

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

# 目 次

## 課題番号

### 第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

### 第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

### 第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

### 第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

## 子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製

所 属 慶應義塾大学医学部  
研究者 福地 剛

### 要 旨

ミサイル療法への応用を志向した有用性の高いヒト型モノクローナル抗体 (MAb) を開発することを目的として、最近開発された完全なヒト抗体を発現する Cross-bred trans-chromosomic mouse を用い、子宮体癌細胞に特異的に反応するヒト型 MAb の作製を試みた。

### 1. 研究目的

1975 年に Köhler と Milstein により細胞融合法が開発されて以来、数限りないモノクローナル抗体 (MAb) が作製され、医学の分野においても多大の貢献を果たしてきた。しかし、これらの抗体のほとんどがマウス型であったため、診断や治療の目的でヒトに投与する場合に、ヒトにとって異種蛋白である human anti-mouse antibody(HAMA)が産生されてしまうことが大きな隘路となっていた。そこで、近年この欠点を克服すべくヒト型 MAb の作製に期待が集まり、最近の遺伝子工学的技術の進歩と相まって、マウス・ヒトキメラ抗体、Humanized 抗体、あるいはトランスジェニックマウスを用いる方法などにより、ヒト型抗体を産生する抗体の開発が内外を問わず繰り返されてきたが、いずれの方法で作製された MAb もヒトの抗体の持つ多様性を完全に再現することが困難なことから実用化に至っている例はほとんどない。そういった状況の中で、我々と共同研究を行っているキリンビール (株) の石田らは、この障害を乗り越えるために、ヒト染色体をマウス個体へ導入するという全く新しいアプローチでこの課題に取り組み、世界に先駆けて完全なヒト抗体 (重鎖+軽鎖 $\kappa$ ) を発現する Cross-bred trans-chromosomic mouse(Cross-bred TC mouse)を作製することに成功した。

そこで、本研究ではこの Cross-bred TC mouse を用い癌細胞に対するヒト型 MAb の作製を試み、癌治療への応用を志向した基礎的実験を行うことを目的とする。

本研究により临床上応用可能なヒト型 MAb を開発でき、それを DDS (Drug Delivery System) のキャリアーとして用い、安全性および有効性が高い癌ミサイル療法が確立されれば、外科的な治療を受けにくい進行癌患者にとって大きな福音となることが期待できる。また、新薬として開発され普及すれば、医薬品業界にとっても大きな経済的波及効果をもたらすことが期待できる。

### 2. 研究方法

#### ① 細胞融合

Cross-bred TC mouse を免疫しヒト型 MAb を作製する。免疫原としては、研究者の研究施設において既に作製された子宮体癌と高頻度に反応するマウス型 MAb MSN-1 の免疫原である SNG-II 細胞の亜株である SNG-S (MSN-1 の認識抗原を高頻度に発現している: Kubushiro K. Int. J. Oncol., 6, 1995) を用いる。培養細胞  $1 \times 10^7$  個を Cross-bred TC mouse の腹腔内に 2 週間毎に免疫し、その都度マウスの尾静脈より採血を行い、Cell ELISA 法により SNG-S 細胞に対する抗体価を測定し、十分抗体価の上昇を認めたことを確認した時点で追加免疫を行い、その数日後に細胞融合を行う。細胞融合は、マウス型 MAb の作製方法と同様の常法に従い、PEG1500 を用い、マウス脾細胞とミエローマ細胞 SP2/O-Ag14 の比率を 5:1 として行い、1 回の細胞融合で、平均 10 枚の 96 ウェルプレートに細胞を播く。

#### ② ハイブリドーマの選別とクローニング

細胞融合後、常法に従い HAT 培地中でハイブリドーマを選択的に増殖させ、顕微鏡下で十分にハイブリドーマが増殖したのを確認後 (細胞融合後約 10 日後前後)、その培養上清を用い免疫原である

