

氏名（本籍）	むら かがみ あき かず 村上 明 一（兵庫県）
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	乙第 1060 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	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

論文審査委員	（主査）嘱託教授 東 隆親
	教授 安部 良 教授 北村 大介
	教授 後飯塚 僚 教授 久保 允人

論文内容の要旨

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_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(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_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_H 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_H95 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、プラズマ細胞へと分化する。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)を産生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_H95 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_H 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プラズマ細胞へと積極的に分化していることを示している。

論文審査の結果の要旨

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。多くのタンパク質が抗原となり抗体産生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。無限ともいえる抗原に対応するために、抗体は遺伝子の再構成や体細胞突然変異 (SHM) 等の多様性形成メカニズムをもっており、抗(4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル)アセチル(NP)抗体のような構造の単純なハプテンに特異的な抗体であっても様々なアミノ酸配列の抗体が存在する。SHM は T 細胞依存性抗原を免疫することにより誘導され、これにより親和性の増大した B 細胞レセプターを発現する細胞が選択される。この現象は抗体の親和性成熟として知られている。申請者は、抗体の親和性の成熟・制御がどのような機構で行われ、どのように機能に反映されていることを明らかにしようとした。

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 遺伝子で構成されていることから、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いる。即ち、抗 NP 抗体は構成する遺伝子セグメントは同じでも、V_H と D のつなぎ目である 95 番目のアミノ酸残基により Tyr95 型と、Gly95 型の 2 つの型が存在する。初回免疫後 7 日目で得られる抗 NP 抗体の大部分は胚細胞型の Tyr95 型であり、14 日目で得られる抗体も Tyr95 型が大部分であるが、V_H の 33 番目が Trp から 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、NP への免疫応答の初期には Tyr95 型が優位に生産される。一方、Gly95 型は二次免疫後に出現頻度が高くなり、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。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 種類の抗体、即ち早期型 (Tyr95 型) と後期型 (Gly95 型) が関与し、これらの 2 つの型の抗体は、最大到達親和性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と呼んでいる。つまり、Gly95 型は 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り、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ものと考え、2 つの型抗体の進化の方法や進化能について検討した。

これまでの抗 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 Ala から Val への変異や 66 番目の Gly から Asn への変異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ため、これら W33L や V_L の変異がこれら両型の抗体に共通に有効であるかを遺伝子工学的手法で調べた結果、W33L は Tyr95 型でのみで、また、V_L の SHM は Gly95 型でのみ親和性の上昇に寄与することが分かった。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が存在することが分かった。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の方法 (戦略) を規定しており、V_H の 95 番目のアミノ酸残基および CDR 3H が、親和性成熟過程や進化能の決定に重要な役割を果たしていることが分かった。

一方、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、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) を産生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_H95 番目のアミノ酸残基は Tyr か Gly であるが、それ以外のアミノ酸をもつクローンが多数存在し、その多くが V_H 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。このことは、IgM のエフェクター機能の効果的な発現には、親和性成熟が必要でなく、クラスによってエフェクター機能発現のための至適親和性が存在することが示唆された。

以上のように本論文は、抗体の親和性を構造と機能の視点から検討し、免疫学に新しい知見を提供しており、博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと判定する。