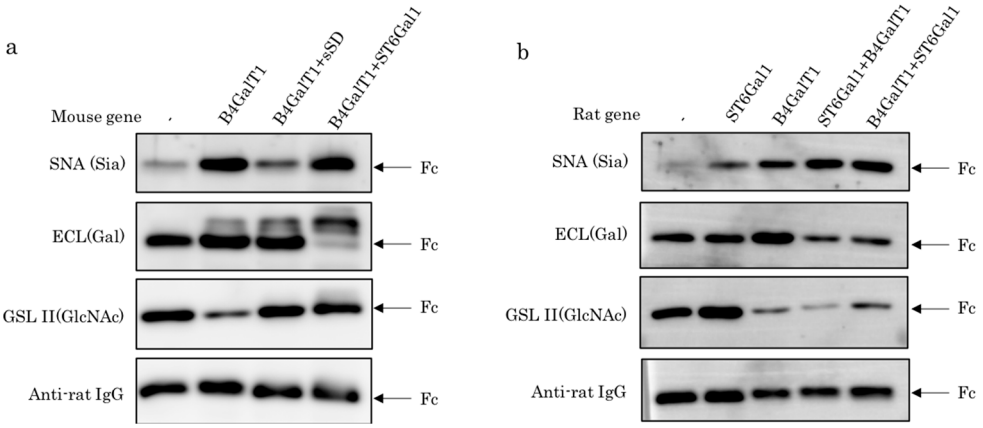
135　IgG上のN型糖鎖改変による新規抗体治療法の検討	大海　雄介

【目的】抗体は特異的な抗原と結合し、さまざまな免疫応答反応を発現するが、このような抗体の機能を利用し、近年、抗体治療が盛んに行われている。一方、IgG は Fc 領域に N 型糖鎖結合部位を一箇所持ち、多様な糖鎖構造が形成される。その中でも末端シアル酸が抗体機能を調節することがわかってきた。我々は、関節リウマチ（RA）において、シアル酸が欠損した抗原特異的抗体は細胞傷害能や炎症誘導能の亢進により癌細胞などへのより効果的な抑制作用が誘導され、逆にシアル酸が付加した抗体では、自己免疫疾患における抗炎症反応を誘導されることを示唆する結果を報告した。しかし、現在、抗体治療に用いられている抗体は糖鎖構造を厳密に制御できていない。そこで、本研究では抗原特異的 IgG 上の糖鎖（主にシアル酸）構造を正確にリモデリングする技術を開発し、さらに、この技術を使って、RA の自己抗体あるいは癌抗原に対する抗体の抗体薬としての効果を検討する。

【方法】マウス、ラットまたはヒト *ST6Gal1* 遺伝子、*B4GalT1* 遺伝子の発現ベクター、さらには、*sialidase* 遺伝子発現ベクターを作製し、マウスハイブリドーマ、ラットハイブリドーマまたはヒトミエローマ細胞にレトロウイルスを用いて遺伝子導入した。それぞれの遺伝子の発現を、*GFP* 遺伝子と *Ds-Red* 遺伝子の蛍光強度で確認し、高発現細胞をセルソーターにて sorting し、蛍光遺伝子発現細胞数が 95%以上の細胞を得た。これらの細胞から精製した IgG の糖鎖構造を lectin blot にて検討した。

【結果】ラットハイブリドーマ細胞へ遺伝子導入して得られた IgG では、部分的にはシアル酸まで伸長できるが、GlcNAc または Gal までしか伸長していない糖鎖構造の IgG が多く生成された。また、ヒトミエローマ細胞へ遺伝子導入して得られた IgG では、GlcNAc または Gal までしか伸長していない糖鎖構造の IgG が、より顕著に生成された。それぞれの species に合わせて、rat または human *ST6Gal1* 遺伝子と rat または human *B4GalT1* 遺伝子を導入し、導入細胞から産生される IgG の糖鎖構造を検討した。その結果、ラット由来 IgG において、mouse 遺伝子を導入した IgG と比べ、rat 遺伝子を導入した方がシアル酸までの伸長が見られた。また、ヒト由来 IgG においても mouse 遺伝子を導入した IgG と比べ、human 遺伝子を導入した方がシアル酸までの伸長が見られた。しかし、ヒト由来 IgG においては、未だ Gal や GlcNAc が端末にある IgG が多く存在し、完全なシアル酸の伸長が認められなかった。また、*sialidase* 遺伝子を導入すると、*B4GalT1* 遺伝子のみ導入した細胞が産生した IgG に比べ、シアル酸の除去が認められたが、遺伝子を全く導入していないコントロール細胞から産生された IgG と同程度のシアル酸が付加していることがわかった。

