

抗体の親和性成熟と集団としての至適親和性  
に関する研究

2013 年

村上 明一

# 目次

	Pagination
Abbreviations	1
要約	3
第一章 序論	6
1-1 抗体の免疫における役割	
1-2 抗体の多様性	
1-3 抗体のイソタイプとエフェクター機能	
1-4 ハプテン NP を用いた抗体の研究	
1-5 補体系	
第二章 実験材料および実験方法	12
2-1 ハプテン-キャリアタンパク質の作製	
2-2 マウスと免疫	
2-3 ELISA	
2-4 T 細胞増殖解析	
2-5 抗 NP 抗体産生ハイブリドーマの樹立と抗体の精製	
2-6 ハイブリドーマ株由来の抗体遺伝子解析	
2-7 変異抗体の作製と変異抗体の命名法	
2-8 ITC 測定	
2-9 Fab-ファージライブラリーの作製	
2-10 プラズマ細胞が発現する抗体解析	
2-11 NP-SRBC の調整と抗体依存的補体活性測定	
第三章 ハプテン-キャリア特異的 T 細胞が抗ハプテン抗体と抗キャリア抗体の産生を補助する	
3-1 研究背景及び目的	19
3-2 結果	21
3-3 考察	23
図表	25

## 第四章 抗 NP 抗体レパートリーにおける親和性成熟戦略の分子構造的解析

4-1	研究背景及び目的	28
4-2	結果	30
4-3	考察	38
	図表	43

## 第五章 二次免疫応答における低親和性 IgM 抗体の生産と役割

5-1	研究背景及び目的	62
5-2	結果	64
5-3	考察	69
	図表	73

## 第六章 総括

90

## 第七章 学会発表

93

## 第八章 発表論文

96

## 謝辞

101

## 参考文献

102

## Abbreviations

Ab	antibody
Ag	antigen
BCR	B cell receptor
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
CH	heavy chain constant domain
CL	light chain constant domain
CDR	complementarity determining region
CIAP	calf intestinal alkaline phosphatase
DCC	dicyclohexyl-carbodiimide
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulphoxid
DTT	dithiothreitol
D segment	diversity gene segment or region
EDTA	ethylen diamine tetaracetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunospot
FACS	fluorescence activated cell sorter
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
HBSS	Hank's balanced solt solution
HEL	hen egg lysozyme
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
HSA	human serum albumin
Ig	immunoglobulin
IgH	immunoglobulin heavy chain
IgL	immunoglobulin light chain
Ig $\lambda$	immunoglobulin lambda chain
Ig $\mu$	immunoglobulin mu chain
Ig $\delta$	immunoglobulin delta chain
Ig $\epsilon$	immunoglobulin epsilon chain
IMDM	Iscove's modified dulbecco's medium
ITC	isothermal titration calorimetry



$K_a$	association constant
Neo	neomycin
NH-Osu	N-hydroxysuccimide
NP	(4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl
NP-Cap	NP- $\epsilon$ aminocaproic acid
N-Free	nuclease free water
O.D.	optical density
OPD	o-phenyldiamine dihydrochloride
PA	paraformaldehyde
PBS	phosphate buffered saline
PBST	PBS/0.1%Tween20
PCR	polymerase chain reaction
PE	phycoerythrin
sAv	streptavidin
SHM	somatic hypermutation
TD	thymus-dependent
TI	thymus-independent
TdT	terminal deoxyribonucleotidyl transferase
Tris	tris(hydroxymethyl) aminomethane
V segment	variable gene segment or region
VH	heavy chain variable domain
VL	light chain variable domain
Zeo	zeocin

## 要約

免疫系は液性免疫と細胞性免疫に分けられ、このうち液性免疫は血液中にある抗体や補体等のタンパク質によって担われている。ほぼ全ての物質が抗原として免疫応答を引き起こすことができ、個々の抗原が複数の異なった抗体分子の産生を誘導する。この無限ともいえる抗原に対処するために、抗体は主に 4 通りの多様性形成メカニズムを有する。第一に、抗体の抗原に結合する領域である可変部は、別々に離れた複数の遺伝子断片(V、(D)およびJ 遺伝子断片)によってコードされており、体細胞遺伝子組み換え(V(D)J 組み換え)によって完全な可変部遺伝子が形成されることによる。それぞれの遺伝子断片はゲノム遺伝子の中に多数内在されており、組み合わせによる多様性を供給する。第二に、遺伝子断片間の結合過程において、遺伝子断片末端での任意の数の P-ヌクレオチドと N-ヌクレオチドの挿入および数々の塩基の削除によって多様性が増大する。第三に、異なる H 鎖と L 鎖の可変部がペアを作り、様々な抗原結合部位を形成することにより獲得される。最後に、活性型 B 細胞の発現する抗体可変部遺伝子にランダムな点突然変異が導入される体細胞突然変異(SHM)により、さらなる多様性が創り出される。よって、抗(4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル)アセチル(NP)抗体のようなハプテン特異的抗体であっても様々なアミノ酸配列からなる抗体が得られる。SHM は T 細胞依存性抗原を免疫することにより誘導され、変異が導入されて親和性の増大した B 細胞レセプター(BCR)を発現する B 細胞が選択される。これらの現象は抗体の親和性成熟(affinity maturation)として知られ、様々なハプテン系が親和性成熟メカニズムの解明に用いられてきた。特に C57BL/6 マウス由来の抗 NP 抗体は、その大部分の H 鎖可変部(V<sub>H</sub>)が V<sub>H</sub>186.2、DFL16.1、J<sub>H</sub>2 遺伝子、また L 鎖可変部(V<sub>L</sub>)が V<sub>L</sub>1、J<sub>L</sub>1 遺伝子と、カノニカルな遺伝子で構成されていることから、抗体の親和性成熟過程における SHM と親和性の関係を研究する上で有用な系として古くから用いられてきた。これら抗 NP 抗体は構成される遺伝子セグメントの点からすると同質(homogeneous)であるが、可変部の相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列、特に H 鎖の 3 番目の CDR(CDR 3H)においては異質(heterogeneous)である。この観点から抗 NP 抗体を分類すると、V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントと D 遺伝子セグメントのつなぎ目である 95 番目のアミノ酸残基がチロシン残基(Tyr)である型 (Tyr95 型)と、グリシン残基(Gly)である型 (Gly95 型)の 2 つの型に分かれる。初回免疫後 7 日目で得られる抗 NP 抗体は Tyr95 型がほとんどであり、SHM は非常に少ない。14 日目で得られる抗体も Tyr95 型が大部分であるが、V<sub>H</sub> の 33 番目のアミノ酸残基がトリプトファン残基(Trp)からロイシン残基(Leu)に置換され(W33L)、胚細胞型と比較して親和性が約 10 倍増大した抗体が多く得られる。この様に、免疫応答の初期には Tyr95 型が優位に

生産される。Gly95 型は非常に少ないながら胚細胞型抗体として免疫初期にも得られるが、免疫後期、特に二次免疫後に出現頻度が高くなる。この Gly95 型は SHM を蓄積し、胚細胞型抗体と比較して最終的には 1000 倍以上も親和性を増大させることができる。つまり、抗 NP 抗体の親和性成熟は免疫応答の異なるステージに、少なくとも 2 系統の抗体が関与して進行していると言える。このような、早期型抗体から後期型抗体へのレパートリー変化は他のハプテン系でも見られる。しかしながら、この現象がどのような分子メカニズムによって起こるかは不明である。前記したように、Tyr95 型と Gly95 型は最大到達親和性(ceiling affinity,  $K_{max}$ )が大きく異なっている。親和性成熟はダーウィンの進化になぞらえることができ、高い親和性へ到達する能力を進化能(evolvability)と呼んでいる。つまり、後期型・Gly95 型は早期型・Tyr95 型よりも進化能が高いと言える。親和性成熟過程や進化能を規定する分子メカニズムは未知であるが、これを解明することは免疫学における知識を広げるだけでなく、より高親和性の抗体を人工的に作製する際にも有用な知見を与える。

ハイブリドーマ由来の抗 NP 抗体の解析から、Tyr95 型は  $V_H$  の W33L 変異により親和性を上げ、Gly95 型では  $V_L$  の 57 番目の SHM(アラニン残基からバリン残基)や 66 番目の SHM(グリシン残基からアスパラギン残基)が親和性を上げるのに効果的であることが分かっている。そこでまず、これら W33L や  $V_L$  の SHM がこれら両型の抗体に有効であるかを調べた結果、これら両型の抗体は類似した抗体遺伝子で構成されているにも関わらず、W33L は Tyr95 型でのみ、 $V_L$  の SHM は Gly95 型でのみ親和性を上昇させることが分かった。さらに、各型の親和性増大に有効な SHM は、異なる型に対しては負に作用するという逆相関関係であった。つまり、 $V_H$  の 95 番目のアミノ酸残基が二つの異なる親和性成熟過程を規定していた。しかしながら、胚細胞 Tyr95 型抗体の  $V_H$ 95 番目のアミノ酸残基を Gly に置換すると NP への結合性を失うことから、 $V_H$  の 95 番目のアミノ酸残基だけが Tyr95 型 Gly95 型を規定しているのではない。それぞれの型での違いは CDR 3H に集中していることから、胚細胞 Tyr95 型抗体をベースにして CDR 3H に点変異や欠損変異を段階的に加えることで胚細胞型 Gly95 型に変化させた。各変異段階での NP への結合力と、親和性に影響する SHM の逆相関関係を判定基準にして検証した結果、Gly95 型への変換には CDR 3H の長さが必須であることが分かった。これらの結果より、親和性成熟過程や進化能の決定には  $V_H$  の 95 番目のアミノ酸残基および CDR 3H が重要な役割を果たしていることが分かった。

親和性成熟した BCR を発現する B 細胞は記憶 B 細胞、もしくは骨髄で比較的長寿の抗体産生細胞になる。同じ抗原に遭遇した際に記憶 B 細胞が主として応答し、PC へと分化する。そのため、親和性成熟し、かつ、クラススイッチし

た抗体が二次免疫応答で豊富に出現するのである。以前、記憶 B 細胞はクラススイッチし、SHM を有した抗体遺伝子を有するものと定義されていた。それはクラススイッチと SHM は共に胚中心依存的な過程でのみ生み出されると考えられていたことが一因である。しかしながら近年、IgM 陽性記憶 B 細胞の存在や、胚中心非依存的な過程によっても記憶 B 細胞が生産されることが報告された。IgM 抗体は初期免疫の早期に生産され、IgG 抗体と比較して親和性が低いと考えられており、さらには IgM 陽性記憶 B 細胞と IgG 陽性記憶 B 細胞で SHM 数が異なることが報告されていることから、二次免疫応答における IgM 抗体が IgG 抗体と異なっている可能性が考えられた。そこで、一次免疫と二次免疫において IgM 陽性記憶 B 細胞がどのように抗体産生に関与しているか、さらに抗体構造や機能の面から違いがあるのかを解析することにした。まず、C57BL/6 マウスと AID 欠損マウスを用いて、抗 NP IgM モノクローナル抗体(mAb)を生産するハイブリドーマを作製して解析した。ELISA による結合解析の結果、二次免疫後に得られる IgM クラスの mAb は、一次免疫後に得られる mAb よりも親和性が低かった。また、二次免疫応答における IgM のレパートリーは、IgG と比較してより不均一であった。通常抗 NP IgG 抗体の V<sub>H</sub>95 番目のアミノ酸残基は Tyr か Gly であるのだが、それらでないクローンが多数存在し、その多くが V<sub>H</sub> 遺伝子に SHM を有していなかった。このレパートリー変化は、二次免疫応答における IgM 抗体の低い親和性と相関があった。AID 欠損マウスから作製したハイブリドーマの解析によっても同じ現象が観察されることから、IgM 抗体の抗体構造と親和性の変化は SHM に非依存的であると言える。二次免疫応答で生産される低親和性 IgM の機能を検討するために、NP 化ヒツジ赤血球を用いて抗体依存的補体活性化能(溶血活性)を解析した。その結果、高親和性 IgM と比較してより高い活性を有し、IgM 抗体の親和性は溶血活性と逆相関関係であることが分かった。この結果は、IgG 抗体などとは異なるタイプの BCR を発現する B 細胞が IgM 陽性記憶 B 細胞として選択され、二次免疫応答において PC へと積極的に分化していることを示している。

## 第一章

### 序論

#### 1-1 抗体の免疫における役割

免疫系は液性免疫と細胞性免疫に分けられ、細胞外環境の防御にあたるのが液性免疫応答であり、B 細胞によって生産される抗体分子が細胞外微生物の破壊を誘導するとともに細胞内感染の拡大を防ぐ。

抗体の免疫における主な役割として中和、オプソニン化、補体系の活性化の三つがあげられる。ウィルスや細胞内細菌が細胞内に侵入するには、その標的細胞表面上の特異的な分子に結合しなくてはならない。病原体に対する抗体にはこのプロセスを阻害し得るものがあり、これを病原体の中和と呼び、この作用を有する抗体を中和抗体と呼ぶ。抗体による中和活性は、細菌毒素の細胞内侵入の阻害においても重要な役割を果たす。多くの細菌は宿主細胞を損傷したり、その機能を傷害す毒素タンパク質を分泌することによって病気を引き起こす。毒素は標的細胞の表面にある特異的なレセプター分子に作用することによってはじめて効果を発揮する。多くの毒素の場合、レセプター結合ドメインと毒性活性化部分とは別のポリペプチド鎖からなっている。毒素分子のレセプター結合部位に対する抗体は、毒素が細胞に結合するのを阻害することによって細胞を防御する。

細胞外で増殖する細菌にとっては、抗体が結合するだけではその分裂を抑えるのに十分ではない。この場合抗体は、細菌が食細胞に貪食されやすくすることに役立っている。食細胞は細菌に結合した抗体を認識することで、食細胞により直接認識され難い多くの細菌でこの作用は重要である。この様に病原体や異物粒子を抗体で被覆することをオプソニン化と呼ぶ。抗体の第三の機能は、補体と呼ばれる血清タンパク質の系を活性化することである。細菌表面に結合した抗体が補体系の最初のタンパク質レセプターとなり、最終的に細菌表面にタンパク質複合体が形成されて補体が直接細菌を傷害する、もしくは、補体が結合することで食細胞により貪食、破壊されやすくなる。以上のように抗体は病原体とその産生物を標的として作用し、食細胞による除去を助ける。抗体を動員する補体系と食細胞それ自体には、抗原特異性は無い。これらの作用は、抗体が粒子を異物として認識する働きに依存している。生体外に存在するほぼすべての物質が生体内に入ると抗原として認識され、抗体分子の生産を誘導する。つまり、無限に存在する抗原に対して応答できる抗体の多様性は免疫にとって非常に重要である。



## 1-2 抗体の多様性

抗体の膨大な多様性は、主として 4 つの機構により生み出される。その一つは、V(D)J 遺伝子再構成(1)である。V、D、J 遺伝子にはそれぞれ多数の遺伝子断片が存在し、異なった組み合わせを選択することにより、異なった可変部を作り出すことができる。ヒトの H 鎖の場合、65 種類の機能的な V<sub>H</sub> 遺伝子断片、約 27 種類の D<sub>H</sub> 遺伝子断片、6 個の J<sub>H</sub> 遺伝子断片から、約 11,000 種類(65×27×6=10,530)の異なった V<sub>H</sub> 領域が作られ得る。二つ目は、遺伝子断片間が結合される際に二段階の反応で生じる塩基の添加、あるいは削除による結合部の多様性である。リンパ球特異的な蛋白質をコードする組換え活性化遺伝子である *RAG-1* と *RAG-2* は、V(D)J リコンビナーゼをコードしており(2)、この遺伝子ペアはリンパ球が抗原受容体を形成しているときのみ発現される。*RAG-1* と *RAG-2* だけではなく DNA 修飾酵素群やエンドヌクレアーゼなどの多様なタンパク質で構成される RAG タンパク質複合体は、二つの適切な組み換えシグナル(recombination signal sequence; RSS)を認識して DNA ヘアピン構造を形成し、RAG タンパク質複合体中のエンドヌクレアーゼの活性によってランダムな位置で切断する(3)。この結果、相補的な塩基の飛び出しが生じ、P-ヌクレオチドを形成した後にターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)により最大 20 個もの塩基で構成される N-ヌクレオチドの付加が起こる(4)。三つめは、再編成を終え完全な機能を持つ H 鎖と L 鎖のランダムな組み合わせによって、抗体の抗原結合部位の多様性はさらに増大する(5)。最後に、活性化誘導シチジン脱アミノ酵素(activation induced cytidine deaminase ; AID)が関与する SHM があげられる(6)。SHM は、一つの遺伝子によってコードされる抗体の可変領域のアミノ酸配列に、多形性が認められたことから明らかになった(7)。胸腺依存性(thymus-dependent ; TD)抗原を免疫後に誘引され、リンパ節や脾臓などの胚中心内で活性化した B 細胞の免疫グロブリン遺伝子の可変領域で観察され、特に相補性決定領域(complementarity determining region : CDR)の CDR1 と CDR2 に高頻度に変異が起こる(8、9)。CDR3 は D<sub>H</sub> セグメントと J<sub>H</sub> セグメントの繋ぎ目に位置し、再構成時の結合によってヌクレオチドの欠損や付加が生じるため、この領域の SHM を明らかにすることは難しい。SHM の発現は、プロモーター領域にはほとんど見られず、その 1.5Kbp 下流にある免疫グロブリン遺伝子の V(D)J エキソンでその頻度が最も高く、3'下流側では減少する。κ軽鎖や重鎖遺伝子の V(D)J エキソンと定常領域エキソンの間には長いイントロンが存在するため、定常領域遺伝子(Cκまたは C<sub>H</sub>)での SHM は認められないが(10)、λ軽鎖遺伝子ではこのイントロンが短い(1.2Kbp)ために、頻度は低いながらも定常領域エキソン(Cλ)に変異が認められる(11)。SHM の出現部位には特徴があり、パルンドローム構造や RGYW モチーフ(R はプロリンで A/T、G、Y はピリミジンで C/T、W は A/T)、CAGCT/A、もしくは

は AAGTT を含む DNA 領域に集中して起こる傾向があり(9、12、13、14)、コドンの中では AGC と AGT が最も高い頻度で SHM が出現する(15)。SHM により B 細胞表面に突然変異が導入された BCR を発現し、その BCR が変異導入前の BCR よりも抗原への結合力が増している際に正の選択を受け、その BCR を発現する細胞は増殖や分化のシグナルを受け取る。また、更に変異を起こして抗体の抗原結合部位に膨大な多様性が生まれる。この現象は抗体の親和性成熟と呼ばれる。この抗体の親和性の成熟過程は、ダーウィンの進化論と類似することから、各抗体における親和性の成熟を抗体の進化と呼び、その能力を *evolvability* と呼んでいる(Joice, 1997)。

### 1-3 抗体のイソタイプとエフェクター機能

任意の B 細胞上にどの  $V_H$  領域エクソンが発現されるかは、骨髄での B 細胞初期分化の過程で決定され、その後に生じる体細胞高頻度突然変異によって修飾を受けるとしてもそれ以上には V(D)J 組み換えは生じない。したがって、その B 細胞の子孫細胞は全て同一の  $V_H$  遺伝子が発現する。一方、免疫応答の過程で B 細胞が成熟し増殖するにつれて、その B 細胞の子孫細胞ではいくつかの異なった定常部イソタイプが発現されてくる。B 細胞によって最初に発現される抗原レセプターは IgM と IgD であり、免疫応答によって最初に産生される抗体は常に IgM クラスである。免疫応答の後期には、再編成した同じ可変部遺伝子断片が IgG、IgA あるいは IgE として発現される。この変化をクラススイッチあるいはイソタイプスイッチという。それぞれのイソタイプは別々の定常部遺伝子によってコードされており、H 鎖定常部遺伝子は、可変部遺伝子の 3'側にクラスターを形成して存在している。機能的な再構成を終えた可変部遺伝子は、初め  $\mu$  鎖および  $\delta$  鎖の定常部とともに発現され、引き続いて同一の可変部遺伝子が異なった定常部遺伝子の 5'側に再構成するクラススイッチ機構により他のイソタイプの定常部遺伝子とともに発現される。イソタイプスイッチ組換えは、V(D)J の組換えと異なり抗原によって活性化された B 細胞で特異的に生じる。各クラスの抗体は免疫学的な機能が異なっており、IgG は、血中、細胞外組織中に平均して分布しており、二次免疫応答で主要な役割を果たし、食細胞に対して病原体の効率的なオプソニン化を促す補体系を活性化し得る。IgA は、分泌液中特に腸管、気道粘膜に上皮分泌液中に存在し中和抗体としての働きをする。IgE は、皮膚や粘膜直下結合組織の血管周囲に分布する肥満細胞や血液中の好塩基球の表面に局在する Fc 受容体に非常に高い親和性で結合し、結合した IgE 分子は、抗原の受容体として働くようになる。このように、クラススイッチが起こることで同じ抗原に対して異なった時期、異なった環境下において、種々の免疫応答を引き起こすことが可能になるのである。つまり抗体は可変領域のもつ抗原の認識と、定常領域がもつエフェクター機能との 2

つの機能を併せ持つ多機能タンパク質である

#### 1-4 ハプテン NP を用いた抗体の研究

ハプテンは小さな化学物質であり、キャリアタンパク質と結合させることで T 細胞依存的免疫応答を誘導することが出来る。2-phenyloxazol-5-one (phOx) 、p-azophenylarsonate (Ars) 、phosphorylcholine (PC) などのさまざまなハプテン系が SHM や抗体の親和性成熟機構の解明に用いられてきた。C57BL/6 マウスの (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetic acid (NP) 誘導体に対する免疫応答は clonal dominance を示し、古くから研究されている有名なモデルのひとつである。C57BL/6 マウスから得られる抗 NP 抗体は、抗体可変部に *V<sub>H</sub>186.2*、*DFL16.1*、*J<sub>H</sub>2*、*V<sub>λ</sub>1*、*J<sub>λ</sub>1* をカノニカル遺伝子として持つことが明らかとなっている(16)。それゆえに、SHM や親和性の成熟の解明を目的とした研究に用いるのに利便性が高い。C57BL/6 マウスに NP-CGG を免疫した後、経時的に細胞融合法でハイブリドーマを作製し、抗体の遺伝子配列と親和性を詳細に調べ(11、17)、そのデータを基に抗体の親和性成熟がどのように進んでいくのかを物理化学的、構造生物学的に評価している。その結果、抗 NP 抗体のアミノ酸配列を系統樹分析すると、二つの異なる集団に分かれ、一つのグループは免疫早期に集中的に現れ、その親和性は胚細胞型抗体と比較して 10~100 倍程度高くなる。もう一つのグループは免疫後期、特に二次免疫後に出現頻度が高くなり、胚細胞型抗体より 1000 倍以上も抗原親和性が高い。この二つのグループのアミノ酸残基を解析すると、H 鎖の可変部を構成する V 遺伝子と D 遺伝子の結合部位である 95 番目のアミノ酸残基に特徴がある。早期型抗体グループはチロシン残基(Tyr)であり、後期型抗体グループではグリシン残基(Gly)であった。そこで、この二つのグループを Tyr95 型抗体、Gly95 型抗体と区別することにした。この 95 番目のアミノ酸残基は、*DFL16.1* 遺伝子由来、もしくは、N 領域始めのコドンとして TdT によって付加されたと考えられる。Tyr95 型抗体のうち、免疫後 1 週目から得られるものはごく低頻度の SHM しか見られないが(16、18)、免疫後 2 週目以降に出現するものは優位に H 鎖の 33 番目のアミノ酸残基がトリプトファン残基(Trp)からロイシン残基(Leu)に置換されており(W33L)、親和性が胚細胞型抗体に比べて約 10 倍上昇している(16、19)。一方、後期に出現する Gly95 型抗体は、H 鎖の 33 番目の変異は観察されず、その他の H 鎖可変部および L 鎖可変部に高頻度に SHM が蓄積され、胚細胞型抗体より 1000 倍以上も親和性を上昇させる。つまり、抗 NP 抗体の親和性成熟は免疫応答の異なるステージにおいて、少なくとも 2 系統の抗体が関与して進行していると言える。

ハプテンは、それだけをマウスに免疫しても免疫応答を起こさないが、様々なキャリアタンパク質に共有結合させて免疫することで初めて免疫応答を引き起こす。キャリアとしては Keyhole limpet hemocyanin (KLH)、Bovine serum albumin (BSA)、Hen egg



lysozyme (HEL)、Ficall、caproic acid 等様々な物質に導入価数を変化させて共有結合させることにより、多種多様な抗原を調整することが出来る。抗体は親和性が上昇することで、より低濃度の抗原と結合することが出来ることから、濃度変化を利用して親和性を評価することが出来る。また、抗原濃度変化に加えて、キャリアに共有結合させる NP 価数を変化させることでも親和性と avidity に応じた結合を評価することができる。つまり、親和性の低い抗体は高濃度、高価数の抗原に対しては高親和性の抗体と同等に結合することができるが、低濃度、低価数の抗原に対しては高親和性の抗体のみが結合することができる。この原理を利用することで、血中の抗 NP 抗体の相対的な親和性を ELISA で測定することや、微量にしか得られない抗体であっても解析することが可能である。また、赤血球や細胞などにも NP を導入することが可能であることから、抗体のエフェクター機能、例えば補体活性化能の測定なども可能である。

## 1-5 補体系

抗体の抗菌活性能を「捕足する」というところから名づけられた補体は、抗体応答のエフェクター相に働き、正常血漿中に存在する熱に弱い成分として 100 年以上前に発見された。その後、感染の初期に抗体の非存在下でも活性化されることが解明された。補体系は多くの異なる血漿タンパク質から成り立ち、相互作用して、病原体のオプソニン化、溶菌、そして感染に抵抗する助けとなる一連の炎症反応の誘導に働く。この系の特徴は、複数の補体タンパク質がそれ自体特定のプロテアーゼに分解されて活性化されるプロテアーゼであることである。活性のない酵素は前駆酵素もしくはザイモゲンと呼ばれ、体液や組織全体に広く分布している。補体が活性化されるカギとなる場所は病原体等の表面であり、補体カスケードには大きく三種類の経路が存在する。第一の経路は、抗体や補体成分である C1q が病原体表面の抗原抗体複合体を認識することによって誘導される古典経路である。第二がマンノース結合レクチン(MBL)やフィコリンなどの糖鎖結合性タンパク質が病原体表面上の糖鎖に結合することで開始されるレクチン経路である。第三が、自然に活性化されている血漿中の補体系因子である C3 が病原体表面へ結合することで誘導される第 2 経路である。これらの経路は開始に際しては異なる分子に依存するが、反応のある段階で収斂し、同一のエフェクター分子となる補体タンパク質を生成する。一番初めに発見されたことから名付けられた古典経路は、自然免疫と適応免疫の両方に関与する。古典経路による補体活性化の最初の成分は C1 であり、これば C1q、C1r、C1s という 3 種類のタンパク質からなる複合体である。C1r、C1s の各 2 分子が 1 分子の C1q に会合しており、病原体の表面に結合した抗体に C1q が結合することによって補体活性化が開始される。つまり、C1q が抗原抗体複合体に結合することによって、液性適応免疫と補体系を繋いでいる。古典経路はまた自然免疫応答においても活性化される。これは、多くが低親和性 IgM

クラスである自然抗体と呼ばれる抗体が関与しており、明らかに感染が無くとも自己及び病原体に対して広範な特異性を持つ抗体として免疫系により生産される。C1q は IgM にも IgG にも結合しうるが、C1q の構造的特性のためいずれのイソタイプも液相では補体を活性化できない。活性化の連鎖反応は、抗体が固層、通常は病原体の表面に多価性に結合している場合にのみ開始される。C1q 分子は球状の頭部とコラーゲン分子に似たフィラメント状の長いドメインを持った 6 個の分子がその茎の根元で会合した構造をしている。球状の頭部の各々が一つの Fc ドメインに結合でき、少なくともその 2 個以上が結合することによって C1q 分子は活性化される。血漿中で IgM 五量体は平坦な構造をしており、C1q を結合することはできない。しかし、病原体の表面に結合すると、IgM 五量体は構造変化を起こしてホッチキスのような形になり、その結果 C1q の頭部への結合部位が露出される。C1q は一部の IgG サブクラスには液相でも低い親和性で結合し得るが、C1q 活性化に必要な結合エネルギーは、1 分子の C1q が抗原への結合によって 30~40nm 以内に近接した少なくとも 2 分子以上の IgG に結合することによってはじめて達成される。このためには、多くの IgG 分子が 1 個の病原体表面に結合していなくてはならない。これが、IgM の方が IgG より遥かに効率よく補体系を活性化できる理由である。C1q が活性化されると(C1r/C1s)<sub>2</sub> 複合体の立体構造変化が引き起こされ、C1r 分子の自己触媒性の酵素活性が活性化される。この活性化 C1r によって、会合している C1s が分解され、活性型セリンプロテアーゼが生成する。さらに、この C1s は C4 次いで C2 を分解して C4b と C2a の 2 つの大きなフラグメントを生成し、これらが一緒になって古典経路の C3 転換酵素が作られる。どの経路も初期反応によって C3 転換酵素を生成し、活性型補体成分 C3b が生成されて、大量の C3b 分子が病原体表面に結合することが補体系活性化におけるもっとも重要な反応である。病原体に結合した C3b を特異的補体レセプターを介して貪食細胞が認識し、貪食する。C3、C4 及び特に C5 の限定分解による小さなフラグメントは、局所へと貪食細胞を動員し、三量体 G タンパク質結合レセプターを介して活性化する。これらの協調作用によって、病原体の貪食細胞による捕食と破壊が促進される。C3 転換酵素に結合した C3b 自体はさらに C5 に結合し、C2a や Bb による C5 の限定分解を促すことによって遅延型反応を誘導する。C5 の大きいフラグメント C5b によって膜侵襲複合体の形成が開始され、これにより、ある種の病原体の融解がもたらされる。これら補体成分の活性は、一連の制御タンパク質によりうまく調節されており、宿主の細胞が、病原体表面からあふれた活性型補体成分や血漿中で自然活性化された補体成分によって障害されるのを防いでいる。

## 第二章

### <実験材料及び実験方法>

#### 2-1 ハプテン-キャリアタンパク質の作製

NP-キャリアタンパク質の作製は、NP を 0.1mol 計り取り、1ml の Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Wako, Japan)で溶解した。そこに 0.1M Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (Wako)と 0.1M *N*-Hydroxysuccinimide ester (OSu) (WAKO)を混合し、室温で 1~2 時間反応させ、NP をサクシニミド化した(NP-OSu)。これを 0.1M 炭酸水素ナトリウムバッファーに溶解した Chicken- $\gamma$ -globulin (CGG) (Wako)または Bovine serum albumin (BSA) (SIGMA, USA)と混合し、室温で 1 時間反応させた。過剰な NP-OSu や副生成物を透析することで取り除き、かつ、最終濃度 0.05%のアジ化ナトリウムを含む PBS へ置換した。NP はアルカリ性条件下で O.D.430nm 付近に吸光度のピークがあり、さらに 280nm にも吸収がある。通常、タンパク質は 430nm に吸収は無いために、NP のモル濃度は O.D.430nm の値を分子吸光係数  $4.23 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  で割ると求まる。NP の O.D.280nm の吸光度は、O.D.430nm の吸光度と相関があり、式:  $\text{O.D.280} - \text{O.D.430} \times 1.077$  (1.077 は NP 由来の O.D.280nm の値を O.D.430nm の値から補正するための定数)でゼロ点補正できる。よって、NP の O.D.280nm の測定値をキャリアタンパク質の O.D.280 の測定値から引くことで、キャリアタンパク質のみの O.D.280nm 値が求まり、タンパク質濃度を決定することができる。この際に CGG は分子量 150KDa、分子吸光光度係数  $1.4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  として、BSA は分子量 67KDa、分子吸光光度係数  $0.667 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  として算出した。

phOx-キャリアタンパク質の作製は、4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolone-5-one (Aldrich Chem, USA)をキャリアタンパク質と異なるモル比で 2 時間反応させた後に、PBS に対して透析した。phOx の濃度は 348nm の吸光度を測定し、分子吸光係数  $3.20 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  で算出した。phOx が共有結合したキャリアタンパク質濃度は、280nm の吸光度を測定し、式:  $\text{O.D.348} \times 0.221$  で求められる phOx の 280nm の吸光度を差し引くことで算出した。高価数の phOx-OVA は分子の集合体を形成するものが現れることから、単分子の phOx-OVA をゲル濾過によって精製して使用した。

#### 2-2 マウスと免疫

本実験で用いた C57BL/6 マウスは CREA Japan (Tokyo, Japan)から購入し、東京理科大学 生命科学研究所内部にある無菌環境下の動物飼育施設で飼育した。AID 欠損マウスは (20)、C57BL/6 マウスと 10 世代以上交配したものを使用した。全てのマウ

すは、一次免疫として100 $\mu$ gのNP<sub>30-40</sub>-CGGを100 $\mu$ lのAlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>に吸着させて alum 化し(NP-CGG/alum)、腹腔内注射(intraperitoneal, i.p.)により投与した。追加免疫は100 $\mu$ gのNP<sub>30-40</sub>-CGG/PBSを、腹腔内注射した。

## 2-3 ELISA

細胞培養液中の抗体量の測定は、2.5 $\mu$ g/mlにPBSで希釈したヤギ抗マウスIgG抗体もしくはヤギ抗マウスIgM抗体を50 $\mu$ l/wellで加え、4度で一昼夜固層したELISAプレートを用いて行った。PBST(0.05% tween 20 / PBS)で3回洗浄後、3% skim milk (Wako)でブロッキングした。さらに3回洗浄後に、様々に希釈した濃度が既知のコントロール抗体、もしくは、培養上清を室温で2時間反応させた。結合した抗体はHRP標識ヤギ抗マウスIg $\lambda$ 抗体で検出した。

抗体のNPへの結合はNP-BSAを50 $\mu$ l/wellで加え、4度で一昼夜固層したELISAプレートを用いて行った。その際のNP-BSA濃度は各実験により0.1、1.0、10 $\mu$ g/mlで使用した。また、NPの価数(一分子のキャリアタンパク質に共有結合したNP分子数)も各実験により使い分けた。PBST(0.05% tween 20 / PBS)で3回洗浄後、3% skim milk (Wako)でブロッキングし、さらに3回洗浄後に、精製抗体はPBSTで、抗体含有培養上清を用いた際には培養液で0.1 $\mu$ g/mlもしくは1.0 $\mu$ g/mlに濃度をそろえて、室温で2時間反応させた。結合した抗体はHRP標識ヤギ抗マウスIg $\lambda$ 抗体で検出した。

ファージ溶液中のFab発現ファージの定量は、2 $\mu$ g/mlにPBSで希釈したヤギ抗マウスIg $\lambda$ 抗体を50 $\mu$ l/wellで加え、4度で一昼夜固層したELISAプレートを用いて行った。PBSTで4回洗浄後、3% skim milkでブロッキングした。さらに4回洗浄後に、様々に希釈したファージ溶液を3% skim milkと2:1で混合して室温で2時間反応させた。結合したFab発現ファージはHRP標識抗M13抗体で検出した。得られた結果からO.D.値が一定になるようにファージ溶液を希釈し、NPへの結合をELISAで測定した。

## 2-4 T細胞増殖解析

OVAもしくはphOx-OVAをマウスに免疫し、2週後の脾臓細胞を単離した。IMag anti-mouse CD4 particle MSC (BD Bioscience)とMACS LS column (Miltenyi Biotec, Germany)を用いてCD4<sup>+</sup>細胞を濃縮し、CD4<sup>+</sup>細胞のPurityが95%以上であることをFACSで確認した。抗原提示細胞(APC)は未免疫マウスの脾臓細胞に、30Gyの $\gamma$ 線を照射して調製した。4 $\times$ 10<sup>5</sup>のCD4<sup>+</sup>細胞を、5 $\mu$ g/mlのOVAもしくはphOx-OVA、4 $\times$ 10<sup>5</sup>のAPCと共に96-wellプレートにまき込み、RPMI1640完全培地で64時間培養後に0.5 $\mu$ Ciの[<sup>3</sup>H]-labeled thymidineを加え、さらに8時間培養した。MicroBeta counter (PerkinElmer, USA)を用



いて細胞内に取り込まれた放射線同位体を測定した。phOx-MSA を免疫したマウス由来の細胞の増殖解析は、 $5 \times 10^5$  の脾臓細胞と  $10 \mu\text{g/ml}$  の MSA、phOx-MSA もしくは phOx-BSA を 96-well プレートにまき込み、RPMI1640 完全培地で 62 時間培養後に  $0.5 \mu\text{Ci}$  の  $^3\text{H}$ -labeled thymidine を加え、さらに 10 時間培養して細胞内に取り込まれた放射線同位体を測定した。

## 2-5 抗 NP 抗体産生ハイブリドーマの樹立と抗体の精製

早期免疫応答におけるハイブリドーマ作製には NP-CGG/alum を免疫後、7 日目と 14 日目で脾臓を摘出し、二次免疫応答におけるハイブリドーマは 53 日目での追加免疫後 3 日、すなわち初回免疫から 56 日後に脾臓を摘出して使用した。脾臓を単一細胞にして PEG1500 (Roche Diagnostic, Germany) を用いて SP2/0-Ag14 ミエローマ細胞と融合した。細胞融合後 2 日目に HT medium supplement と aminopterin (Sigma, USA) を含む Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Sigma) に培地交換し、細胞融合株の選択を行った。2 週間後に NP-BSA を固層した U96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE (Nunc) を用いた ELISA により、抗 NP 抗体産生ハイブリドーマ株をスクリーニングした。この際に使用した検出用抗体は、Horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体、および、HRP 標識ヤギ抗マウス IgM 抗体である。IgG のサブクラスと L 鎖のクラスを同定する際にもそれぞれのクラス特異的抗体を使用した (Southern Biotech, USA)。NP-BSA に結合し、BSA に結合しないクローンを限界希釈法でサブクローニングし、単一クローンであることを確認した。

ハイブリドーマクローン N1G9 は K. Rajewsky 博士 (Harvard Medical school, Boston, MA, USA) から提供していただいた。9TG、B2、9L11、9L18、C6、9T7、E11、9T13 は、東隆親教授所有の株を使用させていただいた (17, 18)。N1G9-IgM、B2-IgM 発現細胞株は、まず、IgG<sub>1</sub> を発現する N1G9 および B2 ハイブリドーマ株から cDNA を調整し、V<sub>H</sub>-D と J<sub>H</sub>2 の一部を含む遺伝子を V<sub>H</sub>-S2 プライマーと J<sub>H</sub>2-A プライマーを用いて PCR により増幅した。さらに C57BL/6 マウスの脾臓細胞から調製した cDNA を用いて J<sub>H</sub>2 と C $\mu$  をコードする遺伝子を J<sub>H</sub>2-S プライマーと 3'C $\mu$  プライマーを用いて増幅し、それぞれの増幅遺伝子を混合して V<sub>H</sub>-S2 プライマーと C $\mu$ -A3 プライマーで再増幅することで接続し、V<sub>H</sub>-C $\mu$  遺伝子を作製した。この遺伝子を哺乳類細胞発現用ベクターである pBudCE4.1 ベクター (Invitrogen) の EF1- $\alpha$  プロモーターの下流にあるクローニング部位に挿入して発現ベクターを作製した。これらのコンストラクトをエレクトロポレーションにより、胚細胞型  $\lambda$ 1L 鎖を恒常的に発現する J558L 株に形質導入し、最終濃度  $1.0 \text{mg/ml}$  の G418 (Wako Chemicals, Japan) を含む IMDM 培地を用いて選択し、抗体を恒常的に発現する細胞株を樹立した。各 mAb を産生する細胞株は 10% Fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen) を含む IMDM で培養し、NP-BSA アフィニティーカラ