SNG-S 細胞を固相化した Cell ELISA 法により陽性ウェルを選別する。

すなわち、ELISA 用 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり約  $2 \times 10^4$  個の SNG-S 細胞を 1 晩培養後、0.05% のグルタルアルデヒドで固定し（室温 3 分）、洗浄、ブロッキングを行った後、ハイブリドーマの上清を  $100 \mu\text{l}$  ずつ滴下し、室温で 1 時間反応させた後、洗浄し、HRP 標識抗ヒト Ig  $\kappa$  (5000 倍希釈) を  $100 \mu\text{l}$  ずつ滴下し、1 時間反応させる。OPD で発色させた後、OD490nm で吸光度を測定する。陽性を示したウェルを選び出し、同様に SKG-III a 細胞（子宮頸部扁平上皮癌由来細胞）を固相化した Cell ELISA 法を行い、SNG-S 細胞を固相化した場合と比較する。

次に SNG-S と反応性を認めたウェルの上清を第 1 抗体として免疫細胞化学的染色（ABC 法）により、SNG-S 細胞ならびに SKG-III a 細胞との反応性を検討する。さらに、免疫組織化学染色により、子宮体癌組織中の癌細胞に特異的に反応し、正常細胞、間質細胞に反応しないようなウェルを選別する。

選別したハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングし、免疫組織化学的に安定した反応性を示すモノクローナル抗体を得る。

なお、ヒト組織切片を用いた免疫組織染色を行う場合に、ヒト型の抗体でヒトの組織を染色することになるので、組織中に内在する Ig  $\kappa$  と第 2 抗体（ビオチン化抗ヒト Ig  $\kappa$ ）が非特異的に反応してしまう可能性があり、特異的な染色との判別が困難になってしまうので、第 1 抗体を反応させる前に予め組織を 1% 抗ヒト  $\kappa$  (in goat serum) で 30 分処理し、非特異的反応を防ぐこととした。

### ③ MAb の子宮体内膜病変に対する反応性の検討

得られた MAb の子宮体内膜病変に対する反応性を多数の症例数を対象に免疫組織化学的染色により検討する。

すなわち、正常子宮体内膜（増殖期、分泌期）、子宮体内膜腺癌（分化型、中等度分化型、未分化型）のパラフィン包埋切片を対象に MAb の反応性を検討し、MAb の認識抗原の局在、子宮体内膜の癌化に伴う反応性の変化等を詳細に解析する。

### ④ MAb の性状、認識抗原の解析

得られた MAb の認識抗原への蛋白あるいは糖の関与を検討するために、予め組織切片をトリプシンや過沃素酸等で処理し、反応性の変化を免疫組織化学染色で比較検討する。

すなわち、組織切片を脱パラフィンした後、トリプシン (0.1%、1%) を 37 °C で 30 分、および過沃素酸 (2.5%、37%) を室温で 2 時間反応させ、通常のステップで染色を行う。トリプシンの処理により染色性が変化した場合は、抗原決定基への蛋白の関与の可能性が考えられるので、SDS-PAGE 電気泳動-western blotting により抗原決定基が可溶性画分あるいは不溶性画分のどちらに存在するかを確認し、分子量を決定する。一方、過沃素酸処理により染色性が変化した場合は、抗原決定基が糖鎖である可能性が高いので、TLC-immunostaining でその反応性を確認後、陰イオン FAB-MS 法や HP-TLC 等により生化学的、糖鎖工学的的手法により認識糖鎖構造を決定する。

### ⑤ 認識抗原の局在に関する検討

子宮体癌以外の女性性器癌（子宮頸癌、卵巣癌）および人体の各正常組織、癌組織における認識抗原の局在を免疫組織化学的染色により検討する。また、細胞内局在を超微形態学的に検索する。

## 3. 研究成果

### ① 細胞融合

SNG-S 細胞  $1 \times 10^7$  個を同時に 5 匹の Cross-bred TC mouse の腹腔に投与し、2 週間毎に尾静脈より採血し Cell ELISA 法により抗体価を測定したところ、第 2 回の免疫後から抗体価が上昇し始めたので、第 3 回の免疫後、最も抗体価の上昇したマウスを選び最終免疫を行い、その 5 日後に細胞融合を行った。

マウスの脾細胞は  $6.0 \times 10^7$  個あったので、ミエローマ細胞 SP2/O-Ag14 との比率を 5:1 として細胞融合を行い、96 ウェルプレート 10 枚に播き、翌日より HAT を 2% になるように培養液を添加した。各ウェルの融合細胞の有無を顕微鏡下で確認したところ、99% のウェルで融合細胞のコロニー形成が認められた。

