

「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 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。

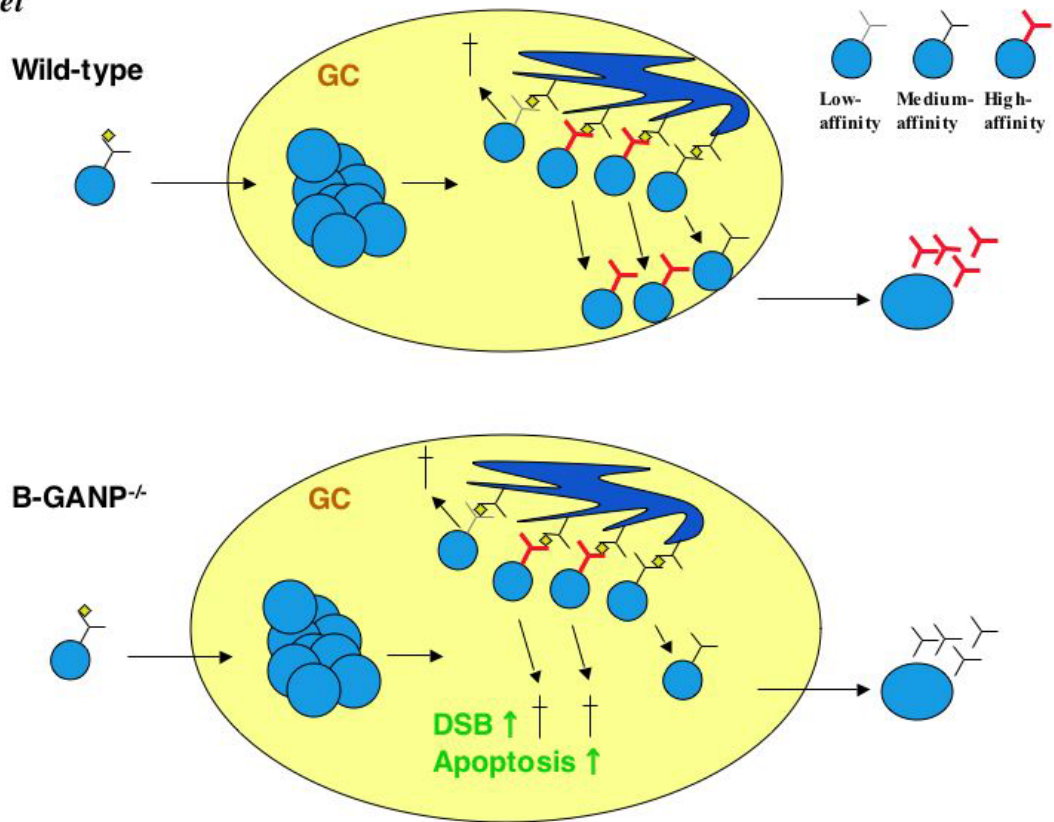
2. 研究実施内容

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。B細胞で特異的なGANP欠損マウスがT細胞依存性の抗原（ウイルスなど大部分の病原体抗原に相当する）に対して、一応の抗体産生を行うことができるが、高い親和性の抗体を産生することができず、より長期間の免疫応答が必要となる。モデル抗原としての最小単位（ハプテン）として、合成抗原ニトロフェニール（NP-CG）を用いて解析した結果、GANP欠損マウスでは結合力の高い高親和性抗体を産生できなかった。このマウスのV領域遺伝子DNAの二重鎖切断（DSBs）の頻度は低下しており、DNA修復系酵素の発現が上昇していた。GANPがDNAの切断に必要なのか、それともGANPの欠如により転写レベルでDNA修復系酵素の発現が上昇し、結果、修復系が亢進してDSBsが減少したのかはこれからの課題として重要であるが、DSBsの減少は突然変異の頻度に影響するのではないかと考えられた。実際このマウスのV領域遺伝子の突然変異導入率とその部位には大きな違いが認められた。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。この結果を、より確実なものとして実証するために、GANP過剰発現マウスを作製して検討した結果、全く逆に高親和性抗体の産生が著しく増加していた。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。その親和性の亢進を正確に測定するため、NP特異的なモノクローナル抗体産生細胞を樹立した。各々6,000クローンの解析からVH186.2において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、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(論文公表)。

このような抗体の親和性の亢進を誘導することのできる動物はこれまで国際的に報告が無く、全く新しい技術の開発に成功したものと言える。そこで、この技術をモデル抗原以外に実際活用することが可能であるかどうかを検証するため、当研究室のみならず、様々な国内外の研究者、国内企業と積極的な共同研究、連携研究等を推進した。これまでの成果として、エイズウイルス抗原のエピトープに対する高親和性モノクローナル抗体を作製することに成功した。この抗エイズ抗体はKD値が 1×10^{-11} 以下と言う非常に優れた抗体であり、実際にエイズウイルスと結合し、その感染性を中和する活性を有している。これまでの技術と比較するとおおよそ二桁の違いがあり、実際に100倍の活性の強度を持つものと推測される。また、SARSコロナウイルスに対するモノクローナル抗体を作製中であるが、これにおいても優れた抗体が作製されつつある。以上、この技術は実際の病原体の感染阻止薬、感染診断薬として、従来のもものと比較にならない活性を有していることが示されたので国際特許を申請したところ、取得に成功した。また、様々な抗原に対する高親和性抗体を作製する新しい技術として国内拠点を形成する基盤を固めている。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であり、その活用は本事業から生まれた新しい技術成果として確立された。さらに、次年度に向けて、GANP分子の活性のメカニズムの解析、免疫難病の自己免疫疾患発症におけるその原因解明の糸口として解析を進める。

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

(1) 論文 (原著論文) 発表

- Nobuo Sakaguchi, Tetsuya Kimura, Shuzo Matsushita, Satoru Fujimura, Junji Shibata, Masatake Araki, Tamami Sakamoto, Chiemi Minoda, and Kazuhiko Kuwahara. Generation of High-Affinity Antibody against T Cell-Dependent Antigen in Ganp Gene-Transgenic Mouse. *J. Immunol.* 174: 4485-4494, 2005.

- Yamashita T, Inui S, Maeda K, Hua DR, Takagi K, Sakaguchi N. The heterodimer of alpha4 and PP2Ac is associated with S6 kinase1 in B cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330:439-445, 2005.
- Sefat-e-Khuda, Mikoto Yoshida, Yan Xing, Tatsuya Shimasaki, Motohiro Takeya, Kazuhiko Kuwahara, and Nobuo Sakaguchi. The Sac3 homologue shd1 is involved in mitotic progression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 279: 46182-46190, 2004.
- Zeljka Korade Mirnics, Eva Caudell, YanHua Gao, Kazuhiko Kuwahara, Nobuo Sakaguchi, Tomohiro Kurosaki, Joan Burnside, Karoly Mirnics, and Seth J. Corey. Microarray Analysis of Lyn-Deficient B Cells Reveals Germinal Center-Associated Nuclear Protein and Other Genes Associated with the Lymphoid Germinal Center. *J. Immunol.* 172: 4133-4141, 2004.
- Kazuhiko Kuwahara, Satoru Fujimura, YoshimasaTakahashi, Maomi Nakagata, Toshitada Takemori, Shinichi Aizawa, 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. U. S. A.* 101:1010-1015, 2004.