ムを用いて精製した。実験によっては、細胞株培養上清中の抗体濃度を定量的 ELISA により測定して使用した。

## 2-6 ハイブリドーマ株由来の抗体遺伝子解析

各ハイブリドーマ株から Trizol reagent (Invitrogen)を用いて total RNA を調整し、oligo-dT プライマーと Reverscript reverse transcriptase (Wako Chemical, Japan)を用いて cDNA 化を行った。H 鎖遺伝子は  $V_H186.2$  特異的なプライマーとして  $V_H-S1$  をセンスプライマーとして、アンチセンスプライマーは定常領域特異的である  $C\mu-A1$ 、 $C\gamma1-A1$ 、 $C\gamma2b-A1$  のいずれかを抗体クラスに応じて使用した。L 鎖遺伝子は  $V_L$  特異的なプライマーとして  $V_L-S1$  をセンスプライマーとして、 $C\lambda1$  特異的な  $C\lambda1-A1$ 、もしくは、 $C\lambda2$ 、 $3$  特異的な  $C\lambda2,3-A1$  をアンチセンスプライマーとして、サブクラスに応じて使用した。プライマー配列は、Table 3-1 に示した。PCR により増幅した遺伝子断片をアガロースゲルから精製し、 $C\mu-A2(C\mu)$ 、 $C\gamma1-A2(C\gamma1)$ 、 $C\gamma2b-A2(C\gamma2b)$ 、 $C\lambda1-A2(C\lambda1)$ 、 $C\lambda2,3-A2(C\lambda2$  と  $C\lambda3)$ プライマーを用い、ACE2000XLE DNA sequencer (Beckman Coulter, USA)で塩基配列を決定した。

## 2-7 変異抗体の作製と変異抗体の命名法

ハイブリドーマ株 N1G9、9TG、B2、9L11、9L18、8B5、C6、9T7、E11、9T13 から RNA を抽出し(QuickPrep micro mRNA purification kit, Amersham)、Oligo-dT プライマーを用いて逆転写酵素による cDNA 化を行った。H 鎖は BudHs プライマーと BudHa プライマーを用いて、L 鎖は Bud-IgL-NotI-F プライマーと EFLa プライマーを用いて、PrimeSTAR DNA polymerase (Takara, Japan)で PCR 増幅を行った。全ての点変異および欠損導入抗体はオーバーラップ PCR 法で行い、その際に使用したプライマーを Table 2-1 に示す。これらの抗体遺伝子を pBudCE4.1 ベクター(Invitrogen)に挿入して発現ベクターを構築した。HEK293T 細胞を 24-well プレートの 1well あたり  $2.5 \times 10^5$  細胞加え、L 鎖遺伝子発現用コンストラクトを HilyMax transfection reagent (Dojin, Japan)を用いて形質導入した。24 時間後に 96-well プレートにまき直し、0.4mg/ml のゼオシン(Invitrogen)を含む培地(10%FCS / DMEM)で形質転換株を選択した。2週間後にゼオシン耐性クローンから FITC 標識ヤギ抗マウス Ig $\lambda$ 抗体を用いた細胞内染色によりスクリーニングした。L 鎖を恒常的に発現する HEK293T 細胞に H 鎖発現コンストラクトを HilyMax transfection reagent を用いて形質導入し、24 時間後に培養液を交換してさらに 48 時間後の培養上清を回収した。培養上清中の抗体濃度は定量的 ELISA により測定した。

アミノ酸残基は一文字表記で行い Kabat の抗体アミノ酸残基番号を使用してその部

位を示した。変異を導入して置換したアミノ酸残基は部位番号の直後に一文字表記で示した。アミノ酸残基の欠損変異抗体は、欠損させたアミノ酸残基の部位番号の直後に $\Delta$ と示した。変異導入前のアミノ酸残基を記入する必要がある際には部位番号の直前に示した。各ハイブリドーマ株由来の H 鎖、L 鎖はそれぞれ  $H^{\text{clone name}}$ 、 $L^{\text{clone name}}$  のように各鎖の直後にハイブリドーマ株名を上付き文字で示した。N1G9、B2、9TG の L 鎖は SHM によるアミノ酸残基の置換が全く無く、V-J のつなぎ目のアミノ酸残基も同一な胚細胞型 $\lambda$ 1 鎖であることから、 $L^{\text{GL}}$  とした。例えば、 $H^{\text{N1G9}}$ (33L 95G 96 $\Delta$  100a $\Delta$  100jH)  $L^{\text{GL}}$  は、H 鎖は N1G9 由来で 33 番目のアミノ酸残基をロイシン残基に、95 番目をグリシン残基に、96 番目と 100a 番目を欠損し、100j 番目をヒスチジン残基に置換しており、L 鎖は胚細胞型 $\lambda$ 1 鎖である抗体を表す。

## 2-8 ITC 測定

MicroCal VP-ITC isothermal titration calorimeter を使用した。全てのサンプルは PBS 溶液に置換し、脱気して調製した。25°C の条件下で、116mM もしくは 232mM の NP-cap 溶液を抗体溶液に対して 20 回~40 回、3ml ずつ滴下して測定した。PBS に対する NP-cap 滴下の際の希釈熱量を差し引き、OriginLab 社の Orifin software で解析した。

## 2-9 Fab-ファージライブラリーの作製

未免疫または NP-CGG 追加免疫後の C57BL/6 マウスから脾臓を摘出して単一細胞にし、Trizol reagent (Invitrogen)を用いて total RNA を調整し、oligo-dT プライマー及び Reverscript reverse transcriptase (Wako Chemical, Japan)を用いて cDNA 化を行った。 $V_{\text{H}}-C_{\text{H1}}$  と  $V_{\text{L}}-C_{\text{L}}$  領域をそれぞれ Table 2-4 に示したオリゴプライマーを使用して PCR により増幅した。 $V_{\text{H}}-C_{\text{H1}}$  遺伝子断片は制限酵素 *Sfi*I と *Not*I、 $V_{\text{L}}-C_{\text{L}}$  遺伝子断片は *Nco*I と *Bam*HI で消化後にアガロースゲルから精製した。Fab 発現用ファージミドベクター pRIBS101 (図 2-11-A) に  $V_{\text{L}}-C_{\text{L}}$  遺伝子断片を、その下流に  $V_{\text{H}}-C_{\text{H1}}$  遺伝子断片を挿入し、大腸菌 (HST02 株) に形質転換した。

胚細胞型抗 NP 抗体 N1G9 または 9TG 遺伝子の  $V_{\text{H}}$  領域及び  $V_{\text{L}}$  領域に、 $V_{\text{H}}$  領域は T7-term comp と  $V_{\text{H}}-Xho$ I-R プライマー、 $V_{\text{L}}$  領域は pRIBS-seq-F と  $mus\lambda$ -seq-R プライマーを用いて Error prone PCR (GeneMorph II Random Mutagenesis Kit, Agilent Technologies) によって点突然変異を導入した。PCR により増幅した遺伝子断片は、それぞれ  $V_{\text{H}}$  領域は制限酵素 *Sfi*I と *Xho*I、 $V_{\text{L}}$  領域は *Avr*II と *EcoRV* で消化後にアガロースゲルから精製し、Fab 発現用ファージミドベクター pRIBS-Fab-cassette (図 2-11-B) に挿入し、大腸菌 (HST02 株) に形質転換した。

形質転換した大腸菌は最終濃度 5%の Glucose 及び 100 $\mu$ g/ml の Ampicillin を含む 2YT 寒天培地で一昼夜培養後、液体培地で培養し、M.O.I.=20 のヘルパーファージを感染させた。さらに、50 $\mu$ g/ml の Kanamycin 及び 100 $\mu$ g/ml の Ampicillin を含む 2YT 液体培地で一昼夜培養してファージ液を調整した。

## 2-10 プラズマ細胞が発現する抗体解析

NP-CGG 免疫後のマウスから脾臓を摘出して単一細胞にし、CD138<sup>+</sup> plasma cell isolation kit および VarioMACS equipment (Milteny Biotech, Germany)を用いて PC を濃縮した。さらに、fixation and permeabilization 溶液(Biolegend, USA)を用いて固定、permeabilize してから FITC 標識ヤギ抗マウス Ig $\lambda$ 抗体と R-phycoerythrin (PE)標識ヤギ抗 IgM 抗体(Southern Biotech)で染色し、FACS Vantage cell sorter (BD Bioscience, USA)を用いて IgM<sup>+</sup> Ig $\lambda$ <sup>+</sup>細胞もしくは IgM<sup>-</sup> Ig $\lambda$ <sup>+</sup>細胞を分取した。分取した PC はプロテアーゼ K (Signa)で消化後、遺伝子再構成した V<sub>H</sub>186.2 遺伝子を 2 段階の PCR により増幅した。1 段階目で使用したプライマーは、V<sub>H</sub>-S3 もしくは V<sub>H</sub>-S4 をセンスプライマーとして、アンチセンスプライマーは 3'J<sub>H</sub>1-A、3'J<sub>H</sub>2-A、3'J<sub>H</sub>3-A、3'J<sub>H</sub>4-A の 4 種類のプライマーを混合して使用した。2 段階目は、V<sub>H</sub>-S4 もしくは V<sub>H</sub>-S5 をネストセンスプライマーとして、アンチセンスプライマーは 1 段階目に使用したアンチセンスプライマーの一つを用いた。使用したプライマー配列を Table. 3-1 に示す。増幅した遺伝子断片を制限酵素 *Kpn*I と *Xba*I で消化後にアガロースゲルから精製し、pBluescriptII (KS+)ベクター (Stratagene, USA)に挿入し、大腸菌に形質転換した。プラスミドを調整して Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, USA)で塩基配列を解析した。

PC から得た V<sub>H</sub> 遺伝子を IgM 抗体として発現するために、C57BL6 マウス由来の C $\mu$  遺伝子を pEF1/Myc-His ベクターに挿入し、V<sub>H</sub> 遺伝子をその上流に組み込んだ。その発現コンストラクトをエレクトロポレーションにより、胚細胞型 $\lambda$ 1L 鎖を恒常的に発現する J558L 株に形質導入し、最終濃度 1mg/ml の G418(Wako Chemicals, Japan)を含む IMDM 培地を用いて選択し、抗体を恒常的に発現する細胞株を樹立した。各 mAb を産生する細胞株は 10% Fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen)を含んだ IMDM で培養した。細胞株培養上清中の抗体濃度を定量的 ELISA により測定して使用した。

## 2-11 NP-SRBC の調整と抗体依存的補体活性測定

ヒツジ赤血球(SRBC)は(株)日本生物材料センター(Tokyo)から購入した。5x ベロナール緩衝液ストック溶液(5VB)は、0.71M NaCl、25mM Brrbital Sodium、17.5mM HCl 溶液を、NaOH で pH=7.3-7.4 に調整して作製した。500x メタルストック溶液(MSB)は、2M CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O、0.1M MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O 溶液。ゼラチンベロナール緩衝液 (GVB<sup>2+</sup>)は



0.1%ゼラチン、1xVB、1xMSB。0.01M EDTA ゼラチンペロナール緩衝液 (EDTA・GVB<sup>2+</sup>)は0.1%ゼラチン、1xVB、1xMSB 0.1M EDTA。グルコースゼラチンペロナール緩衝液(GGVB<sup>2+</sup>)は0.1%ゼラチン、1xVB、1xMSB、5%グルコース(Wako)。

SRBCをEDTA/GVB<sup>2+</sup>溶液で洗浄し、56°Cで30分間、攪拌しながらヒツジ血清由来の補体を不活性化した。再度 EDTA/GVB<sup>2+</sup>溶液で洗浄し、ナイロンメッシュ#200(アベ科学、Japan)を用いて不純物除去後に GGVB<sup>2+</sup>に溶液置換して保存した。SRBCをNP化する際には、炭酸ナトリウム溶液(0.1M NaHCO<sub>3</sub>、0.71M NaCl、pH8.5)で3回洗浄して完全にGGVB<sup>2+</sup>溶液を除き、1x10<sup>9</sup> SRBC/mlになるように調製し、1mlのSRBC溶液に対してNP-Osuを0.01mM(NP<sub>lo</sub>-SRBC)もしくは1mM(NP<sub>hi</sub>-SRBC)加えて30°Cで30分間反応させた。反応後はGGVB<sup>2+</sup>に置換して保存した。溶血活性測定は、96-wellプレートにGVB<sup>2+</sup>溶液で希釈した抗体を10μl/wellで加えた後に5x10<sup>8</sup> NP-SRBC/mlになるようにGVB<sup>2+</sup>溶液で調製したNP-SRBCを40μl/wellで加えて攪拌し、氷上で90分間反応させた。GVB<sup>2+</sup>溶液で洗浄後、GVB<sup>2+</sup>溶液で希釈したウサギ血清Low-Tox-H Rabbit Complement(CEDARLANE、Canada)を50μl/wellで加えて攪拌後、37°Cで30分間反応させた。その後、200μl/wellでGVB<sup>2+</sup>溶液を加えてから遠心し、上清100μlを新たなプレートに移してO.D.415nmの吸光度を測定した。NP-SRBCへの抗体結合量は、FITC標識ヒツジ抗マウスIgλ抗体(Sothern Biotech.)で染色してFACS Calibur (BD Bioscience)で測定した。

## 第三章

ハプテン-キャリア特異的 T 細胞が抗ハプテン抗体と抗キャリア抗体の産生を補助する

### 3-1 研究背景及び目的

ハプテンはキャリアタンパク質に共有結合することで、T 細胞依存的な免疫応答を誘導することができ、抗ハプテン抗体の親和性を容易に測定できることや、キャリア特異的な T 細胞とハプテン特異的な B 細胞を分離して解析できることから、広く T 細胞依存的免疫応答の研究に使用されてきた。しかしながら、その多くの研究は抗ハプテン抗体の産生にのみ注目されており、ハプテン-キャリアを免疫後に、T 細胞クローンや T 細胞ハイブリドーマを作製し、精力的に解析されているにも関わらず(21-31)、ハプテン-キャリア特異的な T 細胞集団についてはまだ解明されていないことが多い。例えば、キャリアタンパク質のみを免疫した際と、ハプテン-キャリアを免疫した際に誘導される T 細胞集団は同じかどうか不明である。そこで、抗体産生に関与する免疫担当細胞の同定を試みた。

ハプテン-キャリア免疫の古典的なモデルでは、キャリア特異的な T 細胞が、ハプテン特異的な B 細胞の抗体産生細胞分化を補助すると考えられている。この仮説は、予めアジュバントと共にキャリアタンパク質を免疫してキャリア特異的な T 細胞を誘導後、アジュバントなしでハプテンキャリアタンパク質を投与すると抗ハプテン抗体の産生が誘導される(キャリア/ハプテン-キャリア免疫)結果により支持されている(32)。しかしながら、キャリア/ハプテン-キャリア免疫と、通常に行われるキャリア-ハプテン免疫の両方で、同じペアの T 細胞と B 細胞が関与しているかは不明である。ハプテン化はキャリアタンパク質の免疫原性に影響を与えると考えられることから、それぞれの免疫方法によって刺激される B 細胞と T 細胞が異なっている可能性がある。例えば、ハプテン化した自己タンパク質を免疫した際には自己タンパク質特異的な T<sub>h</sub> 細胞は存在しないが、ハプテン-自己タンパク質の免疫で抗ハプテン抗体が産生されるとすると、この抗原は T 細胞依存的な様式に則って機能するのか、また、ハプテン-キャリア特異的な T<sub>h</sub> 細胞が誘導されるのであろうか。

ハプテン-キャリアシステムは、どのように化学修飾がタンパク質の免疫原性に影響し、*in vivo* での免疫応答を変化させるかなど、エピトープ変化や自己タンパク質の変化を研究するモデルとしても興味深い。ある条件において、ハプテン化自己タンパク質特異的な T 細胞が化学物質誘導性のアレルギーを引き起

こし、自己免疫疾患になることが知られている (33-36)。しかしながら、*in vivo* でのハプテン化タンパク質に対する免疫応答において、この様な T 細胞とキャリア特異的 T 細胞の関係はまだ調べられていない。よって、オボアルブミン (OVA) を非自己タンパク質として、マウス血清アルブミン (MSA) を自己タンパク質として、キャリアとハプテン-キャリアの抗原性を比較した。ハプテンには **phOx** を用い、異なる価数の抗原を調整して *in vivo* での初期免疫応答の大きさとハプテン化の影響について解析した (37, 38)。さらに、それらのキャリアタンパク質を用いて、抗体の特異性と T 細胞の特異性を評価した。*in vivo* で B 細胞や T 細胞の応答を引き起こすタンパク質の抗原性にとって、ハプテン化がどのように影響するかを詳細に解析することで、化学修飾されたタンパク質に対する免疫応答の理解が深まると考えた。

## 3-2 結果

### 「抗キャリアおよび抗ハプテン抗体の産生とハプテン化キャリアの抗原性」

ハプテンの価数と初期免疫応答の関係を調べるために、Balb/c マウスに 100 $\mu$ g の OVA、phOx<sub>4</sub>-OVA または phOx<sub>7</sub>-OVA を 100 $\mu$ g の完全フロイドアジュバンドと共に免疫し、2 週間後に血清サンプルを回収した。ELISA による結果から、抗 phOx 抗体の産生は phOx<sub>4</sub>-OVA と phOx<sub>7</sub>-OVA を免疫した際に違いは見られなかった(Fig. 1-1-A)。一方、抗 OVA 抗体は phOx の価数が増えるとともに減少していた(Fig. 1-1-B)。つまり、キャリアタンパク質に対する免疫応答の強さは、ハプテンの価数が増えるとともに減少する。この様に、抗 OVA 抗体の産生が減少する理由は、抗 OVA B 細胞に認識される全てのエピトープがハプテン化によって変化するという、抗原性の変化である可能性がある。この可能性を検証するために、phOx-OVA と抗 OVA 抗体の結合を、競合 ELISA により解析した。OVA を免疫して得られた抗 OVA 抗血清中には、OVA の様々なエピトープを認識する抗体が含まれている。この抗血清を用いて、OVA を固層した ELISA プレートへの抗体結合を OVA で競合させると、OVA の濃度依存的に結合が阻害される(Fig. 1-1-C)。phOx<sub>4</sub>-OVA や phOx<sub>7</sub>-OVA を用いて競合させた際にも OVA で競合させた場合と同様に結合が阻害された。このことから、抗 OVA 抗体で認識されるほとんどの OVA エピトープは、少なくとも 7 分子以下の phOx の共有結合では変化しないことが分かる。つまり、抗 OVA B 細胞は OVA を認識するのと同じように phOx-OVA を認識することができる。これらのことから、OVA 免疫マウスと比較して、phOx-OVA 免疫マウスで抗 OVA 抗体の生産が減少するのは、BCR を刺激する OVA の抗原性が変化したためではないことが示唆される。

### 「OVA および phOx<sub>7</sub>-OVA 免疫後の T 細胞による抗原認識」

OVA で免疫した T 細胞が OVA と phOx-OVA にどう反応するかを、免疫 2 週間後の CD4<sup>+</sup>T<sub>h</sub> 細胞を調整して調べた。未免疫マウスの脾臓細胞に $\gamma$ 線を照射した細胞を APC として共培養した。抗原を加えて 3 日間培養後の細胞増殖を、<sup>3</sup>H]TdR の取り込みで解析したところ、OVA で免疫後の CD4<sup>+</sup>T<sub>h</sub> 細胞は OVA に対して増殖応答を示した(Fig. 1-2-A)。興味深いことに、この OVA で活性化した T<sub>h</sub> 細胞は、phOx-OVA にも同様に応答した。つまり、T 細胞にとって OVA の抗原性はハプテン化によって変化せず、OVA 特異的 T 細胞への、APC によって提示される OVA 抗原ペプチドのレパートリーは変化しないことが示唆される。

phOx<sub>7</sub>-OVA を免疫して調製した CD4<sup>+</sup>T<sub>h</sub> 細胞を用いて解析したところ、これらの細胞は phOx<sub>4</sub>-OVA にも phOx<sub>7</sub>-OVA にも同様に応答するが、驚くことに OVA に対しては反応しなかった(Fig. 1-2-B)。つまり、phOx-OVA のみを認識し、OVA を認識しない T 細胞が存在すること、phOx-OVA を免疫したマウスでは、phOx-OVA に特異的な T 細胞のみが活性化され、OVA 特異的な T 細胞は観察されないことを示している。

#### 「ハプテン化自己タンパク質への免疫応答」

ハプテン化タンパク質を認識する T 細胞の存在を確認し、ハプテン-キャリア免疫応答への役割を調べるために、ハプテン化自己タンパク質として、キャリアタンパク質にマウス血清アルブミン(MSA)を用いて解析した。マウスにとって MSA 特異的な T 細胞は免疫寛容が働くため、T 細胞がキャリアタンパク質の未修飾ペプチドのみを認識するのであれば、抗ハプテン B 細胞の補助ができないはずである。phOx<sub>4</sub>-MSA を免疫した際は、抗 phOx 抗体の産生はわずかであったが、8 分子以上の phOx を共有結合させた際には、価数が増加するに従って多くの抗体産生が検出された(Fig. 1-3-A)。MSA に対する抗体は検出されなかった。この結果から、自己タンパク質である MSA はハプテン化により T 細胞に対する抗原性が変化し、ハプテン化 MSA 特異的な T 細胞が活性化され、抗ハプテン B 細胞を補助すると考えられる。この仮説を T 細胞増殖アッセイで確認した。phOx<sub>16</sub>-MSA を免疫して 2 週間後の脾臓の T 細胞は、MSA に対して応答せず、phOx-MSA や phOx-MSA への応答は弱かった(Fig. 1-3-B)。しかし、10 価以上の phOx-MSA を用いた際には強い増殖反応が検出された。phOx-BSA を用いた際に増殖反応は見られない。これらのことから、phOx-MSA を免疫した際に、ハプテン-キャリア特異的な T 細胞が活性化され、ハプテン特異的な B 細胞の補助を行うことが示された。

### 3-3 考察

phOx-OVA と phOx-MSA をマウスに免疫し、B 細胞の特異的と T 細胞応答を解析することによって、抗原性におけるハプテン化の影響と、OVA と MSA の免疫原性について調べた。ハプテン化した非自己タンパク質として、phOx<sub>7</sub>-OVA を免疫した際には、抗 OVA 抗体と抗 phOx 抗体共に生産されたことから、B 細胞はハプテンである phOx も phOx<sub>7</sub>-OVA の OVA エピトープも認識できることを示しており (Fig. 1-1-A)、phOx-OVA によって活性化された T 細胞はこれらの B 細胞を補助できる。一方、OVA とアジュバンドを予め免疫したマウスに phOx-OVA を免疫することで、抗 phOx 抗体が産生されることから (data not shown)、OVA 特異的な T 細胞がキャリア/ハプテン-キャリア免疫における T<sub>h</sub> 細胞として働いていることが示唆される。実際、OVA 免疫後の T 細胞は、phOx-OVA にも OVA にも反応することができる (Fig. 1-2-A)。もしもこれら OVA 特異的 T 細胞が phOx-OVA 免疫マウスで活性化されているのであれば、古典的なモデルで考えられているように、抗 phOx B 細胞を補助するはずである。しかしながら、phOx-OVA 免疫後の CD4<sup>+</sup> T 細胞は、phOx-OVA には反応するが OVA には反応しないことから (Fig. 1-2-B)、キャリアのみに特異的な T 細胞が存在しないことを示している。つまり、抗 phOx 抗体の産生は、古典的なモデルでは説明できないことになる。phOx-OVA 免疫によって、B 細胞を補助する phOx-OVA 特異的 T 細胞が存在することから、ハプテン特異的な B 細胞が、ハプテン-キャリア特異的な T 細胞の補助によって活性化されると言う、新しいモデルが考えられる。phOx-MSA 免疫によっては、抗 phOx 抗体のみが産生され、抗 MSA 抗体は産生されず (Fig. 1-3-A)、T 細胞は phOx-MSA によって刺激されるが MSA では刺激されない (Fig. 1-3-B)。この結果は、MSA は自己免疫寛容によって免疫応答を起こさないが、phOx-MSA は外来抗原として認識されて phOx-MSA に対する抗体が産生される。つまり、MSA と phOx-MSA は完全に異なる抗原として認識されることを示している。phOx-OVA 免疫で得られた結果と同様に、抗 phOx 抗体の産生は phOx-MSA 特異的な T 細胞によって補助される。ハプテン-キャリア免疫により生み出された、それぞれ特異的 T 細胞の類似からすると、新たなモデルがハプテン化タンパク質全般に当てはまると考えられ、化学修飾タンパク質の認識における T 細胞の通的な役割であることを示唆する。

ハプテン化タンパク質に対して特異的な T 細胞の抗原決定基は T 細胞クローンや T 細胞ハイブリドーマで調べられたことがある。Trinitrophenyl (TNP) ペプチドに特異的な CD8<sup>+</sup> T 細胞クローンのエピトープが詳細に解析され、TNP を共有結合した様々に異なる配列のペプチドに反応することが示されている



(24、27、28、31)。また、ニッケル接触皮膚炎の患者から、Ni<sup>2+</sup>特異的な T 細胞が単離されており、MHC 上のペプチドと Ni<sup>2+</sup>が相互作用して抗原性を変化させていることが示されている(36)。関節軟骨のタイプ II コラーゲン、ヒドロキシル化や糖化といった翻訳後修飾を受け、この修飾タンパク質特異的な T 細胞が関節炎の進行において重要であることも示されている(33)。さらに、ペニシリンアレルギーの患者から得られた T 細胞クローンの抗原認識は、ペプチド配列に非依存的である(35)。キャリア配列依存的なものは、phosphorylcholine 化ニワトリ卵白リゾチーム特異的な T 細胞ハイブリドーマで観察されており、弱いながらも非修飾キャリアを認識する(30)。ニトロチロシンを含むチトクロム C ペプチドを免疫することで、修飾ペプチドに特異的な T 細胞が誘導される(4)。自己タンパク質のマレイル化は抗原性を変化させ、抗自己 T 細胞を誘導する(40、41)。この様に、ペプチド配列とハプテン化ペプチドの相対的な寄与は T 細胞依存的な様式にとっては様々であるようだが、ハプテン化アミノ酸残基が相互作用の主たる決定基になるなど、TCR との相互作用においてハプテン化アミノ酸残基は結合における自由エネルギーに大きく貢献していることが見出されている。本研究の結果で、phOx-OVA に特異的な T 細胞は未修飾 OVA にも僅かながら交差反応性があることから(Fig. 1-2-B)、結合エネルギーにハプテンが大きく寄与していると考えられる。この場合、phOx 修飾された OVA ペプチドは APC 上に提示されなければならない。Nalefski と Rao(29)は、*p*-azobenzenearsonate 化した OVA ペプチドである Ars-OVA33-49 は、I-Ad に結合性を有する OVA 抗原性ペプチドとして最も研究が進んでいる OVA33-49 と競合すること、さらに未修飾の OVA33-49 は I-Ad に結合しないことを示している。OVA33-49 はリジン残基を有していることから、phOx-OVA 特異的な T 細胞のエピトープになっているかもしれない。I-Ad に結合する OVA ペプチドとして知られている中で、OVA273-288(42)は 2 つのリジン残基を有することから、phOx 化されていると思われる。その他にもリジン残基を有する OVA ペプチドが存在するかもしれないが、現時点で T 細胞によって認識される phOx-OVA ペプチドのアミノ酸配列に関する情報は少ない。phOx<sub>4</sub>-OVA と phOx<sub>7</sub>-OVA による刺激を比較した際に、顕著な違いが無いことから、phOx と高い反応性を有するリジン残基が抗原性エピトープとして大きく寄与していることが示唆される。phOx-キャリアタンパク質に対する BCR の親和性測定や、phOx-OVA の T 細胞エピトープの解析および T 細胞レパートリーの解析等によって、さらに化学修飾タンパク質に対する免疫応答の理解が深まると考えられる。

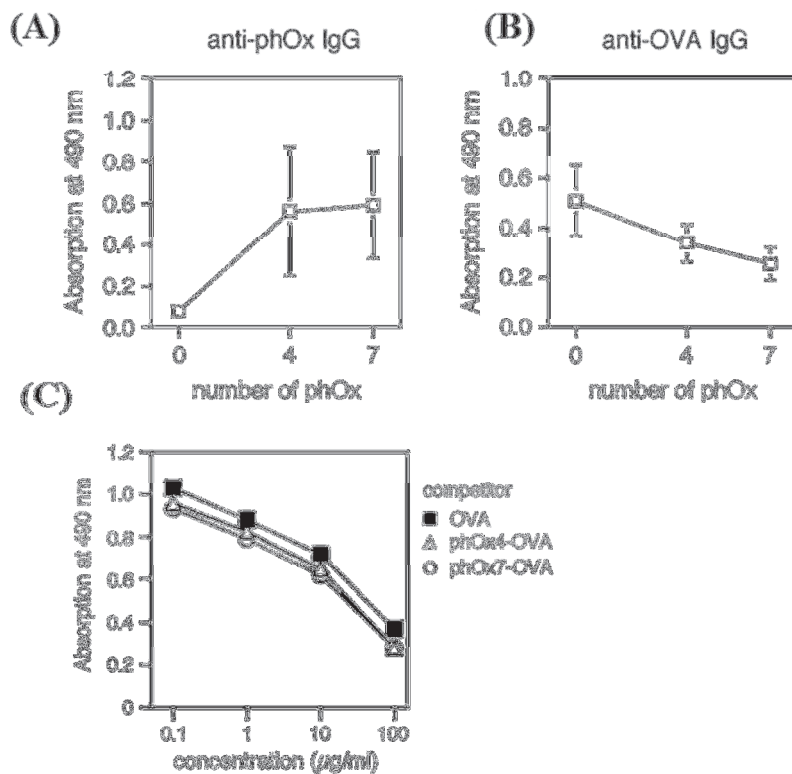


Figure 1-1 OVAおよびphOx-OVA免疫による血中抗体の解析

OVA、phOx<sub>4</sub>-OVA、phOx<sub>7</sub>-OVAで免疫2週後に血清サンプルを調整し、(A)抗phOx抗体を、phOx-BSAを固層したプレートを用い、血清を1/1000希釈して測定した。(B)抗OVA抗体を、OVAを固層したプレートを用い、血清を1/200希釈して測定した。各抗原に結合した抗原特異的IgG抗体を、抗マウスIgG抗体を用いて検出した。X軸は共有結合したphOx分子の数を示した。(C)抗OVA血清を1/200希釈し、予め異なる濃度のOVA、phOx<sub>4</sub>-OVA、または、phOx<sub>7</sub>-OVAと混合して一昼夜反応させた後に、OVA固層プレートを用いて結合した抗OVA IgG抗体を検出した。



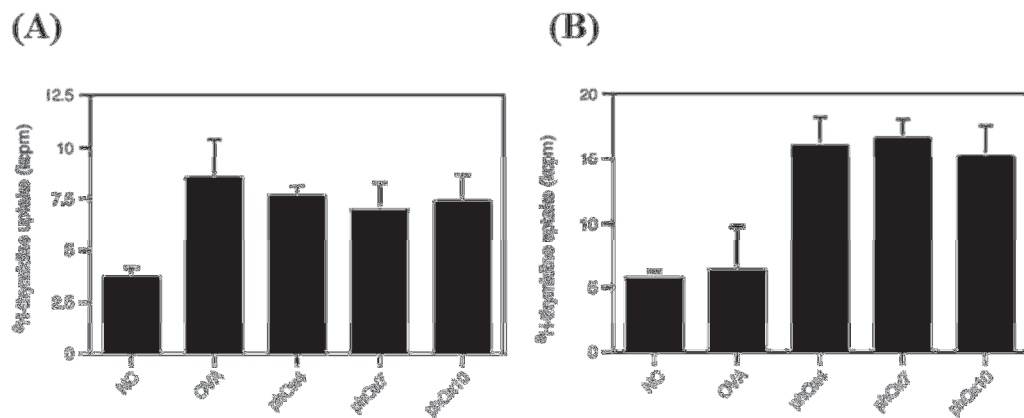


Figure 1 OVAおよびphOx-OVA免疫によるT細胞増殖解析

(A) OVAを免疫後に得られたCD4<sup>+</sup> T細胞をAPCおよびY軸に示した異なる抗原と共に培養し、取り込まれた $^3\text{H}$ TdRを測定した。(B)phOx-OVAを免疫後に得られたCD4<sup>+</sup> T細胞をAPCおよびY軸に示した異なる抗原と共に培養し、取り込まれた $^3\text{H}$ TdRを測定した。NCは抗原なし。

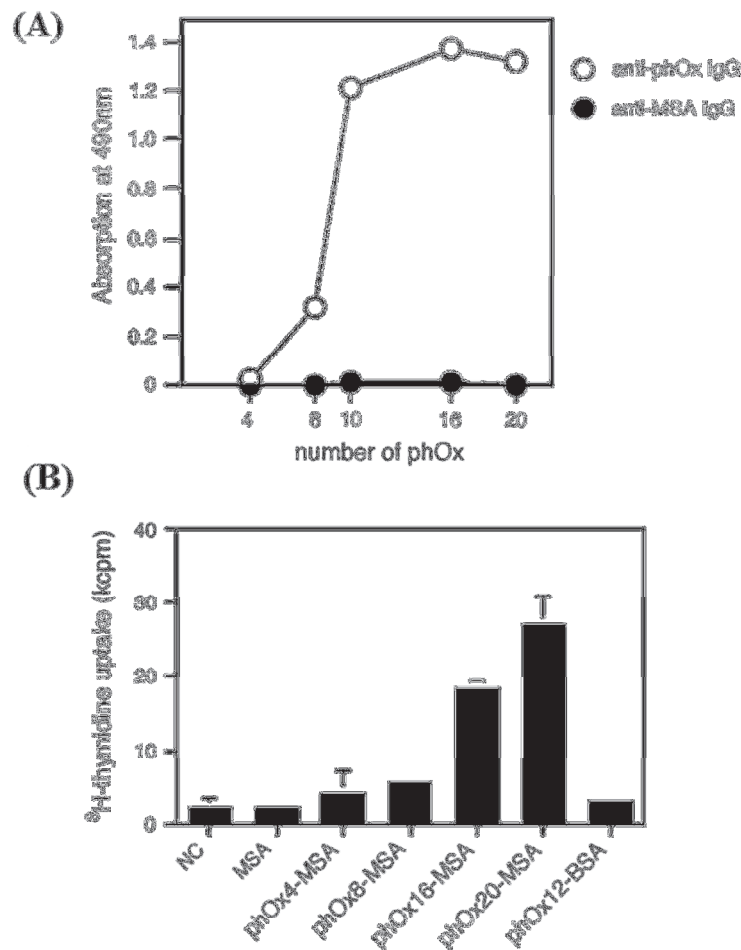


Figure 1-3 phOx-MSAに対する免疫応答

(A) phOx の価数が4、8、10、16、20のphOx-MSAを免疫し、2週後の血清を用いて抗phOx IgGと抗MSA IgGを、それぞれphOx-BSA、MSAを固層したプレートを用いたELISAで測定した。  
 (B) phOx<sub>16</sub>-MSA免疫2週後の脾臓細胞を調整し、Y軸に示した各抗原と共に培養し、取り込まれた<sup>3</sup>H]TdRを測定した。NCは抗原なし。

## 第四章

### 抗 NP 抗体レパートリーにおける親和性成熟戦略の分子構造的解析

#### 4-1 研究背景及び目的

C57BL/6 マウス由来の抗 NP 抗体は、その大部分の H 鎖可変部( $V_H$ )が  $V_H186.2$ 、 $DFL16.1$ 、 $J_H2$  遺伝子、また L 鎖可変部( $V_L$ )が  $V_L1$ 、 $J_L1$  遺伝子と、カノニカルな遺伝子で構成されていることから、抗体の親和性成熟過程における SHM と親和性の関係を研究する上で有用な系として古くから用いられてきた。これら抗 NP 抗体は構成される遺伝子セグメントの点からすると同質(homogeneous)であるが、可変部の相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列、特に H 鎖の 3 番目の CDR(CDR3H)においては異質(heterogeneous)である。この観点から抗 NP 抗体を分類すると、 $V_H$  遺伝子セグメントと D 遺伝子セグメントのつなぎ目である 95 番目のアミノ酸残基がチロシン残基(Tyr)である型 (Tyr95 型)と、グリシン残基(Gly)である型 (Gly95 型)の 2 つの型に分かれる。初回免疫後 7 日目で得られる抗 NP 抗体は Tyr95 型がほとんどであり、SHM は非常に少ない。14 日目で得られる抗体も Tyr95 型が大部分であるが、 $V_H33$  番目のアミノ酸残基がトリプトファン残基(Trp)からロイシン残基(Leu)に置換され(W33L 変異)、胚細胞型と比較して親和性が約 10 倍増大した抗体が多く得られる。この様に、免疫応答の初期には Tyr95 型が優位に生産される。Gly95 型は非常に少ないながら胚細胞型抗体として免疫初期にも得られるが、免疫後期、特に二次免疫後に出現頻度が高くなる。この Gly95 型は SHM を蓄積し、胚細胞型抗体と比較して最終的には 1000 倍以上も親和性を増大させることができる。つまり、抗 NP 抗体の親和性成熟は免疫応答の異なるステージに、少なくとも 2 系統の抗体が関与して進行していると言える。このような、早期型抗体から後期型抗体へのレパートリー変化は他のハプテン系でも見られる。しかしながら、この現象がどのような分子メカニズムによって起こるかは不明である。前記したように、Tyr95 型と Gly95 型は最大到達親和性(ceiling affinity,  $K_{max}$ )が大きく異なっている。親和性成熟はダーウィンの進化になぞらえることができ、高い親和性へ到達する能力を進化能(evolvability)と呼んでいる。つまり、後期型・Gly95 型は早期型・Tyr95 型よりも進化能が高いと言える。親和性成熟過程や進化能を規定する分子メカニズムは未知であるが、これを解明することは免疫学における知識を広げるだけでなく、より高親和性の抗体を人工的に作製する際にも有用な知見を与える。そこで、抗 NP 抗体の 2 種類の各レパートリーがどのような過程で親和性を成熟させているか調べ、親和性成熟における分子メカニズムを詳細に解析した。さらに、未免疫マウス、および、

NP-CGG 免疫マウスの B 細胞を元に作製したファージ抗体ディスプレイライブラリーから NP 特異的に結合する抗体を単離することで、抗体レパートリーの変化を解析した。さらに、進化能の異なる 2 種類の抗体遺伝子に、人工的に突然変異を導入したファージディスプレイライブラリーを構築して、親和性の上昇したクローンを単離することで、*in vivo* と *in vitro* での親和性成熟を比較し、生体における親和性成熟機構の解明を目指した。