ラットハイブリドーマ細胞が産生する IgG 上の糖鎖構造



135. IgG 上の N 型糖鎖改変による新規抗体治療法の検討

大海　雄介

中部大学 生命健康科学部 臨床工学科

Key words：IgG，シアル酸，*ST6Gal1* 遺伝子，*B4GalT1* 遺伝子

緒　言

抗体は特異的な抗原と結合し、さまざまな免疫応答反応を発現するが、このような抗体の機能を利用し、近年、抗体治療が盛んに行われている。一方、IgG は Fc 領域に N 型糖鎖結合部位を一箇所持ち、多様な糖鎖構造が形成される（図 1）。我々は、関節リウマチ（RA）で産生される自己抗体 IgG 上のシアル酸を欠損させると RA が増悪し、逆にシアル酸を付加した自己抗体を RA モデルマウスに投与することにより、RA を抑制できる事を明らかにした［1］。これは、シアル酸が欠損した抗原特異的抗体は細胞傷害能や炎症誘導能の亢進による癌細胞などへのより効果的な抑制作用が誘導され、逆にシアル酸が付加した抗体では、自己免疫疾患における抗炎症反応を誘導することが可能なことを示唆している。しかし、現在、抗体治療に用いられている抗体は糖鎖構造を厳密に制御できていない。そこで、本研究では抗原特異的 IgG 上の糖鎖（主にシアル酸）構造を正確にリモデリングする技術の開発として、糖転移酵素遺伝子を用いた糖鎖制御を行なった。その結果、IgG と糖転移酵素の species を合わせることで、より効率的なシアル酸の付加が可能になった。

方　法

1.　糖転移酵素遺伝子発現ベクターの作製

マウスまたはラット脾臓から RNA を回収し、逆転写により cDNA を作製した。そこから mouse *ST6Gal1* 遺伝子、mouse *B4GalT1* 遺伝子と rat *ST6Gal1* 遺伝子、rat *B4GalT1* 遺伝子の primer を設定し、PCR にて同定した。また HEK293 細胞から RNA を回収し、逆転写により cDNA を作製した。そこから human *ST6Gal1* 遺伝子、human *B4GalT1* 遺伝子を上記と同様に同定した。これらの遺伝子は、pMXs-IRES-GFP ベクターに *ST6Gal1* 遺伝子、pMSCV-IRES2-DsRed express2 ベクターに *B4GalT1* 遺伝子を挿入した。*Arthrobacter ureafaciens* 由来の *sialidase* 遺伝子の酵素活性部位配列（GenBank：AY934539.2、829～1987 bp の配列）を *Arthrobacter ureafaciens* から直接 PCR にて同定した。さらに分泌型にするため、ヒト成長ホルモン遺伝子（*hGH*）のシグナルペプチド配列（NM_000515.4、77～154 bp の配列）をクローニングし、pMXs-IRES-GFP にそれぞれ挿入し、pMXs-hGH シグナルペプチド-sialidase-IRES-GFP とした。

2.　糖鎖改変 IgG 産生細胞の作製と IgG の精製

上記方法で作製した発現ベクターをマウスハイブリドーマ、ラットハイブリドーマまたはヒトミエローマ細胞にレトロウイルスを用いて遺伝子導入し、それぞれの遺伝子の発現を、*GFP* 遺伝子と *Ds-Red* 遺伝子の蛍光強度で確認し、高発現細胞をセルソーターにて sorting し、蛍光遺伝子発現細胞数が 95%以上の細胞をえた。これらの細胞の培養液から Protein G または Protein A を用いて IgG を精製した。

3.　レクチンブロット

精製された IgG の糖鎖構造を検討するため、papain で Fc と Fab 領域に切断し、SDS-PAGE をした後、Fc に結合する糖鎖構造をレクチンブロットで検出した。糖鎖の検出には、末端シアル酸を SNA、末端 Gal を ECL、末端 GlcNAc を GSL II を用いて検出した。また IgG の検出のため、anti-mouse IgG-HRP、anti-rat IgG-HRP または、anti-human IgG-HRP を用いてウエスタンブロットを行なった。

