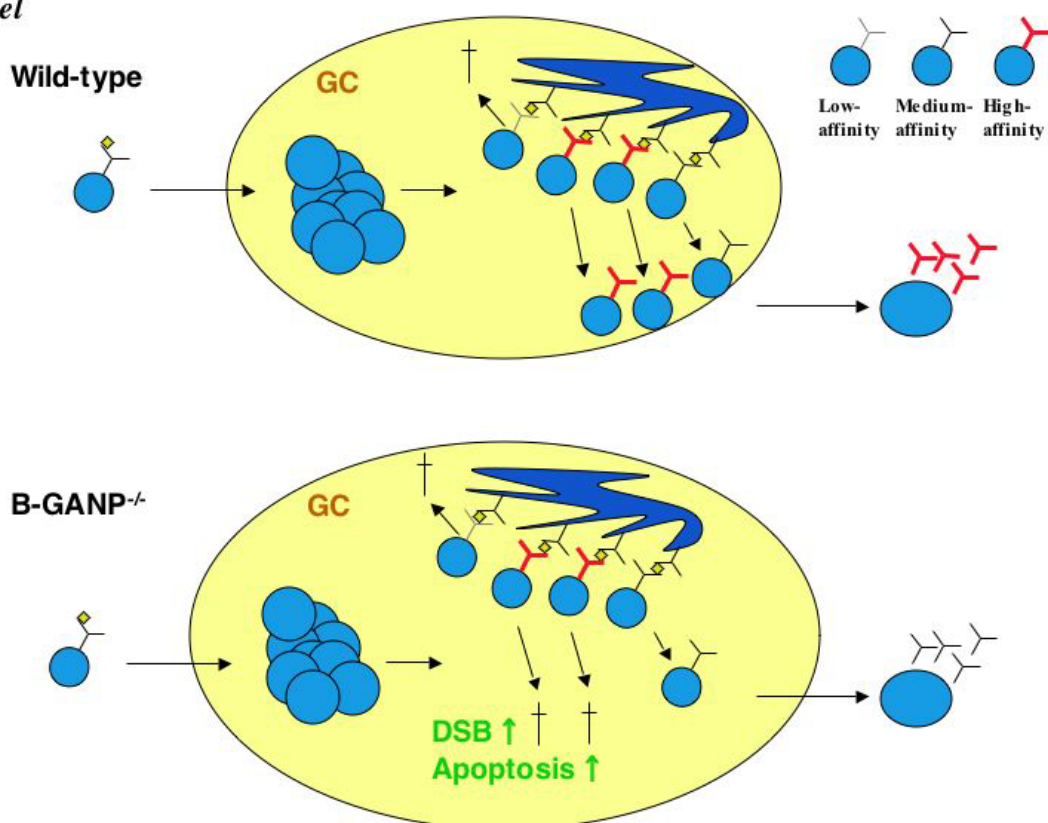
さらに、免疫システムにおいては抗原の侵入に反応してダイナミックにリンパ細胞の増殖、遺伝子再構成、細胞の生存と死が変動することから、必然的に、このシステムの破綻は、重篤なリンパ腫を発症し、また自己認識の異常から生じる自己免疫疾患等の難病を発症する。このような疾患におけるGANPの機能異常を明らかにする。

2. 研究実施内容

獲得免疫における高親和性抗体産生機序を細胞、分子レベルで明らかにし、免疫応答の分子機構を解明する。その破綻による免疫難病の病因解明、治療方略の策定を目指す。この目的のため胚中心B細胞で発現するGANP分子の役割を解析した。GANP欠損マウスは胎生致死であることから、CD19-Creノックインマウスを用いたconditional targeting法によってB細胞で特異的なGANP欠損マウスを樹立し、その免疫応答を解析した。GANP欠損マウスはB細胞分化、血清Igレベル、T細胞非依存性抗原に対する抗体産生、クラススイッチ反応において異常は認められない。寄生虫に対する免疫応答、IgE抗体産生においても異常がなかった。しかし、NP-CGを免疫した際の、高親和性抗体産生が著しく障害され、それを補うためにこのマウスは胚中心形成をし続けていた。V領域遺伝子の突然変異導入に関してはVH186.2の特に抗親和性抗体産生に必要な33番目のTrpがLeuに変異する頻度が著しく低下していた。一方、GANP過剰発現マウスでは、逆に、高親和性抗体産生が増加し、VH186.2領域の高親和性突然変異誘導、すなわち33番目のTrpがLeuへの変異する頻度が増加していた。この結果をさらに、NP特異的なモノクローナル抗体産生細胞の樹立によって

確かめた。各々6,000クローン樹立し高親和性抗体の産生とその際のVH領域の配列の解析をおこなった。VH186.2においては33番目のTrpからLeuへの変異は当然のこととして、さらに多くの変異が導入されていた。親和性はKD値が 5×10^{-9} Mに達し、野生型の抗体の高親和性が 5×10^{-7} Mであるのに比して50倍以上の高親和性をもつ抗体が得られた。このクローンはVH7186を用いており、non canonicalなVH領域に13アミノ酸の置換を導入して、この高い親和性と抗原に対する特異性をもたらしていることを明らかにした。以上の結果は、免疫応答において実際に高親和性をポジティブに増強する分子が存在することを始めて明らかにしたものと考えている。

Model



3. 研究実施体制

阪口グループ

熊本大学大学院医学薬学研究部

感染・免疫学講座免疫学分野 (阪口 薫雄)

研究実施項目：

- 1) B細胞活性化におけるGANP発現とプライマーゼ活性化シグナル伝達の解析
- 2) 体細胞突然変異の誘導メカニズム免疫応答、自己免疫疾患における関与
- 3) GANP分子との結合分子の解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Kazuhiko Kuwahara, Satoru Fujimura, Yoshimasa Takahashi, Naomi Nakagata, Toshitada Takemori, Shinichi Aizawa and Nobuo Sakaguchi. Germinal center-associated nuclear protein contributes to affinity maturation of B cell antigen receptor in T cell-dependent responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:1010-1015, 2004.
- Ding Ron Hua, Seiji Inui, Takeshi Yamashita, Kazuhiko Maeda, Katsumasa Takagi, Junji Takeda, and Nobuo Sakaguchi. T cell-specific gene targeting reveals that $\alpha 4$ is required for early T cell development. *Eur. J. Immunol.* 33: 1899-1906, 2003.
- Satoru Fujimura, Kazuhiko Kuwahara, Taichi Ezaki, Kimio Tomita, Sachiko Hirose and Nobuo Sakaguchi. Spontaneous increase of plasma-like cells with high GANP expression in the extrafollicular region of lymphoid organs of autoimmune-prone mice. *J. Autoimmun.* 20: 291-301, 2003.