## 4-2 結果

### 「ITC による 9TX 抗体の親和性成熟戦略の解析」

C57BL/6 マウスに NP-CGG を免疫後、9 週目にハイブリドーマを作製して得られた mAb である 9T7、9T8、9T10、9T13 は  $V_H186.2$ 、 $DFL16.1$ 、 $J_H2$ 、 $V\lambda 1$ 、 $J\lambda 1$  遺伝子でコードされ CDR 3H の V、D、J 遺伝子のつなぎ目の塩基配列も同一であることから、同じ胚細胞型抗体を先祖抗体に持つと考えられる。Sagawa(43)らにより、9T7 と 9T8 はほぼ同様の NP に対する親和性を有し、9T10 や 9T13 への親和性成熟過程の mAb であることが示唆されている。よって  $V_H$ 、 $V_L$  に存在するどの SHM が親和性を上昇させているかを解析する良い材料である。そこで、これらの mAb の先祖にあたり、SHM を有さない胚細胞型抗体の H 鎖( $H^{9TG}$ )と L 鎖( $L^{9TG}$ )を作製し、さらにそれら全ての mAb に共通する SHM を有する抗体として  $H^{9TC}$  および  $L^{9TC}$  を作製した(Fig. 2-1)。H 鎖と L 鎖の組み合わせを変えることで、 $H^{9TG}L^{9TG}$ (9TG)、 $H^{9TC}L^{9TG}$ 、 $H^{9TG}L^{9T7}$ 、 $H^{9TC}L^{9T7}$ 、 $H^{9T8}L^{9T8}$ (9T8)をミエローマ細胞 SP2/0 株に強制発現させ、精製後に ITC を用いて NP- $\epsilon$ -aminocaproic acid (NP-Cap) への結合性を解析した(Table. 2-2)。抗体溶液に NP-Cap を滴下していくと、結合に伴い熱を放出し、熱量ピークとなって観察される。この熱量ピークの各面積から、NP-Cap 滴下のみで発生する希釈熱を差し引いた。この値を滴下した NP-Cap とのモル比に対してプロットすることで滴定曲線を得た。さらに曲線を非線形最小自乗法で fitting することで、結合定数( $K_a$ )とエンタルピー変化( $\Delta H$ )を算出した。ギブス自由エネルギー( $\Delta G$ )とエントロピー変化( $\Delta S$ )は  $\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S$  ( $R$  は気体定数、 $T$  は絶対温度)で算出した。 $\Delta G$  と  $\Delta S$  は濃度に依存するパラメーターであることから、式  $G^\circ = \Delta G - 7.98 \times 10^{-3} \text{ cal/mol/K}$  および式  $S^\circ = \Delta S + 7.98 \text{ cal/mol/K}$  を用いて、ユニタリー化して示した(44、45)。その結果、9T8 と  $H^{9TC}L^{9T7}$  は全てのパラメーターにおいて、類似した値を示した。また、 $\Delta H$  の大きな変化が結合性に寄与していることが確認できた(43)。 $V_H$  に存在する 6 つの共通した SHM の効果を調べるために  $H^{9TC}L^{9TG}$  を、また 9T7 の L 鎖に存在する 2 つの SHM の効果を調べるために  $H^{9TG}L^{9T7}$  を用いて比較解析した結果(Table. 2-2)、 $H^{9TC}L^{9TG}$  は  $K_a = 4.8 \pm 0.5 \times 10^6$  であり、 $H^{9TG}L^{9T7}$  は  $K_a = 2.0 \pm 0.3 \times 10^7$  であることから、 $V_H$  の 6 つの SHM よりも  $V_L$  の SHM がより効果的に親和性を上昇させていることが分かった。9TG の  $\Delta G^\circ$  を 0% とし、 $H^{9TC}L^{9T7}$  の  $\Delta G^\circ$  を 100% として SHM の  $\Delta G^\circ$  への寄与を計算したところ、 $H^{9TG}L^{9T7}$  は 71% であり、 $H^{9TC}L^{9TG}$  は 38% であった。つまり、Gly95 型の進化における主たる過程は L 鎖への SHM であり、 $V_H$  の SHM との協調で親和性を増大していた。

### 「ELISA による抗体の相対的親和性測定」

ITCでの測定には、各抗体サンプルが1mg以上必要であり、操作も煩雑であることから、より多くのSHMと親和性について解析するために簡便な方法を開発した。抗体は培養細胞を用いて一過性に培養上清中に発現させ、定量的ELISAで抗体量を規定した。それら抗体の相対的親和性をELISAによつての判定可能かを、親和性が既知であるハイブリドーマ由来のmAbを基準抗体とし、NP<sub>1</sub>-BSAおよびNP<sub>26</sub>-BSAを固層したELISAプレートを使用して検討した。胚細胞型抗体であるN1G9と9TGのNP-Capに対する親和性はそれぞれ $K_a=5.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  (45)、 $K_a=1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  であり、NP<sub>1</sub>-BSAに対してはほとんど結合することができない(Fig. 2-2-B)。しかしながら $K_a=3.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ のB2、 $K_a=6.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ の9T13、 $K_a=5.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ のE11は明らかに結合する。さらに、全ての抗体がNP<sub>26</sub>-BSAには結合できる。この結果は、B2以上の親和性を有する抗体はNP<sub>1</sub>-BSAを用いることで相対的な親和性を測定できることを示しており、N1G9や9TGのような低親和性の抗体はNP<sub>26</sub>-BSAを用いてNPへの結合活性の有無を評価できることを示している。

#### 「Tyr95型抗体およびGly95型抗体の親和性におけるW33L変異の効果」

1988年にAllen(46)らは、抗NP mAbのW33L変異により親和性が約10倍上昇することを示しており、この結果をN1G9とB2を用いて確認した。N1G9のV<sub>H</sub>33番目のアミノ酸残基をTrpからLeuに置換した変異体H<sup>N1G9</sup>(33L)L<sup>GL</sup>はNP<sub>1</sub>-BSAに結合することが可能になり、H<sup>B2</sup>(33Y)L<sup>GL</sup>は結合性を失うことから、W33L変異はTyr95型にとって主要な親和性成熟過程に関与していることが再確認できた(Fig. 2-3-A)。これに反して、9T7、9T13、C6等のGly95型にW33L変異を導入すると、NP<sub>1</sub>-BSAへの結合能が著しく減少しすることから、大きな負の作用を有する変異であることが分かった(Fig. 2-3-B)。これらの結果は、W33L変異の親和性に対する効果は、V<sub>H</sub>95番目のアミノ酸残基にリンクしており、Tyr95型抗体の親和性成熟にのみ主要な変異であることを示唆している。

#### 「Gly95型抗体の親和性における様々なV<sub>L</sub>変異の効果」

H<sup>9TG</sup>とGly95型である9T13、C6、E11のL鎖、もしくはTyr95型である9L11、9L18のL鎖とのペア抗体を作製してNP<sub>26</sub>-BSAへの結合性を評価した。その結果、胚細胞型のL<sup>9TG</sup>とのペアと同等の結合性を示した(Fig. 2-4-A)。つまり、L鎖のSHMはGly95胚細胞型H鎖とのペアにより、結合性を無くすことはない。9T7はV<sub>H</sub>に9つのSHMを、V<sub>L</sub>に2つのSHM(V57、D66)を有し、



9TG から 9T13 へ親和性成熟する過程での中間に位置すると考えられる(Fig. 2-1-A)。H<sup>9T7</sup>L<sup>GL</sup>は NP<sub>1</sub>-BSA に対して弱い結合性を示すが、L 鎖 57 番目が Val に、もしくは 66 番目が Asp になることで結合性が上昇する(Fig. 2-4-B)。さらにこれら両方の SHM により親和性が上昇し、より多くの SHM を有する 9T13(6 アミノ酸残基)の L 鎖とのペアでさらに上昇する。すなわち、V<sub>L</sub>の SHM の蓄積が親和性を変化させていた。さらに、H<sup>9T7</sup>L<sup>GL</sup>と比較して H<sup>9T7</sup>L<sup>9T13</sup>は大きく上昇していることから、H<sup>9T7</sup>の SHM が L<sup>9T13</sup>の SHM と協調して親和性を上げていることが分かる。H<sup>9T7</sup>が L<sup>C6</sup>や L<sup>E11</sup>とのペアになると親和性は若干上昇する(Fig. 2-4-B)。その他の Gly95 型においても同様な親和性上昇が観察され、C6 に関しては H<sup>C6</sup>L<sup>GL</sup><H<sup>C6</sup>L<sup>9T7</sup><H<sup>C6</sup>L<sup>C6</sup>、9T13 に関しては H<sup>9T13</sup>L<sup>GL</sup>< H<sup>9T13</sup>L<sup>C6</sup>< H<sup>9T13</sup>L<sup>E11</sup>< H<sup>9T13</sup>L<sup>9T7</sup>< H<sup>9T13</sup>L<sup>9T13</sup>の順で高くなる(Fig. 2-4-C、Fig. 2-4-D)。すなわち、Gly95 型の L 鎖の SHM は、どの Gly95 型の H 鎖に対しても親和性上昇に正の影響を及ぼす。これに対して、H<sup>9T7</sup>L<sup>9L11</sup>、H<sup>9T7</sup>L<sup>9L18</sup>や、H<sup>9T13</sup>L<sup>GL</sup>、H<sup>9T13</sup>L<sup>9L11</sup>、H<sup>9T13</sup>L<sup>9L18</sup>の親和性は大きく変化しないことから、Gly95 型の H 鎖にとって Tyr95 型の L 鎖は中立的な影響に過ぎないことが分かる(Fig. 2-4-B、Fig. 2-4-C)。

#### 「Tyr95 型抗体の親和性における V<sub>L</sub> 変異の効果」

H<sup>9L11</sup>L<sup>GL</sup>と H<sup>9L11</sup>L<sup>9L11</sup> および H<sup>9L18</sup>L<sup>GL</sup>と H<sup>9L18</sup>L<sup>9L18</sup>の比較を行ったところ、若干の親和性の上昇しか観察されないことから、Tyr95 型の親和性にとって V<sub>L</sub>の SHM の貢献度は低いと考えられる(Fig. 2-4-E)。Tyr95 型どうしでの L 鎖の交換では NP への結合性を失うことは無いが、Gly95 型由来の L 鎖と交換すると結合活性を失うか減少する。この負の影響は、H<sup>N1G9</sup>や H<sup>B2</sup>と L<sup>9T7</sup>、L<sup>9T13</sup>、L<sup>C6</sup>のペアで顕著に見られる(Fig. 2-5-B)。つまり、Gly95 型の親和性上昇に寄与する特異な V<sub>L</sub>の SHM は、Tyr95 型の H 鎖と共にあると負に影響する。これらの結果は、V<sub>H</sub>の 95 番目のアミノ酸残基が V<sub>H</sub>と V<sub>L</sub>それぞれについての成熟過程を決定していることを示している。NP 抗原を免疫後 8 週目で得られた Tyr95 型である 8B5 は、V<sub>H</sub>に W33L を含む 8 つの SHM を有し、V<sub>L</sub>に 7 つの SHM を有する(Fig. 2-1-A)。このクローンは W33L を有しているにも関わらず、N1G9 と同様に NP<sub>1</sub>-BSA にほとんど結合することができない(Fig. 2-5-A)。H<sup>N1G9</sup>L<sup>8B5</sup>と H<sup>B2</sup>L<sup>8B5</sup>で NP への結合性を調べたところ、N1G9 や B2 よりも結合活性が低く、L<sup>8B5</sup>の SHM は負に作用していた(Fig. 2-5-B、Fig. 2-5-C)。どのアミノ酸残基が親和性を減少させているかは不明であるが、過剰な SHM が原因であると思われる。Tyr95 型にとって L<sup>9T7</sup>とのペアは結合活性を無くすか大きく減少させることから(Fig. 2-4-E、Fig. 2-5-B)、以後、Tyr95 型と Gly95 型の判定基準と

して利用することにした。

#### 「N1G9 の V<sub>H</sub>95 番目変異と Gly95 型抗体への変換」

N1G9 の V<sub>H</sub>95 番目のアミノ酸残基を本来の Tyr、(H<sup>N1G9</sup>(95Y)L<sup>GL</sup>)、を含む 20 種類全てのアミノ酸残基に置換し、NP<sub>26</sub>-BSA に対する結合を調べた(Fig. 2-6)。その結果、95Y 以外、95G を含める全ての変異体が結合しなかった。これが、NP 免疫の早期に Tyr95 型が主として生産される要因であると考えられる。H<sup>N1G9</sup>(95G)L<sup>GL</sup>が NP への結合活性有さないことから、H<sup>N1G9</sup>の 95 番目のみのアミノ酸置換だけでは Tyr95 型から Gly95 型への変換はできず、さらなる変異が必要であることが分かった。Gly95 型と Tyr95 型の V<sub>H</sub>のアミノ酸配列を比較すると、Gly95 型の 100j 位が His であることが分かる(Fig. 2-1-A)。そこで、D-J 遺伝子断片の繋ぎ目である 100j のアミノ酸残基を Tyr から His に置換した H<sup>N1G9</sup>(100jH)L<sup>GL</sup>を作製して検証したが、N1G9 と比較して若干親和性が低下した。さらに、H<sup>N1G9</sup>(95G 100jH) L<sup>GL</sup>は結合性を失った(Fig. 2-7-A)。そこでさらに各型のアミノ酸配列の違いを検討し、CDR 3H に注目した。今までに、免疫応答の過程で平均的な CDR 3H の長さが減少するという報告がある(19、47)。N1G9 の CDR 3H は 11 アミノ酸残基で構成されており、96 番目は Asp で、Gly95 型を含め他の mAb では欠失している(16)。さらに多くの mAb では 100 位が 1 アミノ酸残基 H<sup>N1G9</sup>よりも短いことから、CDR 3H の 96 番目と 100a 番目を欠損した変異体を作製して結合性を評価した(Fig. 2-7-B)。H<sup>N1G9</sup>(96Δ 100aΔ)L<sup>GL</sup>は NP<sub>26</sub>-BSA に結合出来るものの、H<sup>N1G9</sup>(95G 96Δ 100aΔ)L<sup>GL</sup>は結合することが出来なかった。最終的に H<sup>N1G9</sup>(95G 96Δ 100aΔ 100jH)L<sup>GL</sup>で NP<sub>26</sub>-BSA に強く結合することができた。これが Gly95 型に変換されたかを、W33L 変異を導入することで検証した結果、Fig. 2-7-B に示しように、NP<sub>26</sub>-BSA に対する結合性が減少した。W33L 変異は Gly95 型にとって負の効果として影響することから H<sup>N1G9</sup>(95G 96Δ 100aΔ 100jH)L<sup>GL</sup>は Gly95 型であるといえる。H<sup>N1G9</sup>(95G 96Δ 100aΔ 100jH)L<sup>GL</sup>の 95 番目から 100j 番目のアミノ酸配列は GYYGSH、H<sup>9TG</sup>は GRGSH であり、長さとおアミノ酸残基の点から類似している。

#### 「9TG の V<sub>H</sub>95 番目のアミノ酸変異体」

H<sup>9TG</sup> の 95 番目のアミノ酸残基を 20 種類全てのアミノ酸残基に置換して NP<sub>26</sub>-BSA への結合性を調べたところ、多くの変異体で NP<sub>26</sub>-BSA への結合性を失うか非常に弱くなる(Fig. 2-8-A)。しかし、H<sup>9TG</sup>(95G)L<sup>GL</sup>、H<sup>9TG</sup>(95Y)L<sup>GL</sup>、H<sup>9TG</sup>(95R)L<sup>GL</sup>、H<sup>9TG</sup>(95A)L<sup>GL</sup>、H<sup>9TG</sup>(95K)L<sup>GL</sup>、H<sup>9TG</sup>(95P)L<sup>GL</sup>の 6 種の変異体



は十分な結合活性を示した(Fig. 2-8-A)。これは H<sup>N1G9</sup> の 95 番目を 20 種類のアミノ酸残基へ置換した際に、唯一 95Y のみで NP への結合活性を有した結果と対照的である。これは、CDR 3H の長さが N1G9 では 11 アミノ酸残基であるが 9TG では 9 アミノ酸残基と短いことによる効果であると考えられる。これらの結果は、V<sub>H</sub>95 番目のアミノ酸残基と共に CDR 3H の長さが抗体の特異性を決定するのに重要な因子であることを示している。NP への結合性を有する 6 種の変異体が Tyr95 型であるか Gly95 型であるかを、L<sup>9T7</sup> とのペアを作製して調べた(Fig. 2-8-B)。その結果、H<sup>9TG(95G)</sup>L<sup>9T7</sup> と H<sup>9TG(95A)</sup>L<sup>9T7</sup> のみが結合性を有しており、これらは Gly95 型/後期型に分類できる。H<sup>9TG(95Y)</sup>L<sup>GL</sup>、H<sup>9TG(95R)</sup>L<sup>GL</sup>、H<sup>9TG(95K)</sup>L<sup>GL</sup>、H<sup>9TG(95P)</sup>L<sup>GL</sup> は結合性を失ったことから、Tyr95 型/早期型であると考えられる。H<sup>9TG(95Y)</sup>L<sup>GL</sup> が Tyr95 型である確認のため、W33L 変異を導入して解析したところ、H<sup>9TG(95Y)</sup>L<sup>GL</sup> や H<sup>9TG(95Y)</sup>L<sup>9T7</sup> と比較して H<sup>9TG(33L 95Y)</sup>L<sup>GL</sup> や H<sup>9TG(33L 95Y)</sup>L<sup>9T7</sup> は親和性が大きく上昇していた(Fig. 2-9)。つまり、Gly95 型は V<sub>H</sub>95 番目の 1 つのアミノ酸置換で Tyr95 型へ変換できたことになる。これは、H<sup>9TG</sup> の V<sub>H</sub>95 番目の 1 つのアミノ酸残基が NP への結合性だけでなく、親和性成熟過程と最大到達結合力の観点から、早期型と後期型の 2 つの型になり得ることを示している。Lys、Arg、Pro、Tyr の早期型を生み出すアミノ酸残基の側鎖は大きく (bulky side chain)、後期型を生み出す Ala や Gly は低分子アミノ酸残基であることから、V<sub>H</sub>95 番目に Gly を有する抗体の CDR 3H ループは分子的な柔軟性を備えていると考えられる(48、49)。

#### 「ELISA によるファージ抗体の相対的親和性測定」

人工的親和性成熟の方法の一つとして、PCR を用いて抗体遺伝子に変異を導入した抗体ライブラリーを、M13 ファージの gIII タンパク質に融合させて提示させ、スクリーニングする方法がある(50、51)。通常、gIII タンパク質はファージ上に約 5 分子発現しており、宿主へ感染する際の吸着に働く。全ての gIIIp タンパク質に抗体を融合させると、スクリーニングの際に必要な大腸菌への感染が阻害されてしまうことと、抗原に対する avidity 効果が高まることで低親和性抗体が選択されることから、ファージ 1 個に対して抗体-gIIIp 融合タンパク質の発現が平均 1 分子以下になるように、プロモーター活性を弱めている。つまり、1 分子の抗体を発現したファージと、抗体を発現していないファージが混在した状態である。本研究で用いたファージミドベクター pRIBS101 は、L 鎖発現カセットと、H 鎖の V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub> 領域が gIII タンパク質と融合して発現されるカセットを有しており(Fig. 2-11-A)、ファージ上に Fab として提示される。よって、L 鎖に対する抗体を固層し、抗 M13 ファージ抗体を用いて検出することで、

Fab 発現ファージ量を揃えることが可能である。前述した様に、価数の異なる NP-BSA を抗原に用いた ELISA によって、mAb の相対的親和性を測定することは可能である。そこで、一定量の Fab 発現ファージを用いた際にも同様に相対的親和性を測定できるかを検討した。基準 mAb として、N1G9 ( $K_a=5.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ )、B2 ( $K_a=3.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ )、9T7 ( $K_a=8.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ )、E11 ( $K_a=5.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ )を用いて、NP<sub>1</sub>-BSA、NP<sub>3</sub>-BSA、NP<sub>8</sub>-BSA への結合を ELISA で確認したところ (Fig. 2-12-A)、低親和性の N1G9 は NP<sub>8</sub>-BSA に結合可能であるが、NP<sub>3</sub>-BSA には結合することができない。B2 以上の親和性を有する抗体は NP<sub>3</sub>-BSA に結合可能であり、E11 は NP<sub>1</sub>-BSA にも結合可能であった。つまり、親和性に応じた結合性を示すことが確認できた。これらの mAb の L 鎖および V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub> 領域遺伝子を pRIBS101 ファージミドベクターに挿入してファージを作製し、Fab 発現ファージ量を揃えた上で NP<sub>1</sub>-BSA、NP<sub>3</sub>-BSA、NP<sub>8</sub>-BSA への結合を確認した (Fig. 2-12-B)。1 分子に 2 価の抗原結合部位を有する mAb と異なり、N1G9-Fab 発現ファージは NP<sub>8</sub>-BSA にも結合することができない。B2-Fab は NP<sub>3</sub>-BSA および NP<sub>8</sub>-BSA への弱い結合が検出でき、9T7-Fab は NP<sub>8</sub>-BSA へ強く結合する。E11-Fab は NP<sub>1</sub>-BSA にも結合することができた。これらの結果から、Fab ファージを用いた際にも、ELISA によって相対的な親和性が測定できると分かった。

#### 「NP 免疫および未免疫マウス Fab ライブラリーから単離した抗 NP 抗体」

NP-CGG を追加免疫後のマウスから脾臓を摘出し、その cDNA をテンプレートとして L 鎖および V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub> 領域遺伝子を PCR で増幅後に、pRIBS101 ファージミドベクターに挿入して NP 免疫 Fab ファージディスプレイライブラリーを構築した。また、未免疫マウスの脾臓由来のライブラリーも同時に作製した。ライブラリーの多様性は、それぞれ約  $1 \times 10^7$  と約  $1 \times 10^8$  であった。これらのライブラリーから、イムノチューブに固着した NP-BSA に結合するクローンを単離した。各クローンの Fab 発現ファージ、および、親和性が既知であるコントロール Fab 発現ファージ量を揃え、NP<sub>3</sub>-BSA と NP<sub>15</sub>-BSA への結合量を ELISA で測定した (Fig. 2-13-A)。その結果、 $K_a \sim 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  の親和性を有するクローンが単離できた。それらの抗体遺伝子配列を決定し、アミノ酸配列を解析したところ、NP-CGG 免疫ライブラリー由来の 5 クローン全てが  $\lambda_1$  L 鎖を有しており、そのうち 3 クローンが V<sub>H</sub>186.2 遺伝子で構成されていた (Fig. 2-13-B)。これら 3 クローンは全て W33L 変異を含む複数の SHM を有した Tyr95 型抗体であった。また、V<sub>H</sub>186.2 遺伝子以外の V<sub>H</sub> 遺伝子 (IGHV14-2\*01) で構成された抗体も V<sub>H</sub>95 番目が Tyr であり、W33L 変異を有したクローンであった。この V<sub>H</sub> 遺伝子で構

成された mAb はハイブリドーマ由来、もしくは、脾臓 B 細胞の解析で見られたことが無く、ライブラリー構築時の L 鎖と H 鎖のシャッフルにより NP 結合性を獲得したクローンであると考えられ、生体では存在しないペアだと思われる。未免疫マウス由来のクローンのアミノ酸配列を解析したところ(Fig. 2-13-C)、2 クローン共に変異の無い $\lambda_1$ L 鎖を有していたが、 $V_H$  遺伝子は NP-CGG 免疫マウス由来のライブラリーからも得られた IGHV14-2\*01 で構成された抗体であり、 $V_H95$  番目が Tyr であり W33L 変異を有していた。

#### 「HN1G9 および H9TG 変異 Fab ライブラリーから単離した抗 NP 抗体」

Tyr95 型の胚細胞型抗体である N1G9 と、Gly95 型の胚細胞型抗体である 9TG の  $V_H$  領域のみに、error prone PCR 法で平均 4 個の変異を導入し、胚細胞型 $\lambda_1$ L 鎖遺伝子を予め挿入した pRIBS-Fab-cassette フェージミドベクター(Fig. 2-11-B)を用いて、それぞれ約  $1 \times 10^7$  の多様性を有するライブラリーを構築した。これらのライブラリーから、NP-BSA を固層したイムノチューブに結合するクローンを単離した。各クローンの Fab 発現フェージ、および、親和性が既知であるコントロール Fab 発現フェージ量を揃え、NP<sub>3</sub>-BSA と NP<sub>15</sub>-BSA への結合量を ELISA で測定した(Fig. 2-14-A)。その結果、 $K_a = 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \sim 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  の親和性を有するクローンが単離できた。それらの抗体遺伝子配列を決定し、アミノ酸配列を解析したところ(Fig. 2-14-B)、HN1G9 変異ライブラリー由来の 6 クローン中、5 クローンが W33L 変異を有しており、in vivo と同様な親和性成熟過程を辿っていた。また、W33L 以外の変異は 2 アミノ酸残基以下であった。H9TG 変異ライブラリー由来の 7 クローン全てが 1~4 アミノ酸残基の変異を有していたが、W33L 変異は無い。ハイブリドーマや脾臓 B 細胞の解析で、少数の SHM を有して親和性の上昇した Gly95 型抗体はほとんど見られないことから、生体内では自己反応性を獲得したとして消去されている可能性がある。

#### 「N1G9 及び 9TG の H 鎖 L 鎖変異 Fab ライブラリーから単離した抗 NP 抗体」

N1G9 と 9TG の  $V_H$  領域、 $V_L$  領域共に、それぞれ平均 4 個の変異を導入できる error prone PCR を連続して 3 回行うことで、計算上平均 12 個の変異を有する抗体遺伝子を増幅した。それらの遺伝子断片を pRIBS-Fab-cassette フェージミドベクター(Fig. 2-11-B)に挿入し、それぞれ約  $5 \times 10^6$  の多様性を有するライブラリーを構築した。これらのライブラリーから、イムノチューブに固層した NP-BSA に結合するクローンを単離した。各クローンの Fab 発現フェージ、および、親和性が既知であるコントロール Fab 発現フェージ量を揃え、NP<sub>3</sub>-BSA

と NP<sub>15</sub>-BSA への結合量を ELISA で測定した(Fig. 2-15-A)。その結果、N1G9 由来の変異ライブラリーからの単離は難しく、得られた 2 クロンの親和性も  $K_a=3.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  以下であった。1 つのクロンの V<sub>H</sub> の変異は 4 アミノ酸残基であり V<sub>L</sub> の変異は 0 であった(Fig. 2-15-B)。もう 1 クロンの V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub> の変異はそれぞれ 2 アミノ酸残基であり、多くの変異を導入したライブラリーから、少量の変異を有するクロンが選択的に単離されていた。一方、9TG 由来の変異ライブラリーからは  $K_a=3.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  以上の親和性を有するクロンも単離でき(Clone name: NP3-2-C7) (Fig. 2-15-A)、V<sub>H</sub> の変異は 7 アミノ酸残基、V<sub>L</sub> の変異は 3 アミノ酸残基であった(Fig. 2-15-C)。これらの結果は、Tyr95 型への多くのアミノ酸置換は親和性に負に作用し、Gly95 型はアミノ酸置換による NP 結合性保持の許容量が大きいことを示唆している。

### 4-3 考察

NP 抗原を投与した C57BL/6 マウスの免疫応答で、2 つの型の抗 NP 抗体が出現する。Tyr95 型は主要な抗体として早期に生産され、V<sub>H</sub>33 番目のアミノ酸残基である Trp が Leu に置換されるただ一つの SHM により、胚細胞型と比較して約 10 倍親和性を上昇させることができる。Gly95 型は後期の主要抗体として生産され Tyr95 型よりも高い親和性を有するようになる。2002 年に Sagawa らがハイブリドーマ由来の Gly95 型 mAb である、9T7、9T8、9T10、9T13 を用いて SHM の蓄積による親和性の段階的な上昇を検証している。これらは同一の先祖が起源であり、それらのアミノ酸配列の違いは SHM でのみ生じたものであると考えられる(Fig. 2-1)。これらの mAb の先祖にあたり、SHM を有さない胚細胞型抗体の 9TG を作製し、NP-Cap への結合性を ITC で評価したところ、 $K_a=1.1 \pm 0.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であった。ITC で  $10^6$  以下の親和性を測定し、正確な値を得るのは困難であるが、9TG の親和性は少なくとも、Tyr95 型の胚細胞型抗体である N1G9 の親和性 ( $K_a=5.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  (52, 53))と同等以上であった。このことから、初期免疫後に Tyr95 型が多く出現するが Gly95 型の出現頻度が低い理由は、NP に対する親和性の違いではなく、naïve B 細胞レパートリーの偏在によるものと考えられる。未免疫マウス由来の Fab フェージディスプレイライブラリーから、抗 NP 抗体を単離することで、この偏在を確かめようとしたのだが、得られたクローンはすべて V<sub>H</sub>186.2 以外の遺伝子で構成されていた(Fig. 2-13-C)。今回作製したライブラリーの多様性は約  $1 \times 10^8$  であり、さらに多様性を増して解析することで、naïve B 細胞レパートリーの詳細を理解することが可能になるかもしれない。

免疫応答の時間経過と共に、異なる進化能力を有する抗体の劇的な変化が、どのように V<sub>H</sub>95 番目のアミノ酸残基に関係しているかを調べた。Tyr95 型の親和性成熟に W33L 変異が影響することは以前から知られており、N1G9 の V<sub>H</sub>33 番目のアミノ酸残基を Trp から Leu に置換した変異体 H<sup>N1G9</sup>(33L)L<sup>GL</sup>、およびその逆変異として H<sup>B2</sup>(33Y)L<sup>GL</sup> を作製して解析した結果、これを再確認することができた(Fig. 2-3-A)。H<sup>N1G9</sup>(33L)L<sup>GL</sup> は NP<sub>1</sub>-BSA に結合可能な親和性を獲得し、H<sup>B2</sup>(33Y)L<sup>GL</sup> は結合性を失うことから、H<sup>B2</sup> に存在する W33L 変異以外の SHM は親和性にあまり影響しないと考えられ、Tyr95 型抗体にとって W33L が親和性成熟の主要な SHM であると言える。対して、W33L 変異は Gly95 型抗体の親和性を大きく減少させ (Fig. 2-3-B)、これが後期型抗体で V<sub>H</sub>33 番目の SHM が欠如している一因である。これらの結果は、Fab フェージディスプレイライブラリーを用いた解析でも同様であった。N1G9 の V<sub>H</sub> にのみ少数の変異を導入して NP-BSA に対して親和性を有するクローンを選択すると、W33L 変異を有するクローンが多く単離される(Fig. 2-14-B)。一方、9TG の V<sub>H</sub> に変異を導



入して得られたクローンに W33L 変異を有するものは存在しなかった(Fig. 2-14-C)。NP<sub>1</sub>-BSA への結合性が、H<sup>9T7</sup>L<sup>GL</sup>、H<sup>9T7</sup>L<sup>GL</sup>(57V)、H<sup>9T7</sup>L<sup>GL</sup>(66D)、H<sup>9T7</sup>L<sup>9T7</sup>、H<sup>9T7</sup>L<sup>9T13</sup> と段階的に親和性を上昇させることから、Gly95 型の親和性成熟に V<sub>L</sub> 領域の SHM が重要な役割を果たしていることが分かる(Fig. 2-4-B)。Gly95 型の V<sub>H</sub> の SHM による劇的な親和性上昇効果は見られなかったが(Fig. 2-4-B、2-4-C、2-4-D)、H<sup>9TG</sup>L<sup>9T13</sup> では親和性の変化が少ないにも関わらず、H<sup>9T7</sup>L<sup>9T13</sup> は大きく上昇させることから、V<sub>H</sub> の SHM の蓄積が V<sub>L</sub> のアミノ酸置換による親和性上昇を可能にしていると考えられる。C6、9T7、9T13 で L 鎖を胚細胞型(L<sup>GL</sup>)にすることで大きく親和性が減少することからも、Gly95 型の親和性成熟に V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> の両方の SHM が重要であることが分かる。これらの結果より、Tyr95 型と Gly95 型はそれぞれ独自の親和性成熟戦略を用いていることが示された。

N1G9 の V<sub>H</sub>95 番目を 20 種全てのアミノ酸残基に置換して調べた結果、唯一 H<sup>N1G9</sup>(95Y)L<sup>GL</sup> = N1G9 のみが NP 結合活性を有していた(Fig. 2-6)。N1G9 は C57BL/6 が産生する抗 NP 抗体のプロトタイプであり、さらにカノニカルな V<sub>H</sub>186.2、DFL16.1、J<sub>H</sub>2 遺伝子で構成されていることから、早期に出現する抗 NP 抗体のほとんど全てが Tyr95 型である理由として説明がつく。H<sup>N1G9</sup>(95G)L<sup>GL</sup> が NP 結合活性を持たなかったため、CDR 3H の構造を H<sup>9TG</sup> をまねて N1G9 の段階的な Gly95 型化を試みた。まず、D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub> の結合部である 100j 位を Gly95 型で共通なアミノ酸残基である His に置換したが、NP 結合活性はほとんど変化しなかった(Fig. 2-7-A)。Gly95 型は 9~10 アミノ酸残基で CDR 3H が構成されており、N1G9 は 11 アミノ酸残基であることから、V<sub>H</sub>96 番目と 100a 番目の 2 つのアミノ酸残基を欠損させた。H<sup>N1G9</sup>(95G 96Δ 100aΔ)L<sup>GL</sup> は NP<sub>26</sub>-BSA にほとんど結合することができなかったが、H<sup>N1G9</sup>(95G 96Δ 100aΔ 100jH)L<sup>GL</sup> は強く結合した(Fig. 2-7-D)。この変異体に W33L 変異を導入すると、親和性が大きく減少したことから、明らかに Gly95 型に変換されたと言える。N1G9 の三次元構造解析によると (54)、V<sub>H</sub>95 番目 Tyr の側鎖は結合部の底辺部に存在し、疎水性 CDR 3H 構造を形成する。よって、Tyr から Gly へ置換することにより、残基の大きさの変化と疎水性の面から大きく変化し、結合活性を失っているものと考えられる。しかしながら、構造が類似した Phe を含め、Tyr 以外では結合活性が無いことから、CDR 3H が 11 アミノ酸残基で構成されている際には結合部位の構造はいかなる側鎖を持つアミノ酸残基も許容できない。H<sup>9TG</sup> は 9 アミノ酸残基で構成された短い CDR 3H を有し、100j 位が His である典型的な Gly95 型である。この H<sup>9TG</sup> の 95 番目を 20 種のアミノ酸残基に置換したところ、Gly、Ala、Tyr、Lys、Arg、Pro の際に L<sup>GL</sup> とのペアで NP への結合活性があった。これは Tyr のみで結合活性があった H<sup>N1G9</sup> と異なる点である。Tyr95 型



の H 鎖は L<sup>9T7</sup> とのペアにより結合活性を無くすか著しく低下することから、Tyr95 型と Gly95 型の判定基準として、H<sup>9TG</sup> の変異体を L<sup>9T7</sup> とペアにして解析した(Fig. 2-8-B)。これらの変異体のうち、H<sup>9TG(95G)</sup>L<sup>9T7</sup> と H<sup>9TG(95A)</sup>L<sup>9T7</sup> のみが結合性を有していたことから、これらは Gly95 型であることが示唆される。H<sup>9TG(95Y)</sup>L<sup>GL</sup>、H<sup>9TG(95R)</sup>L<sup>GL</sup>、H<sup>9TG(95K)</sup>L<sup>GL</sup>、H<sup>9TG(95P)</sup>L<sup>GL</sup> は結合性を失ったことから、Tyr95 型であると考えられる。最後に、Tyr95 型への変換を W33L 変異により確認するため、H<sup>9TG(33L 95Y)</sup>L<sup>9TG</sup> を作製して解析したところ、NP への結合性が増したことから、確かに Tyr95 型であった。つまり、CDR 3H が 9 アミノ酸残基で構成される H<sup>9TG</sup> に関しては、95 番目の 1 アミノ酸残基の置換で十分 Tyr95 型に転換できる。これは、Weiss と Rajewsky(19)が記憶 B 細胞で CDR 3H の短い抗体が豊富に現れることを示した結果と一致する。

なぜ免疫の早期に Tyr95 型が豊富に出現し、後期になると減るのか。初期の抗 NP 抗体は V<sub>H</sub>186.2、DFL16.1、J<sub>H</sub>2 でコードされ、CDR 3H の長さは 11~13 アミノ酸残基で構成される(19、47)。N1G9 は免疫後 7 日目で得られる代表的な早期抗 NP 抗体である(16)。CDR 3H が 11 アミノ酸残基で構成される際に NP に結合性を有するものは唯一 Tyr95 だけであることから(Fig. 2-6)、Tyr95 型の BCR を発現する B 細胞が初回免疫による抗原の選択を受け、胚中心において SHM とさらなる選択によって親和性成熟過程を辿る(8)。つまり、V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> の SHM の頻度は親和性成熟にとって重要な因子である。Table 2-3 に示したように、V<sub>H</sub> の SHM の頻度は Tyr95 型においても Gly95 型においても V<sub>L</sub> の頻度の 3.3~3.6 倍高い。この違いは、プロモーターやエンハンサーなどの *cis-acting* 領域など遺伝子構造の違いによる可能性がある(55、56、57)。V<sub>H</sub> の SHM の頻度の高さは、V<sub>H</sub> の W33L 変異が主たる親和性上昇戦略として用いる Tyr95 型抗体にとって有利である。これにより、Tyr95 型は迅速に親和性を上昇させることが出来る。さらに、Tyr95 型において多くの V<sub>L</sub> の SHM は親和性を減少させることから、V<sub>L</sub> の SHM の頻度の低さも Tyr95 型に有利である。一方、9T7 や 9T13 にみられる V<sub>H</sub> の SHM が V<sub>L</sub> の SHM を効果的にして親和性を上昇させるように、Gly95 型の親和性成熟は V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> の両方に SHM を蓄積することで進行する。(Fig. 2-4-B、2-4-C)。すなわち、V<sub>H</sub> と比較して約 3.5 倍 V<sub>L</sub> の SHM 頻度が低いことから、Gly95 型抗体は高い親和性を獲得するのに長い時間が必要になると思われる。これらの後期型抗体は V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> 両方でアミノ酸置換を有効的に行うことが出来ることからより高い進化能力を備えていると考えられる。この様に、V<sub>L</sub> の SHM が及ぼす親和性への影響が Tyr95 型と Gly95 型で異なることにより、免疫応答時の抗体のレパートリー変化を生み出していると考えられる。V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> 両方における Gly95 型のアミノ酸置換の頻度は、Tyr95 型の 2.2~2.3 倍高い。Tyr95 型にとって V<sub>L</sub> の SHM の多くは親和性を大きく減少させること

から、B2のようなW33L変異を有してV<sub>L</sub>にほとんど変異を持たない抗体が主たる初期免疫の抗体である。一方、二次免疫後に得られたTyr95型の8B5は、W33L変異を含む8つのSHMをV<sub>H</sub>に有し、さらにV<sub>L</sub>に7つのSHMを有するが、8B5もHB<sup>2</sup>L<sup>8</sup>B<sup>5</sup>もNP1-BSAに結合することは出来ない(Fig. 2-5-C)。つまり、8B5はW33L変異によって親和性を上昇したにも関わらず、V<sub>L</sub>への変異蓄積により親和性が低下したと考えられる。N1G9のV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>に多数の変異を導入したライブラリーから、NPに結合性を有するクローンを単離することが困難であり、単離したクローンの変異数が少なかったことから(Fig. 2-15-B)、Tyr95型にとってSHMの蓄積は親和性に対して負に作用すると考えられる。この現象がTyr95型の特徴であり、免疫早期に出現するが後期になると消失することを説明している(Fig. 2-10)。

抗体のレパートリー変化は2-phenyl oxazolone (phOx) (38、58)や、phosphocholine (PC) (59、60)などのハプテンを用いたシステムで共通して観察される現象である。phOx-CGGを免疫したBALB/cマウスから得られる初期抗体は、V<sub>H</sub>Ox1とV<sub>L</sub>Ox1遺伝子で構成されているものがほとんどであり(38、58)、SHMによる親和性成熟が観察されるのだが、後期になるとV<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>共に異なる遺伝子で構成された抗体が主として得られるようになる。同様なレパートリー変化がPC-KLHを免疫した際にも観察されることから、免疫システムは少なくとも2つの型の抗体を供給していると考えられ、一つは少ないSHMにより素早く親和性のある程度まで上昇させて抗原に対処する。もう一つは、免疫後期にV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>両方にSHMを蓄積して高い親和性を獲得した後に出現し、長期に亘る生体の防御を司っている。早期型抗phOx抗体と抗PC抗体のV<sub>H</sub>95番目のアミノ酸残基はどちらもAspであり、後期型はGlyである(58、59)。これらの後期型は早期型よりも高い進化能力を有していると思われ、抗NP抗体のGly95型と類似している。1999年にKimらは(48)、シュミレーション解析によってGly95は構造的な多様性を高めることに寄与していることを示している。2008年にLeらは(61)、NP-KLHを免疫したB1-8ノックインマウスでは抗NP抗体の親和性はさほど上昇しないことを示している。B1-8はN1G9と全く同じアミノ酸残基で構成されているTyr95型であり、Gly95型の非存在下でのC57BL/6マウスにおける抗NP抗体の親和性成熟の状態を示していると言える。

