

## 2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

### 総括研究報告書

#### ヒト B 細胞由来の抗体作製に関する研究

主任研究者 垣生園子 東海大学医学部 教授

#### 研究要旨

本研究ではヒト B 細胞由来の臨床応用可能な抗体を得ることを目指して 2 つの系開発を展開している。本年度は、1) 遺伝子工学的手法の改良と免疫化学的手法の組み合わせを開発し、ヒト末梢血中で抗体を産生している B 細胞から抗体遺伝子ライブラリーを作製して、その中から新たに、中和活性を含む高い活性を持つ抗体（赤痢アメーバのおよび B 型肝炎ウイルスの表面分子、TNF- $\alpha$  と CD4 に対する抗体）を得た。また、クローニングした抗体の H 鎖と L 鎖を組み替えることによっても、より反応性の強い抗体を改変できることも示した。2) 一方、目的とする抗原を免疫してヒト型抗体を得るためのヒト免疫系再構築モデルの作製は順調に進行し、昨年度開発したヒト・マウスハイブリッドの凝集共培養による組織を NOD-SCID マウスに移植する *in vivo* との組み合わせによって T 細胞の機能的分化誘導に世界で初めて成功した。すでに確率した B 細胞の分化誘導系との組み合わせも可能であることも確認できた。

研究分担者 猪子英俊 東海大学医学部  
教授  
橋 裕司 東海大学医学部  
助教授  
佐藤健人 東海大学医学部  
講師

を含むため、有効性や安全性の面から臨床応用には問題がある。その意味でヒト B 細胞自身から産生される抗体を利用することが理想的であるが、従来の方法では、感染患者や自己免疫病患者から目的とする抗体を得ることは容易ではない。また、必ずしも希望する抗体が得られない。これら問題を解消するために本研究では、ヒト B 細胞由来のモノクローナル抗体を大量に作製する方法を開発し、臨床に応用できる抗体を得ることを目的としている。本年度は、昨年度開発した 2 つの系をさらに質的に改良を加えて、1) 末梢血 B 細胞から中和機能を含む高い活性をもつ抗体をクロ

#### A. 研究目的

ヒト型抗体は、有効な治療方法がないウイルス感染、自己免疫病あるいは移殖に新しい治療方法を提供出来ると期待されている。しかし、現存するヒト・キメラ抗体や大部分の配列をヒト型価した人工抗体では、マウスのアミノ酸配列やマウス型糖鎖

ーニングする方法、およびヒト幹細胞からヘルパー機能をもつ T 細胞を分化誘導する系の確率して、希望する抗原を投与してヒト抗体を得るための免疫系の再構築モデル作製を進める。

## B. 研究方法

### 1. 末梢ヒトB細胞からの特異抗体のクローニング

1) EBV トランスフォームとファージミドベクターの改良組み合わせによるオリゴクローン法:基本的には昨年と同様に、EB ウイルスでトランスフォームした末梢B細胞の培養上清から目的とする抗体をもとに RT-PCR により抗体遺伝子を増幅する。分離した H と L 鎖遺伝子をファージディスプレイに用いる Fab 抗体発現ベクター (pFab1-His2)に組み込み、大腸菌 (JM109) に導入して大量発現させる。作製したライブラリーはすでにオリゴクローン化してあるので、ファージ抗体の選択はおこなわずに抗体の特異性を該当抗原をコートした ELISA 法にて検討する。

2) コロニーウエスタンプロティング法によるスクリーニング:高抗体価を示す患者B細胞から単離増幅した H 鎖と L 鎖抗体遺伝子ライブラリーを作製し、それら各コロニーの遺伝子産物を当該抗原、標識患者抗体によるサンドウィッチ法にて、陽性クローンをスクリーニングする。特異性は組織染色とウエスタンプロットで検討する。単離 DNA 断片はシークエンス用ベクターで再クローニングして塩基配列を決定する。

### 2. ヒト免疫系の再構築

1) T細胞の機能的分化誘導:昨年と同様の方法でマウス胎仔由来の胸腺ストローマ細胞とヒト CD34+細胞を凝集共培養す

る。2週間の in vitro 系での分化誘導後、それら凝集組織を NOD SCID マウスの腎被膜下に移殖し、経時的にT細胞の末梢への出現と増殖およびサイトカイン産生機能を解析する。

2) 胸腺ストローマ細胞の分化誘導能の解析:定法に従って、胎齢15日のマウス胸腺をデオキシグアノシンとの培養によりリンパ球と樹状突起細胞を除去した後、トリプシンで処理して浮遊状態の上皮細胞をえる。これらを、(i) 無処理 (ii) プラスティックディッシュへの付着 (iii) 付着の解除の ECDI による固定、の3群に分け、各細胞と幹細胞の凝集共培養をおこなう。分化能の有無は CD4/8 の発現パターンで解析する。

3) ヒトB細胞分化誘導法の改良:臍帯血から分離した CD34+ 細胞は in vitro 処理をせず、NOD- SCID マウスに静注移植する。同マウスは昨年度と同様に照射と抗アシアロ GM1 投与を受ける。6-10 週後の血清中ヒト IgG、IgM 値と CD19+(B 細胞)細胞数を、Hess 5 上で培養した CD34+細胞を移植し、種々のサイトカイン投与した NOD-SCID のそれと比較する。

## C. 研究成果

1. 開発したオリゴクローン法によって得た抗体遺伝子産物:

(1) 昨年作製した抗体ライブラリーから新たにクローニングした2種類の抗 HBs 抗体は、異なった V 領域を使用していた。また、以前同一患者からクローニングした中和活性をもつ抗体とはエピトープ、親和性共に異なっていた。現在2クローンの各 H および L 鎖の組み替えによる親和性強化を計っている。(2) 抗 TNF- $\alpha$  抗体5クローンは、BIA-CORE によってエピトー

プマッピングを調べたが、マウス由来の中和抗体に近いものは見いだされなかった。

(3) 抗 CD4 抗体産生のクローンは3種類得られたが、その親和性は現在解析中である。

2. コロニーウエスタンプロット法によるスクリーニングで得た抗体遺伝子産物:

赤痢アメーバに対する抗体価の高い感染患者と低い患者2名から得たB細胞の抗体遺伝子ライブラリーを作製し、虫体表面特異的 Fab 抗体2種類を得た。この抗体は赤痢アメーバ特異的 Gal/GalNAc レクチンを認識していた。そのうちの1クローンの抗体は、虫体とヒト赤血球の接着を阻止でき、治療応用可能な抗体であった。これら抗体の各 H 鎖あるいは L 鎖遺伝子をライブラリーから新たに得た遺伝子と組み合わせることにより、より強い反応生をもつ抗体に改変できた。

3. 機能的T細胞の分化誘導:ヒト CD34+細胞とマウス胎仔胸腺ストローマ細胞との凝集共培養を短縮し、続いて同凝集塊を NOD-SCID マウスに移植すると、6週間後には末梢T細胞と同程度に刺激に反応して IL-2 産生をするT細胞が分化誘導された。これら細胞は細胞表面マーカーの上からも成熟T細胞型を示していた。

