

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 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

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名 (研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

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、教授)

主たる共同研究者

五十嵐英哉 (川崎医科大学免疫学教室准教授; 平成19年4月～)

桑原一彦 (熊本大学大学院医学薬学研究部准教授)

前田和彦 (熊本大学大学院医学薬学研究部助教)

3. 研究内容及び成果

「抗原特異的抗体の親和性の亢進による免疫効果の向上」の機構を明らかにし、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。末梢のリンパ組織で発現する GANP が高親和性抗体産生に及ぼすことを見だし、その異常が重篤なリンパ腫を発症することに着目し GANP の機能異常と難病の原因解明を進めた。

(1) 基礎研究

基礎研究では、新しい免疫関連分子 GANP が胚中心 B 細胞に必要不可欠な分子機能を有しているのかに焦点を絞って研究を進めた。独自の視点から研究を捉え、新たな方向性を示せる研究成果を明らかにした。

1) 免疫における役割(高親和性抗体産生)

B 細胞特異的 GANP (B-GANP) 欠損マウスは B 細胞の成熟機能低下による NP 特異的抗体産生能の低下、VH186.2 遺伝子の高親和性変異の著しい低下、抗 CD40 抗体刺激による増殖低下を示した。また、B 細胞特異的 GANP 遺伝子導入マウス (GANP^{Tg}) は、遺伝子欠損マウスとは反対に、NP に対する高親和性抗体産生能の亢進、VH186.2 遺伝子の高親和性変異頻度の上昇を示した。GANP^{Tg} マウス由来のモノクローナル抗体は、VH186.2 の 33 番目の Trp から Leu の変異を伴わない抗体であっても高親和性抗体を生み出した。また non canonical な VH7183 の VH 領域を用いて高い親和性の抗体を産生する。V 領域の点突然変異が増加し、多数のアミノ酸置換を誘導した。遺伝子改変マウスによって GANP が抗原特異的高親和性抗体の産生に必須な機能分子であることを確定した。

2) GANP の遺伝子転写制御機構

GANP は RNA メタボリズムに関わる機能に加えて転写制御機能に関与することが推測された。プロテオミクス解析でアルギニンメチル化酵素 PRMT5 を同定した。GANP は PRMT5 に結合し、アルギニンメチル化反応を抑制する。IL-4 で誘導される AID やイントロン C ε の転写を制御すること、胚中心での過剰な IgE へのクラススイッチや過剰な AID 発現による DNA 損傷に対して防御的に働くことを明らかにした。

3) 胚中心における高親和性 B 細胞の選別

GANP と会合する脱リン酸化酵素サブユニット G5PR は、骨髄の未熟 B 細胞、新生児 B 細胞に発現が認められないが、濾胞 B 細胞を抗 IgM 抗体で刺激すると Btk 信号によって発現上昇する。B 細胞特異的 *g5pr* 遺伝子欠損マウスは、脾臓が小さく、成熟 B 細胞も減少し、抗 IgM 抗体刺激後の細胞増殖が低下し、activation induced

cell death を来した。G5PR は JNK の過剰リン酸化を抑え、Bim の活性化を抑制し、Bax の apoptosis 誘導信号は回避される。G5PR による高親和性 B 細胞クローンの選別が行われる GC-B 細胞の生存と選別の重要ステップを明らかにした。

(2) 応用研究

1) Hodgkin 病の原因遺伝子の同定

GANP^{Tg} マウスは、老齢期で高頻度に B リンパ細胞由来のリンパ腫を発症し R/S 細胞様の細胞を伴い、Hodgkin 病を発症した。さらにヒトの Hodgkin 病細胞、R/S 細胞に GANP の高発現が確認され、GANP が Hodgkin 病の原因遺伝子であることを確定した。

2) 悪性黒色種と GANP 発現異常

GANP 発現を黒色腫で調べたところ、色素細胞の癌化において GANP の異常が認められた。悪性度の高い悪性黒色腫では、ほぼ核内に集中して発現する。臨床サンプル54例の病理組織標本で、GANP の高発現が観察され、悪性腫瘍の発症と関連することを見いだした。

3) 寄生虫感染で発症する胆管がんと GANP 発現異常

GANP の過剰な発現、その発現が核内に集積する状況は血液系腫瘍、皮膚がんにおいて悪性化の指標となる肝吸虫 (liver fluke) 感染症に起因する胆管がん腫瘍化において、悪性化の進展に伴って GANP の発現が異常を示した。

4) 乳がんと GANP 異常

GANP ヘテロ欠損マウスは、60週齢から全例乳腺組織由来で乳がんの自然発症を起こすマウスであることが判明した。単一遺伝子のヘテロ欠損で乳がんを起こすマウスは稀であり、p53 欠損マウスにおいても他の遺伝子異常を伴ったときに発症するのみである。従って、GANP ヘテロ欠損マウスでは GANP の機能異常が何らかの細胞増殖、細胞分裂、さらには遺伝子の異常を起こす素因となり、それが乳腺組織での発癌誘導を引き起こしたものと推定された。その異常を調べる為に、HeLa 細胞で内在性 GANP の発現を RNAi 法で抑制したところ、染色体分配に顕著な異常が認められ、早期染色体分離が起こっていた。GANP は染色体のセントロメアの結合保持に必要な機能分子 centrin、shugoshin 等のセントロメア結合複合体のタンパク質成分の発現や機能に必要であると考えられる。この研究は GANP の免疫グロブリン遺伝子の V 領域の SHM 誘導における DNA 複製の効果を調べる上でも重要である。