C57BL/6マウスの抗NP抗体遺伝子のレパートリーを調べる目的で、未免疫マウスのB細胞からcDNAを調整し、包括的に抗体遺伝子を増幅することが出来るプライマーセット(Table 2-4)を用いてPCRにより増幅し、ファージディスプレイライブラリーを構築した。そのライブラリーから得られた抗体はλ1鎖を有しているものの、NP抗原をC57BL/6マウスに免疫して得られるカノニカルなV<sub>H</sub>遺伝子を有していなかった(Figure 2-13-C)。しかしながら、そのV<sub>H</sub>95番

目のアミノ酸残基は Tyr で、33 番目が Leu であり、親和性は  $K_a=3.4 \times 10^6$  以上であった(Figure 2-13-A)。NP 免疫マウス由来のハイブリドーマや B 細胞の解析では見られない  $V_H$  遺伝子であったことから、生体では存在しない H 鎖と L 鎖のペアであることが示唆される。未免疫動物由来の抗体ライブラリーは、この様に生体内では存在しない H 鎖と L 鎖の組み合わせが生じる。例えば、正常なヒト B 細胞から作製したライブラリーを用いて、ヒトの成分に対する抗体が得られるのもこれに起因する。つまり、未免疫マウス由来のライブラリーから得られた抗体は、自己反応性を有するとして生体内では消去されるべき組み合わせであると考えられる。カノニカルな遺伝子で構成された抗 NP 抗体が単離されなかった理由は、生体では存在しない H 鎖と L 鎖の組み合わせにより、カノニカルな遺伝子で構成された胚細胞型抗 NP 抗体よりも、親和性が高いクローンがライブラリー内に存在したことで、スクリーニング時に淘汰された可能性が考えられる。また、ライブラリーの多様性が低く、生体内に存在する、全ての H 鎖と L 鎖のペアが揃っていないことが原因であると考えられる。より多様性を増したライブラリーを作製し、全ての NP 結合性クローンを解析することで、未免疫マウスにおいて抗 NP 抗体の先祖として存在する、胚細胞 Tyr95 型と胚細胞 Gly95 型のレパートリーの全容を理解することができると考える。

NP 抗原を追加免疫後のマウスから作製したファージ抗体ライブラリーを用いて得られた NP 結合性クローンは、カノニカルな遺伝子で構成されているものが多く、その  $V_H95$  番目のアミノ酸残基は Tyr で、33 番目が Leu であり、親和性は  $K_a=1 \times 10^7$  以上であった(Figure 2-13-A, B)。NP 免疫によって、カノニカルな遺伝子で構成された抗 NP 抗体を発現する B 細胞が増殖することで、高い割合で得られていると考えられる。得られたクローンの  $V_L$  の CDR 領域に存在する SHM 数は 0~4 残基であることから、Tyr95 型の特性である W33L 変異によって親和性を上昇させた H 鎖が、0 または少数の SHM のみを有する  $\lambda$  鎖と効率よくペアになり NP 結合性を有したと考えられる。一方、Gly95 型抗体は全く得られなかった。この結果は、Gly95 型が H 鎖と L 鎖の SHM の協調によって親和性を上昇させるが、ライブラリー作製時に H 鎖と L 鎖がシャッフルされることで、生体内に存在するペアになり得ず、NP 結合性が低下または消失してしまったためと考えられる。これらの結果は、Tyr95 型と Gly95 型の親和性成熟戦略がそれぞれ異なり、かつ、Tyr95 型が初期免疫応答において短時間である程度親和性を上昇させて優位に存在することと合致する。

## VH

	CDR1 *****	CDR2 *****	CDR3 *****
9TG	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYFTSYMMHWVKQRPGRLEWIGRIDPNSGGTKYNEKFKSKATLTVDKPSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGRYGLHFDYWGQGTTLTVSS		
9TC	-----S-N-----V-Y-R-----S-----		
9T7	-----I-S-N-----V-Y-R-N-T-----P-----S-----		
9T8	-----I-S-IN-----V-Y-R-----S-----		
9T10	-----I-S-IN-----V-D-YIR-N-S-----S-----		
9T13	-----S-IN-----V-D-YIR-N-S-----S-----		

## VL

	CDR1 *****	CDR2 *****	CDR3 *****
9TG	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSSTQAVTTSNYAMFVQERFDHLFTBLIGQTNIRAPQVPAHFSSGLIGDKAALTITQAGTEDEAIYFCALRYSNHWVFGSGTKLTVLG		
9TC	-----		D
9T7	-----	Y	D
9T8	-----S-----S-----I-----D-----		
9T10	-----I-----S-----I-----D-----		
9T13	-----I-----H-S-----I-----D-----		

Figure 2-1 9TX抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域のアミノ酸配列

H<sup>9TG</sup>、H<sup>9TC</sup>、L<sup>9TC</sup>は9T7、9T8、9T10、9T13のV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>から類推したアミノ酸配列を示した。L<sup>9TG</sup>は胚細胞型λ<sub>1</sub>L鎖。ダッシュ(-)は9TGのアミノ酸配列と同じアミノ酸残基を示す。CDR領域を\*で示した。

(A)  $V_H$  region

	Ab	H chain	CDR1	CDR2	CDR3	
	N1G9	H <sup>N1G9</sup>	*****	*****	*****	****
	B2	H <sup>B2</sup>				
Tyr95	9L11	H <sup>9L11</sup>				
	9L18	H <sup>9L18</sup>				
	9T5	H <sup>9T5</sup>				
Gly95	9TG	H <sup>9TG</sup>				
	C6	H <sup>C6</sup>				
	9T7	H <sup>9T7</sup>				
	E11	H <sup>E11</sup>				
	9T13	H <sup>9T13</sup>				

$V_L$  region

	Ab	L chain	CDR1	CDR2	CDR3
	N1G9	L <sup>N1G9</sup>	*****	*****	*****
	B2	L <sup>B2</sup>			
Tyr95	9L11	L <sup>9L11</sup>			
	9L18	L <sup>9L18</sup>			
	9T5	L <sup>9T5</sup>			
Gly95	9TG	L <sup>9TG</sup>			
	C6	L <sup>C6</sup>			
	9T7	L <sup>9T7</sup>			
	E11	L <sup>E11</sup>			
	9T13	L <sup>9T13</sup>			

(B)

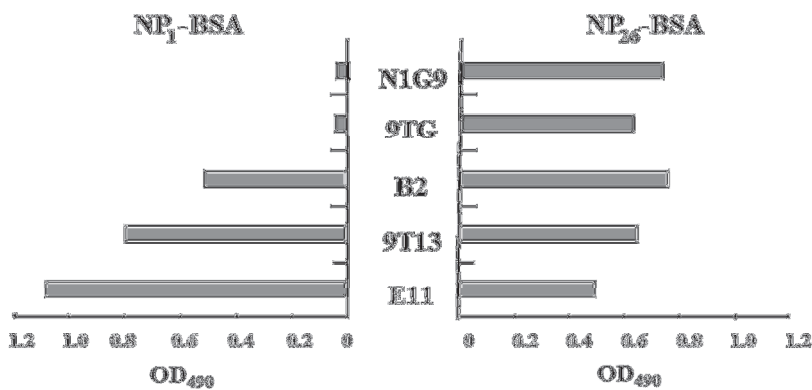


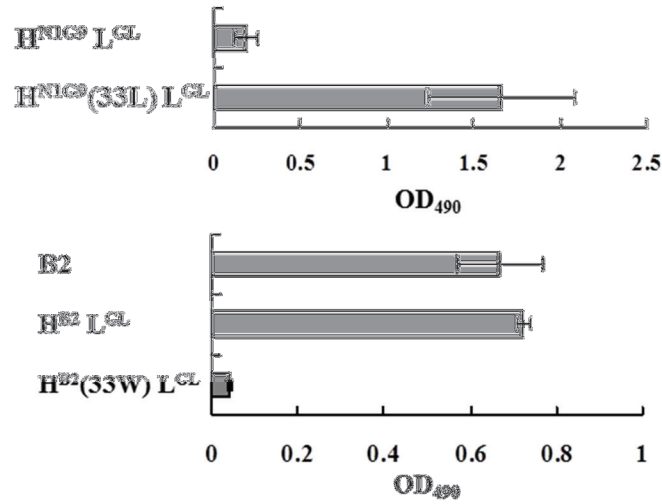
Figure 2-2 抗NP mAbのアミノ酸配列とNP-BSAへの結合

(A) N1G9、B2、9L11、9L18はTyr95型であり、9TG、C6、9T7、E11、9T13はGly95型である。 $V_H$ が  $V_H186.2$ 、 $DFL16.1$ 、 $J_H2$ からなり、 $V_L$ が  $V_L1$ 、 $J_L1$ からなる胚細胞型遺伝子で構成されたN1G9のアミノ酸配列と、各モノクローナル抗体のアミノ酸配列を比較しており、同一のアミノ酸残基をダッシュ(-)で、異なるアミノ酸残基を一文字表記で示した。

(B) NP抗原への結合能をELISAによって測定した。NP<sub>1</sub>-BSAもしくはNP<sub>26</sub>-BSAを1.0 ug/mlで固層したELISAプレートへの各モノクローナル抗体の結合を示した。



(A)



(B)

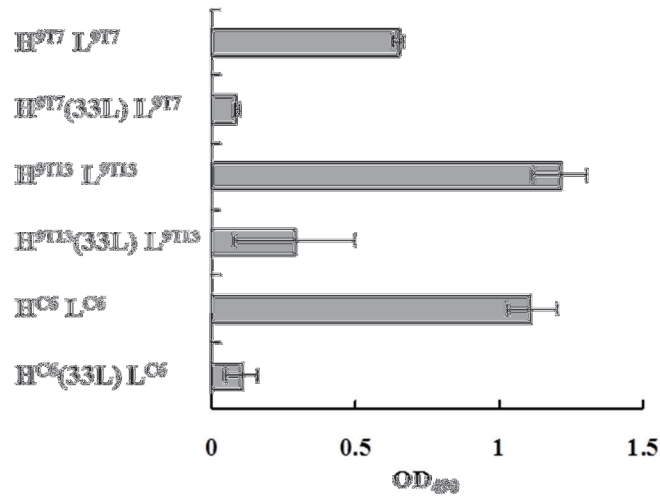


Figure 2-3 V<sub>H</sub>33番目のアミノ酸残基がTrpかLueかによる結合能への影響

(A) Tyr95型のW33L変異と、L33Wへの逆変異による結合能への影響をNP<sub>1</sub>-BSAを0.1ug/mlで固層したELISAプレートを用いて測定した。

(B) Gly95型のW33L変異による結合能への影響をNP<sub>1</sub>-BSAを0.1ug/mlで固層したELISAプレートを用いて測定した。



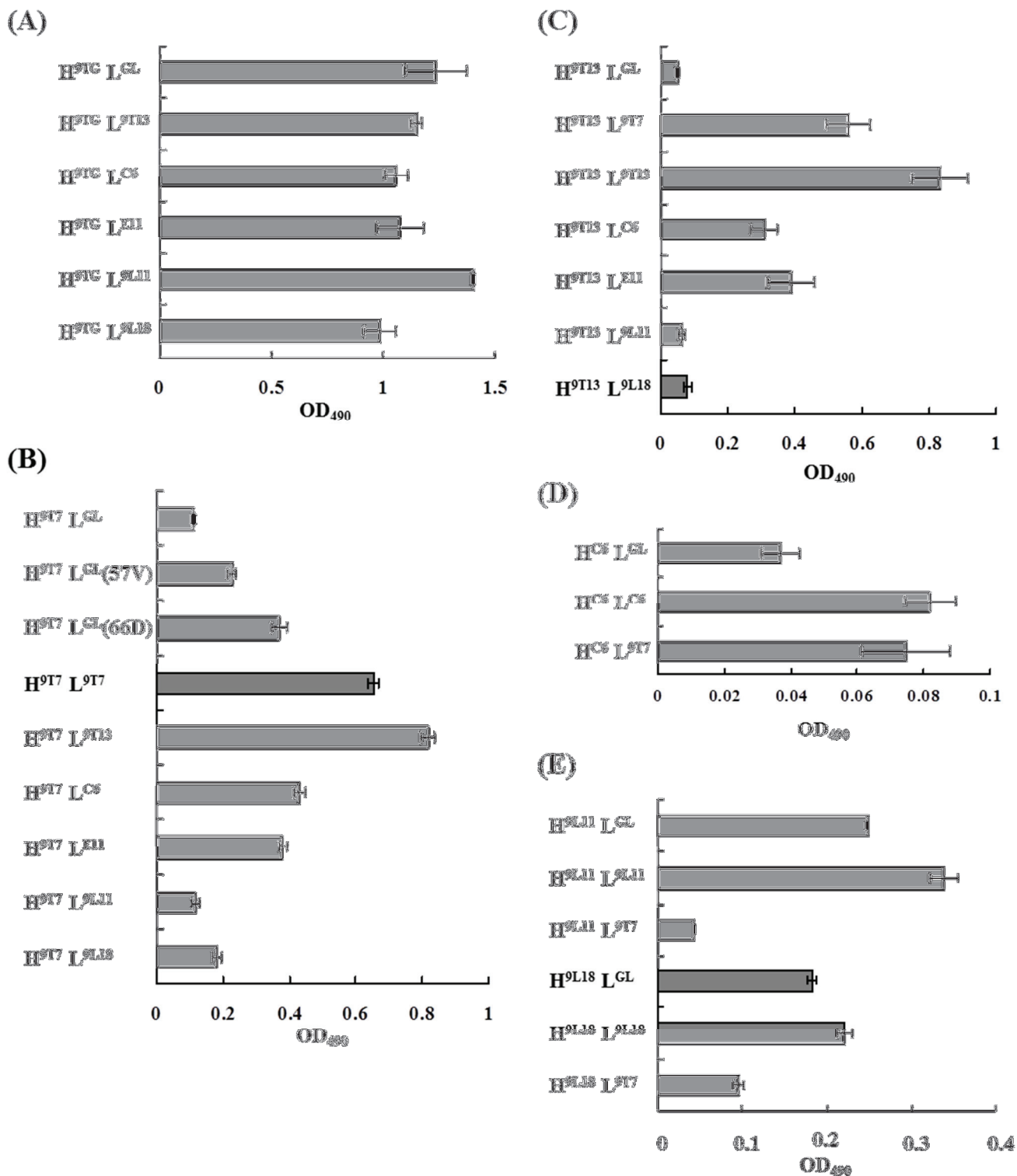


Figure 2-4 V<sub>L</sub>のアミノ酸変異による結合能への影響

Gly95型である(A) H<sup>91G</sup>、(B) H<sup>91T</sup>、(C) H<sup>91T13</sup>、(D) H<sup>91C</sup>、および、Tyr95型である(E) H<sup>91L11</sup>とH<sup>91L18</sup>を、表記した様々なL鎖とペアにし、NPへの結合活性を測定した。(A)はNP<sub>25</sub>-BSAを0.1μg/mlで固層、(B-E)はNP<sub>1</sub>-BSAを1.0μg/mlで固層したELISAプレートを用いた。L<sup>91GL</sup>は胚細胞型のL鎖。

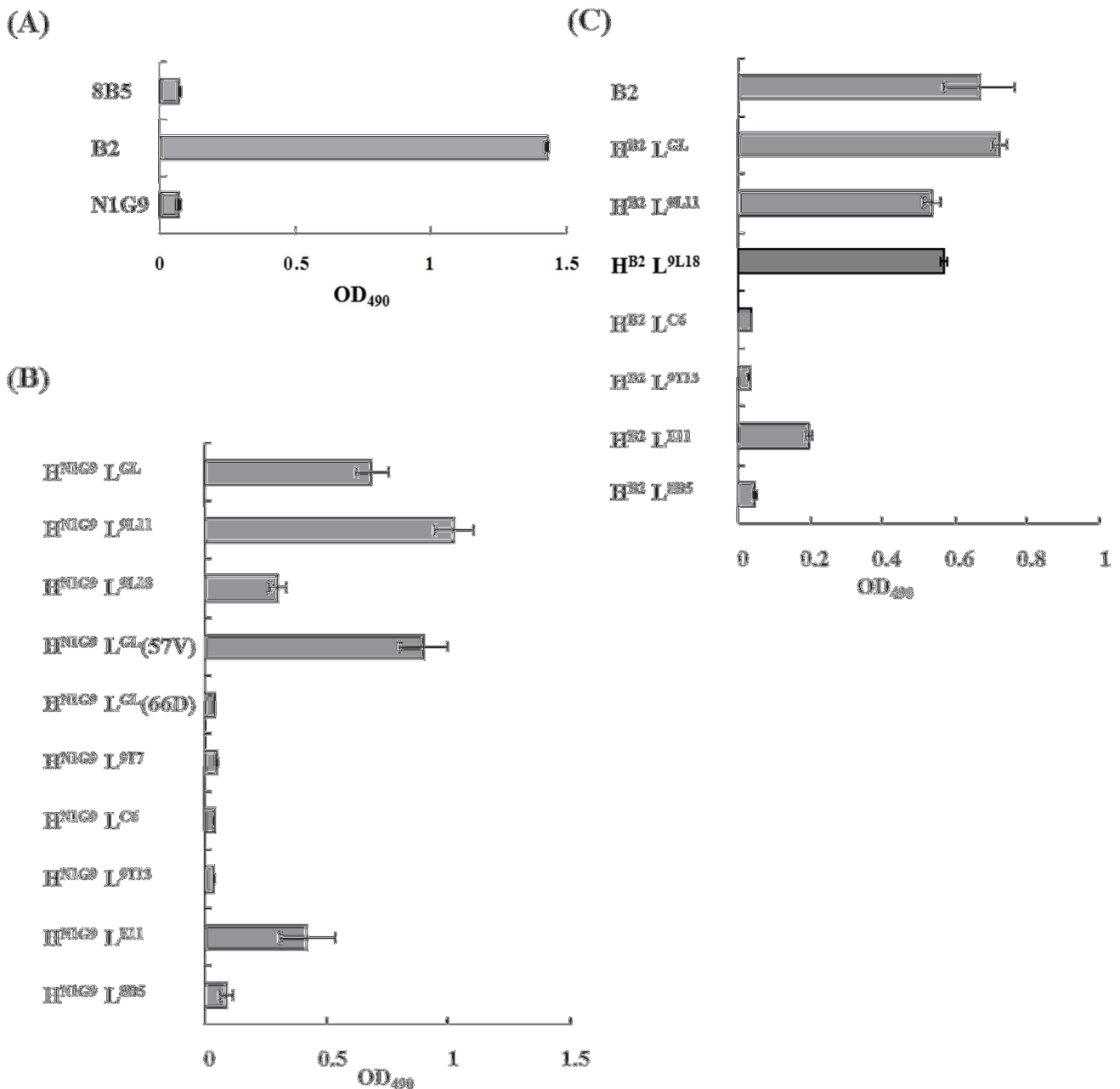


Figure 2-5 Tyr95型抗体のVLのアミノ酸変異による結合能への影響

(A) ハイブリドーマ株由来のTyr95型抗体、8B5、B2、N1G9のNP<sub>1</sub>-BSAを1.0ug/mlで固層したプレートへの結合。

(B) H<sup>N1G9</sup>と、表記してある様々なL鎖とペアにし、NPへの結合活性をNP<sub>26</sub>-BSAを0.1ug/mlで固層したELISAプレートを用いて測定した。L<sup>GL</sup>は胚細胞型のL鎖であり、N1G9は胚細胞型のL鎖を有する。

(C) H<sup>B2</sup>と、表記してある様々なL鎖とペアにし、NPへの結合活性をNP<sub>1</sub>-BSAを1.0ug/mlで固層したELISAプレートを用いて測定した。L<sup>GL</sup>は胚細胞型のL鎖であり、B2は胚細胞型のL鎖を有する。

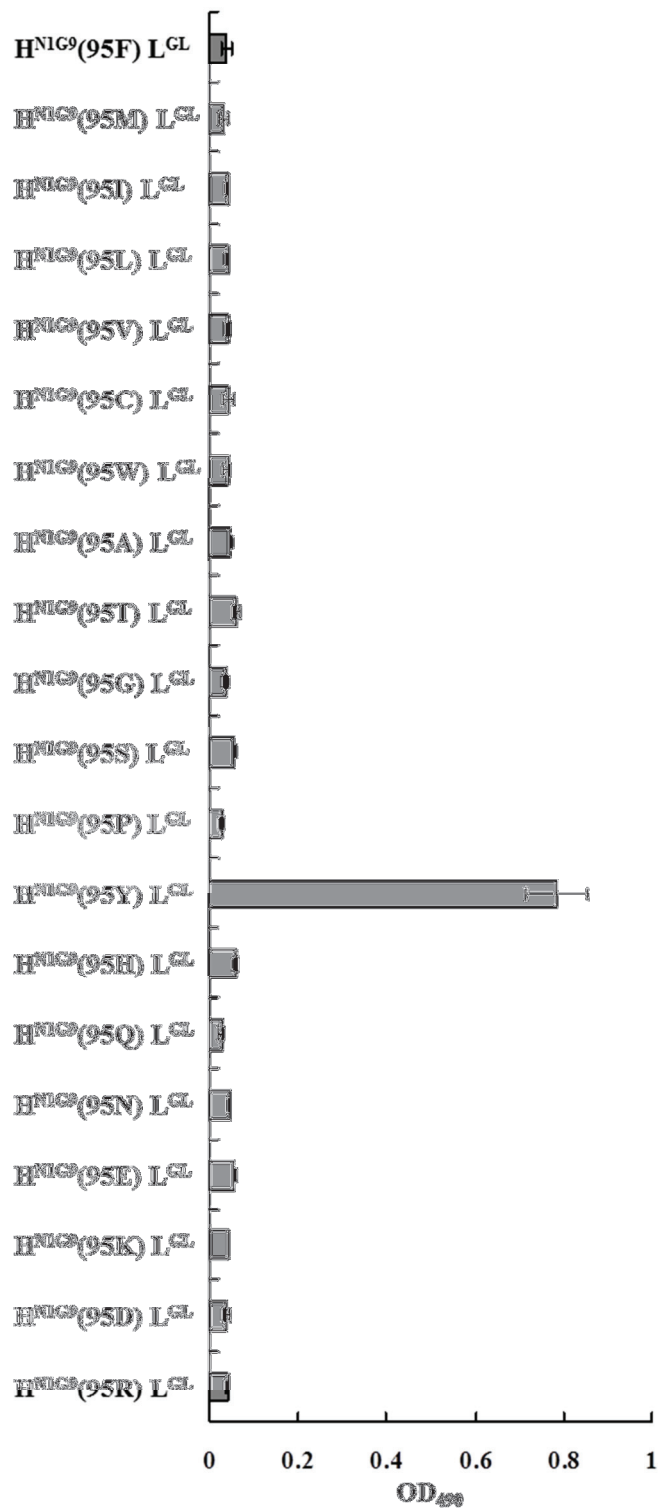


Figure 2-6 N1G9のV<sub>H</sub>95番目のアミノ酸残基が結合能に及ぼす影響

V<sub>H</sub>95番目のアミノ酸残基をそれぞれ20種類のアミノ酸残基に置換し、NP<sub>26</sub>-BSAを1.0 $\mu$ g/mlで固層したELISAプレートを用いて結合能を測定した。

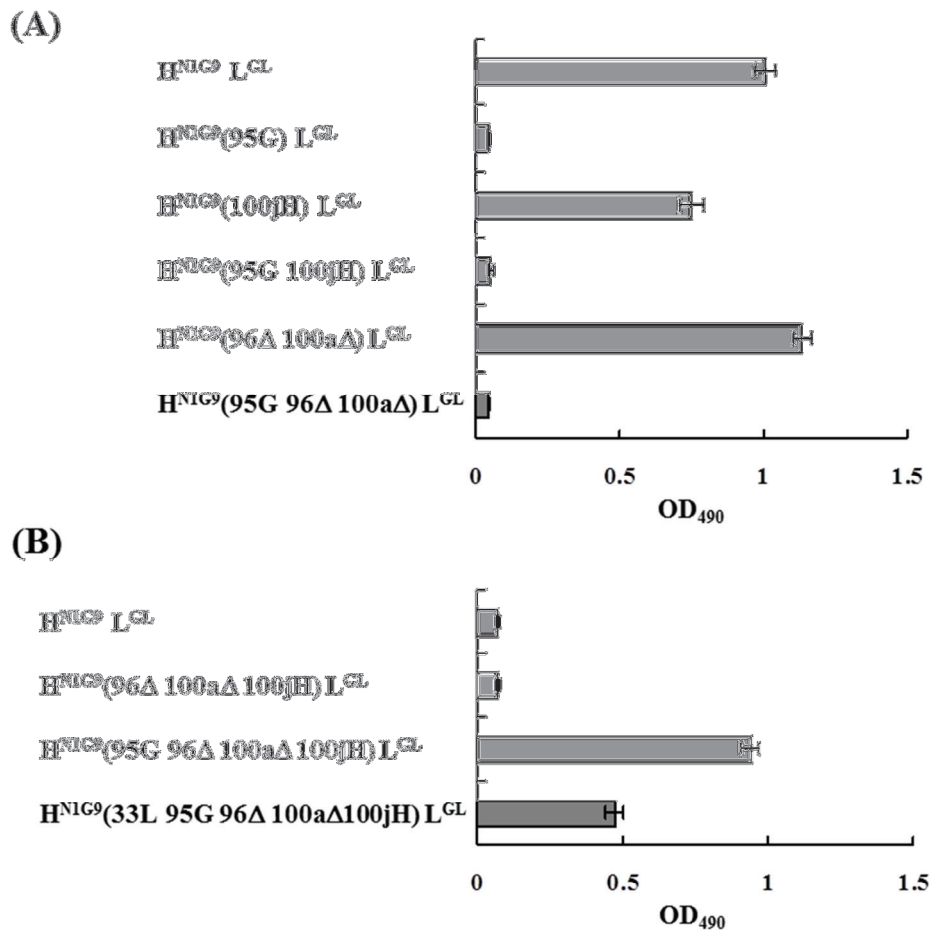


Figure 2-7 Tyr95型抗体N1G9の段階的Gly95型化

(A) H<sup>N1G9</sup>(95G)L<sup>GL</sup>はNP結合活性がない。V<sub>H</sub>100j番目のアミノ酸残基をTyrからHisに置換したH<sup>N1G9</sup>(95G100jH)L<sup>GL</sup>、V<sub>H</sub>96番目と100a番目のアミノ酸残基を欠損させたH<sup>N1G9</sup>(95G96Δ100aΔ)L<sup>GL</sup>変異体を作製し、NPに対する結合活性をNP<sub>26</sub>-BSAを1.0ug/mlで固層したELISAプレートを用いて測定した。H<sup>N1G9</sup>(100jH)L<sup>GL</sup>、H<sup>N1G9</sup>(96Δ100aΔ)L<sup>GL</sup>はTyr95型のコントロール変異体。

(B) V<sub>H</sub>100j番目アミノ酸残基をTyrからHisに置換し、さらに96番目と100a番目のアミノ酸残基を欠損させたH<sup>N1G9</sup>(95G96Δ100aΔ100jH)L<sup>GL</sup>変異体のNPに対する結合活性をNP<sub>26</sub>-BSAを1.0ug/mlで固層したELISAプレートを用いて測定した。Gly95型への変換をV<sub>H</sub>33番目のアミノ酸残基をTrpからLeuに置換したH<sup>N1G9</sup>(33L95G96Δ100aΔ100jH)L<sup>GL</sup>変異体のNPに対する結合活性をNP<sub>26</sub>-BSAを1.0ug/mlで固層したELISAプレートを用いて測定することで確認した。

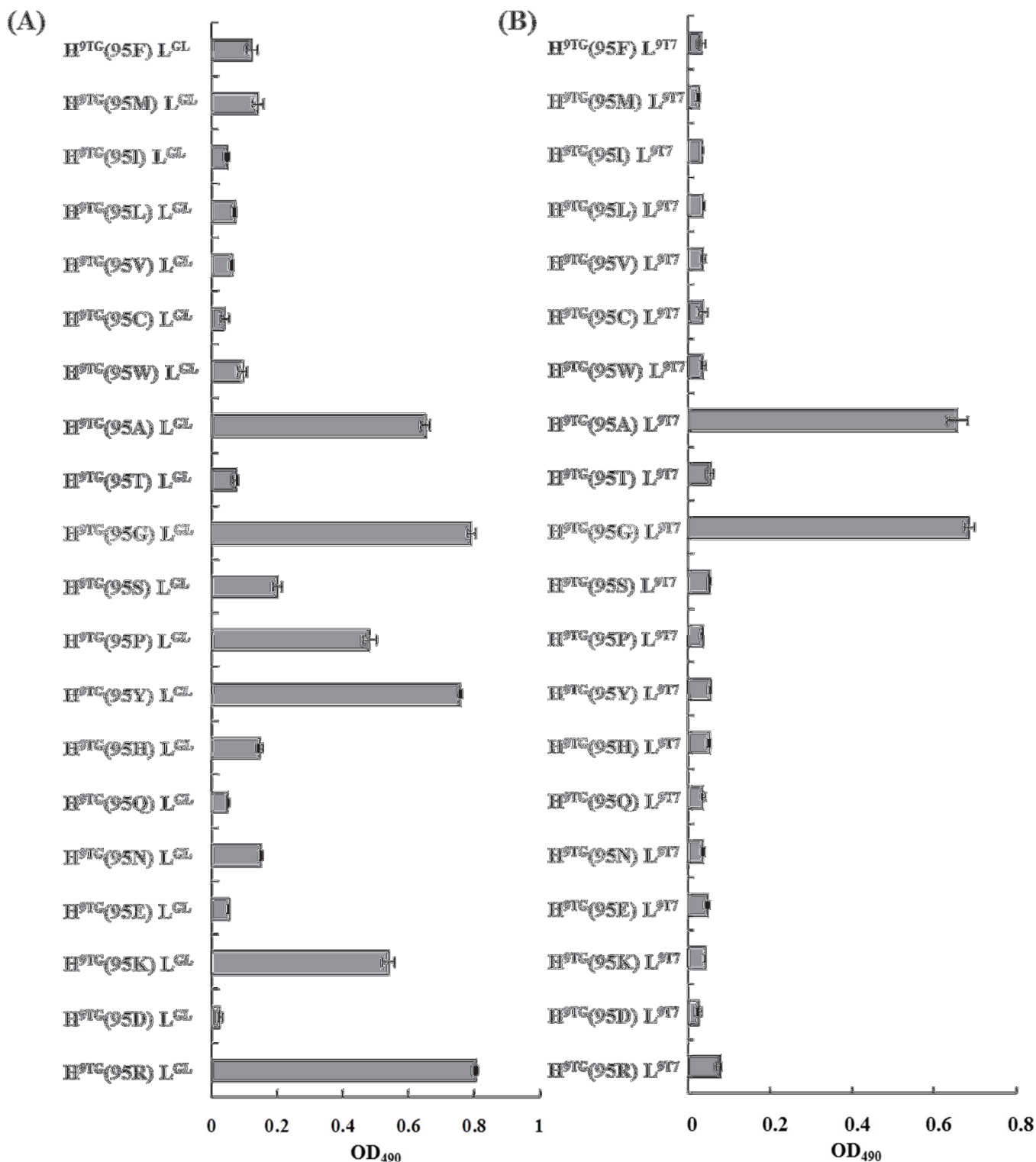


Figure 2-8 9TGのV<sub>H</sub>95番目のアミノ酸残基が結合能に及ぼす影響

(A) 9TGのV<sub>H</sub>95番目のアミノ酸残基を20種類のアミノ酸残基に置換した際のNPに対する結合活性を、NP<sub>26</sub>-BSAを1.0ug/mlで固層したELISAプレートを用いて測定した。

(B) それぞれの変異体がTyr95型かGly95型かを調べるために、Gly95型のL鎖であるL<sup>917</sup>とのペア変異体を作製し、NPに対する結合活性をNP<sub>26</sub>-BSAを1.0ug/mlで固層したELISAプレートを用いて測定した。



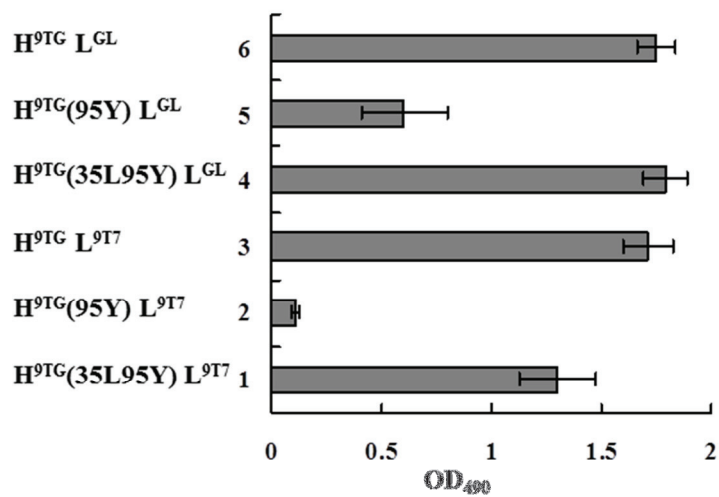


Figure 2-9 Gly95型抗体9TGのTyr95型化

9TGのV<sub>H</sub>95番目のアミノ酸残基をTyrに、V<sub>H</sub>33番目をLeuに置換した変異体と、さらにL<sup>9T7</sup>とのペア変異体のNPに対する結合活性をNP<sub>26</sub>-BSAを1.0ug/mlで固層したELISAプレートを用いて測定した。

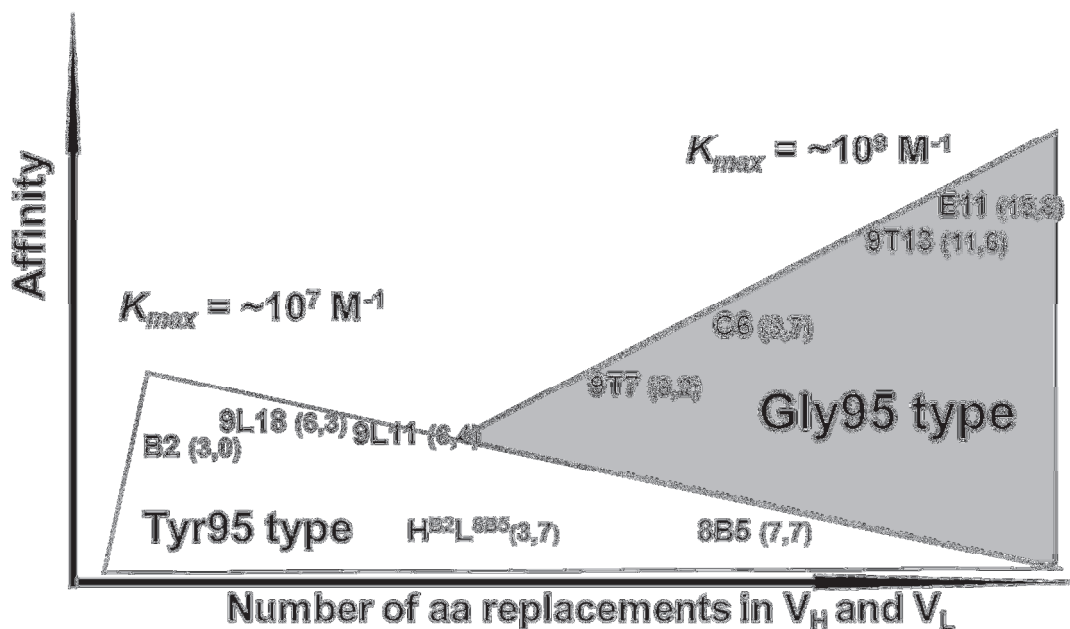


Figure 2-10 C57BL/6マウスの抗NP抗体の親和性成熟の略図

Tyr95型を白抜き三角、Gly95型灰色三角で示した。Tyr95型は免疫後初期に現れ、V<sub>H</sub>のW33Lの置換によって最高到達親和力である約 $10^7 \text{ M}^{-1}$ まで親和力が上昇する。9T11や9T18のようにV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>のアミノ酸置換によって若干の親和力上昇が見られるが、アミノ酸置換の蓄積は8B5を例とするように親和力が減少する。Gly95型は免疫後期に現れ、9T7、C6、9T13、E11で見られるように、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>にアミノ酸置換を蓄積して時間経過と共に徐々に親和力を上げ、最大到達親和力である約 $10^9 \text{ M}^{-1}$ まで上昇する。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>のアミノ酸置換数を各抗体名横に記載した。

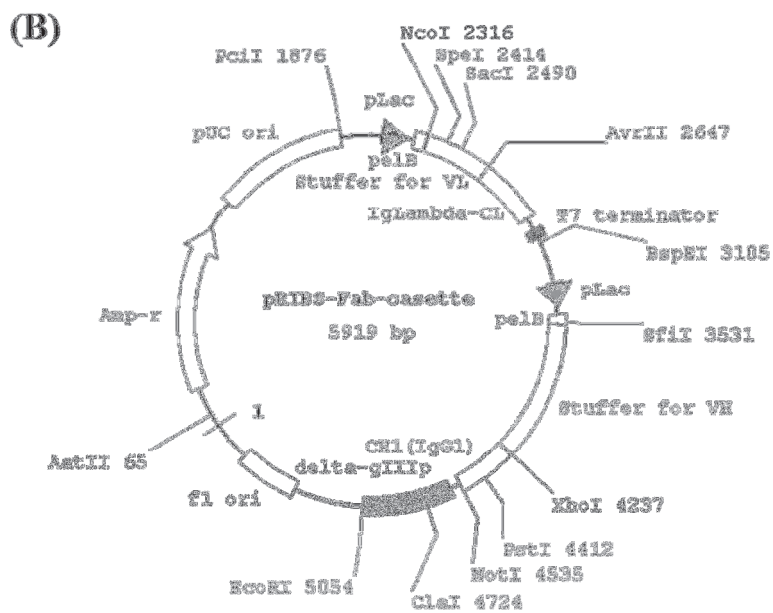
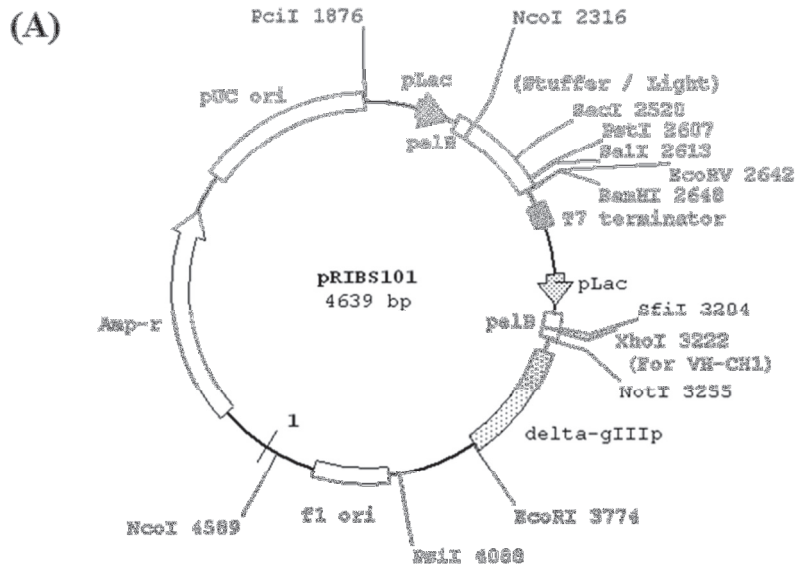