4. 胸腺ストローマ細胞のT細胞分化誘導能:遊離した胸腺上皮細胞は未熟T細胞の分化を誘導できるが、20時間以上プラスチックディッシュに付着するとその機能は消失した。しかし、付着細胞を ECDI で固定すると正の選択的分化能は回復した。

5. B細胞分化誘導系の再検討: in vitro における培養に伴う危険性を軽減する目的で、また経済的観点から、分離したヒト CD34+細胞をマウス細胞株上で培養する

ことなく新鮮な状態で、NOD-SCID マウスに移植して B 細胞の分化状態を観察した。その結果、昨年採用した予め培養した CD34+細胞を移植して種々のサイトカイン投与を受けたマウスと同等にB細胞が分化することが判明した。

#### D. 考察

1) 昨年までに作製した患者および健人の末梢血から昨年までに作製した抗体遺伝子のライブラリーの中から、遺伝子工学的手法に改良を加えながら、特異性および反応性の高い抗体を複数得た。中でも、コロニーウエスタンプロット法を導入して得た赤痢アメーバ表面に特異的レクチンと反応する抗体は、臨床応用が期待される。また、クローニングされた抗体の H 鎖と L 鎖の組み替えにより反応性の高い抗体を得たことは、遺伝子工学的手法の有用性を示しており、今後高い活性の抗体を得る良い手がかりとなった。

2) 患者あるいは健常人から得がたい抗体を作製する目的で作製しているヒト免疫系の再構築モデルでは、幹細胞からの T、B 細胞の分化誘導が順調に進展しているが、次年度の課題は分化誘導したT細胞を脾臓をはじめとする末梢リンパ組織に分布させることである。ヒト接着分子やサイトカイン遺伝子導入マウスの利用、および、ヘルパーT細胞代替分子によるB細胞の分化誘導も試みる予定である。

#### E. 結論

遺伝子工学的手法に改良を加えながら、ヒトB細胞由来の高い活性と抗原特異性のある IgG 抗体を複数作製することに成功した。一方、胸腺ストローマ細胞と幹細胞を混合して in vitro と in vivo にて培養す

ることにより、臍帯血由来のヒト CD34+ 幹細胞から、機能的に成熟した T 細胞を世界で初めて分化誘導した。昨年度開発した B 細胞誘導系との組み合わせにより、このモデルに抗原を投与して目的とするヒト抗体作製が期待される。

## F. 研究発表

### 3. 論文発表

- (1). Satoshi Nunomura, Takehito Sato, Sonoko Habu, Molecular Basis for Functional Maturation of Thymocytes: Increase in c-fos Translation with Positive Selection. *J.Immunol.*, in press, 2000
- (2). Tetsuya Saito, Yoshihiro Kumagai, Taichi Hiramatsu, Masaru Kurosawa, Takehito Sato, Sonoko Habu, Kenichi Mitsui, Yoh Kodera, Misao Hiroto, Ayako Matsushima, Yuji Inada, Hiroyuki Nishimura. Immune Tolerance Induced by Polyethylene Glycol-Conjugate of Protein Antigen: Clonal Deletion of Antigen-specific Th Cells in the Thymus. *J. Biomaterials Science, Polymer Edition.* in press, 2000
- (3). Wataru Ise, Mamoru Totsuka, Rumi Takato, Satoshi Hachimura, Takehiko Sato, Akio Ametani, Yoshihiro Kumagai, Sonoko Habu, Shuichi Kaminogawa Primary response of native CD4+ T cells to amino acid- substituted analogs of an antigenic peptide can show distinct activation patterns: Th1- and Th2-type cytokine secretion, and helper activity for antibody production without apparent cytokine secretion. *FEBS Letters* 465:28-33, 2000
- (4). Katsuto Hozumi, Ryo Ohtsuka, Daisuke Suzuki, Kiyoshi Ando, Mamoru Ito, Takashi Nishimura, Matthias Merkenschlager and Sonoko Habu Establishment of efficient teaggregation culture system for gene transfection into immature t cells by retroviral vectors. in press, *Immunol. Lett.*, 2000
- (5). Kan Shida, Satoshi Hachimura, Akio Ametani, Mina Ishimori, Mei Ling, Masaki Hashiguchi, Sonoko Habu and Shuichi Kaminogawa. Serum IgE response model using allergen-specific T cell receptor transgenic mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* in press. 2000.
- (6). Kanna Haneda, Kunio Sano, Gen Tamura, Hidekazu Shirota, Yuichi Ohkawara Takehito Sato, Sonoko Habu and Kunio Shirata Transforming growth factor- $\beta$  secreted from CD4+ T cells ameliorates antigen-induced eosinophilic inflammation A novel high-dose tolerance in the trachea *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 21:268-274, 1999.
- (7). Nishimura T., Iwakabe K., Sekimoto M., Ohmi Y., Yahata T., Nakui M., Sato T., Habu S., Tashiro H., Sato M., Ohta A. Distinct role of antigen-specific T helper type 1(Th1) and Th2 cells in tumor Eradication in vivo. *J. Exp. Med.* 190(5):617-628, 1999.
- (8). Haneda K., Sano K., Tamura G., Shirota H., Ohkawara Y., Sato T., Habu S., Shirata K. Transforming growth factor-beta secreted from CD4(+)

cells Ameliorates antigen-induced eosinophilic inflammation. A novel high-dose tolerance in the trachea. *Am. J. Respir Cell Mol. Biol.* 21(2):268-274, 1999.

(9). Yahata T., Abe N., Yahata C., Ohmi Y., Ohta A., Iwakabe K., Habu S., Yagita H., Kitamura H., Matsuki N., Nakui M., Sato T. and Nishimura T. The essential role of phorbol ester-sensitive protein kinase C isoforms in activation-induced cell death of Th1 cells. *Eur. J. Immunol.* 29(3):727-732, 1999.

(10). Takehito Sato, Satoshi Numomura, Chiharu Sato, Katsuto Hozumi, Yoshihiro Kumagai, Takashi Nishimura, Tak W. Mak, Kenji Kishimura, Sonoko Habu. CD45 can act as a negative regulator for the transition from early to late CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes. *Int. Immunol.*, 11:89-97, 1999.

## 2. 学会発表

(1) 亀谷美恵、餅田尚子、穂積勝人、渡辺守、日比紀文、西本宏史、垣生園子、「IL-7 と自己反応性 TCR 重複トランスジェニックマウス (IL-7/2C) 胸腺に検出される B 細胞の解析」第 88 回日本病理学会総会 1999.

(2) 妹尾 誠、土屋いずみ、松村琢也、森俊之、岡本 尚、加藤宏幸、垣生園子「p53 類縁遺伝子 p73 の癌関連遺伝子としての可能性—ヒト癌における p73L 遺伝子転写産物の発現解析—」第 58 回日本癌学会総会 1999.