結果および考察

1. 糖転移酵素遺伝子による IgG 上の糖鎖の改変方法の検討

マウス由来の IgG 上の糖鎖構造を改変するために、mouse *ST6Gal1* 遺伝子（蛍光遺伝子として *GFP* 遺伝子を共発現）と mouse *B4GalT1* 遺伝子（蛍光遺伝子として *Ds-Red* 遺伝子を共発現）につき、レトロウイルスを用いて安定発現させ、安定的なシアル酸付加 IgG を生成したが、本研究では最終的に、ヒト由来の IgG にシアル酸を付加する必要がある。そこで、mouse *ST6Gal1* 遺伝子と mouse *B4GalT1* 遺伝子が他種族由来（ラットまたはヒト）の IgG 上の糖鎖を効率的に改変できるかを検討するために、mouse *ST6Gal1* 遺伝子と mouse *B4GalT1* 遺伝子を、それぞれ、ラットハイブリドーマ細胞またはヒト由来ミエローマ細胞に導入し、IgG 上の糖鎖構造をレクチンブロットで検討した。

その結果、マウスハイブリドーマ細胞にマウス遺伝子を導入した場合は、ほぼ全ての IgG 上の糖鎖をシアル酸まで伸長することができたが、ラットハイブリドーマ細胞へ遺伝子導入して得られた IgG では、部分的にはシアル酸まで伸長するが、GlcNAc または Gal までしか伸長していない糖鎖構造の IgG が生成された（図 2a）。また、ヒトミエローマ細胞へ遺伝子導入して得られた IgG では、GlcNAc または Gal までしか伸長していない糖鎖構造の IgG が、より顕著に生成された（図 3a）。そこで、それぞれの species に合わせて、rat または human *ST6Gal1* 遺伝子と rat または human *B4GalT1* 遺伝子のレトロウイルス発現ベクターを作製したのち、それぞれの細胞に導入し、導入細胞から産生される IgG の糖鎖構造を検討した。また今回は、遺伝子導入の順番で IgG 上の糖鎖構造が変化するかにつき検討した。その結果、ラット由来 IgG において、mouse 遺伝子を導入した IgG と比べ、rat 遺伝子を導入した方がシアル酸までの伸長が高率に見られた。また、ヒト由来 IgG においても mouse 遺伝子を導入した IgG と比べ、human 遺伝子を導入した方がシアル酸までの伸長が多く見られた（図 2b）。しかし、ヒト由来 IgG においては、未だ Gal や GlcNAc が端末にある IgG が多く存在し、完全なシアル酸の伸長が認められなかった。また遺伝子導入の順番の影響は、human 由来 IgG において *B4GalT1* 遺伝子から導入した方がよりシアル酸まで伸長することが明らかになった（図 3b）。

このように、産生する IgG の species と導入する糖転移酵素遺伝子の species を合わせることによって、糖鎖付加の効率が向上することがわかった。しかし、human 由来の IgG に関して完全なシアル酸付加は、現在のままでは難しく、今後の検討が必要である。特に、発現プロモーターの検討、IgG のサブタイプによる糖鎖付加の差異につき、詳細な検討が必要である。

2. *Arthrobacter ureafaciens* 由来の *sialidase* 遺伝子導入によるシアル酸欠損 IgG の生成法の検討

さらに、より厳密に制御されたシアル酸欠損 IgG を作製するため、*Arthrobacter ureafaciens* 由来の *sialidase* 遺伝子の酵素活性部位配列をヒト成長ホルモン遺伝子のシグナルペプチドの配列を融合させた分泌型 *sialidase* 遺伝子を作製し、sialidase によって IgG 上の糖鎖構造がどのように変化するかをレクチンブロットで検討した。ラット由来 IgG において、*B4GalT1* 遺伝子を導入した細胞に、*Arthrobacter ureafaciens* 由来の *sialidase* 遺伝子を導入すると、*B4GalT1* 遺伝子のみ導入した細胞が産生した IgG に比べ、シアル酸の減少が認められたが、遺伝子を全く導入していないコントロール細胞から産生された IgG と同程度のシアル酸が付加していることがわかった（図 2a）。これは、*Arthrobacter ureafaciens* 由来の *sialidase* 遺伝子を導入するシステムでは、シアル酸を完全に除去することができないことを示唆した。よって完全な欠損には CRISPR/Cas9 等を用いた遺伝子レベルでの欠損を行う必要があることがわかった。しかしこの場合、多岐にわたる糖転移酵素遺伝子のサブタイプ全てを欠損させるか、または、重要な遺伝子を同定した後に、そのサブタイプ遺伝子を欠損する必要がある。また、現在は CHO 細胞の亜株にそれぞれの species の遺伝子導入を行なっているところであり、IgG 発現ベクターを用いた IgG 産生細胞の糖鎖改変を可能にする系の構築を行なっている。