Figure 2-11 Fabファージディスプレイ用ファージミドベクター

(A) Fabライブラリー用ファージミドベクターpRIBS101のベクターマップ。

(B) 変異導入Fabライブラリー用ファージミドベクターpRIBS-Fab-cassetteのベクターマップ。

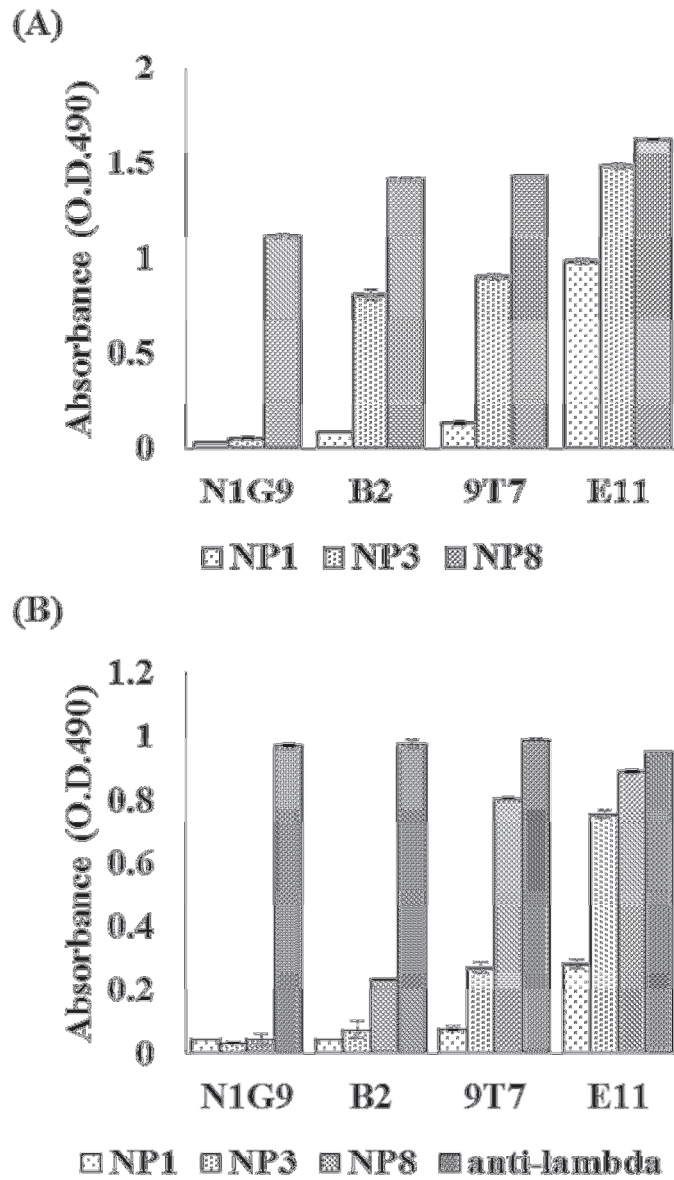


Figure 2-12 NPの価数が異なるNP-BSAに対するIgG mAbとFab発現ファージの結合  
 (A) NP<sub>1</sub>-BSA、NP<sub>3</sub>-BSA、NP<sub>8</sub>-BSAを固層したプレートを用いて抗NP IgG mAbの結合をELISAで測定した。  
 (B) NP<sub>1</sub>-BSA、NP<sub>3</sub>-BSA、NP<sub>8</sub>-BSA及び抗マウスIgλ抗体を固層したプレートを用いてFab発現ファージの結合をELISAで測定した。

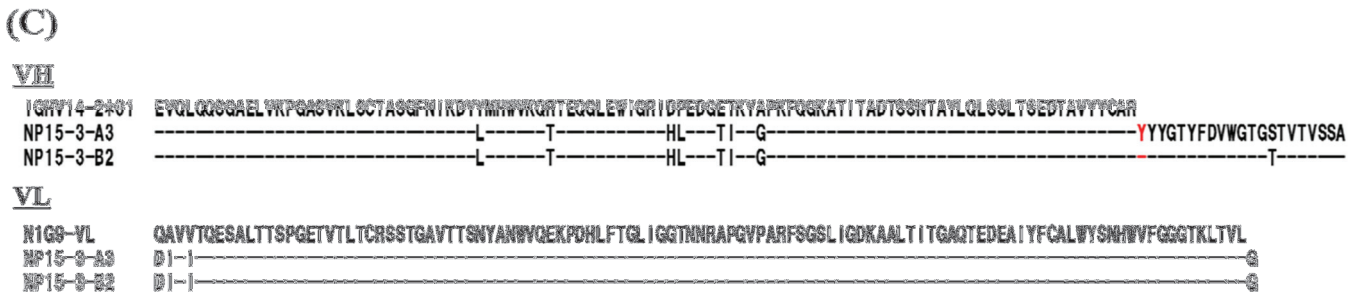
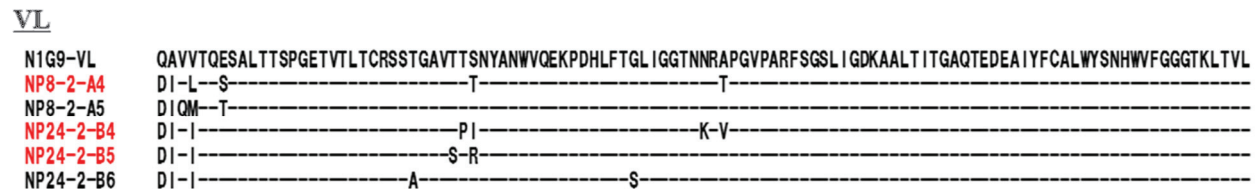
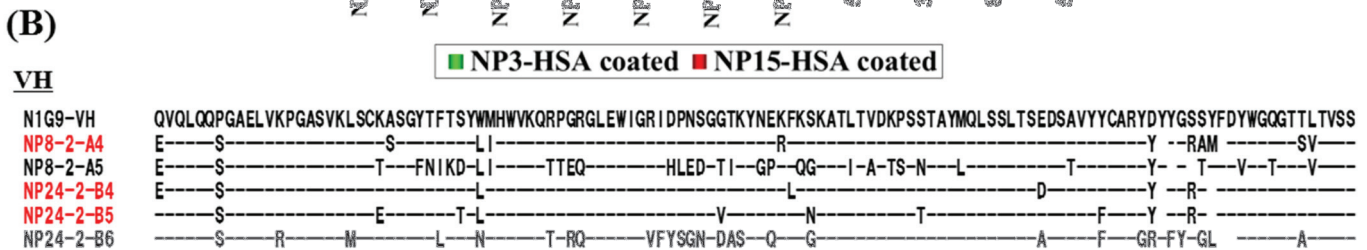
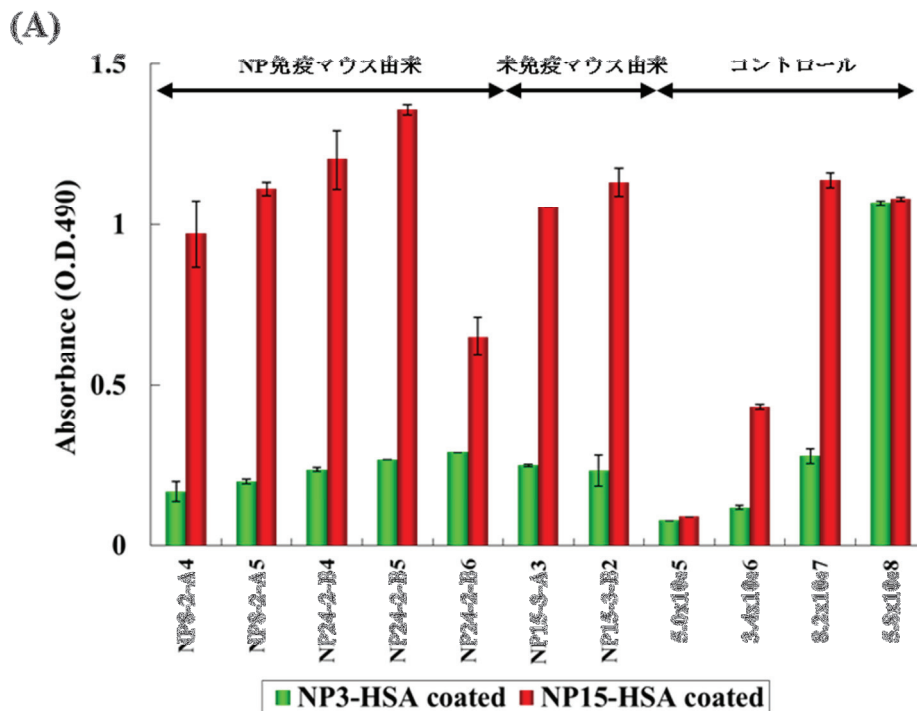


Figure 2-13 NP免疫マウスおよび未免疫マウスFabライブラリーから単離した抗NP抗体

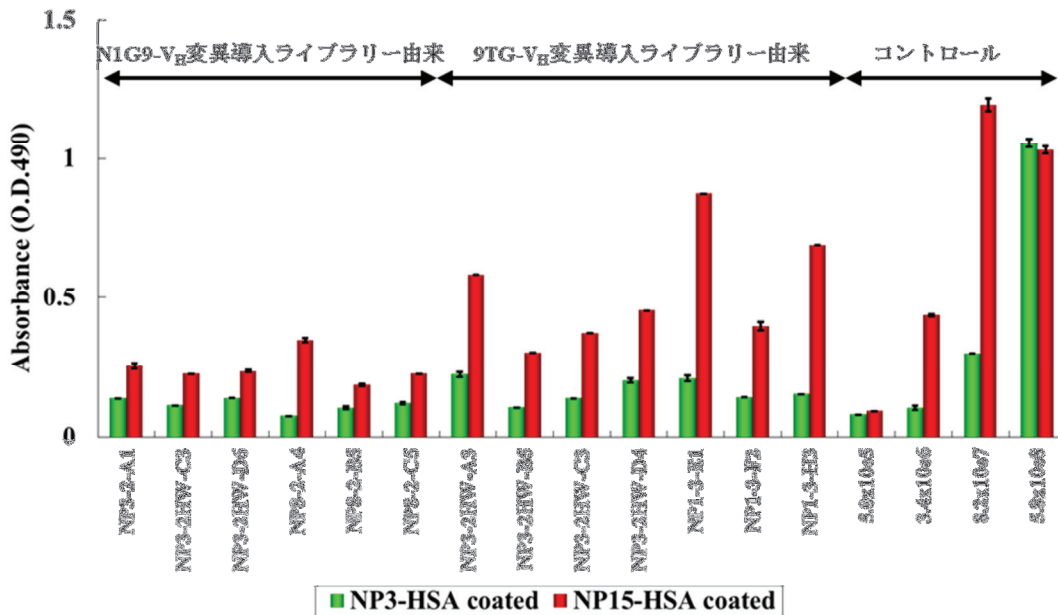
(A) NP-BSAを抗原としたパンニングによって単離したファージを、抗マウスIgA抗体固着したプレートを用いたELISAによってFab発現ファージ量を揃え、NP<sub>3</sub>-BSAおよびNP<sub>8</sub>-BSAへの結合をELISAによって測定した。その際に、抗NP mAbであり、親和性(K<sub>a</sub>)が既知である N1G9(K<sub>a</sub>=5.0x10<sup>5</sup>M<sup>-1</sup>)、B2(K<sub>a</sub>=3.4x10<sup>6</sup>M<sup>-1</sup>)、9T7(K<sub>a</sub>=8.2x10<sup>7</sup>M<sup>-1</sup>)、E11(K<sub>a</sub>=5.8x10<sup>8</sup>M<sup>-1</sup>)をFabとして発現するファージをコントロールとして用いた。

(B) NP免疫マウスFabライブラリーからNP-BSAを抗原としたパンニングによって単離した抗NP抗体のVHのアミノ酸配列と、胚細胞型抗NP抗体N1G9のアミノ酸配列の比較し、同一のアミノ酸残基を(-)で、異なるアミノ酸残基を一文字表記で示した。赤字はV<sub>H</sub>186.2で構成されたクローン。

(C) 未免疫マウスFabライブラリーからNP-BSAを抗原としたパンニングによって単離した抗NP抗体のVHのアミノ酸配列を(B)と同様に示した。



(A)



(B)



(C)

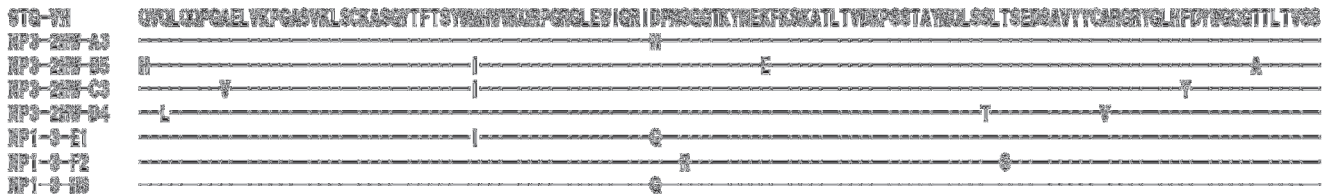


Figure 2-14 Tyr95胚細胞型N1G9とGly95胚細胞型9TGのV<sub>H</sub>に変異を導入したFabライブラリーから単離した抗NP抗体

(A) 変異導入Fabライブラリーから、NP-BSAを抗原としたパンニングによって単離したファージを、抗マウスIgA抗体固着したプレートを用いたELISAによってFab発現ファージ量を揃え、NP<sub>3</sub>-BSAおよびNP<sub>15</sub>-BSAへの結合をELISAによって測定した。その際に、抗NP mAbであり、親和性(K<sub>a</sub>)が既知であるN1G9(K<sub>a</sub>=5.0x10<sup>6</sup>M<sup>-1</sup>)、B2(K<sub>a</sub>=3.4x10<sup>6</sup>M<sup>-1</sup>)、9T7(K<sub>a</sub>=8.2x10<sup>7</sup>M<sup>-1</sup>)、E11(K<sub>a</sub>=5.8x10<sup>8</sup>M<sup>-1</sup>)をFabとして発現するファージをコントロールとして用いた。

(B) N1G9-V<sub>H</sub>への変異導入FabライブラリーからNP-BSAを抗原としたパンニングによって単離した抗NP抗体のV<sub>H</sub>のアミノ酸配列と、Tyr95胚細胞型抗NP抗体N1G9のアミノ酸配列の比較し、同一のアミノ酸残基をダッシュ(-)で、異なるアミノ酸残基を一文字表記で示した。

(C) 9TG-V<sub>H</sub>への変異導入FabライブラリーからNP-BSAを抗原としたパンニングによって単離した抗NP抗体のV<sub>H</sub>のアミノ酸配列と、Gly95胚細胞型抗NP抗体9TGのアミノ酸配列の比較し、(B)と同様に示した。



Name	Sequences	Used for
BudHs	5'-aggcggccgcacacaggacctcaccatg-3'	H chain cloning
BudHa	5'-tcctcgaggcctccaaggacactgg-3'	
BudEF-IgL-NotI-F	5'-aggcggccgcttagacctggtttgtgaattatg-3'	L chain cloning
EFLa	5'-aggcggccgcaggttagatgacctaggaac-3'	
GL(W33L)-F	5'-cttcaccagctacttgatgcaactgggtga-3'	H <sup>N1G9</sup> (33L)
GL(W33L)-R	5'-tcaccagtgcatcaagttagctggggaag-3'	H <sup>9TG</sup> (33L)
B2(L33W)-F	5'-cttcaccagctactggatgcaactgggtga-3'	H <sup>B2</sup> (33W)
B2(L33W)-R	5'-tcaccagtgcatccagttagctggggaag-3'	
9T7(W33L)-F	5'-cttcaccaactacttgatgcaactgggtga-3'	H <sup>9T7</sup> (33L)
9T7(W33L)-R	5'-tcaccagtgcatcaagttagctggggaag-3'	
9T13-W33L-F	5'-cttcacccaactacttgatgcaactgggtga-3'	H <sup>9T13</sup> (33L)
9T13-W33L-R	5'-tcaccagtgcatcaagttagctggggaag-3'	
<sup>a</sup> E11/C6-W33L-F	5'-cttccccwactacttgatgcaactgggtga-3'	H <sup>C6</sup> (33L)
<sup>a</sup> E11/C6-W33L-R	5'-tcaccagtgcatcaagttagctggggaag-3'	
9T7L-V57A-F	5'-taccacaacacgagctccaggtgttcct-3'	L <sup>9T7</sup> (57A)
9T7L-V57A-R	5'-aggaacacctggagctcgggtgttgta-3'	
L9T7-D66G-F	5'-tgccagattctcaggtcctgattggag-3'	L <sup>9T7</sup> (66G)
L9T7-D66G-R	5'-ctccaatcaggagcctgagaactcgga-3'	
<sup>a</sup> N1G9-Y95X-F	5'-cggctctattattgtgcaagannngattactacggtagtagta-3'	H <sup>N1G9</sup> (95X)
<sup>a</sup> N1G9-Y95X-R	5'-tagctactaccgtagtaaatcnnntctgcacaataatagaccg-3'	
<sup>a</sup> N1G9-Y100jX-F	5'-ttactacggtagtagcnnnttgactactggggcc-3'	H <sup>N1G9</sup> (100jH)
<sup>a</sup> N1G9-Y100jX-R	5'-ggccccagtagtcaaanngctactaccgtagtaa-3'	
<sup>a</sup> N1G9-96Δ-F	5'-tattattgtgcaagkrctactacggtagtagc-3'	H <sup>N1G9</sup> (96Δ)
<sup>a</sup> N1G9-96Δ-R	5'-gctactaccgtagtagymtctgcacaataata-3'	
<sup>a</sup> N1G9-100AΔ-F	5'-tactacggtagtyaytttgactactgg-3'	H <sup>N1G9</sup> (100aΔ)
<sup>a</sup> N1G9-100AΔ-R	5'-ccagtagtcaaartractaccgtagta-3'	
<sup>a</sup> 9TG-G95X-F	5'-cggctctattattgtgcaagnnnagataggtcttcttga-3'	H <sup>9TG</sup> (95X)
<sup>a</sup> 9TG-G95X-R	5'-tcaaagtgaagaccatattcnnnctgcacaataatagaccg-3'	

Table 2-1 変異抗体作製用オリゴプライマー

<sup>a</sup> ディジェネレートプライマー。k=G or T, m=A or C, n=A, C, G or T, r=A or G, w=A or T, y=C or T。

mAb	$K_a(M^{-1})$	$\Delta G^{\circ}$ (kcal $M^{-1}$ )	$\Delta H$ (kcal $M^{-1}$ )	Mutation (%)
H <sup>9TG</sup> L <sup>9TG</sup> (9TG)	$1.1 \pm 0.1 \times 10^6$	-10.6	$-8.4 \pm 0.5$	0
H <sup>9TC</sup> L <sup>9TC</sup>	$4.8 \pm 0.5 \times 10^6$	-11.5	$-8.5 \pm 0.1$	38
H <sup>9TG</sup> L <sup>9T7</sup>	$2.0 \pm 0.3 \times 10^7$	-12.3	$-10.3 \pm 0.1$	71
H <sup>9TC</sup> L <sup>9T7</sup>	$6.0 \pm 2.5 \times 10^7$	-13.0	$-11.1 \pm 0.2$	100
H <sup>9T8</sup> L <sup>9T8</sup> (9T8)	$4.5 \pm 1.0 \times 10^7$	-12.8	$-11.0 \pm 0.1$	92

Table 2-2 NP-CapとmAbの結合における熱力学パラメーター

Mutation(%)は9TGと比較した際の $\Delta G^{\circ}$ の負への増加を評価した値として求めた。9TGとH<sup>9TC</sup>L<sup>9T7</sup>の違いを100%と規定した。

Type	# of sequence compared <sup>a</sup>	# of replacements <sup>b</sup>		Frequency (mutation/residue) <sup>c</sup>		Relative frequency of mutations (V <sub>H</sub> /V <sub>L</sub> )
		V <sub>H</sub>	V <sub>L</sub>	V <sub>H</sub>	V <sub>L</sub>	
Gly95	14	200	67	0.145	0.043	3.3
Tyr95	12	78	24	0.066	0.018	3.6

Table 2-3 Tyr95型抗体とGly95型抗体のSHMによるアミノ酸置換頻度の比較

a Furukawa et al. (1999)のアミノ酸配列を元に比較した。比較したアミノ酸残基はV<sub>H</sub>が98残基、V<sub>L</sub>が110残基。

b 比較したアミノ酸残基の合計は、Gly95型のV<sub>H</sub>が98x14=1372、V<sub>L</sub>が110x14=1540、Tyr95型のV<sub>H</sub>が98x12=1176、V<sub>L</sub>が110x12=1320。

c Frequencyはアミノ酸置換数を全アミノ酸残基数で割ることで求めた。





## 第五章

### 二次免疫応答における低親和性 IgM 抗体の生産と役割

#### 5-1 研究背景及び目的

naïve B 細胞が B-cell receptor (BCR) を介して T 細胞依存性抗原を認識し、T<sub>h</sub> 細胞から補助を受け取った際に、それらの細胞は活性化して増殖・分化する。いくらかの細胞は濾胞外部へ移行し、短命なプラズマ細胞(PC)へと分化する(62)。これらの細胞は、胚細胞型で比較的低親和性の IgM 抗体や IgG 抗体を分泌する。また、いくらかの細胞は濾胞に移行して、体細胞突然変異(SHM)やクラススイッチ(CSR)の場である胚中心(GC)を形成する(63-65)。SHM と CSR は共に activation-induced cytidine deaminase (AID) 依存的である(6)。

胚中心において、SHM により BCR の親和性が高まった B 細胞は、濾胞樹状細胞に提示された抗原によって選択されて胚中心を離れる。自己反応性を獲得した B 細胞や、抗原に対する親和性を失った B 細胞は消失する(66、67)。抗原選択を受けた B 細胞は胚中心を離れた後、骨髄に存在する長寿命な PC へと分化するか(68、69)、記憶 B 細胞へと分化する。再度同じ抗原と遭遇した際には、主として記憶 B 細胞が反応して PC へと分化する。よって、親和性成熟し、かつ、クラススイッチした抗体が二次免疫応答において豊富に存在する。既に、抗 NP IgG 抗体の親和性成熟やレパートリーの変化について、数多くの研究結果が報告されている(16、71)。C57BL/6 マウスの産生するカノニカルな抗 NP 抗体は V<sub>H</sub>186.2 遺伝子断片とλ鎖で構成されており(16、71)、その H 鎖 95 番目のアミノ酸残基のほとんどがチロシン残基(Tyr)かグリシン残基(Gly)である(Kabat の抗体アミノ酸残基番号を使用(72))。V<sub>H</sub>95 番目が Tyr である Tyr95 型抗体は初期免疫で高頻度に見つかり、V<sub>H</sub>95 番目が Gly であり 100j 番目が His である Gly95(H)型抗体は二次免疫応答で高頻度に出現する(70、73)。Tyr95 型抗体は、V<sub>H</sub>33 番目のアミノ酸残基をトリプトファン残基(Trp)からロイシン残基(Lue)に置換する W33L 変異だけで、親和性を約 10 倍上昇させることができる(74-76)。Gly95(H)型抗体は H、L の両鎖へ複数の変異を蓄積することで親和性を上昇させることから、親和性成熟過程は低速であるが胚細胞型抗体と比較して 1000 倍以上も親和性を上昇させることができる。つまり、免疫応答の初期に Tyr95 型は迅速な成熟が可能なことで多く見られ、Gly95(H)型抗体は高い進化能力によって、競合を勝ちぬいてくると考えられる。前述した様に、抗 NP IgG 抗体の親和性成熟は、胚中心依存的な過程による SHM により高い親和性を獲得することができた記憶 B 細胞の産生に深く関与している。V<sub>H</sub>95 番目のアミノ酸

残基による SHM の導入や抗体進化能力の決定は、IgG<sup>+</sup>記憶 B 細胞の産生によって非常に重要な因子である。

以前、記憶 B 細胞は胚中心依存的過程によってのみ産生されると思われていたことから、クラススイッチし、抗体遺伝子に SHM を有するものと定義されていた。しかしながら近年、BCR イソタイプや SHM の発現が異なるといった、記憶 B 細胞の不均一性が報告され(77-79)、IgM<sup>+</sup>記憶 B 細胞の存在や(80-83)、GC 非依存的な過程で産生されることなども報告された(84、85)。IgM 抗体は初期免疫の早期に分泌され、IgG 抗体よりも親和性が低いと考えられている。さらに、IgM<sup>+</sup>記憶 B 細胞と IgG<sup>+</sup>記憶 B 細胞で SHM の導入数が異なることが報告されており(78、86)、二次免疫応答における IgM 抗体と IgG 抗体は異なる可能性がある。よって、抗体産生において IgM<sup>+</sup>記憶 B 細胞がどのように関与しているのか、また、初期免疫と二次免疫において IgM 抗体が構造的・機能的に異なっているのかを調べることは興味深い。そこで、C57BL/6 マウスと AID 欠損マウスから抗 NP IgM 抗体産生ハイブリドーマを作製し、抗体構造と親和性を解析した。さらに、補体依存性的赤血球溶血活性を基準に、IgM の親和性と機能についての解析を行った。

## 5-2 結果

「二次免疫応答時の IgM 抗体レパートリーは IgG 抗体レパートリーと異なる」

NP-CGG を免疫したマウスの脾臓細胞をミエローマ細胞と融合することでハイブリドーマを作製し、抗 NP 抗体の産生を ELISA によりスクリーニングした。初回免疫後 7 日目で 30 クローン、14 日目で 10 クローンが得られ、そのうち 3 クローンは  $\kappa$ 鎖を有しており、残りは  $\lambda$ 鎖であった。 $\lambda$ 鎖を有するクロンの V 領域遺伝子配列を RT-PCR で増幅して解析したところ、24 クローンがカノニカルな遺伝子である  $V_H186.2$  遺伝子であり、6 クローンが  $V_H186.2$  に近縁な遺伝子であった。残り 7 クローンは RT-PCR による増幅が見られなかったことから、 $V_H186.2$  と無縁な遺伝子であると考えられる。 $V_H186.2\lambda$  を有するクロンのうち、IgM は 7 クローンであり、IgG は 17 クローンであった (Table 3-2)。抗体レパートリーにおける SHM と CSR の影響を解析するために、免疫した AID 欠損マウスからも同時にハイブリドーマを作製したところ、7 日目で 19 クローンの抗 NP IgM 抗体産生クローンが得られ、14 日目で 5 クローンが得られた。塩基配列解析の結果、8 クローンは  $V_H186.2\lambda$  を有するクローンであり、遺伝子使用頻度に関して AID 欠損による影響は無かった。初回免疫と二次免疫における抗体レパートリーを比較するために、追加免疫 3 日後にハイブリドーマを作製した。C57BL/6 マウスからは、17 クローン得られ、そのうち 15 クローンは  $\lambda$ 鎖を有し、さらにその中の 13 クローンは  $V_H186.2$  遺伝子を発現していた。この 13 クローン中 6 クローンは IgM、7 クローンは IgG であった。追加免疫した AID 欠損マウス由来のハイブリドーマは 21 クローン得られ、そのうち 9 クローンは  $V_H186.2\lambda$  を有するクローンであった。

得られたクロンのうち、 $V_H186.2\lambda$  を有するクロンの構造的特徴を Table 3-3 と 3-4 に、アミノ酸配列を Figure 3-1 と 3-2 に示した。さらにこれらを、抗 NP 抗体の親和性成熟過程の決定に重要なアミノ酸残基によって、4 つの型に分類分けした。 $V_H95$  番目が Tyr である Tyr95 型、さらに親和性が上昇した Tyr95 型で頻繁に見られる Tyr95W33L 型、 $V_H95$  番目が Gly であり 100j 番目が His である Gly95(H)、そして、Tyr でも Gly でもないクローンを X95 型とした (Fig. 3-3)。免疫後 7 日目と 14 日目で C57BL/6 マウスから得られた全ての IgM mAb と、17 クローン中 15 クローンの IgG mAb の  $V_H95$  番目のアミノ酸残基は Tyr であった。1B6 は  $V_H95$  番目が Gly であるが、100j 番目が His でないことから X95 型と考えられる。この結果から、初期に出現する抗 NP 抗体のレパートリーは H 鎖のイソタイプに関係なく、Tyr95 型と Tyr95W33L 型が 92% 存在しており主要な構成成分であると言える。免疫後 7 日目と 14 日目の AID 欠損マウ



ス由来の抗 NP 抗体の構造的特徴は、IgM mAb のみしか生産しないことを除いて本質的に同様であり、8 クローンのうち 6 クローンは Tyr95 型であり、残りは Gly か Asp であった。AID 欠損マウスは SHM が起こらないことから、これら V<sub>H</sub>95 番目のアミノ酸残基の違いは SHM によるものではないと言える。

頻度は低いものの、7 日目で得られた IgM mAb で SHM を有するクローンがあった。1B366 は V<sub>H</sub> に 3 つのアミノ酸置換があり、1B269 は V<sub>L</sub> に 1 つ置換があった。一方、以前に報告されている通り (10.14.35.36)、7 日目の IgG には全くアミノ酸置換が見られない。14 日目で得られた全ての IgG mAb の V<sub>H</sub>95 番目は Tyr であり、そのうち 2 クローンは W33L 変異を有していた。また IgM mAb でも 1 クローンで W33L 変異が観察されたことから、この時期までに胚中心において親和性を基準とした選択が行われていることが示唆される。予想通り AID 欠損マウス由来のクローンに SHM は見受けられなかった。

二次免疫後の C57BL/6 マウスから得られた IgG mAb は 7 クローン中 4 クローン、57% が Gly95(H)型であった。この型の mAb は V<sub>H</sub> と V<sub>λ</sub>両方に SHM による複数のアミノ酸置換が見られ、全てのクローンで V<sub>H</sub>58 番目が Lys から Arg に置換されていた(16)。他の 3 クローンの V<sub>H</sub>95 番目は Tyr であり、2 クローンは W33L 変異を有していたが、1 クローンは全く SHM を有していなかった。以前の報告(11)にもあったように、多くの SHM が蓄積した Gly95 型が二次免疫応答における IgG の主要な型であった。一方、追加免疫後の IgM mAb には SHM によるアミノ酸置換が起こっておらず、初回免疫後の IgM 抗体においても、二次免疫後の IgG mAb においてもほとんど得られることの無い X95 型が存在した。これらの結果は、C57BL/6 マウスの二次免疫応答における IgG 生産する B 細胞集団と IgM を生産する集団が異なっていることを示している。AID 欠損マウス由来の 9 クローン中 4 クローンの V<sub>H</sub>95 番目が Gly であったが、100j 番目は His ではないことから X95 型である。これは、Gly95(H)型抗体の出現は CSR と SHM に依存していることを示唆する。C57BL/6 マウス同様 AID 欠損マウスにおいても、初回免疫と二次免疫で異なる B 細胞集団が関与していた。

#### 「低親和性 IgM を測定する NP 価数の異なる抗原を用いた ELISA」

NP 依存的に選択される IgM レパートリーの変化を、親和性を基準として解析するために、相対的親和性を測定する系の確立を目指した。NP-CGG を免疫して得られた多くの IgM mAb の親和性は低すぎて、ITC では測定不能であったため、ELISA を用いた相対的親和性測定を検討した。異なる NP 価数の NP-BSA を抗原として固着したプレートを用い、抗体の結合比を算出することで IgG 抗体の親和性を予測する簡易な手法は広く用いられている(91、92)。N1G9 は



Tyr95 胚細胞型の IgG<sub>1</sub> で NP-Cap に対する親和性は  $K_a=5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  である。B2 は W33L 変異を有する親和性成熟した IgG<sub>1</sub> であり  $K_a=3.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  である。これら親和性が既知である 2 種類の IgG 抗体の  $V_H\text{-}D\text{-}J_H$  遺伝子を  $C\mu$  遺伝子と PCR で接続し、胚細胞型  $\lambda 1L$  鎖を恒常的に発現する J558L 細胞に形質導入することでリコンビナント IgM を作製し(88)、それぞれ N1G9-IgM、B2-IgM と命名した。NP<sub>2</sub>-BSA と NP<sub>26</sub>-BSA を固層したプレートを用いた際の吸光度を測定し、NP<sub>Lo</sub>/NP<sub>Hi</sub> の結合比を検討したところ、IgG である N1G9 の結合比は 0 に近く、B2 は 0.6 であった(Fig. 3-4-A)。この結果は、B2 は N1G9 よりも相対的に高い親和性を有していることを示しており、予想通りであった。一方、N1G9-IgM の結合比は B2-IgM とほぼ等しく約 1 であった。これは、N1G9-IgM 以上の親和性を有する IgM は、10 個の抗原結合部位を有することによる高い avidity 効果により同じ結合比になることを示している(93)。N1G9 および N1G9-IgM は ITC で NP-Cap に対する親和性を測定した結果、 $K_a=5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  であったが、NP-CGG を免疫して得られた多くの IgM mAb は、親和性が低すぎることによって ITC 測定が不可能であった。つまり、これらの IgM 抗体は N1G9-IgM よりも親和性が低い。よって、それらの相対的親和性を ELISA で測定できる条件を検討した。N1G9-IgM を含む 5 種類の IgM 抗体を選択し、異なる NP 価数の NP-BSA への結合を測定した(Fig. 3-4-B)。N1G9-IgM では NP の価数による変化がほとんど観察されないが、1A236、1A8、8A507 では 6 以上の価数の際には多く結合し、NP<sub>1</sub>-BSA や NP<sub>2</sub>-BSA への結合性は減少する。1A32 は NP<sub>8</sub>-BSA でも十分な結合性を示さない。しかしながら、NP<sub>26</sub>-BSA には全ての抗体が同様に結合することが出来た。これらの結果は、NP<sub>2</sub>-BSA(NP<sub>Lo</sub>-BSA)では親和性依存的に結合するが、20 以上の価数(NP<sub>Hi</sub>-BSA)では親和性に関係なく結合できることを示している。続いて、IgM 抗体濃度についても検討した。NP<sub>2</sub>-BSA への結合は、N1G9-IgM は濃度上昇と共に結合量が増加するが、1A32 では  $10 \mu\text{g M}^{-1}$  でも若干の増加に止まった(Fig. 3-4-C)。しかしながら、NP<sub>26</sub>-BSA への結合は、全ての IgM 抗体で濃度による違いはほとんど観察されなかった(Fig. 3-4-D)。すなわち、N1G9-IgM よりも低親和性の IgM 抗体は、抗体濃度  $1 \mu\text{g M}^{-1}$  に揃えて NP<sub>Lo</sub>/NP<sub>Hi</sub> の結合比を求めることで、相対的親和性を測定できることが分かった。

#### 「二次免疫応答における超低親和性抗 NP IgM 抗体の高頻度な出現」

初回免疫 7 日目に得られる抗 NP IgG mAb の NP<sub>Lo</sub>/NP<sub>Hi</sub> の結合比は 0~0.3 であり、14 日目では W33L 変異により結合比の上昇が確認される(Fig. 3-5-A)。さらに、2 クローンを除いて追加免疫後にはほとんどの mAb で 0.7 以上になり、7

日目よりも親和性が上昇することから、免疫応答において親和性成熟した IgG 抗体が選択されていることが分かる。抗 NP IgM mAb の相対的親和性を測定し、 $NP_{Lo}/NP_{Hi}$  の結合比が 0.2 を超えるものを  $NP_{Lo}^+$  と表し、0.2 以下のものを  $NP_{Lo}^-$  として解析すると、ほとんどのクローンが  $NP_{Lo}^+$  であったが、N1G9-IgM よりもは低親和性であった。初回免疫応答での C57BL/6 マウス(Fig. 3-5-B)と AID 欠損マウス由来(Fig. 3-5-C)の IgM mAb は  $V_H95$  番目が Arg である 1A376 を除いて  $NP_{Lo}^+$  であった。つまり、92%(12/13)の IgM mAb が  $NP_{Lo}^+$  であった。一方、追加免疫後の C57BL/6 マウス由来の IgM は 50%が  $NP_{Lo}^-$  であり、IgG mAb とは異なり、IgM mAb の相対的な親和性は上昇せず、反対に減少していた。56 日目で得られた 6 クローン中 2 クローンは X95 型 IgM であり、どちらも  $NP_{Lo}^-$  であった。追加免疫後の AID 欠損マウス由来のクローンは、57%(4/7)が  $NP_{Lo}^-$  であった。8A38 と 8A303 の  $V_H95$  番目は Gly であるが、100j 番目は His ではなく、相対的親和性は  $NP_{Lo}^-$  に分類される。変異を有さない Gly95(H)型の 1A350 の親和性は Tyr95 型と同等であることから、8A38 と 8A303 は X95 型であると言える。 $NP_{Lo}^+$  の IgM mAb は Tyr95 型が多く、X95 型は  $NP_{Lo}^-$  であり SHM を有さない。しかしながら、8B668、8A507、8A307 は Tyr95 型であるが  $NP_{Lo}^-$  に分類されることから、 $NP_{Lo}^+$  と  $NP_{Lo}^-$  は単純に  $V_H95$  番目のアミノ酸残基だけでは説明できない。

「二次免疫応答時、SHM のない X95 型抗体産生 IgM<sup>+</sup> PC が高頻度に存在する」

二次免疫応答時の超低親和性 X95 型 IgM 抗体の高頻度な出現は予想外であった。そこで、in vivo で再確認した。二次免疫応答時の血清中抗 NP IgM は初期免疫応答時よりも、相対的親和性が低く(Fig. 3-6)、二次免疫応答によって超低親和性 IgM 抗体が産生されていることを示している。X95 型の出現を確認するために、免疫マウスの脾臓から、PC を単離して  $V_H$  遺伝子を解析した。脾臓から磁気ビーズを使用して PC を濃縮後、IgM<sup>+</sup> Igλ<sup>+</sup> PC と、IgM<sup>+</sup> Igλ<sup>+</sup> PC を FACS により分取し(Fig. 3-7-A)、 $V_H186.2$  遺伝子を PCR で増幅後にクローニングして解析した。重要なアミノ酸残基と SHM 数の詳細を Table 3-5 ~ 3-7 に示し、Fig. 3-7-B、3-7-C にまとめた。初期免疫応答(7 日目)で IgM<sup>+</sup> の全ての  $V_H$  遺伝子と、クラススイッチ後で IgM<sup>+</sup> の 17/19 は Tyr95 型であり、SHM を有していなかった。この結果は、ハイブリドーマの解析と類似している。追加免疫 3 日目と 5 日目に解析したクラススイッチ後の PC の  $V_H$  レパートリーは、54%(35/65)が W33L 変異を有する Tyr95 型であった。5 日目からは、複数の SHM を有する Gly95(H)型も見つかった。高親和性成熟した後にみられるアミノ酸配列の出現もまた、IgG 産生ハイブリドーマと類似していた。ハイブリドーマ作製のタイ

ミングと同じ、追加免疫 3 日後の IgM<sup>+</sup> IgI<sup>+</sup> PC の V<sub>H</sub> レパートリーを解析したところ、32%(6/19)が X95 型で SHM を有していなかった。5 日目では、W33L 変異を含むより多くの SHM を有するクローンが得られた。つまり、二次免疫応答において、SHM を有さない X95 型 IgM 抗体と親和性成熟した IgM 抗体が産生されていた。単一細胞での解析でないことから、L 鎖のアミノ酸配列の情報を得ておらず、親和性に関しては言及することが出来ない。V<sub>H</sub> 遺伝子に SHM を有さないクローンは、L 鎖にも SHM を有しないと仮定して胚細胞型 Igλ 鎖とのペアでリコンビナント IgM 抗体を発現させて解析した。初回免疫後 7 日目から得た Tyr95 型 IgM のうち、90%(9/10)が NP<sub>Lo</sub><sup>+</sup>であり (Fig. 3-8-A)、二次免疫後に得られたクローンの 50%(7/14)が NP<sub>Lo</sub><sup>-</sup>であった (Fig. 3-8-B)。X95 型 IgM は低親和性であり、そのうち 2 クローンは NP<sub>Lo</sub><sup>+</sup>であるが結合比は低かった。つまり、二次免疫応答においてハイブリドーマの解析で見られた SHM を有さない超低親和性 IgM 抗体は、in vivo でも生産されていた。