(3) 斎藤哲也、平松太一、黒沢 大、熊谷喜博、佐藤健人、佐藤千春、林 啓太郎、

佐竹正延、垣生園子「胸腺細胞分化における c-Fos 誘導能の変化；機構とその意義」第 29 回日本免疫学会総会 1999.

(4) 亀谷美恵、佐藤健人、垣生園子「胸腺内 T 細胞の CD4/CD8 lineage への分化における Lc 活性調節分子の解析」第 29 回日本免疫学会総会 1999.

(5) 妹尾 誠、松村琢也、真貝洋一、垣生園子 「T 細胞レセプター遺伝子エンハンサー機能の分化階段特異的活性化」第 29 回日本免疫学会総会 1999.

(6) 斎藤哲也、平松太一、黒沢 大、熊谷善博、佐藤健人、垣生園子、小寺 洋、廣戸三佐雄、松島端子、稲田祐二、西村裕之「ポリエチレングリコール (PEG) 修飾抗原による抗原特異的な免疫寛容の誘導」第 29 回日本免疫学会総会 1999.

(7) 布村 聡、佐藤健人、垣生園子「ポジティブセレクションに伴う機能的成熟の分子機構」第 29 回日本免疫学会総会 1999.

(8) 長谷川千巳、佐藤健人、布村 聡、林啓太郎、佐竹正延、垣生園子「AML-1 は胸腺の増殖・機能的成熟に必要なである」第 29 回日本免疫学会総会 1999.

(9) 八幡 崇、太田明夫、関本柁史、垣生園子、佐藤まりも、岩壁賢治、西村孝司「免疫系における Steroidogenesis:Th2 特異的 P450<sub>scc</sub> の発現」第 29 回日本免疫学会総会 1999.

(10) 鎌仲正人、高橋秀徳、佐藤健人、垣生園子「デキサメサゾン存在下で分化した T 細胞の増殖とサイトカイン産生」第 29 回日本免疫学会総会 1999.

(11) 吉田 優、若月芳雄、渡辺智裕、白井泰彦、白井 崇、垣生園子、千葉 勉、北徹、「腸管内微生物性抗原に対する免

疫応答と炎症性腸疾患」 第 29 回日本  
免疫学会総会 1999.

(12) 妹尾 誠、松村琢也、松村泰子、

垣生園子 「p53 の転写活性能を抑制する  
p53 類縁蛋白質 p73L/ΔNp63 $\alpha$  の機能  
解析」 第 22 回日本分子生物学会 1999.

### 3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

#### 分担研究報告書

ヒト B 細胞由来抗体の大量生産方法の開発

分担研究者 猪子英俊 東海大学 医学部 教授

#### 研究要旨

昨年に引き続き、ヒト B 細胞にエプスタイン・バー・ウイルス(EBV)を感染させ、特に処理をほどこさずに継続培養して得られたオリゴクローンからライブラリを作製しその中から 2 種類の抗原に対する抗体群のクローニングに成功した。1 つは B 型肝炎ウイルス(HBV)の表面抗原(HBs)に対する新たな抗体 2 種類である。もう 1 つは CD4 に対する新規の 3 種類の抗体である。

また昨年度調製した抗 TNF- $\alpha$  抗体に関しては BIO-CORE でエピトープを解析するための方法を検討した。そして新たな抗体産生ベクターの作製を行い、各種大腸菌での生産効率を調べた。さらに大腸菌での効率的な大量生産条件の基本的な検討を行った。

研究協力者 竹腰正隆 東海大学医学部  
講師

#### A. 研究目的

昨年度、報告したようにヒト抗体産生の方法として我々は EB ウイルストランスフォーム法とファージディスプレイ法を組み合わせたオリゴクローン法の開発を行った。この方法により有用なヒト抗体が取得できることを、今年度も実際にヒト抗体を得ることによって証明した。今年度は抗 HBs 抗体および抗 CD4 抗体遺伝子についてクローニングを行った。オリゴクローン法の確かさの再確認を行った。

一方、我々の手法で作られる Fab 抗体は、1 価であるため実験方法によってはうまく機能しないことがある。そこでベクターの改良を行って 2 価として抗体が産生されるものを作製した。このベクターでは産生されるタンパクの分子量が 70K を越えるためか大腸菌での産生は難しい。そこで各種大腸菌での発現の検討を行い、さらにベクターの改良を行っている。

#### B. 研究方法

抗 HBs 活性または抗 CD4 抗体活性が確認されたオリゴクローンから全 RNA を抽出し、すでに我々が開発したプライマーを利用して RT-PCR で抗体遺伝子 ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ) の分離を行う。得られた抗体遺伝子のうち L 鎖に関しては, AscI で切断した後に NheI で切断して抗体発現用ベクター pFabI-His2 の NheI-AscI サイトにクローニングする。次に H 鎖を SfiI で切断した後に、NotI で切断して L 鎖をクローニングした pFabI-His2 の SfiI-NotI サイトにクローニングする。これで L 鎖と H 鎖の入ったライブラリが作製されたことになる。このライブラリを抗体産生用の JM109 に導入し、得られた各クローンについて培養を行い、IPTG による抗体産生誘導後菌体を凍結・融解によって破碎し遠心上清を Fab 抗体試料とする。これについて抗原（培養細胞産生 HBs またはバキュロウイルス産生組換え CD4）を ELISA プレートに塗布したものについて ELISA

を行う。陽性クローンについて塩基配列の解析を行うとともに大量培養を行いアフィニティ精製を行う。

得られた陽性クローンについては塩基配列解析を行う。またホモロジーサーチやマルチプルアライメントによって抗体遺伝子の特徴を調べる。また ELISA による抗体活性の解析、BIACORE による解析、組織染色等を行い各抗体間の反応性の違いを調べる。

抗体遺伝子発現ベクターの改変に関して、付加するアルカリフォスファターゼ遺伝子は PCR によって大腸菌より取り出し適当な制限酵素部位を付加する。ベクター側も合成ヌクレオチドを挿入して改変してからアルカリフォスファターゼ遺伝子の導入を図る。

## C. 研究結果

### 1. 抗 HBs 抗体

用いた抗体産生細胞株は、抗体遺伝子の解析結果からオリゴクローンであることが判明した。出発材料として約  $10^7$  個の細胞を用い RNA を抽出した。H 鎖には  $\gamma$  鎖と  $\mu$  鎖用のプライマーを用い、L 鎖には  $\kappa$  鎖と  $\lambda$  鎖用のプライマーを用いて各抗体遺伝子の Fab 領域の増幅を行い、発現ベクターに組み込んで大腸菌で抗体を産生した。各抗体遺伝子について塩基配列を調べた。

今年度、解析を行ったオリゴクローン 308 については得られた RNA を用いて抗体遺伝子を容易に得ることができた。遺伝子解析の結果、抗 HBs 抗体活性を示したのは 308-09 ( $\gamma\kappa$ ) と 308-19 ( $\gamma\lambda$ ) の 2 クローンであった。これまで同一患者から取られたオリゴクローンの解析を行ってきたが、H 鎖に関してはすべて  $\gamma$  鎖であったが、L 鎖に関しては今回初めて  $\lambda$  鎖が分離された。遺伝子解析の結果、クローン 308-09 は VH3, Vk3b に、クローン 308-19 は VH4, VI1 に属することが判明した。以前に我々がクローニングした抗 HBs 抗体の FabCL4 (同一患者から分離された抗