### ② ハイブリドーマの選別とクローニング

細胞融合後 8 日後に、各ウェルの底面にコンフルエントに近い状態に融合細胞が増殖したので、SNG-S 細胞を固相化した Cell ELISA 法によるスクリーニングを開始した。培養上清の代わりに PBS

を滴下したblankよりも高い吸光度を示したウェルが 55 ウェルあったので、その 55 ウェルの培養上清を用いて、子宮頸部扁平上皮癌由来培養細胞 (SKG-III a) を固相化した Cell ELISA 法によりその反応性を比較した。同様に免疫細胞化学的に SNG-S 及び SKG-III a を染色した。Cell ELISA 法と、免疫細胞化学的染色との反応性は必ずしも相関しない場合もあるが、今回は、Cell ELISA 法で陽性を示し、かつ免疫細胞化学的にも SNG-S 細胞との反応性を認めた 22 ウェルを選び、中等度分化型子宮体癌組織 2 例のパラフィン包埋切片を免疫組織化学的に染色した。その結果、子宮体癌細胞と特異的に反応性を認める 2 クローン (6-4E, 10-9D) および、体癌細胞と血管内皮細胞に反応性を認める 1 クローン (5-12H) を選択した (Fig.1 ~ 4)。

この 3 クローンを限界希釈法によりクローニングし、安定した反応性を示すモノクローナル抗体を選別した。

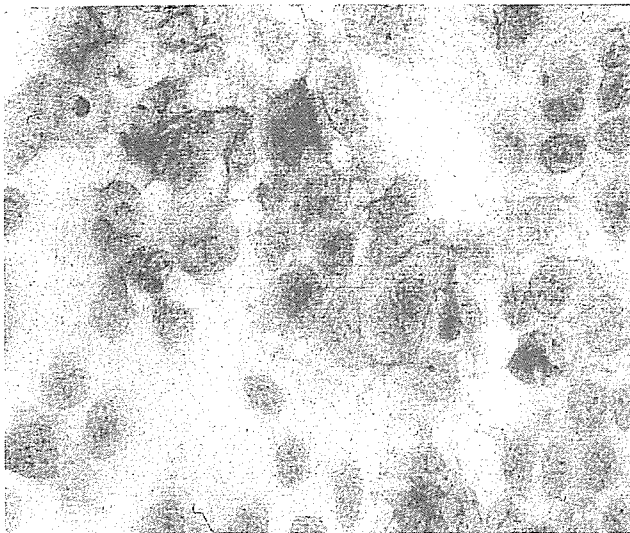


Fig. 1 Immunocytochemical staining of SNG-S with 6-4E

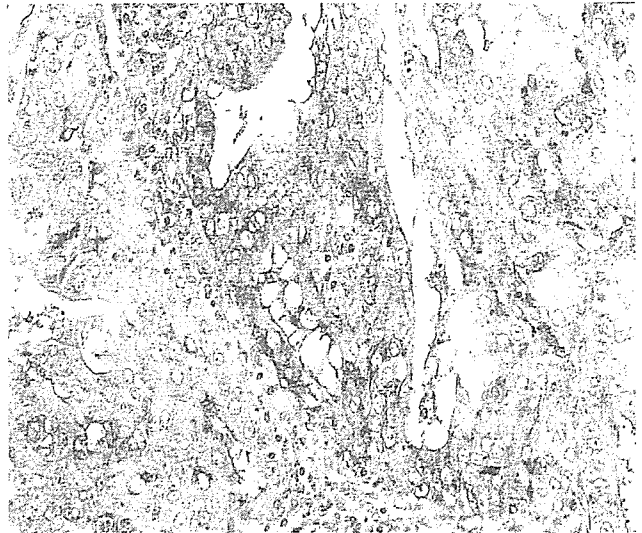


Fig. 2 Immunohistochemical staining of endometrial adenocarcinoma with 6-4E

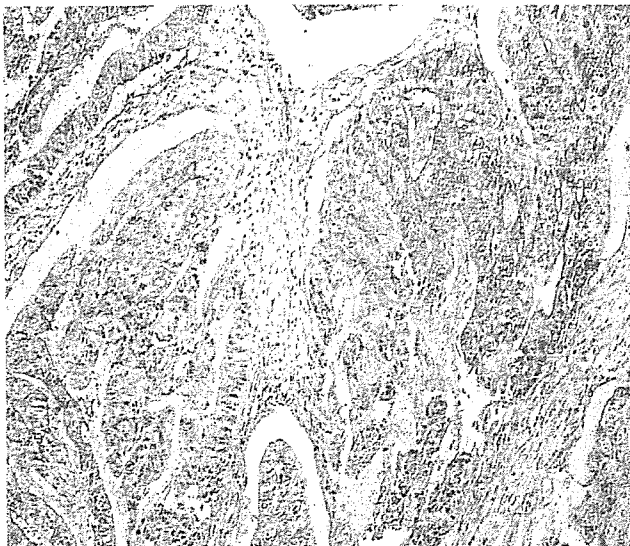


Fig. 3 Immunohistochemical staining of endometrial adenocarcinoma with 10-9D

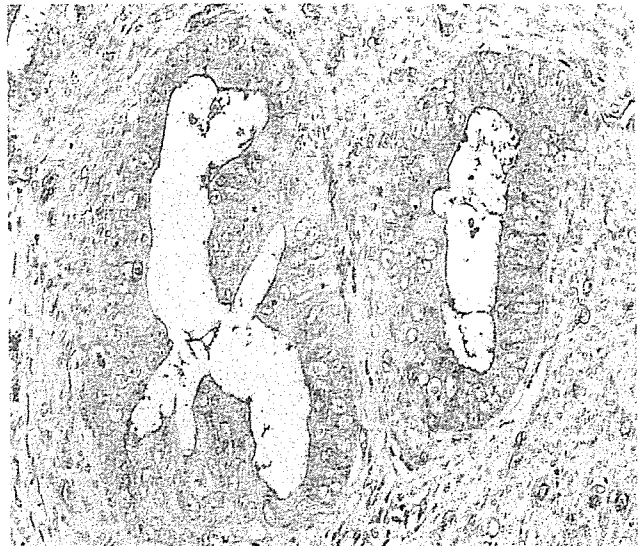