「低親和性 IgM mAb は高い補体依存的溶血活性を有する」

IgG の親和性成熟と異なり、超低親和性 IgM が二次免疫応答時に産生されることは驚きであった。この様な超低親和性 IgM 抗体に生物学的防御の役割があるかを、親和性と機能に注目して解析した。IgM が有する重要な機能の一つが、補体系の古典経路を活性化することである。よって、NP 化したヒツジ赤血球 (SRBC) を作製し、ウサギ血清を補体成分とした補体依存的溶血活性を測定することにした。NP の価数が十分高い際には全ての IgM 抗体が NP-SRBC に結合することが FACS での解析から分かった。溶血反応にとって、NP-SRBC に結合した IgM 量は決定的な要因であることから、蛍光強度 (geometric means) が同じになるように、それぞれの IgM 濃度を調節して結合量を揃えた上で (Fig. 3-9-A)、溶血活性を測定した。興味深いことに、高親和性の抗体ほど溶血活性化能が低かった (Fig. 3-9-B)。つまり、溶血活性化能は NP<sub>Lo</sub>/NP<sub>Hi</sub> 結合比 (親和性) と反比例していた (Fig. 3-9-C)。しかし、低価数の NP-SRBC を用いた際には、超低親和性 IgM 抗体は結合できず溶血活性が無いが、高親和性 IgM 抗体は溶血活性がある (Fig. 3-9-D)。これらの結果は、二次免疫応答時に低親和性 IgM 抗体が分泌され、抗原エピトープの密度が高い際に、高親和性 IgM 抗体よりも高い補体活性化能を有していることを示している。

### 5-3 考察

クラススイッチした記憶 B 細胞は二次免疫応答において、IgG の親和性成熟とレパートリー変化に重要である。近年の研究により、B 細胞記憶における IgM<sup>+</sup> 記憶 B 細胞の存在や SHM を有さない記憶 B 細胞の存在が明らかになってきた。また、胚中心において抗原依存的な選択により親和性成熟記憶 B 細胞が生産されることに加えて、胚中心非依存的な過程での記憶 B 細胞の産生も明らかになってきた(85)。いくらかの IgM<sup>+</sup> 記憶 B 細胞の V<sub>H</sub> 遺伝子で SHM が見つかったものの、ほとんど全ての IgM<sup>+</sup> 記憶 B 細胞は SHM を有さない(94)。さらに、T 細胞非依存的抗原によっても記憶 B 細胞が生産され(95)、Marginal-zone B 細胞や(96)、B1b 細胞(97)が IgM<sup>+</sup> 記憶 B 細胞の産生に関与していることが示されている。

免疫応答における抗体レパートリーを比較するために、免疫後の異なる時間において作製したハイブリドーマと、脾臓から単離した PC の抗体遺伝子配列を解析した。また、抗体の生物学的重要性を解明するためには、遺伝子配列に加えて機能解析が重要であることから、親和性と補体活性化能を合わせて解析した。免疫 7 日目のほぼ全ての抗 NP IgG 産生ハイブリドーマは Tyr95 型であった。これらの V<sub>H</sub> 遺伝子に SHM はないことから、胚中心の関与が無い naïve B 細胞から直接分化したと考えられる。同様に、クラススイッチ後の PC の V<sub>H</sub> 遺伝子にも SHM が無い Tyr95 型であったことから、ハイブリドーマのレパートリーは、in vivo で産生される抗体レパートリーを反映していることを示している。免疫後 14 日目で作製した IgG mAb のうち 2 クロームは Tyr95W33L 型であり、NP に対する親和性が上昇していたことからこの時点で既に、胚中心で親和性を基準とした選択が行われていることが示唆される。追加免疫後に得られた IgG mAb で、Tyr95W33L 型や SHM が複数蓄積した Gly95(H)型の親和性成熟したタイプの出現頻度が高まり、ELISA によって親和性も上昇していることが確認されることから、これらは胚中心依存的な記憶 B 細胞由来であると考えられる。追加免疫後に得られたクロームの中で、2 クロームの親和性が低かった。8B529 は W33L 変異を有するが、その他にも複数の SHM を有しており、前記したように Tyr95 型にみられる過剰な SHM により親和性が低下したと考えられる。8B550 は SHM のない胚細胞型であったことから、胚中心非依存的な記憶 B 細胞由来であると思われる。追加免疫後 5 日目のクラススイッチした PC の V<sub>H</sub> では多くの Tyr95W33L 型と Gly95(H)型抗体が高頻度に出現する。つまり、ハイブリドーマで見られるような親和性成熟した IgG 抗体が in vivo で生産されていることが分かる。一方、ハイブリドーマと異なる点として、クラススイッチした PC では W33L 変異を有さない Tyr95 型がより多く見受けられるが、



L鎖の同定が困難であることから、親和性については不明である。

IgG レパートリーと類似して、初期免疫後 7 日目で得られたほとんどの IgM mAb は SHM を有さない Tyr95 型であり、IgM<sup>+</sup> PC もまたすべてが Tyr95 型であった。これらの結果は、同じ naïve B 細胞集団が、胚中心を通らずに IgM PC と IgG PC へと分化するように選択されていることを示している。SHM を有する IgM mAb は胚中心に入り、クラススイッチすることなく SHM を得ていると思われる。追加免疫後の IgM レパートリーはこれと異なり、SHM を全く有さない Tyr95 型や X95 型であった。多くの Tyr95 型 IgM mAb は SHM を有さなくても、相対的に高い親和性(NP<sub>Lo</sub>/NP<sub>Hi</sub> 結合比)の NP<sub>Lo</sub><sup>+</sup>であるが、X95 型は非常に親和性が低い NP<sub>Lo</sub>である。免疫後 3 日目で得られた PC の V<sub>H</sub> 遺伝子には SHM を有さない X95 型が多く存在し、リコンビナント IgM を作製して親和性を測定したところ、初期免疫応答時の Tyr95 型 IgM レパートリーよりも相対的親和性が低い。IgG 産生ハイブリドーマで X95 型の V<sub>H</sub> 遺伝子が得られない理由の一つは、IgG 型では結合能力が低すぎることでハイブリドーマスクリーニング時の ELISA で検出不可能であったことが考えられる。一方、五量体の IgM は avidity 効果が増すために検出可能であり、ハイブリドーマとして樹立されたと考えられる。しかしながら、PC は Igλ<sup>+</sup>として単離しており、NP 結合能力を指標に単離しているわけではないのだが、X95 型は IgM<sup>+</sup> PC では存在するがクラススイッチ後の PC からは検出されなかった。よって、X95 型を発現する B 細胞は、クラススイッチが起こっていない際のみ選択されると思われる。追加免疫後 5 日目の IgM<sup>+</sup> PC で親和性成熟した W33L 変異を有するものが存在した。これらは胚中心依存的な IgM<sup>+</sup> 記憶 B 細胞であると考えられる。今回の塩基配列と親和性の解析から、追加免疫により三種類の IgM が存在すると考えられる。1 つ目は、SHM は有さない胚細胞型であり、相対的親和性が高い(NP<sub>Lo</sub><sup>+</sup>) 典型的な Tyr95 型であり、胚中心非依存的に生産された記憶 B 細胞由来の抗体である。2 つ目は、IgG<sup>+</sup> 記憶 B 細胞と同様に GC 依存的に選択された親和性の成熟した Tyr95W33L 型や Gly95 型である。3 つ目は、二次免疫後の IgM レパートリー特異的な、SHM を有さない非常に親和性の低い(NP<sub>Lo</sub>)タイプである。この 3 つ目のタイプは、AID 欠損マウスでも出現することから、SHM は不要であり、胚中心非依存的に生産されていると考えられる。

記憶 B 細胞は、naïve B 細胞と比較してより迅速で強力に応答することができ、ほとんどの抗体の二次免疫応答は記憶 B 細胞由来であると考えられが、二次免疫後に記憶 T<sub>h</sub>細胞が naïve B 細胞を活性化して IgM 産生を促している可能性がある。しかしながら、CGG で予め免疫して T<sub>h</sub>細胞を誘導し、追加免疫として NP-CGG を免疫しても抗 NP IgM 産生量はほとんど増加しなかった(Fig. 3-10)。この結果は、二次免疫応答において naïve B 細胞は IgM 産生にほとんど

関与しておらず、二次免疫後の IgM 抗体レパートリーは、IgM<sup>+</sup> 記憶 B 細胞のレパートリーを反映していると考えられる。

今回の結果は、naïve B 細胞の運命が BCR の親和性によって決定されていることを示している。抗原に出会うまでは SHM のない Tyr95 型、Gly95 (H)型、X95 型の naïve B 細胞が存在する。Tyr95 型および Gly95(H)型の BCR は SHM なしで  $10^5 \text{ M}^{-1}$  の親和性を有するが、X95 型はそれよりも低い。胚中心形成により、高親和性 B 細胞は低親和性 B 細胞に競り勝つ(99-101)。優先的に高親和性 B 細胞が short-lived PC に分化することがトランスジェニックマウスを用いた実験で証明されている(102、103)。つまり、相対的に親和性が高い Tyr95 型や Gly95(H)型の B 細胞は優先的に活性化され、増殖して PC へ分化したり、胚中心 B 細胞になりクラススイッチを起こす。胚中心での反応により、親和性が成熟した IgM-BCR または IgG-BCR を発現する B 細胞が作られる。いくらかの Tyr95 型 B 細胞は胚中心を出て記憶 B 細胞に分化する。一方、X95 型のような著しく親和性の低い BCR を発現する B 細胞は初期免疫応答では効率よく PC や胚中心 B 細胞に分化することが出来ないが、抗原認識後に SHM やクラススイッチを起こすことなく記憶 B 細胞として生存する。結果として、胚中心依存的親和性成熟記憶 B 細胞や胚中心非依存的記憶 B 細胞と共に SHM のない超低親和性 IgM<sup>+</sup> 記憶 B 細胞が生み出される。抗原に再度出くわすことで、それらの記憶 B 細胞は活性化され、PC へと分化する。よって、二次免疫応答において親和性成熟 IgG 抗体や、SHM のない超低親和性 IgM 抗体が生産される。

追加免疫後 3 日目の IgM<sup>+</sup> PC のほとんどは SHM を有していないが、5 日目では W33L 変異のような親和性を上昇させる変異のあるクローンが多く得られるようになる。この結果は、SHM のない IgM<sup>+</sup> 記憶 B 細胞は、SHM を有するものより早く追加免疫に応答することを示している。この要因として、胚中心非依存的な IgM<sup>+</sup> 記憶 B 細胞は、胚中心依存的な IgM<sup>+</sup> 記憶 B 細胞よりも感受性が高い可能性や、低親和性 BCR に抗原が結合した際にはより効率的に MHC クラス II 分子に提示され易くなることで(105)、T<sub>h</sub> 細胞からより多くの刺激を受けることが出来るからかもしれない。また、追加免疫後に *in vivo* で高親和性 IgG が生産されるために、5 日目になると低親和性 BCR を発現する細胞の活性化が抑制される可能性もあるが(86)、これらの可能性は検証しなければならない。

追加免疫によって、中和反応で重要な役割を担う親和性が成熟した IgG 抗体に加えて、IgM 抗体の産生が誘導される。IgM は 1 分子に 10 か所の抗原結合部を有することで高い avidity 効果を発揮できる。使用した NP-CGG は比較的高い密度(高価数)であり、親和性が低くても IgM は効率的に結合することが出来る。この様な多価構造はレクチンファミリー分子で広く見られ、バクテリアやウイルスのような繰り返し構造を有する分子形態の認識に役立っていると考



えられている(106)。また、IgM 抗体は、強い凝集能や古典的補体経路の活性化能を有することが知られている。このような機能を有することから、インフルエンザウィルス感染防御においても重要な役割を果たすことができる(107、108)。

B1b 細胞由来の IgM は *Borrelia hermsii* の感染を除去し、T 細胞非依存的な終生免疫に関与する(97)。親和性成熟した IgG 抗体が出現するまでは、初期 IgM 抗体が細菌の侵入に対する唯一の防御抗体である。しかしながら、親和性成熟 IgG が出現した後であっても、IgM 抗体は二次免疫応答において引き続き役割を担っているようである。生物学的意義は不明であるが、トランジェニックマウスを用いた研究で二次免疫応答において低親和性 IgM が産生されることが観察されている(100)。本研究においても、超低親和性 IgM が産生されること、さらに、これら超低親和性 IgM は高親和性 IgM よりも溶血活性化能が高いことを示した。Fossati-Jimack らは(109)、低親和性の自己抗体が強い溶血活性を有していることを示しており、Swanson らは(110)、高親和性の抗 FITC IgM 抗体( $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1}$ )は IgG よりも補体活性化因子である C1 に結合しにくいことを示している。IgM はそれぞれ 2 つの抗原結合部位を有する 5 つのサブユニットから構成されており、抗原に結合していない際は平面的な形態である。この形態では C1 が結合できないことから、補体を活性化できない。抗原と結合した際には、親和性、抗原エピトープの密度、5 量体 IgM の柔軟性などの要因により構造変化が誘導される。この構造変化(かすがい型・ホッチキス型構造)になることで、C1 が効率よく IgM に結合できるようになる(111、112)。高親和性の 5 量体 IgM が NP-SRBC のような高密度のエピトープを有する抗原に結合する際は、一つの IgM サブユニットの 1 つか 2 つの抗原結合部位で結合に十分であると思われる。よって、構造変化を起こさず、NP-SRBC 上の 5 量体 IgM は平面形態のままであると考えられる。それぞれの抗原エピトープの間隔が長すぎて、1 分子の IgM 中の 1 つのサブユニットに存在する 2 つの抗原結合部位を用いて結合できない際には、5 量体中の他のサブユニットが結合に関与することで、かすがい型への構造変化を起こして C1 の結合を誘導し、補体系を活性化すると考えられる。一方、低親和性の IgM は 1 つのサブユニットのみでは NP-SRBC への結合ができず、複数のサブユニットが協調する必要があるが、この際に構造変化を起こすと考えられる。これらの仮説は実証される必要があるが、本研究で超低親和性 IgM 抗体がユニークな免疫機能を有していることが示唆された。

## Day 7

### H鎖

GL VH186.2 QVQLQQGAEIVKPGASVKLSCKASGYFTFTSYMHVVKQRPGRLGIEWIGRIDPNSGGTKYNEKFKSKATLTVDKPSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR  
 1B230 .....  
 1B236 .....  
 1B269 .....  
 1B324 .....  
 1B343 .....  
 1B366 ..... G . T . . . . . L . . . . .  
 1B22 .....  
 1B40 .....  
 1B70 .....  
 1B106 .....  
 1B152 .....  
 1B183 .....  
 1B273 .....  
 1B395 .....  
 1B402 .....  
 1B427 .....  
 1B6 .....  
 1B49 .....

TYVYGSLLY YFDYWGQGTLLTVSS JH2 Cm  
 YDYVSSS YFDYWGQGTLLTVSS JH2 Cm  
 YRYVGSLL DYVWQGTLLTVSS JH2 Cm  
 YMIGYVFPV YAMDYWGQGTLLTVSS JH4 Cm  
 YVYYSI YFDYWGQGTLLTVSS JH2 Cm  
 YRLF FDYWGQGTLLTVSS JH2 Cm  
 YVYSSG MDYWGQGTLLTVSS JH4 Cg1  
 YDYVSSS YFDYWGQGTLLTVSS JH2 Cg2b  
 YDYVSSS YFDYWGQGTLLTVSS JH2 Cg1  
 YVYSSS YFDYWGQGTLLTVSS JH2 Cg1  
 YVYDT WFAVWQGTLLTVSSA JH3 Cg2b  
 YRYVGSLL DYVWQGTLLTVSS JH2 Cg1  
 YFG AMDYWGQGTLLTVSS JH4 Cg2b  
 YRLGSL DYVWQGTLLTVSS JH2 Cg1  
 YVYVGSLL DYVWQGTLLTVSS JH2 Cg1  
 YVYVGR FDYWGQGTLLTVSS JH2 Cg1  
 GNYFP YFDYWGQGTLLTVSS JH2 Cg1  
 HP FAYWQGTLLTVSSA JH3 Cg2b

### L鎖

GL VL1 QAVVTQESALTTSPGETVLTCSRSTGAVTTSNYANVQEKPDHFLTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALITGAQTEDEAIYFCALWYSNHF  
 GL VL2 ..... G . I . . . . . S . . . . . V . . . . . D . M . . . . . T . . . . .  
 1B230 .....  
 1B236 .....  
 1B269 ..... N . . . . .  
 1B324 ..... G . I . . . . . S . . . . . V . . . . . D . M . . . . . T . . . . .  
 1B343 .....  
 1B366 .....  
 1B22 .....  
 1B40 .....  
 1B70 .....  
 1B106 .....  
 1B152 .....  
 1B183 .....  
 1B273 .....  
 1B395 .....  
 1B402 .....  
 1B427 .....  
 1B6 .....  
 1B49 .....

WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 FIFGSGTKVTVLG JL3 CL3  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 YVFGGKTVTVLG JL2 CL2  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 Y WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1

## Day 14

### H鎖

GL VH186.2 QVQLQQGAEIVKPGASVKLSCKASGYFTFTSYMHVVKQRPGRLGIEWIGRIDPNSGGTKYNEKFKSKATLTVDKPSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR  
 2B729 ..... N . L . . . . . T . . . . . E . . . . .  
 2B219 ..... D . . . . . N . . . . . G . . . . . T . . . . .  
 2B614 .....  
 2B989 ..... S . T . I . . . . . R . T . . . . .  
 2B474 ..... N . . . . . I . L . . . . . T . . . . .  
 2B700 ..... T . L . I . . . . .

YDYVGSN FDYWGQGTLLTVSS JH2 Cmu  
 YVYVSSS FDYWGQGTLLTVSS JH2 Cg1  
 YDYVSSS YFDYWGQGTLLTVSS JH1 Cg1  
 NYVYL YFDYWGQGTLLTVSS JH1 Cg2b  
 YVYVSL FDYWGQGTLLTVSS JH2 Cg1  
 YVYVSG FDYWGQGTLLTVSS JH2 Cg2b

### L鎖

GL VL1 QAVVTQESALTTSPGETVLTCSRSTGAVTTSNYANVQEKPDHFLTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALITGAQTEDEAIYFCALWYSNHF  
 GL VL2 ..... G . I . . . . . S . . . . . V . . . . . D . M . . . . . T . . . . .  
 2B729 ..... S . . . . .  
 2B219 ..... O . . . . . I . . . . .  
 2B474 ..... NN . . . . .  
 2B700 ..... A . . . . .  
 2B989 .....

WFVGGGKTLAVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLAVLG JL1 CL1

## Boost day 3

### H鎖

GL VH186.2 QVQLQQGAEIVKPGASVKLSCKASGYFTFTSYMHVVKQRPGRLGIEWIGRIDPNSGGTKYNEKFKSKATLTVDKPSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR  
 8B337 .....  
 8B665 .....  
 8B668 .....  
 8B744 .....  
 8B587 .....  
 8B699 .....  
 8B550 .....  
 8B264 ..... Q . H . . . . . R . L . . . . . M . T . . . . . N . L . N . . . . . F . . . . .  
 8B529 ..... T . . . . . I . . . . . G . S . . . . . T . . . . . L . . . . .  
 8B285 ..... T . T . . . . . N . . . . . R . . . . . N . R . . . . . N . . . . . G . . . . . F . . . . .  
 8B429 ..... I . I . . . . . I . . . . . D . . . . . Y . . . . . R . . . . . T . . . . . F . . . . .  
 8B472 .....  
 8B794 ..... R . . . . . S . . . . . I . . . . . S . . . . . D . F . R . I . N . R . . . . . F . . . . .

YVYVSSS YFDYWGQGTLLTVSS JH2 Cm  
 YVYVSSS YFDYWGQGTLLTVSS JH2 Cm  
 YVYVSI YFDYWGQGTLLTVSS JH2 Cm  
 YDYVSSS YFDYWGQGTLLTVSS JH2 Cm  
 RGYGG FDYWGQGTLLTVSS JH2 Cm  
 SF FDYWGQGTLLTVSS JH2 Cm  
 YVYVSRPG AMDYWGQGTLLTVSS JH4 Cg1  
 YVYV WYFHWGQGTLLTVSS JH1 Cg1  
 YVYVRS FDYWGQGTLLTVSS JH2 Cg1  
 GYVYSH FDYWGQGTLLTVSS JH2 Cg1  
 GYVYRH FDYWGQGTLLTVSS JH2 Cg1  
 GYVYH FDYWGQGTLLTVSS JH2 Cg1  
 GYVGFH FDYWGQGTLLTVSS JH2 Cg1

### L鎖

GL VL1 QAVVTQESALTTSPGETVLTCSRSTGAVTTSNYANVQEKPDHFLTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALITGAQTEDEAIYFCALWYSNHF  
 GL VL2 ..... G . I . . . . . S . . . . . V . . . . . D . M . . . . . T . . . . .  
 8B337 ..... G . I . . . . . S . . . . . V . . . . . D . M . . . . . T . . . . .  
 8B665 .....  
 8B668 .....  
 8B744 ..... G . I . . . . . S . . . . . V . . . . . D . M . . . . . T . . . . .  
 8B587 .....  
 8B699 .....  
 8B550 .....  
 8B264 ..... . G . . . . . T . . . . . P . . . . . S . N . F . . . . . A . . . . .  
 8B529 ..... G . I . . . . . S . . . . . S . . . . . S . . . . . V . . . . . V . . . . . D . M . . . . . T . . . . .  
 8B285 ..... S . . . . . S . . . . . S . . . . . S . . . . . V . . . . . Y . . . . . V . . . . . D . M . . . . . T . . . . .  
 8B429 ..... L . . . . . T . . . . . S . . . . . L . . . . . T . . . . . S . . . . . G . . . . .  
 8B472 .....  
 8B794 ..... V . S . . . . . I . . . . . V . . . . . F . . . . .

WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 FIFGSGTKVTVLG JL3 CL3  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 YVFGGKTVTVLG JL2 CL2  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1  
 WFVGGGKTLTVLG JL1 CL1

Figure 3-1 C57BL/6マウス由来の抗NP mAbのVH及びVLのアミノ酸配列

胚細胞型のV<sub>H</sub>186.2およびV<sub>L</sub>1のアミノ酸配列を最上段に示し、それと相同なアミノ酸残基を点で示した。V<sub>H</sub>33番目および95番目をそれぞれ線と赤で示した。塩基配列はGenBank/EMBL/DBJデータベースにAccession番号AB510041からAB510112で登録してある。

## Day 7

### H鎖

GL VH186.2	QVQLQQGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYMHWVKQRPRGLEWIGRIDPNSGGTKYNEKFKSKATLTVDKPSSTAYMQLSSTSEDSAVYYCAR	YDYP	WYFDVNGTGTITVSS	JH1	Cmu
1A8	.....	YYYGSF	FDYWGQGTTLTVSS	JH2	Cmu
1A86	.....	YGYGSTYGL	YFDYWGQGTTLTVSS	JH2	Cmu
1A239	.....	YDYGSS	YFDYWGQGTTLTVSS	JH2	Cmu
1A440	.....	YDYGSS	YFDYWGQGTTLTVSS	JH2	Cmu
1A499	.....	GGIYYGIH	FDYWGQGTTLTVSS	JH2	Cmu
1A350	.....	RDDGYH	FAYWGQGTTLTVSA	JH3	Cmu
1A376	.....				

### L鎖

GL VL1	QAVVTQESALITSPGETVILTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALITGAQTEDEAIYFCALWYSNHF				
GL VL2	.....G.I.....S.....V.....D.M.....T..				
1A8	.....		WVFGGKTLTVLG	JL1	CL1
1A86	.....		WVFGGKTLTVLG	JL1	CL1
1A239	.....		WVFGGKTLTVLG	JL1	CL1
1A440	.....		WVFGGKTLTVLG	JL1	CL1
1A499	.....		WVFGGKTLTVLG	JL1	CL1
1A350	.....		WVFGGKTLTVLG	JL1	CL1
1A376	.....		WVFGGKTLTVLG	JL1	CL1

## Day 14

### H鎖

GL VH186.2	QVQLQQGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYMHWVKQRPRGLEWIGRIDPNSGGTKYNEKFKSKATLTVDKPSSTAYMQLSSTSEDSAVYYCAR	SYYYGSS	YFDYWGQGTTLTVSS	JH2	Cmu
2A122	.....				

### L鎖

GL VL1	QAVVTQESALITSPGETVILTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALITGAQTEDEAIYFCALWYSNHF				
GL VL2	.....G.I.....S.....V.....D.M.....T..				
2A122	.....		WVFGGKTLTVLG	JL1	CL1

## Boost day 3

### H鎖

GL VH186.2	QVQLQQGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYMHWVKQRPRGLEWIGRIDPNSGGTKYNEKFKSKATLTVDKPSSTAYMQLSSTSEDSAVYYCAR	YYYGSS	YFDYWGQGTTLTVSS	JH2	Cmu
8A300	.....	YDGYPH	YFADYWGQGTTLTVSS	JH4	Cmu
8A307	.....	YDYGSSY	YFDYWGQGTTLTVSS	JH2	Cmu
8A479	.....	NYYYQGR	YFDVNGTGTITVSS	JH1	Cmu
8A507	.....	YYYGSPY	YFDYWGQGTTLTVSS	JH2	Cmu
8A537	.....	GLGG	FDYWGQGTTLTVSS	JH2	Cmu
8A38	.....	GWYGSSS	WFAYWGQGTTLTVSA	JH3	Cmu
8A303	.....	KGLGG	YWQGTTLTVSS	JH2	Cmu
8A45	.....	XGLGG	YWQGTTLTVSS	JH2	Cmu
8A127	.....				

### L鎖

GL VL	QAVVTQESALITSPGETVILTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALITGAQTEDEAIYFCALWYSNHF				
GL VL2	.....G.I.....S.....V.....D.M.....T..				
8A300	.....		YVFGGKTVTLG	JL2	CL2
8A307	.....	L	WVFGGKTLTVLG	JL1	CL1
8A479	.....		WVFGGKTLTVLG	JL1	CL1
8A507	.....		WVFGGKTLTVLG	JL1	CL1
8A537	.....		WVFGGKTLTVLG	JL1	CL1
8A38	.....		WVFGGKTLTVLG	JL1	CL1
8A303	.....		WVFGGKTLTVLG	JL1	CL1
8A45	.....G.I.....S.....V.....D.M.....T	N	YVFGGKTVTLG	JL2	CL2
8A127	.....G.I.....S.....V.....D.M.....T	N	YVFGGKTVTLG	JL2	CL2

Figure 3-2 AID欠損マウス由来の抗NP mAbのVH及びVLのアミノ酸配列

胚細胞型のV<sub>H</sub>186.3およびV<sub>L</sub>1のアミノ酸配列を最上段に示し、それと相同なアミノ酸残基を点で示した。V<sub>H</sub>33番目および95番目をそれぞれ緑と赤で示した。塩基配列はGeneBank/EMBL/DBJデータベースにAccession番号AB510113からAB510146で登録してある。



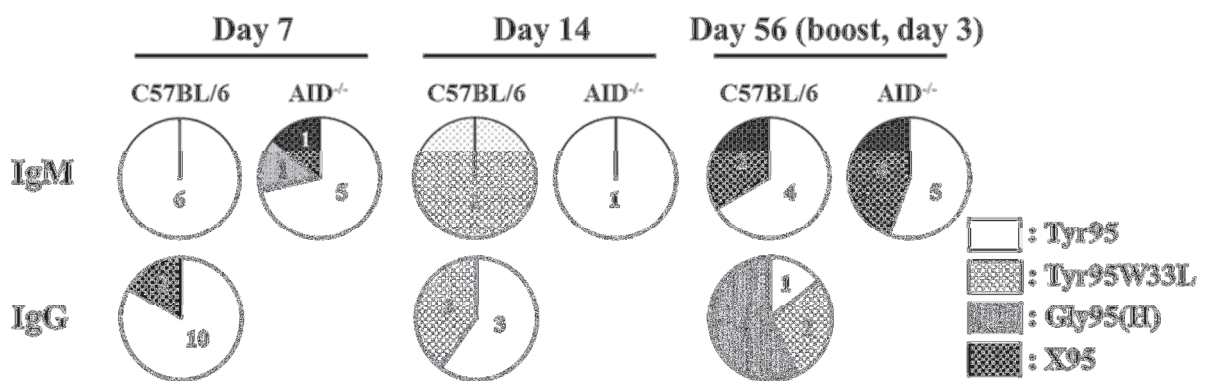


Figure 3-3 抗NP mAbのレパートリー

NP-CGGをC57BL/6マウスに免疫して得られた抗NP mAbでH鎖にV<sub>H</sub>186.2遺伝子を、L鎖に2L鎖を有するクローンを、V<sub>H</sub>の95番目のアミノ酸残基と33番目のアミノ酸残基がTryであるかLueであるかによってクラス分けした。円グラフ内の数字はクローン数を示す。

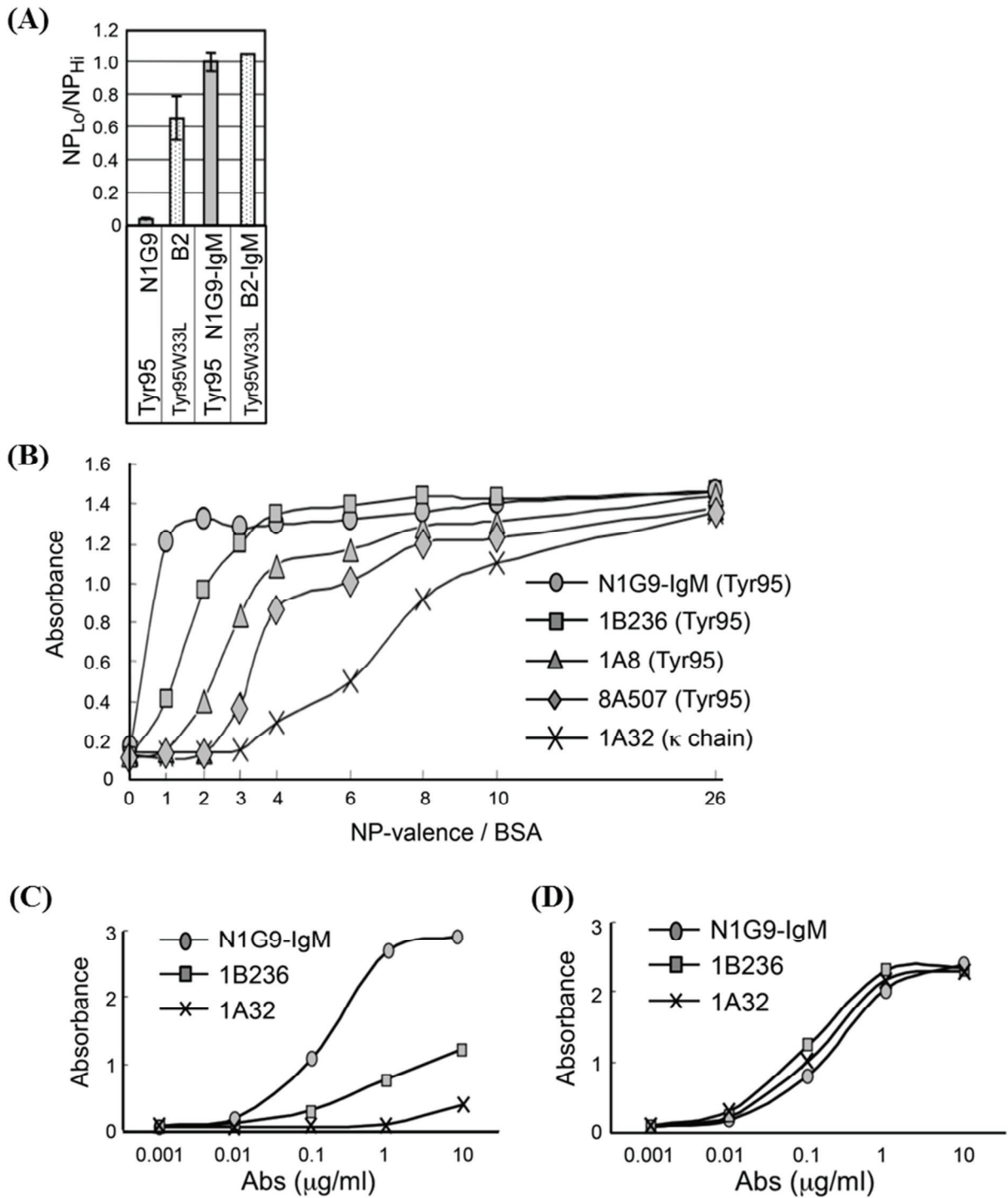


Figure 3-4 NP価数の異なるNP-BSAに対するIgM mAbの結合

(A) NP<sub>2</sub>-BSAとNP<sub>26</sub>-BSAへのIgG mAbとIgM mAbの結合を測定し、NP<sub>Lo</sub>/NP<sub>Hi</sub>結合比として示した。  
 (B) NP<sub>1</sub>、NP<sub>2</sub>、NP<sub>4</sub>、NP<sub>6</sub>、NP<sub>8</sub>、NP<sub>10</sub>、NP<sub>26</sub>-BSAをELISAプレートに固層し、IgMモノクローナル抗体の結合を抗IgM抗体で検出し、吸光度をしめした。  
 (C、D) NP<sub>2</sub>-BSAとNP<sub>26</sub>-BSAへの結合を、IgM mAbの濃度を変化させて検出した。

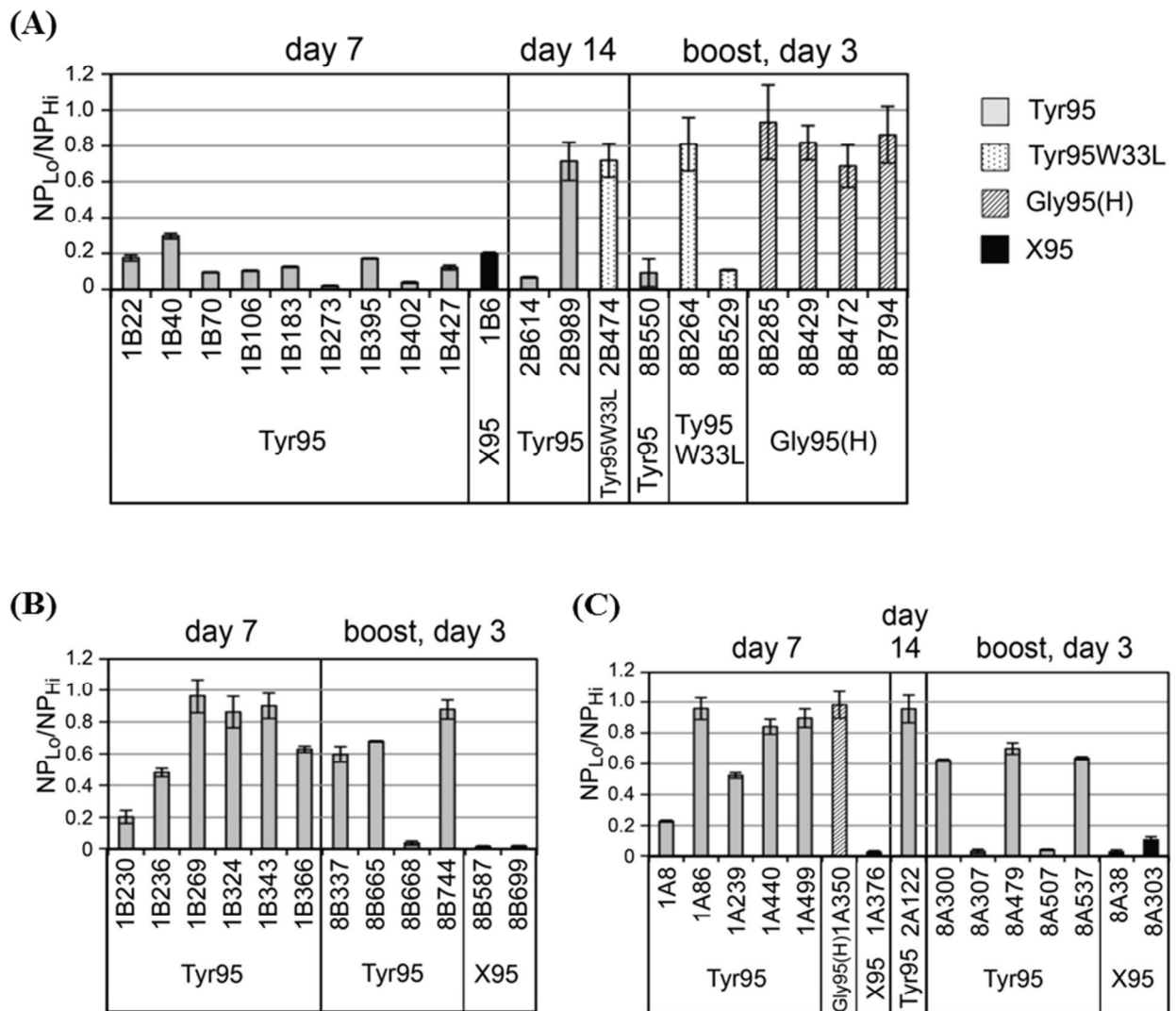


Figure 3-5 mAbの相対的親和力

(A) C57BL/6マウス由来の抗NP IgG mAbの、NP<sub>L</sub>-BSAとNP<sub>H</sub>-BSAへの結合を測定し、NP<sub>L</sub>/NP<sub>H</sub>結合比として示した。

(B) C57BL/6マウス由来の抗NP IgM mAbの、NP<sub>L</sub>-BSAとNP<sub>H</sub>-BSAへの結合を測定し、NP<sub>L</sub>/NP<sub>H</sub>結合比として示した。

(C) AID欠損マウス由来の抗NP IgM mAbの、NP<sub>L</sub>-BSAとNP<sub>H</sub>-BSAへの結合を測定し、NP<sub>L</sub>/NP<sub>H</sub>結合比として示した。