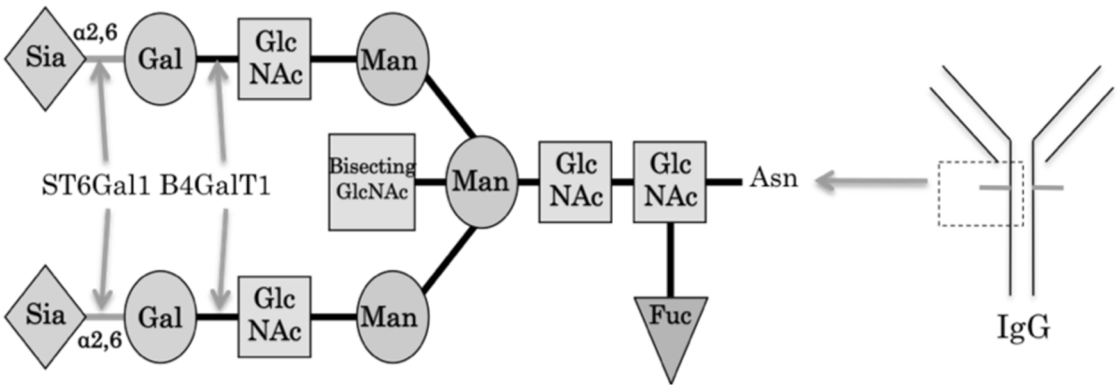


図 1. IgG の糖鎖構造

IgG は Fc 領域に一箇所 N 型糖鎖が結合し、ST6Gal1 によりシアル酸が、B4GalT1 がガラクトースを付加される。

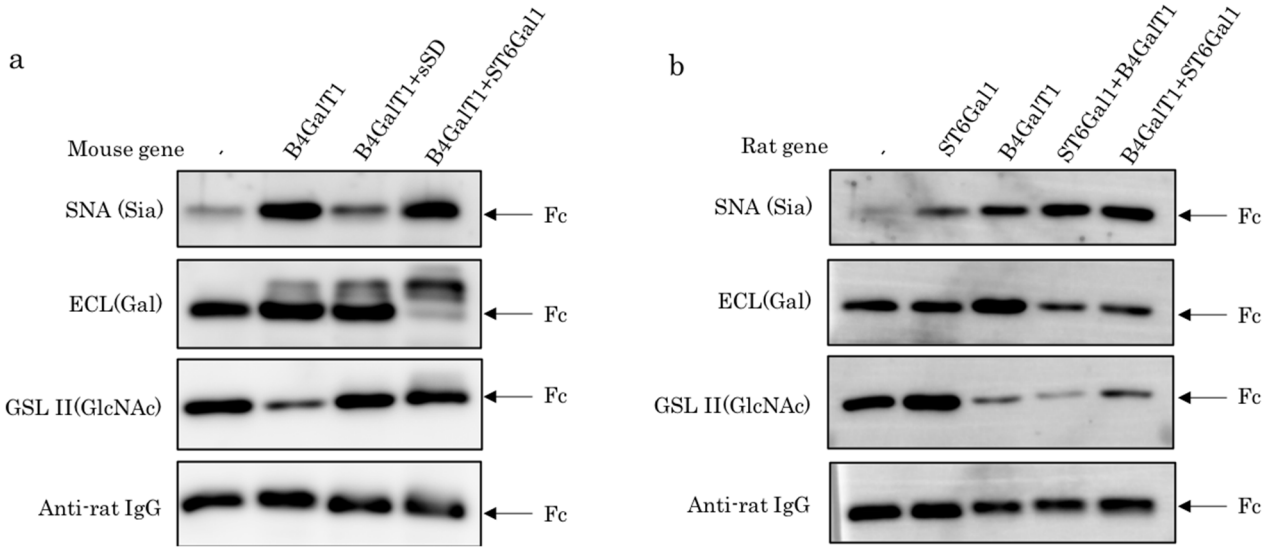


図 2. ラットハイブリドーマ細胞産生 IgG 上の糖鎖構造

マウス遺伝子 (a) またはラット遺伝子 (b) を導入した細胞から精製した IgG の Fc 領域上の糖鎖のレクチンブロット。SNA : シアル酸 (Sia)、ECL : ガラクトース (Gal)、GSL II : *N*アセチルグルコサミン (GlcNAc)。－ : 遺伝子未導入細胞 IgG、ST6Gal1 : *ST6Gal1* 遺伝子導入細胞 IgG、B4GalT1 : *B4GalT1* 遺伝子導入細胞 IgG、B4GalT1＋sSD : *B4GalT1* 遺伝子と分泌型 *sialidase* 遺伝子 (sSD) 導入細胞 IgG、ST6Gal1＋B4GalT1 : *ST6Gal1* 遺伝子、*B4GalT1* 遺伝子の順番で導入された細胞からの IgG。