体) とコンペティション ELISA を行った結果、認識するエピトープは異なることが判明した。またクローン 308-19 は組織染色で陽性反応を示し、変性させた組織を染色できない FabCL4 との違いが確認できた。抗体のアフィニティに関しては FabCL4 を上回る抗体はなかった。現在、得られた抗体遺伝子についてシャッフリングを行い、よりアフィニティの高い抗体を得る試みも行っている。

### 2. 抗 TNF- $\alpha$ 抗体

昨年度得られた抗 TNF- $\alpha$  抗体 5 種 (クローン mk-25,26、クローン gk-1,10,20) について BIA-CORE を用いたエピトープマッピングを行っている。しかしながら 1 価の Fab 抗体では BIA-CORE を用いて十分なシグナルを得ることができない。そのため Fab 抗体を大腸菌で発現させるベクターについて改良を行った。現在のベクター pFab-His2 の H 鎖の 3' 末端に大腸菌のアルカリフォスファターゼが融合して産生するベクター pFab-Pho の開発を行った。アルカリフォスファターゼはダイマーを形成するため、このベクターで Fab 抗体を作らせるとあたかも IgG のような構造と分子量で産生されることになる。このベクターで抗体を産生させたところ、タンパク量としては非常に少なかった。そのため抗体遺伝子におけるコドン使用頻度についての解析を行った。その結果、アルギニンをコードする AGA と AGG が大腸菌では本来 2.7 と 1.6% しか使われていないのに、抗体遺伝子では 11.36 と 13.63% 使われてることが判明した。同様にプロリンをコードする CCC が本来の 5.4% に対して抗体遺伝子では 20.45% であった。これらの不均衡が大腸菌での抗体産生の少なさの原因と考え、これらのコドンを人為的に増加させた大腸菌株 BL21 CODONPLUS RP を入手して抗体遺伝子の導入をはかった。しかしながらまったくコロニーが生じなかった。抗体産生の改善で大量に生産さ



れる抗体が大腸菌に対してトキシックなためと考え、抗体産生量の増大に関しては断念した。現在は、大腸菌 JM109 を用い、大量培養の菌体から抗体を効率よく回収するために新たなタグを導入したベクターを構築中である。

### 3. 抗 CD4 抗体

抗 CD4 抗体を産生してるオリゴクローン HO538 と HO702 を出発材料として抗 CD4 抗体遺伝子のクローニングを行った。抗体活性を示したのは  $\mu$   $\kappa$  の組み合わせの時であった。クローンとしては  $\mu$  鎖は HO538 - 123, HO702-01,-16 の 3 種が  $\kappa$  鎖は HO538 - 123 と HO702-01 の 2 種 (01=16) が存在した。 $\mu$  鎖  $\kappa$  鎖共に CDR2, CDR3 ではその塩基配列が大きく異なった。現在、得られた抗体について分析を行ってるところである。

### D. 考察

昨年度に引き続き、B 細胞の EBV 感染により得られたオリゴクローンより各種抗体遺伝子を抽出して大腸菌で発現させることに成功した。オリゴクローン法によるヒト抗体の取得が容易であることを再度証明したことになる。特にオリゴクローンは培養不能なバイアビリティのないクローンでも抗体遺伝子を取り出す分には何ら問題がないことが判明した。したがって本方法はオリゴクローンだけでなく、例えば保存中に死滅したモノクローナル抗体産生細胞にも適用できることになる。

### E. 結論

オリゴクローン法によるヒト抗体の取得は、出発材料の選択に厳しく縛られるファージディスプレイ法に比べ容易であることが判明した。また得られた抗 HBs 抗体に関してはウイルスに対する中和抗体として活用すべく工業化の検討を行っている。また他の抗体に関しても CDR3 ランダムイズを利用して有用な抗体にすべく検討を

行っている。

### F. 研究発表

#### 4. 論文発表

- (1) Shiina H., Tamiya G., Oka A., Takishima N., Yamagata T., Kikkawa E., Iwata K., Tomizawa M., Okuaki N., Kuwano Y., Watanabe K., Fukuzumi Y., Itakura S., Sugawara C., Ono A., Yamazaki M., Tashiro H., Ando A., Ikemura T., Soeda E., Kimura M., Bahram S., Inoko H. Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96:13282-13287.
- (2) Beck S., Geraghty D., Inoko H., Rowen L. et al. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. Nature. 1999; 401:921-923.
- (3) Shiina T., Tamiya G., Oka A., Takishima N., Inoko H. Genome sequencing analysis of the 1.8Mb entire human MHC class I region. Immunol. Rev. 1999; 167:193-199.
- (4) Tachibana H, Cheng X.-J, Watanabe K, Takekoshi M, Maeda F, Aotsuka S, Kaneda Y, Takeuchi T, Ihara S. Preparation of recombinant human monoclonal antibody Fab fragments specific for Entamoeba histolytica. Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology 1999; 6:383-387.
- (5) Maeda F, Nagatsuka Y, Ihara S, Aotsuka S, Ono Y, Inoko H, Takekoshi M. Bacterial Expression of a Human Recombinant Monoclonal Antibody Fab Fragment Against Hepatitis B Surface Antigen. J Med Virol. 1999 58:338-345.

(6) Nagatsuka Y, Takekoshi M, Maeda F, Ihara S, Ono Y. Reconstruction of Fab antibody from Epstein-Barr virus-transformed, monoclonal anti-i cold agglutinin-producing cell line, GL-2. *Biochim Biophys Acta* 2000 in press.

## 2. 学会発表

(1) 井原 征治、竹腰 正隆. 人工免疫グロブリンの開発 第14回ヘルペスウイルス研究会 ワークショップ ヘルペスウイルス抗体工学・免疫 福岡 1999.

(2) 竹腰 正隆、前田 史子、井原 征治. フェージディスプレイ法とオリゴクローン法によるヒト抗体の作製 日本動物細胞工学会大会シンポジウム「免疫・アレルギー研究の新技法」 東京 1999.

(3) 井原 征治、前田 史子、竹腰 正隆. HCMV を中和する組み換えヒトモノクローナル抗体の作製 第47回日本ウイルス学会 横浜 1999.

(4) 周 乙華、宇野 正恒、竹腰 正隆、前田 史子、江角 真理子 C型肝炎ウイルス超可変部位に対する抗体 Fab の遺伝子単離とその塩基配列解析 第22回日本分子生物学会 福岡 1999.

(5) 安達 暁子、前田 史子、竹腰 正隆、井原 征治 フェージディスプレイ法による HCMV 中和人工ヒト抗体の作製 第22回日本分子生物学会 福岡 1999.