±SDでデータを示す。



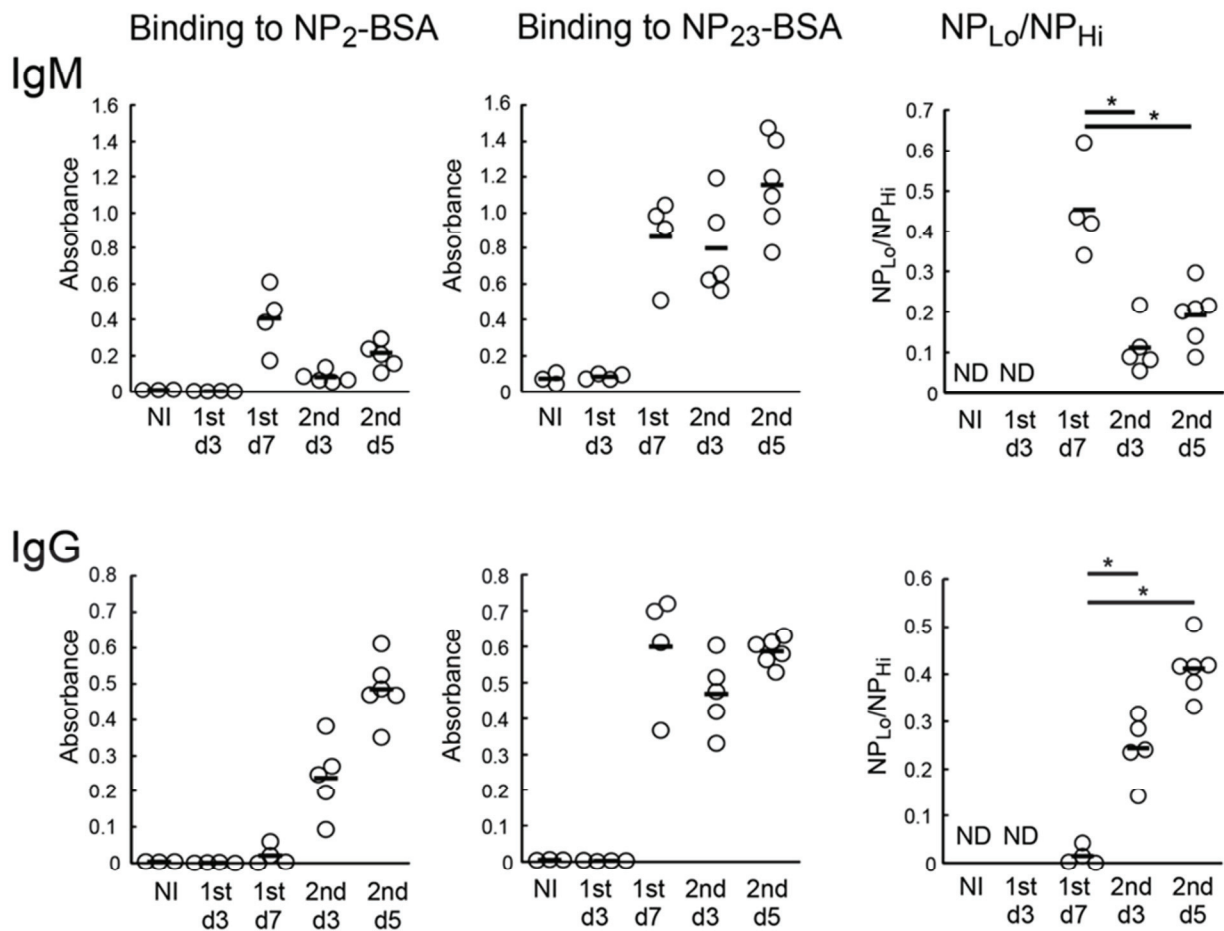


Figure 3-6 NP-CGG免疫後のC57BL/6マウスが産生する抗NP抗体

血清中のNP<sub>2</sub>-BSAおよびNP<sub>23</sub>-BSAに結合する抗体をELISAにより測定した。抗NP IgM抗体の測定は100倍希釈した血清から、Protein Gビーズを用いてIgG抗体を除去してから行った。抗NP IgG抗体は1000倍希釈で測定した。それぞれ結合抗体は抗IgM抗体、抗IgG抗体を用いた。NIは未免疫マウス、NDは吸光度値が低く測定不可を示す。バーは平均値を示す。\* $p < 0.01$ 。

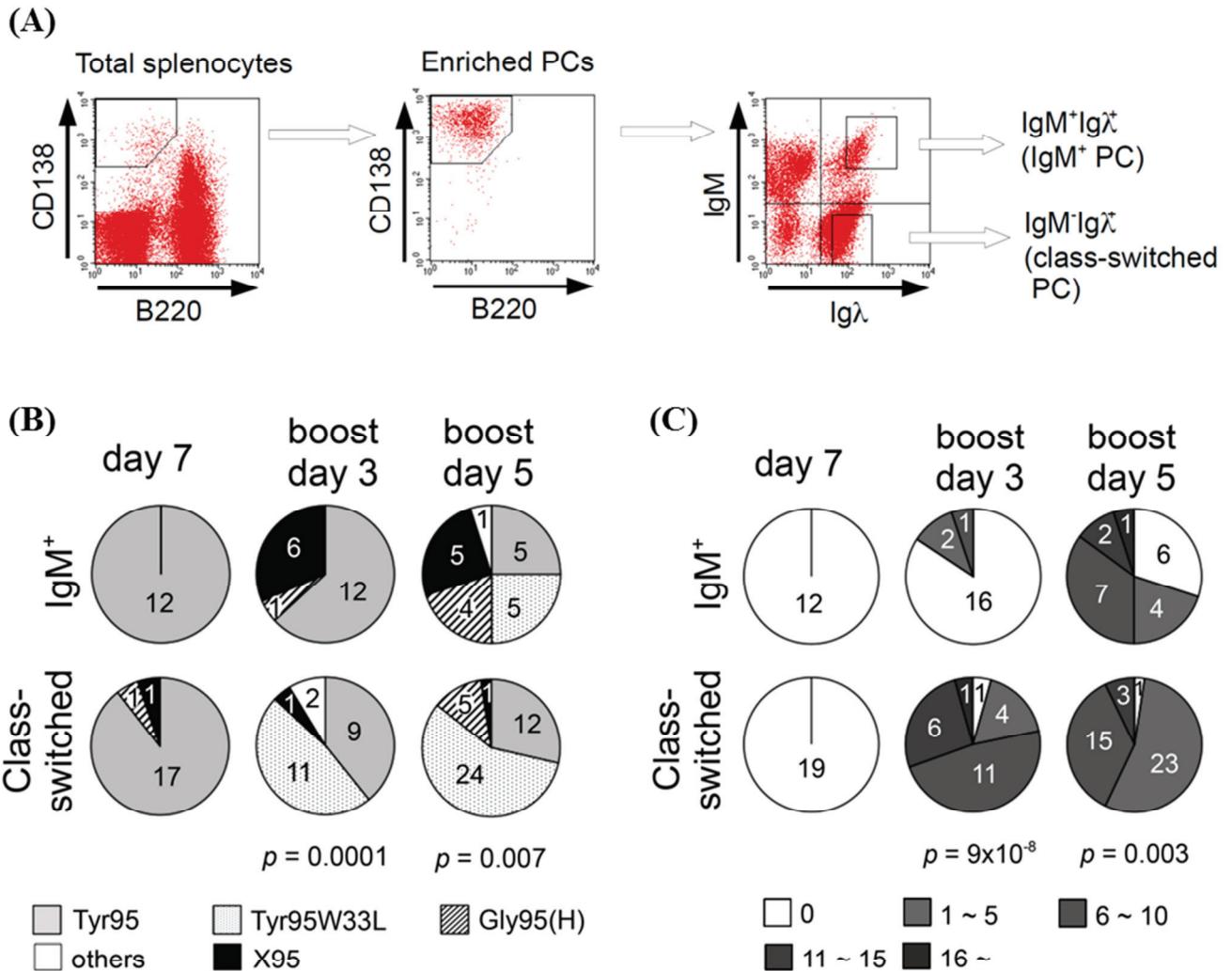


Figure 3-7 プラズマ細胞の単離とVH遺伝子のレパートリー

(A) NP-CGG免疫C57BL/6マウスの脾臓細胞からプラズマ細胞をマグネットビーズを用いて濃縮した。さらに、IgMとIgλの細胞内染色を行い、Igλを発現し、かつIgM陽性である細胞と、クラススイッチした細胞を単離した。初回免疫後7日目の結果を示す。

(B) H鎖にV<sub>H</sub>186.2遺伝子を有するクローンを、V<sub>H</sub>95番目のアミノ酸残基と33番目のアミノ酸残基がTyrであるかLeuであるかによって分類分けした。33番目のアミノ酸残基がTyrでもLeuでもないクローン、もしくはLeuに置換されているが95番目がTyrでないクローンは”other”として分類した。IgM陽性プラズマ細胞とクラススイッチ後のプラズマ細胞のV<sub>H</sub>タイプの比をFisher's exact testで比較し、求めたp valueを示した。

(C) V<sub>H</sub>領域の体細胞超突然変異により置換されたアミノ酸残基の数を示す。IgM陽性プラズマ細胞とクラススイッチ後のプラズマ細胞の変異が挿入されていないクローンの頻度を比較し、p valueを求めた。

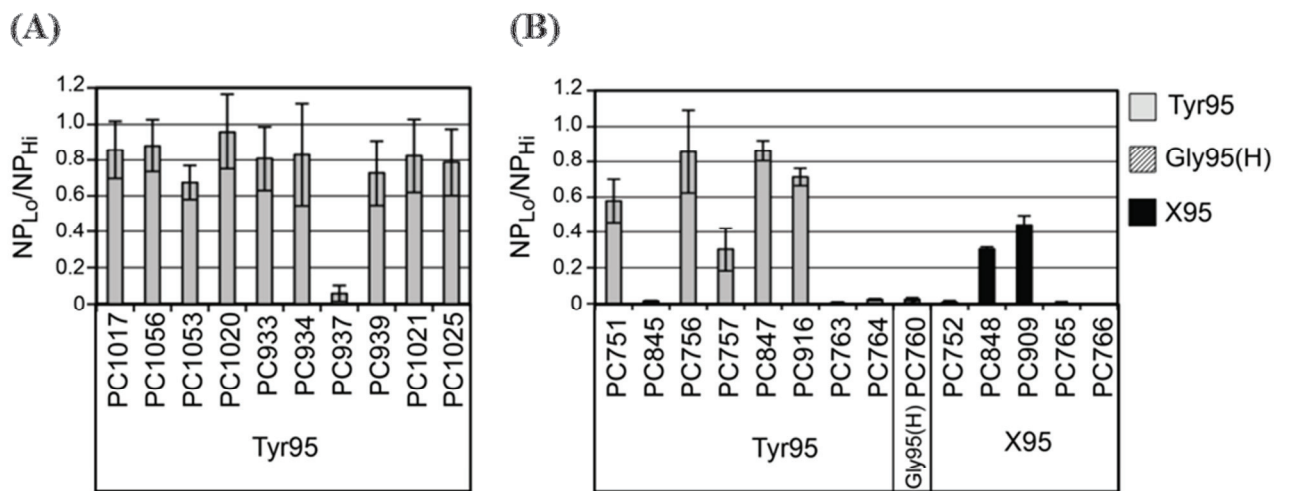


Figure 3-8 プラズマ細胞由来V<sub>H</sub>遺伝子を用いたIgMの相対的親和力

IgM陽性プラズマ細胞から得られた変異を有さないV<sub>H</sub>遺伝子をリコンビナントIgMとして作製し、それらの親和力をELISAで測定した。NP<sub>Lo</sub>への結合とNP<sub>Hi</sub>への結合比(NP<sub>Lo</sub>/NP<sub>Hi</sub>)を示す。(A)初回免疫後7日で得られたV<sub>H</sub>遺伝子を有するクローン。(B)2次免疫後3日で得られたV<sub>H</sub>遺伝子を有するクローン。エラーバーは±SD。

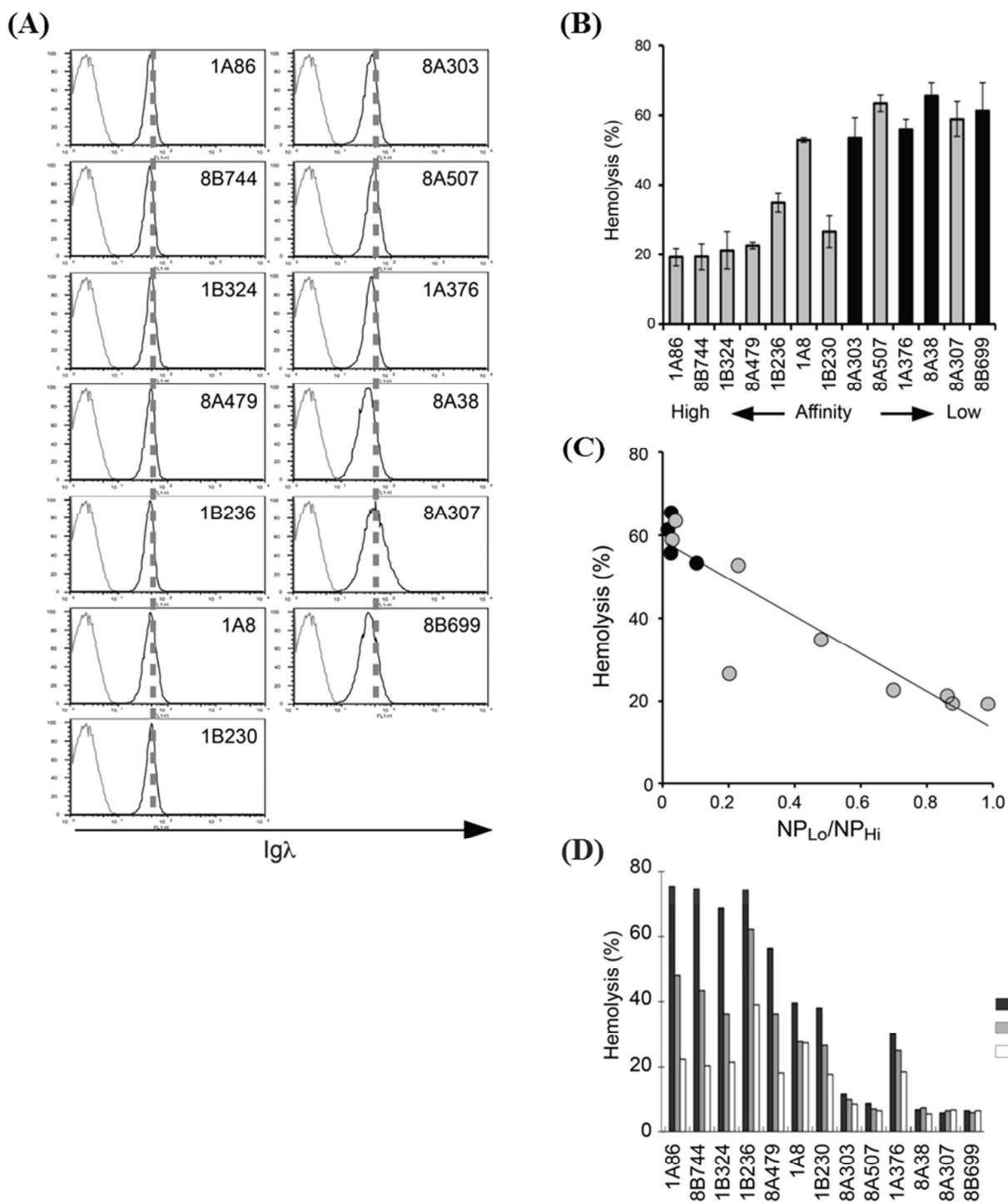


Figure 3-9 IgM mAbとウサギ補体を用いたNP化ヒツジ赤血球の溶血

(A) IgM mAbとNP<sub>Hi</sub>-SRBCを反応後、FITC標識抗Igλ抗体を用いたフローサイトメトリーによってIgM抗体の結合量を測定した。黒線は抗体非存在下、灰線は抗体存在下での傾向強度を示す。

(B) 等量のIgM抗体が結合したNP<sub>Hi</sub>-SRBCと希釈したウサギ血清を反応させ、各IgM抗体の溶血活性を測定した。黒棒は95X型IgM。

(C) 相対的な結合力と、NP<sub>Hi</sub>-SRBCを用いた際の補体活性の関係を示す。黒点は95X型IgM。

(D) NP<sub>Lo</sub>-SRBCを用いた際の、各IgM抗体の溶血活性を測定した。

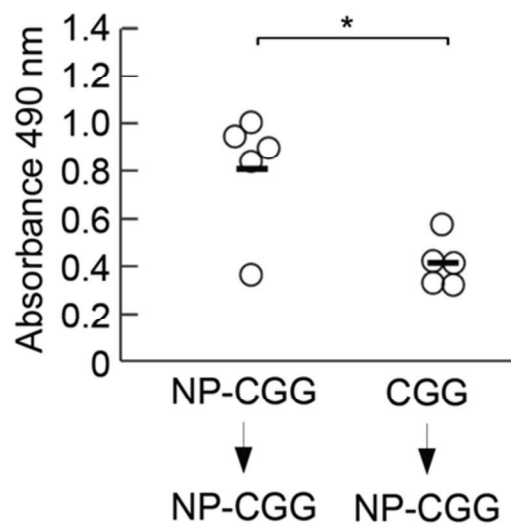


Figure 3-10 CGG予免疫後のNP-CGG免疫における抗NP IgM抗体の産生

C57BL/6マウスをCGG/alumで、もしくはコントロールとしてNP-CGG/alumで免疫し、NP-CGGを二次免疫後に血清を調整した。Protein Gビーズを用いてIgGを除去した血清中のIgMの、NP<sub>26</sub>-BSAへの結合をELISAで測定した。棒は平均値を示す。\*, p<0.05。



name	sequence
V <sub>H</sub> -S1	GTGGTCGACGCTGTATCATGCTCTTCTTGGC
C <sub>μ</sub> -A1	CCAGGTGAAGGAAATGGTGCTGG
C <sub>γ</sub> 1-A1	GGGATCCAGAGTTCCAGGTCCT
C <sub>γ</sub> 2b-A1	GGGATCCAGAGTTCCAAGTCACA
V <sub>λ</sub> -S1	ATGGCCTGGATTTCACTTATACTCTCTC
C <sub>λ</sub> 1-A1	CTTTCCCATGCTCTTGCTGTCAGG
C <sub>λ</sub> 2,3-A1	TGAGATCTCCACTGGTCCGATGTC
C <sub>μ</sub> -A2	GGGCTCTCGCAGGAGACG
C <sub>γ</sub> 1-A2	TTAGTTTGGGCAGCAGAT
C <sub>γ</sub> 2b-A2	CCAGTTGTATCTCCACAC
C <sub>λ</sub> 1-A2	GAGCTCTTCAGAGGAAGGTGGAAACA
C <sub>λ</sub> 2,3-A2	ACACACSAGTGTGGCTTTGTTTTTC
V <sub>H</sub> -S2	AGGCGGCCGCACACAGGACCTCACCATG
J <sub>H</sub> 2-A	CTGAGGAGACTGTGAGAG
C <sub>μ</sub> -A3	TCCTCGAGCATGGTCAATAGCAGGTGCC
J <sub>H</sub> 2-S	CTCTCACAGTCTCCTCAG
V <sub>H</sub> -S3	TTTACAGTACTGAGCACACAGGAC
V <sub>H</sub> -S4	GGAGGTACCACACAGGACCTCACCATG
V <sub>H</sub> -S5	GAGGTACCTGTATCATGCTCTTCTTGGC
3' <sub>H</sub> 1-A	CCTCTAGACCGTTTCAGAATGGAATGTGC
3' <sub>H</sub> 2-A	CCTCTAGATCTAAGCTGAATAGAAGAGAGAG
3' <sub>H</sub> 3-A	CCTCTAGAATGGGAGAAGTTAGGACTC
3' <sub>H</sub> 4-A	CCTCTAGACCTGGAGAGGCCATTCT
C <sub>μ</sub> -S	GAGGCGGCCCAAGGAAATAGCAGGGTGTAG

Table 3-1 抗体遺伝子解析およびリコンビナント抗体作製用オリゴプライマー

	C57BL/6						AID <sup>-/-</sup>		
	day 7		day 14		boost day 3		day 7	day 14	boost day 3
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgM	IgM
Igκ	1	1	0	1	1	1	3	3	3
Igλ	7	21	3	6	7	8	16	2	18
V <sub>H</sub> 186.2 <sup>a</sup>	(6)	(12)	(1)	(5)	(6)	(7)	(7)	(1)	(9)

Table 3-2 抗NPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ数。

<sup>a</sup>λL鎖を有し、かつ、V<sub>H</sub>186.2遺伝子を発現するクローン数をかっこ内に示した。

clone	H chain							L chain			
	V <sub>H</sub>	D <sub>H</sub> <sup>a</sup>	J <sub>H</sub>	C <sub>H</sub>	33 <sup>b</sup>	95 <sup>c</sup>	Mut <sup>d</sup>	V <sub>L</sub>	J <sub>L</sub>	C <sub>L</sub>	Mut <sup>e</sup>
day 7											
1B230	186.2	FL16.1	2	μ	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
1B236	186.2	FL16.1	2	μ	W	Y	0	λ1	λ3	λ3	0
1B269	186.2	FL16.1	2	μ	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	1
1B324	186.2	SP2	4	μ	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
1B343	186.2	FL16.1	2	μ	W	Y	0	λ2	λ2	λ2	0
1B366	186.2	x	2	μ	W	Y	3	λ1	λ1	λ1	0
1B22	186.2	FL16.1	4	γ1	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
1B40	186.2	FL16.1	2	γ2b	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
1B70	186.2	FL16.1	2	γ1	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
1B106	186.2	FL16.1	2	γ1	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
1B152	186.2	SP2	3	γ2b	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
1B183	186.2	FL16.1	2	γ1	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
1B273	186.2	x	4	γ2b	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
1B395	186.2	FL16.1	2	γ1	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
1B402	186.2	FL16.1	2	γ1	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
1B427	186.2	FL16.1	2	γ1	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
1B6	186.2	SP2	2	γ1	W	G	0	λ1	λ1	λ1	0
1B49	186.2	x	3	γ2b	W	H	0	λ1	λ1	λ1	0
day 14											
2B729	186.2	FL16.1	2	μ	L	Y	4	λ1	λ1	λ1	1
2B219	186.2	FL16.1	2	γ1	W	Y	4	λ1	λ1	λ1	2
2B614	186.2	FL16.1	1	γ1	W	Y	3	λ1	λ1	λ1	2
2B989	186.2	FL16.1	1	γ2b	W	Y	4	λ1	λ1	λ1	0
2B474	186.2	FL16.1	2	γ1	L	Y	4	λ1	λ1	λ1	1
2B700	186.2	FL16.1	2	γ2b	L	Y	3	λ1	λ1	λ1	1
boost, day 3											
8B337	186.2	FL16.1	2	μ	W	Y	0	λ2	λ1	λ1	0
8B665	186.2	FL16.1	2	μ	W	Y	0	λ1	λ3	λ3	0
8B668	186.2	FL16.1	2	μ	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
8B744	186.2	FL16.1	2	μ	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
8B587	186.2	FL16.1	2	μ	W	R	0	λ2	λ2	λ2	0
8B699	186.2	FL16.2	2	μ	W	S	0	λ1	λ1	λ1	0
8B550	186.2	FL16.1	4	γ1	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
8B264	186.2	FL16.1	1	γ1	L	Y	11	λ1	λ1	λ1	6
8B529	186.2	FL16.1	2	γ1	L	Y	8	λ1	λ1	λ1	7
8B285	186.2	FL16.1	2	γ1	W	G(H)	9	λ2	λ1	λ1	5
8B429	186.2	x	2	γ1	W	G(H)	7	λ1	λ1	λ1	6
8B472	186.2	SP2	2	γ1	W	G(H)	3	λ1	λ1	λ1	4
8B794	186.2	SP2	2	γ1	W	G(H)	11	λ1	λ1	λ1	5

Table 3-3 C57BL/6マウスから得られたH鎖にV<sub>H</sub>186.2を、L鎖がλである抗NPモノクローナル抗体の遺伝子構造的

<sup>a</sup> いくつかのクローンのDH遺伝子は同定することができずxと示した。SP2はDSP2ファミリーを示す。

<sup>b</sup> V<sub>H</sub>33番目のアミノ酸残基。

<sup>c</sup> V<sub>H</sub>95番目のアミノ酸残基。G(H)は95番目がGlyであり、100番目がHisであることを表す。

<sup>d</sup> V<sub>H</sub>領域の体細胞超突然変異によるアミノ酸置換数。

<sup>e</sup> V<sub>L</sub>領域の体細胞超突然変異によるアミノ酸置換数。

clone	H chain							L chain			
	V <sub>H</sub>	D <sub>H</sub> <sup>a</sup>	J <sub>H</sub>	C <sub>H</sub>	33 <sup>b</sup>	95 <sup>c</sup>	Mut <sup>d</sup>	V <sub>L</sub>	J <sub>L</sub>	C <sub>L</sub>	Mut <sup>e</sup>
day 7											
1A8	186.2	SP2	1	μ	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
1A86	186.2	FL16.1	2	μ	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
1A239	186.2	FL16.1	2	μ	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
1A440	186.2	FL16.1	2	μ	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
1A499	186.2	FL16.1	2	μ	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
1A350	186.2	SP2	2	μ	W	G(H)	0	λ1	λ1	λ1	0
1A376	186.2	SP2	3	μ	W	R	0	λ1	λ1	λ1	0
day 14											
2A122	186.2	FL16.1	2	μ	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
boost, day 3											
8A300	186.2	FL16.1	2	μ	W	Y	0	λ2	λ2	λ2	0
8A307	186.2	SP2	4	μ	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
8A479	186.2	FL16.1	2	μ	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
8A507	186.2	FL16.1	1	μ	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
8A537	186.2	FL16.1	2	μ	W	Y	0	λ1	λ1	λ1	0
8A38	186.2	x	2	μ	W	G	0	λ1	λ1	λ1	0
8A303	186.2	FL16.1	3	μ	W	G	0	λ1	λ1	λ1	0
8A45	186.2	Q52	2	μ	W	G	0	λ2	λ2	λ2	0
8A127	186.2	Q52	2	μ	W	G	0	λ2	λ2	λ2	0

Table 3-4 AID欠損マウスから得られたH鎖にV<sub>H</sub>186.2を、L鎖がλである抗NPモノクローナル抗体の遺伝子構造的

<sup>a</sup> いくつかのクローンのDH遺伝子は同定することができずxと示した。SP2はDSP2ファミリーを示す。

<sup>b</sup> V<sub>H</sub>33番目のアミノ酸残基。

<sup>c</sup> V<sub>H</sub>95番目のアミノ酸残基。G(H)は95番目がGlyであり、100番目がHisであることを表す。

<sup>d</sup> V<sub>H</sub>領域の体細胞超突然変異によるアミノ酸置換。

<sup>e</sup> V<sub>L</sub>領域の体細胞超突然変異によるアミノ酸置換。

IgM <sup>+</sup> PC							Class-switched PC						
	# <sup>a</sup>	clone	D <sub>H</sub> <sup>b</sup>	33 <sup>c</sup>	95 <sup>d</sup>	Mut <sup>e</sup>		#	clone	D <sub>H</sub>	33	95	Mut
V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 1	6	PC1017	FL16.1	W	Y	0	V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 1	5	PC1029	FL16.1	W	Y	0
		PC1056	FL16.2	W	Y	0			PC1064	SP2	W	Y	0
		PC1053	FL16.1	W	Y	0			PC1031	SP2	W	Y	0
		PC1020	FL16.1	W	Y	0			PC1032	FL16.1	W	Y	0
V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 2	8	PC933	FL16.1	W	Y	0	V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 2	8	PC941	FL16.1	W	Y	0
		PC934	FL16.1	W	Y	0			PC943	FL16.1	W	Y	0
		PC937	FL16.1	W	Y	0			PC944	FL16.1	W	Y	0
		PC939	FL16.1	W	Y	0			PC945	FL16.1	W	Y	0
						PC946			FL16.1	W	Y	0	
						PC983			FL16.1	W	Y	0	
						PC986			FL16.1	W	Y	0	
						PC947			x	W	G(H)	0	
V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 3	3	PC1021	FL16.1	W	Y	0			V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 3	4	PC1033	FL16.1	W
		PC1023	x	W	Y	0	PC1034	FL16.1			W	Y	0
		PC1057	FL16.1	W	Y	0	PC1036	FL16.1			W	Y	0
					PC1035	SP2	W	D			0		
V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 4	4	PC1025	FL16.1	W	Y	0	V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 4	4	PC1037	FL16.1	W	Y	0
									PC1038	SP2	W	Y	0
									PC1040	x	W	Y	0

Table 3-5 初回免疫後7日目に単離したプラズマ細胞由来のV<sub>H</sub>遺伝子の構造的

<sup>a</sup> シーケンスを行ったプラスミド数。V<sub>H</sub>186.2遺伝子以外を有するクローンは除外した。同一の配列は一つの遺伝子とした。

<sup>b</sup> いくつかのクローンのD<sub>H</sub>遺伝子は同定することができずxと示した。SP2はDSP2ファミリーを示す。

<sup>c</sup> V<sub>H</sub>33番目のアミノ酸残基。

<sup>d</sup> V<sub>H</sub>95番目のアミノ酸残基。G(H)は95番目がGlyであり、100番目がHisであることを表す。

<sup>e</sup> V<sub>H</sub>領域の体細胞超突然変異によるアミノ酸置換数。



IgM <sup>+</sup> PC							Class-switched PC									
	# <sup>a</sup>	clone	D <sub>H</sub> <sup>b</sup>	33 <sup>c</sup>	95 <sup>d</sup>	Mut <sup>e</sup>		#	clone	D <sub>H</sub>	33	95	Mut			
V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 1	10	PC751	FL16.1	W	Y	0	V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 1	8	PC1131	FL16.1	W	Y	9			
		PC1122	FL16.1	W	Y	0			PC767	FL16.1	L	Y	11			
		PC752	x	W	N	0			PC768	FL16.1	L	Y	20			
								PC1133	FL16.1	L	Y	5				
V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 2	18	PC845	FL16.1	W	Y	0	V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 2	12	PC771	FL16.1	W	Y	0			
		PC756	FL16.1	W	Y	0			PC924	FL16.1	W	Y	13			
		PC757	FL16.1	W	Y	0			PC922	SP2	W	Y	4			
		PC847	FL16.1	W	Y	0			PC923	SP2	W	Y	11			
		PC914	FL16.1	W	Y	1			PC773	FL16.1	L	Y	3			
		PC916	FL16.1	W	Y	0			PC774	SP2	L	Y	15			
		PC957	FL16.1	W	Y	3			PC917	FL16.1	L	Y	5			
		PC848	FL16.1	W	S	0			PC918	FL16.1	L	Y	12			
		PC909	FL16.1	W	S	0			PC772	Q52	Y	Y	8			
V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 3	8	PC760	SP2	W	G(H)	0	V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 3	8	PC1136	SP2	W	Y	8			
		PC1125	Q52	W	D	0			PC775	FL16.1	W	A	7			
								PC1137	FL16.1	L	W	8				
V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 4	1	PC763	FL16.1	W	Y	0	V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 4	8	PC781	SP2	W	Y	6			
		PC764	FL16.1	W	Y	0			PC1140	SP2	W	Y	10			
		PC1128	SP2	W	Y	10			PC1142	SP2	W	Y	10			
		PC765	SP2	W	R	0			PC779	FL16.1	L	Y	9			
		PC766	x	W	S	0			PC782	x	L	Y	7			
								PC1139	SP2	L	Y	9				
								PC1141	FL16.1	L	Y	12				

Table 3-6 二次免疫後3日目に単離したプラズマ細胞由来のV<sub>H</sub>遺伝子の構造的

<sup>a</sup> シーケンスを行ったプラスミド数。V<sub>H</sub>186.2遺伝子以外を有するクローンは除外した。同一の配列は一つの遺伝子とした。

<sup>b</sup> いくつかのクローンのD<sub>H</sub>遺伝子は同定することができずxと示した。SP2はDSP2ファミリーを示す。

<sup>c</sup> V<sub>H</sub>33番目のアミノ酸残基。

<sup>d</sup> V<sub>H</sub>95番目のアミノ酸残基。G(H)は95番目がGlyであり、100番目がHisであることを表す。

<sup>e</sup> V<sub>H</sub>領域の体細胞超突然変異によるアミノ酸置換数。

IgM <sup>+</sup> PC							Class-switched PC							
	# <sup>a</sup>	clone	D <sub>H</sub> <sup>b</sup>	33 <sup>c</sup>	95 <sup>d</sup>	Mut <sup>e</sup>		#	clone	D <sub>H</sub>	33	95	Mut	
V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 1	8	PC473	FL16.1	W	G(H)	9	V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 1	8	PC652	FL16.1	W	Y	5	
		PC636	SP2	W	Q	1			PC653	FL16.1	W	Y	5	
		PC474	FL16.2	F	Y	9			PC655	FL16.1	W	Y	8	
									PC489	FL16.1	L	Y	7	
									PC492	FL16.1	L	Y	9	
									PC490	FL16.1	W	G(H)	6	
V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 2	36	PC477	Q52	W	Y	0	V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 2	28	PC496	x	W	Y	5	
		PC566	x	W	Y	4			PC592	FL16.1	W	Y	2	
		PC640	FL16.1	W	Y	9			PC658	FL16.1	W	Y	5	
		PC642	FL16.1	W	Y	0			PC659	FL16.1	W	Y	5	
		PC643	FL16.1	W	Y	6			PC494	Q52	L	Y	1	
		PC480	FL16.1	L	Y	2			PC495	FL16.1	L	Y	6	
		PC567	FL16.1	L	Y	9			PC578	FL16.1	L	Y	7	
		PC574	FL16.1	L	Y	8			PC580	FL16.1	L	Y	1	
		PC606	FL16.1	L	Y	11			PC581	FL16.1	L	Y	4	
		PC610	FL16.1	L	Y	16			PC582	Q52	L	Y	10	
		PC602	FL16.1	W	G(H)	11			PC583	FL16.1	L	Y	7	
										PC584	FL16.1	L	Y	2
										PC585	FL16.1	L	Y	11
						PC586	FL16.1	L	Y	3				
						PC591	FL16.1	L	Y	10				
						PC656	FL16.1	L	Y	6				
						PC657	SP2	L	Y	11				
						PC493	FL16.1	W	G(H)	15				
						PC579	FL16.1	W	G(H)	4				
						PC587	FL16.1	W	G(H)	1				
						PC588	FL16.1	W	G(H)	6				
						PC593	FL16.1	W	S	2				
V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 3	7	PC645	FL16.1	W	G(H)	0	V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 3	7	PC498	x	W	Y	3	
		PC646	FL16.1	W	G(H)	8			PC500	x	W	Y	0	
		PC481	FL16.1	W	S	0			PC661	FL16.1	W	Y	10	
		PC482	SP2	W	G	1			PC497	x	L	Y	6	
								PC499	x	L	Y	1		
V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 4	8	PC485	SP2	W	R	0	V <sub>H</sub> -J <sub>H</sub> 4	8	PC664	SP2	W	Y	8	
		PC487	SP2	W	R	0			PC665	FL16.1	W	Y	5	
								PC501	SP2	L	Y	5		
								PC502	FL16.1	L	Y	3		
								PC503	SP2	L	Y	9		
								PC1067	SP2	L	Y	5		
								PC1068	FL16.1	L	Y	5		
								PC666	FL16.1	L	Y	3		
								PC667	SP2	L	Y	3		

Table 3-7 二次免疫後5日目に単離したプラズマ細胞由来のV<sub>H</sub>遺伝子の構造的

<sup>a</sup> シーケンスを行ったプラスミド数。V<sub>H</sub>186.2遺伝子以外を有するクローンは除外した。同一の配列は一つの遺伝子とした。

<sup>b</sup> いくつかのクローンのD<sub>H</sub>遺伝子は同定することができずxと示した。SP2はDSP2ファミリーを示す。

<sup>c</sup> V<sub>H</sub>33番目のアミノ酸残基。

<sup>d</sup> V<sub>H</sub>95番目のアミノ酸残基。G(H)は95番目がGlyであり、100番目がHisであることを表す。

<sup>e</sup> V<sub>H</sub>領域の体細胞超突然変異によるアミノ酸置換数。

## 第六章 総括

ハプテンとは、Karl Landsteiner が 1921 年に人工抗原の研究に際して提唱した概念上の抗原決定基であり、その定義によれば、独立では抗原性をもたないが、他のタンパク質(担体)と結合させて投与することで特異的な抗体を作らせ、その抗体と結合する能力を有する低分子物質を指す。ハプテンはニッケルなどの金属、一部の食品色素添加物などがあり、さらに多くの薬物がハプテンとして作用し、血清タンパク質または細胞に結合したタンパク質と共有結合する。この共有結合によりハプテンは免疫原性を持つようになり、抗ハプテン抗体が産生される。プロハプテンは代謝に伴いハプテンとなる。例えば、ペニシリンそのものには抗原性がないが、その主要分解産物であるベンジルペニシリン酸は組織タンパク質と結合でき、主要な抗原決定基であるベンジルペニシロイル (BPO) を形成する。この様に、様々なハプテンが免疫系に対してアレルギーを発症し、接触性皮膚炎などを引き起こすと考えられている。

研究において、ハプテンはキャリアタンパク質に共有結合することで、T 細胞依存的な免疫応答を誘導することができ、抗ハプテン抗体の親和性を容易に測定できることや、キャリア特異的な T 細胞とハプテン特異的な B 細胞を分離して解析できることから、広く T 細胞依存的免疫応答の研究に使用されてきた。ハプテン-キャリア免疫の古典的なモデルでは、予めアジュバントと共にキャリアタンパク質を免疫してキャリア特異的な T 細胞を誘導後、アジュバントなしでハプテン-キャリアタンパク質を投与すると抗ハプテン抗体の産生が誘導される結果から、キャリア特異的な T 細胞が、ハプテン特異的な B 細胞の抗体産生細胞分化を補助すると考えられてきた。しかし、金属や薬物等は自己タンパク質と共有結合することで免疫原性を獲得することからも、このモデルが全てのハプテン-キャリア免疫現象を説明できるか疑問であった。今回、phOx-OVA と phOx-MSA をマウスに免疫し、B 細胞の特異的と T 細胞応答を解析することによって、抗原性におけるハプテン化の影響と、OVA と MSA の免疫原性について調べた結果、ハプテン特異的な B 細胞が、ハプテン-キャリア特異的な T 細胞の補助によって活性化されることが判明した。また、自己タンパク質とハプテン-自己タンパク質は完全に異なる抗原として認識されることから、この新たなモデルがハプテン化タンパク質全般に当てはまると考えられ、化学修飾タンパク質の認識における T 細胞の通的な役割であることを示している。今回使用した、phOx-キャリアタンパク質に対する BCR の親和性測定や、phOx-OVA の T 細胞エピトープの解析および T 細胞レパトリーの解析等によって、さらに化学修飾タンパク質に対する免疫応答の理解が深まると考える。

ハプテン系は抗体の親和性成熟機構の解明にも広く用いられてきた。

2-phenyloxazol-5-one (phOx) 、 p-azophenylarsonate (Ars) 、 phosphorylcholine (PC) などのさまざまなハプテン系が用いられているが、(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetic acid (NP)は親和性成熟機構の解明に特に有用である。それは、C57BL/6 マウスの NP 誘導体に対する免疫応答が clonal dominance を示すため、体細胞超突然変異と親和性の関係を理解しやすく、継時的な抗体親和性成熟の進行を研究しやすい点である。親和性成熟機構を解明することは、免疫学における知識を広げるだけでなく、より高親和性の抗体を人工的に作製する際にも有用な知見を与える。現在、抗体の抗原に対する高い結合特異性を利用して、免疫組織化学、ELISA、ウエスタンブロットなど実験試薬、診断薬だけでなく、癌、自己免疫疾患、新興・再興感染症などの難治性疾患の治療薬、いわゆる抗体医薬としての利用が活発に行われている。そうした抗体医薬となる高特異性・高親和性のモノクローナル抗体の、効率的な作製技術の開発へのニーズが高まっている。ヒトに投与する治療用抗体の多くは、マウス由来のハイブリドーマが産生する抗体の定常領域やフレームワーク領域をヒト化した、マウス-ヒトキメラ抗体が用いられてきた。しかし、マウス由来の成分を含むことから、投与抗体に対する免疫応答が問題であった。1990年に McCafferty らによって、singl chain Fv や Fab を線状ファージ上に提示する方法である、ファージディスプレイ法が開発され、分子生物学的手法の発展もあり、大きな多様性を有する抗体ライブラリーが作製できるようになった。このライブラリーを用いて動物免疫を行うことなく、また、ハイブリドーマ作製技術を迂回してモノクローナル抗体を作製できるようになった。さらに、ライブラリー作製時に、ヒト B 細胞由来の抗体遺伝子を使用することで、完全ヒト抗体を得ることが出来るようになり、既に自己免疫疾患を治療する目的で TNF $\alpha$ をターゲットとした adalimumab (Humira)を始めとした、遺伝子組換えによって作られた完全ヒト抗体が臨床使用されている。また、Wittrap らによって開発された酵母表面ディスプレイ技術の応用と error prone PCR 法によって、人工的に抗体遺伝子に突然変異を導入し、親和性の上昇した抗体を得る方法が生まれ、数十 fM の親和性を有した抗体も得られている(116)。これら遺伝子組み換え技術を用いることで、生体に免疫することが出来ないような毒素に対する抗体や、免疫原性の低い抗体、さらに、自己成分に対する抗体も得ることが出来る。これは、生体に免疫する必要が無いことと、ライブラリー作製時に H 鎖と L 鎖がシャッフルされることに起因する。つまり、本来生体においては自己反応性を有する等で存在しない H 鎖と L 鎖のペアがライブラリー中には存在し、それらが自己成分にも反応する抗体として得られる。本研究で、抗 NP 胚細胞 95Gly 型抗体に人工的に少数の変異を導入して得られた NP に対する親和性が上昇したクローンは、ハイブリドーマや B 細胞の解析では得られたことが無い。つまり、生体では自己反応性を有する BCR を発現する B 細胞として消去されている可能性が高く、交差反応性が高い抗体であることが示唆される。一方、抗 NP 胚細胞 95Tyr 型抗体を人工的に親和性成熟させた際には、この型の特徴である、VH33 番目のアミノ酸残基であるトリプトファン



ン残基がロイシン残基に置換(W33L 変異)された抗体が優位に得られた。95Tyr 型抗体の W33L 変異を有する抗体は、ハイブリドーマ法においても高頻度 to 得られ、マウスに対する自己反応性が無いと考えられる。本研究で、これら 2 つの型は、最高親和性到達能(進化能力)が大きく異なり、それは V<sub>H</sub>95 番目のアミノ酸残基と CDR 3H の長さによって規定される親和性成熟戦略が大きく異なることに起因することが明らかになった。人工的な親和性成熟を考えた場合、親和力の高い抗体を得る際には進化能力の高い 95Gly 型が有用であると考えられるが、交差反応性をも考慮し、ある程度の親和力の上昇で十分な際には、95Tyr 型がより有利であるかもしれない。

体細胞免疫応答において最初に生産される抗体は常に IgM であり、これは IgM のみがクラススイッチによらずに発現されるからである。初期に生産される IgM は B 細胞が体細胞超突然変異を起こす前に生産され、親和性は一般に低いが、IgM は 5 量体を形成することにより、10 か所の抗原結合部位が同時に多価抗原に結合することが出来る。この多価結合性によって、単量体 IgM の低親和性が代償されており、IgM 全体として高い avidity を示す。5 量体形成による分子量の増大の結果、IgM は主に血中と一部リンパ液に存在し、効果的な補体活性化能を示す。血液の感染は速やかに対処しなければ重篤になるため、IgM の迅速な生産とそれによる効率的な補体系の活性化はこのような感染への対応に重要な役割を果たしている。二次応答においても IgM は生産されるが親和性は低く、親和性の上昇した IgG、IgA、IgE などの他のイソタイプが優位になる。これらのイソタイプは IgM と比較して分子量が小さく、血中から容易に組織へと拡散できる。クラススイッチ後の抗体の有効性には個々の抗原結合部位の親和性が決定的であり、抗体の親和性成熟が重要な鍵となる。二次免疫応答で生産される IgM は低親和性のままであり、重要な役割を担っているとは考えられていなかった。しかし、本研究において、二次免疫応答時の IgM 抗体レパートリーが IgG 抗体レパートリーと異なり、超低親和性 IgM 抗体が IgM+記憶 B 細胞から高頻度に産生されることが判明した。さらに、この超低親和性 IgM 抗体が高親和性 IgM 抗体よりも補体活性化能が高いことが判明した。つまり、初期免疫のみならず、二次免疫応答においても IgM はユニークな免疫機能を有していることが示唆された。これは、有用な抗体は親和性が高い抗体であるという概念と逆であり、前述した抗体医薬等の開発にとっても重要な知見である。



## 第七章 学会発表

1. Germinal Center Reaction Actively Induces Somatic Hypermutation in IgM but Down-regulates Class Switch Recombination.  
Yasuyuki Tashiro, Yasushi Hara, Akikazu Murakami, Takachika Azuma.  
第 42 回日本免疫学会学術集会、2013 年 12 月 12 日
2. フェージライブラリー法を用いた抗体進化能力の *in vitro* での解析  
中山 光子、村上 明一、西村 深雪、岸本 英博、内海 文彰、東 隆親  
第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 5 日
3. Characterization of memory B cells responsible for affinity maturation of anti-(4-Hydroxy-3-Nitrophenyl)acetyl (NP) antibodies.  
Miyuki Nishimura, Yasushi Hara, Akikazu Murakami, and Takachika Azuma  
日本免疫学会、2011 年 12 月
4. IgM+ memory B cells involved in immune response to a T cell dependent antigen.  
Yasushi Hara, Akikazu Murakami, Miyuki Nishimura, Takeyuki Shimizu, Takachika Azuma  
日本免疫学会、2011 年 12 月
5. Characterization of memory B cells responsible for affinity maturation of anti-(4-Hydroxy-3-Nitrophenyl)acetyl (NP) antibodies  
Miyuki Nishimura, Yasushi Hara, Akikazu Murakami, and Takachika Azuma.  
The 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology 2010 年 08 月
6. 抗体を用いた還元型リゾチームの構造平衡の評価  
丸岡麻美、北井麻希、村上明一、西村深雪、東 隆親、織田昌幸  
第 464 回日本農芸化学会、2010 年 5 月 29 日
7. Search for memory B cells responsible for high affinity antibody production during immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl CGG  
Miyuki Nishimura, Akikazu Murakami, Takachika Azuma  
日本免疫学会、2009 年 12 月
8. Identificaton of High affinity memory B cells by fluorescence-activated cell sorter.