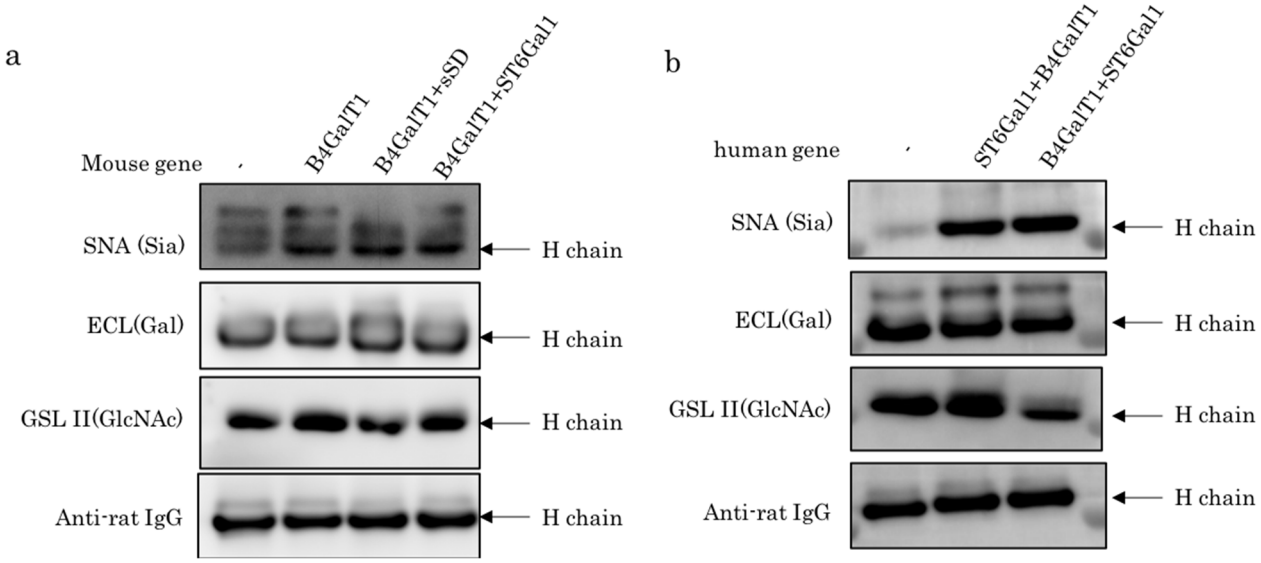


図 3. ヒトミエローマ細胞産生 IgG 上の糖鎖構造

マウス遺伝子（a）またはヒト遺伝子（b）を導入した細胞から精製した IgG の Fc 領域上の糖鎖のレクチンブロット。SNA：シアル酸（Sia）、ECL：ガラクトース（Gal）、GSL II：*N*アセチルグルコサミン（GlcNAc）。－：遺伝子未導入細胞 IgG、B4GalT1：*B4GalT1* 遺伝子導入細胞 IgG、B4GalT1＋sSD：*B4GalT1 遺伝子*と分泌型 *sialidase* 遺伝子（sSD）導入細胞 IgG、ST6Gal1＋B4GalT1：*ST6Gal1* 遺伝子、*B4GalT1* 遺伝子の順番で導入された細胞からの IgG。

共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋大学医学部整形外科学講座の高橋信典、中部大学生命健康科学部の古川鋼一、河原敏男である。

文　献

1） Ohmi Y, Ise W, Harazono A, Takakura D, Fukuyama H, Baba Y, Narazaki M, Shoda H, Takahashi N, Ohkawa Y, Ji S, Sugiyama F, Fujio K, Kumanogoh A, Yamamoto K, Kawasaki N, Kurosaki T, Takahashi Y, Furukawa K. Sialylation converts arthritogenic IgG into inhibitors of collagen-induced arthritis. Nat Commun. 2016 Apr 5;7:11205. PMID:27046227 doi: 10.1038/ncomms11205.