(6) 増井 理、竹腰 正隆、前田 史子、安藤 等、成瀬 妙子、猪子 英俊、井原 征治 HLA タイピングに使用する組み換えヒト抗体の作製 第22回日本分子生物学会 福岡 1999.

分担研究報告書

病原微生物に対するヒト型抗体の作製

分担研究者 橋 裕司 東海大学医学部 助教授

研究要旨

赤痢アメーバに中和活性を示すヒト抗体をコードする遺伝子のクローニングと大腸菌における発現について検討した。アメーバ性肝膿瘍を呈する患者の末梢リンパ球から mRNA を単離し、RT-PCR によって抗体H鎖の Fd 領域とL鎖をコードする遺伝子を増幅した。この DNA 断片を発現ベクターに組み込み、大腸菌に導入して抗体遺伝子ライブラリーを作製した。約  $5 \times 10^4$  個のクローンについて、抗赤痢アメーバ Fab 抗体産生の有無をコロニーウエスタンブロット法によってスクリーニングし、更に間接蛍光抗体法による2次スクリーニングを行い、虫体表面と反応する1クローンを得た。この Fab 抗体は、赤痢アメーバに特異的な 260-kDa の Gal/GalNAc レクチンを認識しており、*in vitro* 系で虫体のヒト赤血球への接着を有意に抑制した。また、無症候性嚢子排出者の末梢リンパ球を出発材料として、同様に抗体遺伝子ライブラリーを作製した。約  $6 \times 10^4$  個のクローンをスクリーニングし、260-kDa レクチンを認識する別の1種類の Fab 抗体を得た。2つの抗体のL鎖、H鎖遺伝子を組み換えて発現させたところ、抗体の特異性は失われず、ELISA における反応性が異なる Fab が得られた。さらに、L鎖とH鎖のそれぞれについて、他方を2つのライブラリーの遺伝子と reshuffling して、再びスクリーニングを行った。その結果、より強い反応性を示すL鎖の組み合わせを持つ抗体に改変できた。

A. 研究目的

細胞工学により作製されたマウスモノクローナル抗体は、病原微生物の抗原解析や感染症の診断に大きな役割を果たし、さらにモデル動物では受動免疫によって感染を阻止できることが報告されている。赤痢アメーバにおいても、虫体表面の Gal/GalNAc レクチンが宿主細胞への接着と傷害に重要な役割を果たしており、それに対するマウスモノクローナル抗体は肝膿瘍形成を阻止できることが知られている。しかし、マウス抗体はヒトにとって異種抗体であり、治療や予防のために投与することはできない。もし同様な特異性を持ったヒト抗体を作製できれば臨床応用が可能になると思われるが、細胞融合法ではヒト抗体の作製は困難であ

る。また、可変領域あるいは超可変領域だけをマウス由来とするキメラ抗体やヒト化抗体においても、マウスのアミノ酸配列が含まれているために繰り返しの使用は難しい。

本研究は、感染症の予防や治療に応用できる純粋なヒトモノクローナル抗体を作製することを目的としている。昨年度は、アメーバ性肝膿瘍患者の末梢リンパ球を出発材料にして抗体遺伝子ライブラリーを作製し、赤痢アメーバ特異的な4種類のヒトモノクローナル抗体 Fab 断片を作製できた。しかし、これらの抗体には虫体に対する中和活性は認められなかった。今年度はスクリーニング法を改良することでより多くのクローンを検索し、虫体接着を阻止できるヒト抗体の作製を

試みる。また、無症候性の赤痢アメーバ嚢子排出者のリンパ球由来の抗体遺伝子ライブラリーを作製し、同様な方法で抗赤痢アメーバ抗体遺伝子のクローニングを試みる。無症候性感染者の血清抗体価は低いものの、効果的な中和抗体の存在が期待できる。また、異なる患者から得られたL鎖とH鎖の組み換えによる抗体の特異性や反応性の変化、さらに、reshufflingによるL鎖とH鎖のよりよい組み合わせの検索法についても検討する。

## B. 研究方法

アメーバ性肝膿瘍患者の末梢リンパ球から mRNA を単離し、RT-PCR によってヒト免疫グロブリンL鎖 ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ) の全領域とH鎖 ( $\gamma$ ) の Fd 領域をコードする遺伝子をそれぞれ増幅した。発現ベクター pFab1-His2 の2つのクローニング部位に、増幅されたL鎖、H鎖のDNA断片を組み込み、大腸菌 JM109 に導入し、抗体遺伝子ライブラリーを作製した。寒天プレートに形成させた大腸菌コロニーをニトロセルロース膜に移したのち、発現を誘導し、菌を溶解した。赤痢アメーバ抗原 (HM-1:IMSS 株)、酵素標識した患者抗体、基質を順次反応させて陽性クローンのスクリーニングを行った。赤痢アメーバ栄養型生虫体を用いた間接蛍光抗体法によって2次スクリーニングを行い、陽性クローンについて抗体遺伝子の塩基配列を決定した。また、陽性クローンは大量培養し、抗ヒト抗体を用いたイムノアフィニティクロマトグラフィーによって Fab を精製した。ウェスタンブロットは、粗抽出抗原と精製した Gal/GalNAc レクチンを用いて行った。抗体で赤痢アメーバ栄養型虫体を前処理した後、ヒト赤血球と反応させて接着能に対する影響を *in vitro* 系で調べた。また、無症候性赤痢アメーバ嚢子排出者の末梢リンパ球を出発材料にして、抗体遺伝子ライブラリーを作製した。肝膿瘍患

者由来のライブラリーの場合と同様に、陽性クローンのスクリーニングと解析を行った。L鎖とH鎖を組み換えたクローンについては、虫体粗抗原を用いた ELISA によって、反応性を比較した。

## C. 研究結果

肝膿瘍患者由来の抗体遺伝子ライブラリーの約  $5 \times 10^4$  個のクローンについて、コロニーウェスタンブロット法によるスクリーニングを行い、27 個の陽性クローンを得た。更に、アメーバ生虫体を用いた2次スクリーニングを行ったところ、1クローンのみが陽性反応を示した。このクローン (LA-01) について塩基配列を決定し、V領域のアミノ酸配列を Kabat データベースの配列と比較した。H鎖は VH6 ファミリーに属し、L鎖は V $\kappa$ 1 ファミリーに属していた。イムノアフィニティクロマトグラフィーによって精製された蛋白質を SDS-PAGE で解析したところ、24-kDa と 25-kDa のバンドが認められた。ウェスタンイムノブロットにおいて、24-kDa のバンドは抗  $\kappa$  鎖抗体により、25-kDa のバンドは Ni-NTA により認識され、それぞれが  $\kappa$  鎖と  $\gamma$  鎖であることが確認された。LA-01 の特異性について間接蛍光抗体法により検討したところ、赤痢アメーバの標準株 9 株 (HK-9, 200:NIH, HB-301:NIH, H-302:NIH, H-303:NIH, DKB, C-3-2-1, SAW1627, SAW755CR) すべてと反応し、病原性のない *Entamoeba dispar*, *E. moshkovskii* とは反応せず、赤痢アメーバに対する特異性が認められた。また、ウェスタンイムノブロットによると、非還元条件下で 260-kDa のバンドを認識していた。この分子量の抗原は患者血漿中の抗体が最も強く反応するものであり、Gal/GalNAc レクチンであると考えられた。そこで精製抗原を用い、抗 Gal/GalNAc レクチン抗体であることを確認した。赤痢アメーバ栄養型虫体 (104