Miyuki Nishimura, Akikazu Murakami, Takuma Sagawa, Takachika Azuma  
日本免疫学会、2008年12月

9. 立体構造エピトープを認識する抗体の抗原結合速度  
北井麻希、丸岡麻美、村上明一、西村深雪、大栗誉敏、阿部義人、植田正、  
中村春木、東隆親、織田昌幸、  
蛋白質科学会、2009年5月20日
10. 抗原・抗体複合体の直接観察：抗原の大きさ、結合価、及び抗体の結合親  
和性の影響  
古賀舞子、真柳浩太、北井麻希、村上明一、東隆親、織田昌幸  
第45回日本生物物理学会年会、2007年12月21日～23日
11. Changing Antibody Evolvability by Replacing an Amino Acid Residue at the  
Junction of Variable and Diversity Segments of Heavy chains.  
Akikazu Murakami, Yuka Takahashi, Takachika Azuma  
日本免疫学会、2007年11月
12. 抗体の構造およびアフィニティーとエフェクター機能との関係  
西村深雪、村上明一、東隆親  
日本免疫学会、2006年12月11日～12月13日
13. ELISAによる低親和性抗NP抗体の親和性測定系の確立  
佐藤将吉、中川将利、村上明一、古川功治、東隆親  
日本免疫学会、2006年12月11日～12月13日
14. 抗体の構造およびアフィニティーとエフェクター機能との関係  
西村深雪、村上明一、東隆親  
日本免疫学会、2006年12月11日～12月13日
15. Dynamism of immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl hapten AID  
deficient mice  
Takeyuki Shimizu, Mina Ohsako, Akikazu Murakami, Masamichi Muramatu,  
Tasuku Honjo, Azuma Takachika  
日本免疫学会、2005年12月13日～12月15日

16. 抗体に発現する体細胞突然変異の自己免疫系による認識  
遠藤加奈子、清水健之、村上明一、東隆親  
日本免疫学会、2005年12月13日～12月15日

## 第八章 発表論文

1. Wada, M. R., Murakami, A. R., Kawamura, H., Nakamori, R., Tanaka, K. J., Nakayama, H., and Nishikata, T. The expression of the protochordate homologue of the proteasome regulatory subunit Rpn12 is transcriptionally, and post-translationally regulated during cleavage stage. *Zool. Sci.* 16, 125-129. 1999 Feb 15.
2. Nakamori, R., Murakami, A., and Nishikata, T. Characterization of MTR1: A novel protein correlated with the myoplasmic movement during ascidian ooplasmic segregation. *Mem. Konan Univ., Sci. Ser.* 46, 25-33. 1999.
3. Kawashima, T., Murakami, A. R., Ogasawara, M., Tanaka, K. J., Isoda, R., Sasakura, Y., Nishikata, T., Okano, H., and Makabe, K. W. Expression patterns of musashi homologus of the ascidians, *Halocynthia roretzi* and *Ciona intestinalis*. *Devl. Genes Evol.* 210, 162-165. 2000.
4. Katano, M., Yamada, A., Tanaka, K. J., Murakami, A., Taira, K., Kawakami, J. Sugimoto, N., and Nishikata, T. Utilization of ribozymes for loss-of-function analyses of the early development of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mem. Konan Univ., Sci. Ser.* 48, 11-20. 2001.
5. Tomonori, I, Kei Ohnuma, Akikazu Murakami, Naruhiko Takasawa, Seiji Kobayashi, Nam H. Dang, Stuart F. Schlossman, Chikao Morimoto. CD26-mediated signaling for T cell activation occurs in lipid rafts through its association with CD45RO. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(21):12138-43. Epub. 2001 Oct 2.
6. Dongsheng Zhang, Akikazu Murakami, Paul R. Johnson, Jianhua Sui, Jihua Cheng, Jirong Bai, Wayne A. Marasco. Optimization of ex vivo activation and expansion of macaque primary CD4-enriched peripheral blood mononuclear cells for use in anti-HIV immunotherapy and gene therapy strategies. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 32(3):245-54. 2003 Mar 1.

7. Tomonori Ishii, Kei Ohnuma, Akikazu Murakami, Naruhiko Takasawa, Tadanori Yamochi, Satoshi Iwata, Masahiko Uchiyama, Nam H. Dang, Hirotochi Tanaka, Chikao Morimoto. SS-A/Ro52, an Autoantigen Involved in CD28-Mediated IL-2 Production. *J Immunol.* 170(7):3653-61. 2003 Apr 1
8. Jianhua Sui, Wenhui Li, Akikazu Murakami, Azaibi Tamin, Leslie J. Matthews, Swee Kee Wong, Michael J. Moore, Aimee St. Clair Tallarico, Mobolaji Olurinde, Hyeryun Choe, Larry J. Anderson, William J. Bellini, Michael Farzan, Wayne A. Marasco. Potent Neutralization of SARS Coronavirus Infection by a Human Monoclonal Antibody Against the ACE2-Binding Domain of Spike Protein. *Proc Natl Acad Sci*, 101(8):2536-41. 2004 Feb 24
9. Wenhui Li, Chengsheng Zhang, Jianhua Sui, Jens H Kuhn, Michael J Moore, Shiwen Luo, Swee-Kee Wong, I-Chueh Huang, Keming Xu, Natalya Vasilieva, Akikazu Murakami, Yaqing He, Wayne A Marasco, Yi Guan, Hyeryun Choe, Michael Farzan. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J.* 24(8):1634-43. 2005 Apr 20
10. Jianhua Sui, Wenhui Li, Anjeanette Roberts, Leslie J. Matthews, Akikazu Murakami, Leatrice Vogel, Swee Kee Wong, Kanta Subbarao, Michael Farzan, Wayne A. Marasco. Evaluation of human monoclonal antibody 80R for immunoprophylaxis of severe acute respiratory syndrome by an animal study, epitope mapping, and analysis of spike variants. *J Virol* 79:5900-6. 2005 May.
11. Harshawardhan P. Bal, Jihua Cheng, Akikazu Murakami, Aimee St. Claire Tallarico, Wei Wang, Daixing Zhou, Thomas J. Vasicek, Wayne A. Marasco. GITR overexpression on CD4+CD25+ HTLV-I transformed cells: Detection by massively parallel signature sequencing. *Biochem Biophys Res Commun.* 332:569-84. 2005 July 1.



12. L. Hannah Gould, Jianhua Sui, Harald Foellmer, Theodore Oliphant, Tian Wang, Michel Ledizet, Akikazu Murakami, Kristin Noonan, Cassandra Lambeth, Kalipada Kar, John F. Anderson, Aravinda M. de Silva, Michael S. Diamond, Raymond A. Koski, Wayne A. Marasco, Erol Fikrig. Protective and therapeutic capacity of human single-chain Fv-Fc fusion proteins against West Nile virus. *J Virol.* 79(23):14606-13. 2005 Dec.
13. Koji Furukawa, Takeyuki Shimizu, Akikazu Murakami, Ryo Kono, Masatoshi Nakagawa, Takuma Sagawa, Ichiro Yamato, Takachika Azuma. Strategy for affinity maturation of an antibody with high evolvability to (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl hapten. *Mol Immunol.* 2007 Mar;44(9):2436-45. Epub 2006 Nov 21.
14. Jihua Cheng, Andre R Kydd, Koichi Nakase, Kristin M Noonan, Akikazu Murakami, Hong Tao, Markryan Dwyer, Chen Xu, Quan Zhu, Wayne A Marasco. Negative regulation of the SH2-homology-containing protein-tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) P2 promoter by the HTLV-1 tax oncoprotein. *Blood.* 100(6):2110-20. 2007 May.
15. Takeyuki Shimizu, Yuko Osaka, Chihiro Banri-Koike, Maiko Yoshida, Kanako Endo, Koji Furukawa, Masayuki Oda, Akikazu Murakami, Shuhei Ogawa, Ryo Abe, Takachika Azuma. T cells specific to hapten carrier but not to carrier alone assist in the production of anti-hapten and anti-carrier antibodies. *Int, Immunol.*,19(10):1157-64. 2007 Oct
16. Jianhua Sui, Daniel R. Aird, Azaibi Tamin, Akikazu Murakami, Meiyong Yan, Anuradha Yammanuru, Huaiqi Jing, Biao Kan, Xin Liu, Quan Zhu, Qing-an Yuan, Gregory P. Adams, William J. Bellini, Jianguo Xu, Larry J. Anderson, Wayne A. Marasco. Broadening of Neutralization Activity to Directly Block a Dominant Antibody-Driven SARS-Coronavirus Evolution Pathway. *PLoS Pathogens* 4. 2008 Nov 7.

17. Jianhua Sui, William C. Hwang, Sandra Perez, Ge Wei, Daniel Aird, Li-mei Chen, Eugenio Santelli, Boguslaw Stec, Greg Cadwell, Maryam Ali, Hongquan Wan, Akikazu Murakami, Anuradha Yammanuru, Thomas Han, Nancy J. Cox, Laurie A. Bankston, Ruben O. Donis, Robert C. Liddington, Wayne A. Marasco<sup>1</sup>. Structural and Functional Basis for Broad-Spectrum Neutralization of Avian and Human Influenza A Viruses. *Nat Struct Mol Biol.* 2009 Feb 22.
18. Masayuki Oda, Aki Kitai, Akikazu Murakami, Miyuki Nishimura, Takatoshi Ohkuri, Yoshito Abe, Tadashi Ueda, Haruki Nakamura, Takachika Azuma. Evaluation of the conformational equilibrium of reduced hen egg lysozyme by antibodies to the native form. *Arch Biochem Biophys.*494(2):145-50. Epub 2009 Nov 26.
19. Xu Chen, Lo Agnes, Yammanuru Anuradha, Tallarico Aimee St Clair, Brady Kristen, Murakami Akikazu, Barteneva Natasha, Zhu Quan, Marasco Wayne A. Unique biological properties of catalytic domain directed human anti-CAIX antibodies discovered through phage-display technology. *PLoS One.*5(3):e9625. 2010 Mar 10.
20. Akikazu Murakami, Yuka Takahashi, Miyuki Nishimura, Takeyuki Shimizu, Takachika Azuma. The amino acid residue at position 95 and the third CDR region in the H chain determine the ceiling affinity and the maturation pathway of an anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl antibody. *Mol Immunol.* 2010 Nov-Dec;48(1-3):48-58. Epub 2010 Oct 20.
21. Miyuki Nishimura, Akikazu Murakami, Yasushi Hara, Takachika Azuma. Characterization of memory B cells responsible for affinity maturation of anti- (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) antibodies. *Int. Immunol.* 23 (4): 271-285. First published online: 2011Mar 18.
22. Atsuko Miyazaki, Satomi Yogosawa, Akikazu Murakami, Daisuke Kitamura. Identification of CMTM7 as a Transmembrane Linker of BLNK and the B-Cell Receptor. *PLoS ONE* 7(2): e31829. 2012 Feb 21.

23. Akikazu Murakami, Hayato Moriyama, Mina Osako-Kabasawa, Kanako Endo, Miyuki Nishimura, Keiko Udaka, Masamichi Muramatsu, Tasuku Honjo, Takachika Azuma, Takeyuki Shimizu. Low affinity IgM antibodies lacking somatic hypermutations are produced in the secondary response of C57BL/6 mice to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl hapten. *International Immunology* /accepted 2013 Oct 09.
  
24. Koichi Kutsuzawa, Chihiro Takahashi, Ryohei Sato, Toshihiro Suzuki, Hidehiro Kishimoto, Akikazu Murakami, Takachika Azuma, Ryo Abe, Hidenori Otsuka, Multiarray Formation of CHO Spheroids Cocultured with Feeder Cells for Highly Efficient Protein Production in Serum-Free Medium. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Volume 13, Number 1, pp. 229-235(7). 2013 Jan.

## 謝辞

有意義な研究生生活を送る機会をお与え下さり、基礎研究の大切さ、また、誠実さが有する力をご御教授下さった東京理科大学生命医科学研究所生命情報科学部門 東 隆親教授に謹んで深く深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、有益なご指導、ご助言を賜りました、高知大学医学部医学科免疫学講座 清水 健之先生に謹んで感謝の意を表します。

長きに渡りご指導、ご助言をいただきました、生命医科学研究所 穂積 信道教授、安部 良教授、北村 大介教授、後飯塚 僚教授、久保 允人教授、琉球大学大学院医学研究科寄生虫・免疫病因病態学講座 岸本 英博教授、京都府立大学大学院生命環境学部生命分子化学科生命物理化学研究室 織田 昌幸先生に深く感謝いたします。

東京理科大学生命医科学研究所で共に研究生生活を送った東京理科大学職員 原 泰志先生、東研究室卒業生、佐川 琢麻君、大迫 弥奈さん、西村 深雪さん、遠藤 加奈子さん、森山 隼人君、榎田 純一君、高橋 由香さん、瀬上 真澄君、原田 英子さん、清水 大輔君、須山 良樹君、中島 雄介君、小見川 郁子さん、田代 泰之君、塚原 成俊君、菅野 暁音さん、中山 光子さん、Panasonic 株式会社 村岡 仁君、極東製薬工業株式会社 小柳 亜紀子さん、また、生命医科学研究所関係者の皆様方には多々ご助力頂き、素晴らしい研究生生活を送ることが出来ました、心から感謝いたします。

東京理科大学生命医科学研究所の更なる発展をお祈りいたします。

## 参考文献

1. Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302:575-581.
2. Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C., Baltimore, D. 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*. 248(4962):1517-23.
3. Shockett, P.E., Schatz, D.G. 1999. DNA hairpin opening mediated by the RAG1 and RAG2 proteins. *Mol Cell Biol.* 19(6):4159-66.
4. Komori, T., Okada, A., Stewart, V., Alt, F.W. 1993 Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science*. 261(5125):1171-5.
5. Gauss, G.H., Lieber, M.R. 1996. Mechanistic constraints on diversity in human V(D)J recombination. *Mol Cell Biol.* 16(1):258-69.
6. Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell.* 102:553.
7. Gray, W.R., Dreyer, W.J., Hood, L. 1967. Mechanism of antibody synthesis: size differences between mouse kappa chains. *Science.* 155(3761):465-467.
8. Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., and Weiss, U., 1991. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 354, 389-392.
9. Rogozin, I. B., and Kolchanov, N. A. 1992. Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta.*1171:11
10. Lebecque, S. G., and Gearhart, P. J. 1990. Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1kb from V(D)J gene. *J. Exp. Med.* 172:3652
11. Azuma, T. 1998. Somatic hypermutation in mouse  $\kappa$  chains. *Immunol. Rev.* 162:97
12. Golding, G. B., Gearhart, P. J. and Glickman, B. W. 1987. Patterns of somatic mutations in immunoglobulin variable genes. *Genetics.* 115:169
13. Kolchanov, N. A., Solovyov, V. V. and Rogozin, I. B. 1987. Peculiarities of immunoglobulin gene structures as a basis for somatic mutation emergence. *FEBS. Lett.* 214:87
14. Betz, A. G., Neuberger, M. S. and Milstein, C. 1993b. Discriminating intrinsic and antigen-selected mutational hotspots in immunoglobulin V genes. *Immunol. Today.* 14:405



15. Jolly, C. J., Wagner, S. D., Rada, C., Klix, N., Milstein, C., and Neuberger, M. S. 1996. The targeting of somatic hypermutation. *Semin. Immunol.* 8:159
16. Cumano, A., and Rajewsky, K., 1985. Structure of primary anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) antibodies in normal and idiotypically suppressed C57BL/6 mice. *Eur. J. Immunol.* 15:512
17. Azuma, T., Sakato, N., Fujio, H., 1987. Maturation of the immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)-acetyl (NP) haptens in C57BL/6 mice. *Mol. Immunol.* 24: 287.
18. Taketani, M., Naitoh, A., Motoyama, N., Azuma, T., 1995. Role of conserved amino acid residues in the complementarity determining regions on hapten-antibody interaction of anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl antibodies. *Mol. Immunol.* 32: 983.
19. Weiss U. and Rajewsky, K. 1990. The repertoire of somatic antibody mutants accumulating in the memory compartment after primary immunization is restricted through affinity maturation and mirrors that expressed in the secondary response. *J. Exp. Med.* 172: 1681.
20. Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102:553
21. Rock, K. L., Benacerraf, B. and Abbas, A. K. 1984. Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. I. Role of surface immunoglobulin receptors. *J. Exp. Med.* 160:1102.
22. Malynn, B. A., Romeo, D. T. and Wortis, H. H. 1985. Antigen-specific B cells efficiently present low doses of antigen for induction of T cell proliferation. *J. Immunol.* 135:980.
23. Rao, A., Faas, S. J. and Cantor, H. 1984. Activation specificity of arsonate-reactive T cell clones. Structural requirements for hapten recognition and comparison with monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 159:479.
24. Martin, S., Ruh, H., Hebbelmann, S., Pflugfelder, U., Rude, B. and Weltzien, H. U. 1995. Carrier-reactive hapten-specific cytotoxic T lymphocyte clones originate from a highly preselected T cell repertoire: implications for chemical-induced self-reactivity. *Eur. J. Immunol.* 25:2788.
25. Gorbachev, A. V., Heeger, P. S. and Fairchild, R. L. 2001. CD4+ and CD8+ T cell priming for contact hypersensitivity occurs independently of CD40-CD154 interactions. *J. Immunol.* 166:2323.
26. Stockl, J., Majdic, O., Fischer, G., Maurer, D. and Knapp, W. 2001. Monomorphic

- molecules function as additional recognition structures on haptened target cells for HLA-A1-restricted, haptenspecific CTL. *J. Immunol.* 167:2724.
27. Ortmann, B., Martin, S., von Bonin, A., Schiltz, E., Hoschutzky, H. and Weltzien, H. U. 1992. Synthetic peptides anchor T cellspecific TNP epitopes to MHC antigens. *J. Immunol.* 148:1445.
  28. von Bonin, A., Ortmann, B., Martin, S. and Weltzien, H. U. 1992. Peptide-conjugated hapten groups are the major antigenic determinants for trinitrophenyl-specific cytotoxic T cells. *Int. Immunol.* 4:869.
  29. Nalefski, E. A. and Rao, A. 1993. Nature of the ligand recognized by a hapten- and carrier-specific, MHC-restricted T cell receptor. *J. Immunol.* 150:3806.
  30. Jang, Y. S., Lim, K. H. and Kim, B. S. 1991. Analysis of T cell reactivities to phosphorylcholine-conjugated hen egg lysozyme in C57BL/6 mice: hapten-conjugate specificity reflects an altered expression of a major carrier epitope. *Eur. J. Immunol.* 21:1303.
  31. Preckel, T., Breloer, M., Kohler, H., von Bonin, A. and Weltzien, H. U. 1998. Partial agonism and independent modulation of T cell receptor and CD8 in hapten-specific cytotoxic T cells. *Eur. J. Immunol.* 28:3706.
  32. Katz, D. H., Paul, W. E., Goidl, E. A. and Benacerraf, B. 1970. Carrier function in anti-hapten immune responses. I. Enhancement of primary and secondary anti-hapten antibody responses by carrier preimmunization. *J. Exp. Med.* 132:261.
  33. Michaelsson, E., Malmstrom, V., Reis, S., Engstrom, A., Burkhardt, H. and Holmdahl, R. 1994. T cell recognition of carbohydrates on type II collagen. *J. Exp. Med.* 180:745.
  34. Weltzien, H. U., Moulon, C., Martin, S., Padovan, E., Hartmann, U. and Kohler, J. 1996. T cell immune responses to haptens. Structural models for allergic and autoimmune reactions. *Toxicology* 107:141.
  35. Padovan, E., von Greyerz, S., Pichler, W. J. and Weltzien, H. U. 1999. Antigen-dependent and -independent IFN- $\gamma$  modulation by penicillins. *J. Immunol.* 162:1171.
  36. Romagnoli, P., Labhardt, A. M. and Sinigaglia, F. 1991. Selective interaction of Ni with an MHC-bound peptide. *EMBO J.* 10:1303.
  37. Makela, O., Kaartinen, M., Pelkonen, J. L. and Karjalainen, K. 1978. Inheritance of antibody specificity V. Anti-2-phenyloxazolone in the mouse. *J. Exp. Med.* 148:1644.
  38. Griffiths, G. M., Berek, C., Kaartinen, M. and Milstein, C. 1984. Somatic mutation and the maturation of immune response to 2- phenyl oxazolone. *Nature* 312:271.

39. Birnboim, H. C., Lemay, A. M., Lam, D. K., Goldstein, R. and Webb, J. R. 2003. Cutting edge: MHC class II-restricted peptides containing the inflammation-associated marker 3-nitrotyrosine evade central tolerance and elicit a robust cell-mediated immune response. *J. Immunol.* 171:528.
40. Abraham, R., Choudhury, A., Basu, S. K., Bal, V. and Rath, S. 1997. Disruption of T cell tolerance by directing a self antigen to macrophage-specific scavenger receptors. *J. Immunol.* 158:4029.
41. Choudhury, A., Mukherjee, P., Basu, S. K., George, A., Rath, S. and Bal, V. 2000. Disruption of T cell tolerance to selfimmunoglobulin causes polyclonal B cell stimulation followed by inactivation of responding autoreactive T cells. *J. Immunol.* 164:1713.
42. Lazarski, C. A., Chaves, F. A., Jenks, S. A. et al. 2005. The kinetic stability of MHC class II:peptide complexes is a key parameter that dictates immunodominance. *Immunity* 23:29.
43. Sagawa, T., Oda, M., Ishimura, M., Furukawa, K., Azuma, T. 2003. Thermodynamic and kinetic aspects of antibody evolution during the immune response to hapten. *Mol. Immunol.* 39: 801.
44. Gurney, R.W., 1953. *Ionic Process in Solution*. McGraw-Hill, New York.
45. Torigoe, H., Nakayama, T., Imazato, M., Shimada, I., Arata, Y., Sarai, A., 1995. The affinity maturation of anti-4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl mouse monoclonal antibody. A calorimetric study of the antigen-antibody interaction. *J. Biol. Chem.* 270: 22218.
46. Allen, D., Simon, T., Sablitzky, F., Rajewsky, K., and Cumano, A. 1988. Antibody engineering for the analysis of affinity maturation of an anti-hapten response. *EMBO J.* 7: 1995.
47. McHeyzer-Williams, M.G., McLean, M.J., Lalor, P.A., and Nossal, G.J.V. 1993. Antigen-driven B cell differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* 178:295.
48. Kim, S.T., Shirai, H., Nakajima, N., Higo, J., Nakamura, H., 1999. Enhanced conformational diversity search of CDR-H3 in antibodies: role of the first CDR-H3 residue. *Proteins* 37, 683–696.
49. Zemlin, M., Klinger, M., Link, J., Zemlin, C., Bauer, K., Engler, J.A., Schroeder Jr., H., Kirkham, P.M., 2003. Expressed murine and human CDR-H3 intervals of equal length exhibit distinct repertoires that differ in their amino acid composition and predicted range of structures. *J. Mol. Biol.* 334, 733–749.
50. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, and Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. 1994. *Annu Rev Immunol.* 12:433-55.

51. Hawkins, R.E., Russell, S.J., and Winter, G. 1992. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol.* 226(3):889-96.
52. Cumano, A. and Rajewsky, K. 1986. Clonal recruitment and somatic mutation in the generation of immunological memory to the hapten NP. *EMBO J.* 5: 2459.
53. Torigoe, H., Nakayama, T., Imazato, M., Shimada, I., Arata, Y., Sarai, A., 1995. The affinity maturation of anti-4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl mouse monoclonal antibody. A calorimetric study of the antigen-antibody interaction. *J. Biol. Chem.* 270: 22218.
54. Mizutani, R., Miura, K., Nakayama, T., Shimada, I., Arata, Y., Satow, Y., 1995. Three-dimensional structures of the Fab fragment of murine N1G9 antibody from the primary immune response and of its complex with (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetate. *J. Mol. Biol.* 254, 208–222.
55. Azuma, T., Motoyama, N., Fields, L.E., and Loh, D.Y., 1993. Mutation of the chloramphenicol acetyl transferase transgene driven by the immunoglobulin promoter and intron enhancer. *Int. Immunol.* 5, 121–130.
56. Betz, A.G., Milstein, C., Gonzalez-Fernandez, A., Pannell, R., Larson, T., and Neuberger, M.S., 1994. Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin gene: critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell* 77, 239–248.
57. Peters, A., and Storb, U., 1996. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity* 4, 57–65.
58. Berek, C., Griffiths, G.M., and Milstein, C., 1985. Molecular events during maturation of the immune response to oxazolone. *Nature* 316, 412–418.
59. Guo, W.-X., Burger, A.M., Fischer, R.T., Sieckmann, D.G., Longo, D.L., Kenny, J.J., 1996. Sequence changes at the V–D junction of anti-phosphocholine antibodies after binding to and protection against *Streptococcus pneumoniae*. *Int. Immunol.* 9, 665–677.
60. Wiens, G.D., Brown, M., Rittenberg, M.B., 2003. Repertoire shift in the humoral response to phosphocholine-keyhole limpet hemocyanin: VH somatic mutation in germinal center B cells impairs T15 Ig function. *J. Immunol.* 170, 5095–5102.
61. Le, T-v., Kim, T.H., and Chaplin, D., 2008. Interaclonal competition inhibits the formation of high-affinity antibody-secreting cells. *J. Immunol.* 181, 6027–6037.
62. MacLennan, I. C., Toellner, K. M., Cunningham, A. F. et al. 2003. Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* 194:8.
63. Victora, G. D. and Nussenzweig, M. C. 2012. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 30:429.

64. Vinuesa, C. G., Linterman, M. A., Goodnow, C. C. and Randall, K. L. 2010. T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. *Immunol. Rev.* 237:72.
65. Chan, T. D. and Brink, R. 2012. Affinity-based selection and the germinal center response. *Immunol. Rev.* 247:11.
66. Notidis, E., Heltemes, L. and Manser, T. 2002. Dominant, hierarchical induction of peripheral tolerance during foreign antigen-driven B cell development. *Immunity* 17:317.
67. Liu, Y. J., Joshua, D. E., Williams, G. T., Smith, C. A., Gordon, J. and MacLennan, I. C. 1989. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342:929.
68. Manz, R. A., Thiel, A. and Radbruch, A. 1997. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388:133.
69. Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E. O. et al. 2006. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat. Rev. Immunol.* 6:741.
70. Furukawa, K., Akasako-Furukawa, A., Shirai, H., Nakamura, H. and Azuma, T. 1999. Junctional amino acids determine the maturation pathway of an antibody. *Immunity* 11:329.
71. Bothwell, A. L., Paskind, M., Reth, M., Imanishi-Kari, T., Rajewsky, K. and Baltimore, D. 1981. Heavy chain variable region contribution to the NPb family of antibodies: somatic mutation evident in a gamma 2a variable region. *Cell* 24:625.
72. Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. and Foeller, C. 1991. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5th edn. U.S. Department of Health and Human Service, Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD.
73. Lu, Y. F., Singh, M. and Cerny, J. 2001. Canonical germinal center B cells may not dominate the memory response to antigenic challenge. *Int. Immunol.* 13:643.
74. Rajewsky, K., Förster, I. and Cumano, A. 1987. Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. *Science* 238:1088.
75. Allen, D., Simon, T., Sablitzky, F., Rajewsky, K. and Cumano, A. 1988. Antibody engineering for the analysis of affinity maturation of an anti-hapten response. *EMBO J.* 7:1995.
76. French, D. L., Laskov, R. and Scharff, M. D. 1989. The role of somatic hypermutation in the generation of antibody diversity. *Science* 244:1152.
77. Anderson, S. M., Tomayko, M. M., Ahuja, A., Haberman, A. M. and Shlomchik, M.



- J. 2007. New markers for murine memory B cells that define mutated and unmutated subsets. *J. Exp. Med.* 204:2103.
78. Tomayko, M. M., Steinel, N. C., Anderson, S. M. and Shlomchik, M. J. 2010. Cutting edge: hierarchy of maturity of murine memory B cell subsets. *J. Immunol.* 185:7146.
79. Good-Jacobson, K. L. and Tarlinton, D. M. 2012. Multiple routes to B-cell memory. *Int. Immunol.* 24:403.
80. Reynaud, C. A., Descatoire, M., Dogan, I., Huetz, F., Weller, S. and Weill, J. C. 2012. IgM memory B cells: a mouse/human paradox. *Cell. Mol. Life Sci.* 69:1625.
81. Kruetzmann, S., Rosado, M. M., Weber, H. et al. 2003. Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J. Exp. Med.* 197:939.
82. White, H. and Gray, D. 2000. Analysis of immunoglobulin (Ig) isotype diversity and IgM/D memory in the response to phenylloxazalone. *J. Exp. Med.* 191:2209.
83. Klein, U., Küppers, R. and Rajewsky, K. 1997. Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood* 89:1288.
84. Taylor, J. J., Pape, K. A. and Jenkins, M. K. 2012. A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J. Exp. Med.* 209:597.
85. Kaji, T., Ishige, A., Hikida, M. et al. 2012. Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *J. Exp. Med.* 209:2079.
86. Pape, K. A., Taylor, J. J., Maul, R. W., Gearhart, P. J. and Jenkins, M. K. 2011. Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science* 331:1203.
87. Oda, M. and Azuma, T. 2000. Reevaluation of stoichiometry and affinity/avidity in interactions between anti-hapten antibodies and mono- or multi-valent antigens. *Mol. Immunol.* 37:1111.
88. Oi, V. T., Morrison, S. L., Herzenberg, L. A. and Berg, P. 1983. Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 80:825.
89. Terauchi, A., Hayashi, K., Kitamura, D., Kozono, Y., Motoyama, N. and Azuma, T. 2001. A pivotal role for DNase I-sensitive regions 3b and/or 4 in the induction of somatic hypermutation of IgH genes. *J. Immunol.* 167:811.
90. Furukawa, K., Manabe, A., Furukawa, A., Kuba, H., Okajima, T. and Azuma, T. 2006. Initial repertoire of anti-(4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl) antibodies as potential donors for effective affinity maturation. *Mol. Immunol.* 43:1751.

91. Herzenberg, L. A., Black, S. J., Tokuhisa, T. and Herzenberg, L. A. 1980. Memory B cells at successive stages of differentiation. Affinity maturation and the role of IgD receptors. *J. Exp. Med.* 151:1071.
92. Shimizu, T., Oda, M. and Azuma, T. 2003. Estimation of the relative affinity of B cell receptor by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 276:33.
93. Dal Porto, J. M., Haberman, A. M., Shlomchik, M. J. and Kelsoe, G. 1998. Antigen drives very low affinity B cells to become plasmacytes and enter germinal centers. *J. Immunol.* 161:5373.
94. Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V. et al. 2009. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* 10:1292.
95. Obukhanych, T. V. and Nussenzweig, M. C. 2006. T-independent type II immune responses generate memory B cells. *J. Exp. Med.* 203:305.
96. Song, H. and Cerny, J. 2003. Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *J. Exp. Med.* 198:1923.
97. Alugupalli, K. R., Leong, J. M., Woodland, R. T., Muramatsu, M., Honjo, T. and Gerstein, R. M. 2004. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* 21:379.
98. Gray, D., MacLennan, I. C. and Lane, P. J. 1986. Virgin B cell recruitment and the lifespan of memory clones during antibody responses to 2,4-dinitrophenyl-hemocyanin. *Eur. J. Immunol.* 16:641.
99. Shih, T. A., Meffre, E., Roederer, M. and Nussenzweig, M. C. 2002. Role of BCR affinity in T cell dependent antibody responses in vivo. *Nat. Immunol.* 3:570.
100. Dal Porto, J. M., Haberman, A. M., Kelsoe, G. and Shlomchik, M. J. 2002. Very low affinity B cells form germinal centers, become memory B cells, and participate in secondary immune responses when higher affinity competition is reduced. *J. Exp. Med.* 195:1215.
101. Schwickert, T. A., Victora, G. D., Fooksman, D. R. et al. 2011. A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *J. Exp. Med.* 208:1243.
102. Paus, D., Phan, T. G., Chan, T. D., Gardam, S., Basten, A. and Brink, R. 2006. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J. Exp. Med.* 203:1081.
103. O'Connor, B. P., Vogel, L. A., Zhang, W. et al. 2006. Imprinting the fate of antigen-reactive B cells through the affinity of the B cell receptor. *J. Immunol.*

177:7723.

104. Richard, K., Pierce, S. K. and Song, W. 2008. The agonists of TLR4 and 9 are sufficient to activate memory B cells to differentiate into plasma cells in vitro but not in vivo. *J. Immunol.* 181:1746.
105. Brooks, K. and Knight, A. M. 2004. Lowering the affinity between antigen and the B cell receptor can enhance antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* 34:837
106. Cambi, A., Koopman, M. and Figdor, C. G. 2005. How C-type lectins detect pathogens. *Cell. Microbiol.* 7:481.
107. Baumgarth, N., Herman, O. C., Jager, G. C., Brown, L. E., Herzenberg, L. A. and Chen, J. 2000. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J. Exp. Med.* 192:271.
108. Harada, Y., Muramatsu, M., Shibata, T., Honjo, T. and Kuroda, K. 2003. Unmutated immunoglobulin M can protect mice from death by influenza virus infection. *J. Exp. Med.* 197:1779.
109. Fossati-Jimack, L., Reininger, L., Chicheportiche, Y. et al. 1999. High pathogenic potential of low-affinity autoantibodies in experimental autoimmune hemolytic anemia. *J. Exp. Med.* 190:1689.
110. Swanson, S. M., Dombrink-Kurtzman, M. A. and Voss, E. W., Jr. 1988. C1q binding by a high affinity anti-fluorescein murine monoclonal IgM antibody and monomeric subunits. *Mol. Immunol.* 25:545.
111. Feinstein, A. and Munn, E. A. 1969. Conformation of the free and antigen-bound IgM antibody molecules. *Nature* 224:1307.
112. Perkins, S. J., Nealis, A. S., Sutton, B. J. and Feinstein, A. 1991. Solution structure of human and mouse immunoglobulin M by synchrotron X-ray scattering and molecular graphics modelling. A possible mechanism for complement activation. *J. Mol. Biol.* 221:1345.
113. Landsteiner, K. and J. Jacobs, 1936. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 64, 625–639.
114. von Greyerz, S., Zanni, M., Schnyder, B., Pichler, W.J. 1998. Presentation of non-peptide antigens, in particular drugs, to specific T cells. *Clin Exp Allergy. Suppl* 4:7-11.
115. Chipinda I, Hettick JM, Siegel PD. 2011. Haptenation: chemical reactivity and protein binding. *J Allergy (Cairo)* 10.1155/2011/839682.
116. Boder, E.T., Wittrup, K.D. 1997. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol.* 15(6):553-7.