(3) 社会貢献、新産業創成

本研究計画の成果の大きな柱として GANP 分子の発現を制御することによって高親和性抗体産生が可能であるということである。この分子機構として基礎研究でほぼ GANP 分子の全容が理解される様になった。NP ハブテンによる解析では数倍から10倍程度の上昇と予想された。この親和性抗体増強効果を生体の免疫賦活効果として応用、遺伝子導入などの技術によって immunomanipulation の先端技術として開発、抗原特異的なモノクローナル抗体を容易に作製する生物学、工学、医療、医薬、公衆衛生、食品衛生などに広範囲に活用可能な技術である。

安定に、抗原特異的に、しかも高感度に結合親和性を発揮する抗体を作成することができれば我が国の科学技術の進展、技術の優位性、経済効果を高めるということに貢献できるものと考えている。

実証試験として HIV を対象とし、GANP^{Tg} マウスにおいて、様々な程度の結合親和性モノクローナル抗体産生細胞が樹立されたが、中でも著しく親和性が高い ($K_D = 9.90 \times 10^{-11}$ M) 抗体を産生し HIV の中和活性が、コント

ロールの抗体の100分の1の量で同等の効果をした。このような抗体を他のウイルスに対しても作成することが可能であるといえる。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

研究者の発見した GANP 分子の高親和性抗体産生における機能の分子過程を明らかにしたことは高く評価できる。特に、GANP の発見からその機能、作用メカニズムの解明、高親和性抗体を産生するマウスの作製などに関して一連の成果を上げた。しかし、GANP が本当は何をしているのか、完全に明らかにされたわけではない。特に AID との関連が不明であり、その解明に向けて今後の進展を期待したい。

これらの研究成果は、論文発表(海外19件)、口頭発表(海外10件、国内56件)、招待講演(海外1件、国内4件)として発表している。J. Exp. Med, Proc. Natl. Acad. Sci. USA.等の質の高い国際誌や国際会議で優れた成果を発表している。高親和性抗体作製技術を用いた HIV 抗体の作製に関しては、熊本日々新聞「HIV 抗体販売を開始」(2007 年 9 月)で報道された。

下記はその中でも特筆すべきものである。

- 1) GANPTM マウスでの発症、ヒト Hodgkin 病細胞での GANP 高発現などから、GANP が Hodgkin 病にも関わっていることを示した。
- 2) 自然発症の乳がん、GANP 異常の確認などから、GANP が新規の乳がん発症に関わっていることを示した。
- 3) 我が国発の高親和性モノクローナル抗体作製の技術基盤を確立した。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

GANP の発癌における関与、GANP の作用機構の解明、高親和性モノクローナル抗体作製技術への応用などで成果をあげた。これらの成果は、高親和性抗体を用いる診断、治療法の開発という大きな未来が開かれたすぐれた研究成果であり、今後の医療に貢献するものであると評価した。

特に、GANP が、抗体の V 領域体細胞突然変異誘導機構に関わる分子であることを明らかにし、その機能をモデルマウスで実証し、自然発症の乳がん、炎症性の発癌に関連することを示した。本研究成果は、乳がん、炎症による肝臓、胆管がんの原因解明に貢献することが期待できる。

高親和性抗体作製技術は、GANP 特許の取得後、創薬創出の技術として発展させ、商品化された。この技術は、高親和性抗体を安価に容易に作成することが可能であり、既存の臨床診断薬の高感度化、新規バイオマーカーの開発、難治性疾患の治療薬の開発、感染症に対する強力な標的治療薬の開発に貢献するものと期待される。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

受賞

阪口薫雄

「SARS ウイルス高感度感染症検出システムの開発」(財)三井生命厚生事業団

五十嵐英哉

「脱リン酸化酵素結合分子 G5PR の機能解析」熊本医学会

桑原一彦

「非遺伝性乳癌新規発症機構の解明とそれに基づく早期診断へのアプローチ」(財)神澤医学研究振興財団、「新規乳癌診断法研究開発に関する分科会」熊本県バイオシーズ調査研究、「早期胆管癌診断に求められる高親和性モノクローナル抗体の応用」(財)黒住医学研究振興財団、「悪性黒色腫における胚中

心関連分子 GANP の異常リン酸化とゲノム不安定性に及ぼす影響の解析と遺伝子導入による悪性黒色腫発症モデルマウスの作製」(財)ノバルティス科学振興財団、「国際感染症防疫における高親和性抗体の樹立-致死的感染症類鼻疽症に対する診断・治療への応用-」(財)東京生化学研究会