個)を 50  $\mu$ g の LA-01 で前処理することにより、ヒト赤血球への接着は 79%抑制された。有意な効果は 1  $\mu$ g の濃度まで認められた。

無症候性の赤痢アメーバ嚢子排出者の末梢リンパ球由来の抗体遺伝子ライブラリーを作製し、約  $6 \times 10^4$  個のコロニーについて1次スクリーニングを行った。得られた 6 個の陽性クローンについて2次スクリーニングを行い、生虫体表面と反応する1個のクローン (CP-33) を得た。CP-33 のL鎖V領域のアミノ酸配列は LA-01 と比較して 92%の相同性を示し、同じく V $\kappa$ 1 ファミリーに属していた。一方、H鎖V領域は LA-01 とは大きく異なっており、MISC に分類された。CP-33 も赤痢アメーバに特異的に反応し、非還元条件下で 260-kDa の抗原を認識していた。

LA-01 のH鎖と CP-33 のL鎖、CP-33 のH鎖と LA-01 のL鎖をそれぞれベクターに組み込み、大腸菌に導入して発現させた。これらの抗体も赤痢アメーバに特異的に反応し、260-kDa の抗原を認識していた。ELISA で赤痢アメーバ抗原に対する反応性を比較したところ、CP-33 (H)-CP-33 (L) を 1 とすると、CP-33 (H)-LA-01 (L) は 0.72、LA-01 (H)-CP-33 (L) は 0.84、LA-01 (H)-LA-01 (L) は 0.75 であった。

CP-33 のL鎖、H鎖遺伝子の片方を固定し、他方をライブラリーの遺伝子と reshuffling して約  $2 \times 10^4$  個のコロニーを再スクリーニングした結果、72 個の陽性反応を確認した。L鎖遺伝子ライブラリーの再スクリーニングの方が陽性率が 10~14 倍高く、また、無症候性嚢子排出者由来と肝膿瘍患者由来の比較では、肝膿瘍患者由来の方が 3~4 倍高い陽性率を示した。それぞれのクローンのL鎖、H鎖遺伝子を制限酵素で切断し、電気泳動パターンを比較した結果、少なくとも 18 のクローンが違う配列を持つことが確認

された。これらのクローンについてELISA で反応性を比較したところ、L鎖遺伝子を reshuffling して得られた 3 つのクローン、CP-17、LA-22、CP-26 が CP-33 より高い値を示した (CP-33 を 1 として、それぞれ 1.61、1.41、1.26 倍)。クローン CP-17、LA-22 も 260-kDa 抗原を認識していた。CP-17、LA-22 のL鎖アミノ酸配列を CP-33 と比較してみると、CP17 はフレームワークの 7 箇所のみで違いがみられ、相補性決定領域については CDR3 の 1 アミノ酸がアルギニン (CP-33) かヒスチジン (CP-17) かの違いだけであった。LA-22 ではフレームワークの 7 箇所のアミノ酸が異なるのみで、CDR の配列に差は認められなかった。一方、H鎖遺伝子ライブラリーの再スクリーニングでは、より高い価を示すクローンは得られなかった。

#### D. 考察

今年度は、抗体遺伝子ライブラリーのスクリーニングにコロニーウェスタンブロット法を新たに採用し、より多くのクローンを検索することで、赤痢アメーバの接着に対して阻止活性を有する抗体を作製することができた。大腸菌が産生する Fab と、リンパ球分離の際に得られた血漿中の抗体で、赤痢アメーバ抗原を挟み込んで検出する方法は、大腸菌のスクリーニング法として有用であると考えられた。特に、抗体価の高い肝膿瘍患者だけでなく、抗体価の低い無症候性嚢子排出者の少量の末梢血液を出発材料にして、抗赤痢アメーバ抗体を作製できたことは注目すべきである。病原微生物に対しては、ファージディスプレイ法を用いなくても、特異抗体の遺伝子クローニングが可能であることを示している。ただし、この系では Fab と血漿中の抗体が結合する抗原エピトープは異なる場合が多いと予想され、コロニーブロットにおける反応の強さと間接蛍光抗体法におけ

る反応の強さが必ずしも一致しないことを考慮する必要がある。

赤痢アメーバの嚢子は宿主の腸管内において脱嚢し、腸粘膜に接着する。宿主細胞への接着は赤痢アメーバが病原性を発揮する上で必須であり、接着因子として 260-kDa の Gal/GalNAc レクチンが同定されている。今年度得られた抗体 Fab はこのレクチンを認識しており、宿主細胞への接着を阻止できることが確認された。寄生虫に対する組み換え型の中和抗体として最初のものである。この抗体を産生する大腸菌を腸内細菌叢に導入できれば、赤痢アメーバの感染を阻止できる可能性がある。また、赤痢アメーバ症は男性同性愛者における感染が多く認められ、AIDS の合併症としても重要である。最近、抗アメーバ抗体が陰性の症例も報告されており、大腸菌で作製された抗体が治療や発症予防に応用できるものとして期待される。

また、異なる患者のリンパ球を出発材料にして得られた L 鎖と H 鎖を組み換えて、特異性は保たれたままで、ELISA における反応性の異なる抗体が得られた。さらに、H 鎖の遺伝子を固定し、L 鎖遺伝子のライブラリーと reshuffling することによって、反応性の高い L 鎖と H 鎖の組み合わせを得ることができた。このように、H 鎖と L 鎖を自在に組み換えた抗体を作製できるのが、大腸菌による発現系の利点である。今後は更に、人為的な変異を導入することによって、親和性の高い抗体に改変する方法についても検討する予定である。

#### E. 結論

赤痢アメーバ感染者（アメーバ性肝膿瘍および無症候性嚢子排出者）の末梢リンパ球由来の抗体遺伝子を大腸菌で発現させ、赤痢アメーバに特異的に反応する Fab 抗体を作製した。赤痢アメーバの 260-kDa レクチンを認識し、in vitro 系

で虫体の宿主細胞への接着を有意に抑制する抗体が得られた。また、L 鎖遺伝子の reshuffling によって、より反応性の高い抗体に改変できた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Tachibana, H., Cheng, X.-J., Watanabe, K., Takekoshi, M., Maeda, F., Aotsuka, S., Kaneda, Y., Takeuchi, T. and Ihara, S. (1999) Preparation of recombinant human monoclonal antibody Fab fragments specific for *Entamoeba histolytica*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6: 383-387.
- (2) Horiki, N., Kaneda, Y., Maruyama, M., Fujita, Y. and Tachibana, H. (1999) Intestinal blockage by carcinoma and *Blastocystis hominis* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60: 400-402.
- (3) Tachibana, H. and Cheng, X.-J. (2000) *Entamoeba dispar*: Cloning and characterization of peroxiredoxin genes. *Experimental Parasitology*, 94: 51-55.
- (4) Tachibana, H., Kobayashi, S., Nagakura, K., Kaneda, Y. and Takeuchi, T. (2000) Asymptomatic cyst passers of *Entamoeba histolytica* but not *Entamoeba dispar* in institutions for the mentally retarded in Japan. *Parasitology International*, 48: in press.
- (5) Tachibana, H., Cheng, X.-J., Kobayashi, S., Fujita, Y. and Udonon, T. (2000) *Entamoeba dispar*, but not *E. histolytica*, detected in a colony of chimpanzees in Japan. *Parasitology Research*, 86: in press.