Fig. 4 Immunohistochemical staining of endometrial adenocarcinoma with 5-12H

### ③ MAb の子宮体内膜病変に対する反応性の検討

6-4E および 10-9D の子宮体癌（中等度分化型：20 例）に対する反応性を、免疫組織化学的に検討したところ、6-4E は 20 例中 7 例、10-9D は 20 例中 10 例の症例で反応性を認めた。現在、分化型体癌、未分化型体癌、正常子宮体内膜に対する反応性を検討しつつある段階である。

### ④ MAb の性状、認識抗原の解析

6-4E および 10-9D の認識抗原を検討する目的で、免疫組織染色を行う際に、あらかじめトリプシンおよび過沃素酸処理を行いその反応性の変化を検討したところ、両 MAb ともトリプシン処理では無処理に比べ、染色性にほとんど変化が認められなかったのに対し、過沃素酸 2.5% 処理では染色性がやや減弱し、37% 処理において消失したことから、認識抗原には糖鎖が関与している可能性が強く示唆された。

## 4. 考察

近年癌治療の手技として分子標的治療が注目されているが、癌化に伴い細胞に新たに発現してくる分子に高い特異性を有するモノクローナル抗体 (MAb) を作製し、これに毒素や抗癌剤を結合させた免疫複合体を人体に投与し、正常細胞を傷害することなく癌細胞を選択的に殺すことを目的としたミサイル療法は理想的な癌の治療の一つと考えられる。しかしながら、従来より開発されてきた MAb のほとんどがマウス型であり、人体に投与した場合に障害があり、ミサイル療法の臨床応用は実現に至っていない。この欠点を補うために最近の遺伝子工学的技術の進歩と相まって、ヒト型抗体を効率的に産生する抗体の開発が内外を問わず繰り返されつつあるが、実用化に至っている例はほとんどない。このような状況の中、共同研究施設であるキリン (株) の石田らはヒト染色体をマウス個体へ導入して発現させるという画期的な方法を用いて、完全ヒト型抗体を産生する Cross-bred Trans-Chromosomal mouse (Cross-bred TC mouse) を作製することに成功した。