2. 学会発表

(1) Tachibana, H., Cheng, X.-J., Kaneda, Y. and Ihara, S. Preparation of a recombinant human monoclonal antibody Fab fragment recognizing a surface antigen of *Entamoeba histolytica*. 第68回日本寄生虫学会大会. 1999年4月

(2) Kaneda, Y., Horiki, N., Cheng, X.-J. and Tachibana, H. Serological analysis of asymptomatic individuals infected with *Blastocystis hominis*. 第68回日本寄生虫学会大会. 1999年4月

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

分担研究報告書

抗原特異的ヒトB細胞由来抗体獲得を目指したモデルの開発

分担研究者 佐藤健人 東海大學医学部 講師

研究要旨

臍帯血から得たヒト造血幹細胞である CD34+細胞を操作して、免疫不全マウス内にヒトの機能的TおよびB細胞を機能的に分化誘導することに成功した。すなわち、B細胞の分化に必要なT細胞は、ヒト臍帯血由来 CD34+幹細胞をマウス胸腺環境支持細胞（ストローマ細胞）との凝集共培養により分化誘導できることを、昨年度報告した。本年度はこれらの系をさらに改良して、T細胞がマーカーのみならず機能的にも成熟型免疫機能をもつ細胞に分化誘導できることを世界で初めて明らかにした。また、胸腺ストローマ細胞のT細胞分化誘導能はプラスチックへの付着により失われるが、化学固定剤で回復した。一方、NOD-SCID マウスに移殖する CD34+細胞は、骨髄由来ストローマ細胞株（Hess5）との培養を省いても、抗体産生細胞が十分得られることを示した。臨床応用を考えると重要な所見であると考えられる。

研究協力者 安藤 潔 東海大學医学部  
講師  
齋藤雄紀 東海大學医学部  
大学院生

ス環境でのT細胞による抗原認識が出来ないため、目的とする特異的抗体を得ることが困難であり、又移入細胞の寿命に制限がある。本研究では、マウス環境に適応したBおよびT細胞を分化誘導することにより、また抗原提示能に優れた樹状突起細胞(DC)も分化できる系を樹立して、目的とする抗原に対するヒトB細胞由来の抗体を得ようとするものである。

A. 研究目的

目的とする抗原に対するヒトB細胞由来の抗体を得るためには、ヒト免疫系が再構成されたモデル動物が必要である。特に、親和性が高くT細胞依存的抗原に対する抗体を得るためには、ヒトB細胞のみならずヒトT細胞も必要とされる。従来免疫不全マウスを用いて進められてきたヒト末梢血中のTおよびB細胞の単純な移入では、マウ

B. 研究方法

I. ヒトT細胞出現組織と分化度の解析：  
昨年確率したマウス胸腺ストローマ細胞とヒト CD34+細胞の凝集共培養(RTOC) に



よるマウス・ヒトハイブリッド組織を NOD-SCID マウスの腎皮膜下に移植し、経日的に移植局所および末梢リンパ組織内のヒト T 細胞の出現を細胞表面マーカーを指標にして flowcytometer にて解析する。

2) 分化誘導された T 細胞の機能の解析：RTOC 単独あるいは NOD-SCID マウスへの移植併用の凝集組織から得たヒト T 細胞を PMA+IM で刺激培養し、細胞増殖とサイトカイン産生能をサイミジンの取り込みおよび ELISA 法により検討する。

3) マウス胸腺ストローマ細胞の分化誘導能：胎齢 15 日のマウス胸腺をデオキシグアノシンで処理してリンパ球および樹状突起細胞を除去した後、トリプシンで上皮細胞の浮遊細胞を得る。これらをプラスチックディッシュで 24 時間培養し、一部はその後 ECDI で処理する。これら 2 種類と無処理のストローマ細胞は、各々上記の RTOC に使用し、T 細胞の分化程度を表面マーカーで調べる。

4. B 細胞誘導系の改良：NOD-SCID 内マウス骨髄ストローマ細胞株 (Hess 5) 上で培養した CD34+細胞としない CD34+細胞を各々 NOD-SCID マウスに移植し、経日的にリンパ系組織および末梢血におけるヒト B 細胞の出現を CD19 と Ig をマーカーとして比較する。

## C. 研究成果

### 1. 機能的ヒト T 細胞の分化誘導：

昨年までの成果として、ヒト CD34+細胞とマウス胸腺ストローマ細胞との凝集共培養法を開発し、ヒト幹細胞から T 細胞マーカーをもつ細胞が *in vitro* で分化誘導できることを示した。また、上記凝集共培養組織を NOD-SCID マウスの腎皮膜下に移植す

ると、T 細胞マーカーをもつ細胞増殖の効率が上昇することを示した。本年度は、*in vitro* での培養期間の短縮と移植後の培養期間の延長によって、移植局所で分化増殖した T 細胞は、末梢成熟 T 細胞と同程度に刺激に対して IL-2 を産生することを明らかにし、マウス胸腺のストローマ細胞でもヒト T 細胞の機能的分化誘導ができることを初めて、示した。また、マウス・ヒト凝集組織をマウスに移植すると、ストローマ細胞の生存が維持されることを組織学的に示した。しかし、移植後 10 週では、機能的 T 細胞の脾臓への出現は検出されなかった。

### 2. 胸腺ストローマ細胞の分化誘導能：

マウス胸腺ストローマ細胞とのハイブリッド組織を形成することにより、ヒト T 細胞が分化誘導される事実から、T 細胞はマウス・ヒト共有の因子によって幹細胞から誘導されると結論される。そのような分子同定に先立ち、本年はマウス胸腺細胞の生物学的性状を解析した。その結果、1) 20 時間以上ストローマ細胞をプラスチックディッシュで単層培養すると、T 細胞の分化能は失われる。2) この単層培養細胞は ECDI による固定処理によって分化誘導能が回復した。従って、ストローマ細胞の分化誘導能は、2次元構造をとることによって抑制される因子によって担われていることが示唆された。

### 3. ヒト B 細胞分化誘導系の改良：

昨年までは、ヒト臍帯血より得た CD34+細胞は Hess 5 細胞と培養して増殖させてから NOD SCID マウスに静注していた。しかし、臨床応用を視野に置いてマウス細胞との培養を削除する方向で、研究を進めた。その結果、新鮮な CD34+細胞  $2 \times 10^6$  個の移植により、従来の方法と同程度のヒト B

細胞が NOD-SCID マウスの脾臓および骨髄に検出された。また、移植 4 週後に施行していた SCF と GM-CS 投与を中止したが、CD19+B 細胞の分化出現に差異は無かった。

#### D. 考察

1. 本年度の研究により、ヒト CD34+細胞はマウスの胸腺細胞ストローマ細胞の支持により機能的成熟 T 細胞にまで分化誘導されることが明らかとなった。我々も含めた従来の報告では、マウスの胸腺ストローマ細胞によって誘導されるヒト T 細胞は、CD4 および CD8 の発現パターンからは成熟型であったが、機能的に分化成熟していないとされていた。今年度の研究で開発した *in vivo* との組み合わせによる結果は、胸腺ストローマ細胞の生存条件の改善がヒト T 細胞を機能的に分化まで支持したと考えられる。また、この実験系は T 細胞をヒト生体外で分化するために使用できる有用な系と評価される。しかし、本研究の目的である B 細胞の抗体産生誘導には、機能分化した T 細胞が十分に末梢へ分布することが必要であり、次年度の課題とされた。

2. T 細胞の分化誘導には胸腺ストローマの存在、しかもその 3 次元的構築が不可欠なことが判っている。しかし、倫理的見地からヒト胸腺ストローマ細胞を使用することができない。従って、マウス胸腺ストローマ細胞から T 細胞分化誘導に関わる因子・分子を同定することは極めて重要であり、本年度の研究成果はその一助となろう。

3. 昨年確率した B 細胞の NOD-SCID 内での分化誘導系から、移植前の培養とサイトカイン投与項目を除いても、十分な B 細胞の分化が可能であることを明らかにしたことは、危険性や倫理問題を軽減すること、

およびマウス内でのヒト免疫系再構築を容易にした。

#### E. 結論

臍帯血より得たヒト CD34+細胞を、胸腺ストローマ細胞との凝集共培養およびそれら凝集組織の NOD SCID への移植を組み合わせることによって、機能的に成熟した T 細胞を分化誘導することに初めて成功した。すでに、CD34+細胞から同マウス内で B 細胞を分化誘導することに成功しているので、本年度の成果を発展させて機能的 T 細胞を末梢リンパ組織に分布させて、ヒト免疫系をマウス内で樹立できることが期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1). Satoshi Nunomura, Takehito Sato, Sonoko Habu, Molecular Basis for Functional Maturation of Thymocytes: Increase in c-fos Translation with Positive Selection. *J.Immunol.*, in press, 2000

(2). Tetsuya Saito, Yoshihiro Kumagai, Taichi Hiramatsu, Masaru Kurosawa, Takehito Sato, Sonoko Habu, Kenichi Mitsui, Yoh Kodera, Misao Hiroto, Ayako Matsushima, Yuji Inada, Hiroyuki Nishimura. Immune Tolerance Induced by Polyethylene Glycol-Conjugate of Protein Antigen: Clonal Deletion of Antigen-specific Th Cells in the Thymus. *J. Biomaterials Science, Polymer Edition*, in press, 2000

(3). Wataru Ise, Mamoru Totsuka, Rumi Takato, Satoshi Hachimura, Takehito Sato, Akio Ametani,

Yoshihiro Kumagai, Sonoko Habu, Shuichi Kaminogawa Primary response of native CD4+ T cells to amino acid- substituted analogs of an antigenic peptide can show distinct activation patterns: Th1- and Th2-type cytokine secretion, and helper activity for antibody production without apparent cytokine secretion. FEBS Letters 465:28-33, 2000

(4). Kanna Haneda, Kunio Sano, Gen Tamura, Hidekazu Shirota, Yuichi Ohkawara Takehito Sato, Sonoko Habu and Kunio Shirata Transforming growth factor- $\beta$  secreted from CD4+ T cells ameliorates antigen-induced eosinophilic inflammation A novel high-dose tolerance in the trachea Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 21:268-274, 1999

(5). Nishimura T., Iwakabe K., Sekimoto M., Ohmi Y., Yahata T., Nakui M., Sato T., Habu S., Tashiro H., Sato M., Ohta A. Distinct role of antigen-specific T helper type 1(Th1) and Th2 cells in tumor Eradication in vivo. J. Exp. Med. 190(5):617-628, 1999.

(6). Haneda K., Sano K., Tamura G., Shirota H., Ohkawara Y., Sato T., Habu S., Shirata K. Transforming growth factor-beta secreted from CD4(+) cells Ameliorates antigen-induced eosinophilic inflammation. A novel high-dose tolerance in the trachea. Am. J. Respir Cell Mol. Biol. 21(2):268-274, 1999

(7). Yahata T., Abe N., Yahata C., Ohmi

Y., Ohta A., Iwakabe K., Habu S., Yagita H. Kitamura H., Matsuki N., Nakui M., Sato T. and Nishimura T. The essential role of phorbol ester-sensitive protein kinase C isoforms in activation-induced cell death of Th1 cells. Eur. J. Immunol. 29(3):727-732, 1999

(8). Takehito Sato, Satoshi Numomura, Chiharu Sato, Katsuto Hozumi, Yoshihiro Kumagai, Takashi Nishimura, Tak W. Mak, Kenji Kishimura, Sonoko Habu. CD45 can act as a negative regulator for the transition from early to late CD4+CD8+ thymocytes. Int. Immunol., 11:89-97, 1999

## 2. 学会発表

(1) 斎藤哲也、平松太一、黒沢 大、熊谷喜博、佐藤健人、佐藤千春、林 啓太郎、佐竹正延、垣生園子「胸腺細胞分化における c-Fos 誘導能の変化；機構とその意義」第 29 回日本免疫学会総会 1999.

(2) 亀谷美恵、佐藤健人、垣生園子「胸腺内 T 細胞の CD4 / CD8 lineage への分化における Lc 活性調節分子の解析」第 29 回日本免疫学会総会 1999.

(3) 斎藤哲也、平松太一、黒沢 大、熊谷善博、佐藤健人、垣生園子、小寺 洋、廣戸三佐雄、松島端子、稲田祐二、西村裕之「ポリエチレングリコール (PEG) 修飾抗原による抗原特異的な免疫寛容の誘導」第 29 回日本免疫学会総会 1999.

(4) 布村 聡、佐藤健人、垣生園子「ポジティブセレクションに伴う機能的成熟の分子機構」第 29 回日本免疫学会総会 1999.

(5) 長谷川千巳、佐藤健人、布村 聡、林啓太郎、佐竹正延、垣生園子「AML-1 は胸腺

の増殖・機能的成熟に必要である」 第 29  
回日本免疫学会総会 1999.

(6) 鎌仲正人、高橋秀徳、佐藤健人、垣生園  
子「デキサメサゾン存在下で分化した T 細  
胞の増殖とサイトカイン産生」 第 29 回日  
本免疫学会総会 1999.