すなわち、ヒト線維芽細胞由来のヒト染色体断片をマウス ES 細胞へ導入し、この ES 細胞を 8 細胞期のマウス胚へ注入し、これを擬似妊娠マウスの子宮へ移植した。誕生したキメラマウスにおいて、導入されたヒト染色体が正しく機能することが確認された。さらに、ヒト重鎖遺伝子をもつ 14 番、および、軽鎖遺伝子をもつ 2 番 ( $\kappa$  鎖) または 22 番 ( $\lambda$  鎖) 染色体断片それぞれが導入されたマウスを交配することによって、完全なヒト抗体 (重鎖+軽鎖  $\kappa$ ) を発現する TC マウスを作製した。さらに、この TC マウスとヒト Ig 遺伝子断片を導入したトランスジェニックマウスとを交配することにより、より完全なヒト抗体を長期にわたり産生しうる Cross-bred TC mouse を開発した。

本研究では、すでに研究者らの過去の研究成果から、子宮体癌に特異的にしかも高頻度に反応するマウス型 MAb (MSN-1) の認識抗原が、癌細胞の細胞膜脂質上に高頻度に存在するフコシル化糖鎖 (主として Lewis<sup>x</sup> 型糖鎖) であり、ミサイル療法の標的抗原として望ましい条件を備えていることを明らかにしているため、その認識抗原を高頻度に発現している培養細胞 SNG-S を免疫原としてヒト型 MAb の作製を試みた。

有用性の高い MAb を得るには、そのスクリーニング方法が重要であるので、我々は過去にマウス型 MAb を開発した経験を踏まえ、Cell ELISA 法と、免疫細胞・組織化学的手法を組み合わせを行った。Cell ELISA 法は、短時間に多くの検体数を処理することができ、定量的評価が可能であるという利点があるが、免疫細胞・組織化学染色との discrepancy を認めることもしばしばあるので、Cell ELISA 法によりわずかでも陽性を示したものについて、免疫細胞・組織化学染色を行った。組織標本を用いる場合、ヒト型の抗体であるため内在性の Ig による非特異的反応が起きてしまうので、それを防ぐために予めヒト Ig で充分ブロッキングを行うこととした。また、同一切片を MSN-1 でも染色することにより、MSN-1 の反応性との比較検討を行った。

今回得られた MAb (6-4E、10-9D) は、現在までの検討結果では、子宮体癌の約半数近い症例と反応性を認め、正常子宮体内膜とはほとんど反応性を認めないこと、認識抗原の局在は細胞膜上および細胞質内に認められ、おそらくは糖鎖抗原である可能性が高いということが明らかになっている。

今後は、この MAb の子宮体内膜病変における反応性を多数の症例を対象に検討すると同時に、認識抗原の構造解析を進める。さらに、現在臨床で繁用されている抗癌剤 (タキセン化合物) との免疫複合体を作製し、ミサイル療法への有用性を基礎的に検討していく予定である。

## 5. まとめ

癌の分子標的治療を志向した、ミサイル療法への有用性が高いと考えられる優れたヒト型 MAb を開発することを本研究の目的とした。

我々の共同研究者は世界に先駆け、染色体断片をマウス固体へ導入する新たな方法により、完全ヒト型抗体を安定した状態で産生し得る Cross-bred Trans-Chromosomic mouse (Cross-bred TC mouse) の開発に成功したので、これを用いることにより、我々が過去にマウス型 MAb を開発した経験があり、しかも婦人科領域において近年増加しつつある子宮体癌を対象としてヒト型 MAb の作製に着手した。

その結果、子宮体癌組織と反応し正常体内膜とは反応せず、その認識抗原が癌細胞膜上に存在する糖鎖である可能性の高いヒト型 Mab を作製することに成功した。

しかし本研究は未だ緒についたばかりであり、更なる細胞融合実験の繰り返しが必要であり、得られた MAb のミサイル療法への応用の可能性に関しては今後も研究の継続が必要であるものの、従来より多くの研究者により試みられてきた、ヒト型 MAb の開発が、Cross-bred TC mouse が開発されたことにより、一歩現実に近づきつつあることが本研究によって明らかになったことは、非常に意義深いことと確信している。



---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社