

厚生労働科学研究研究費補助金

医薬安全総合研究事業

感染症発症抑制に関わるヒト B 細胞由来抗体の作製

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 垣生 園子

平成 15 年 (2003 年) 3 月

目次

I.総括研究報告書	
感染症発症抑制に関わるヒトB細胞由来抗体の作製-----	5
II.分担研究報告	
生物活性抗体が認識するエピトープの解析 -----	11
瀧 孝雄	
ヒト免疫系再構築 NOG マウスにおけるヒトB細胞分化の特徴と抗体産生--	14
垣生 園子	
SLE 患者血清の検討 -----	18
関川 巖	
III.研究成果の刊行に関する一覧表-----	20
IV.研究成果の刊行物・別刷-----	22

研究費の名称=厚生労働科学研究費補助金

研究事業名=医薬安全総合研究費事業

研究課題=感染症発症抑制に関わるヒト B 細胞由来抗体の作製に関する研究（総括研究報告書）

国庫補助金精算所要額（円）=20,000,000

研究期間（西暦）=2001-2003

研究年度（西暦）=2002

主任研究者名（所属機関名）=垣生園子（東海大学医学部）

分担研究者名（所属機関名）=瀧 孝雄（大塚製薬株式会社分子医科学研究所）, 関川 巖（順天堂大学医学部内科学）

研究目的=病原体やその産物が引き起こす様々な生体の病的反応は、抗体で阻止できることが動物実験から明らかとなっている。従って、それら病原体に対するモノクローナル抗体（Mab）の臨床応用が期待されているが、実用に際しては、以下のような障害がある。

（1）マウス・ヒトのキメラ抗体やマウス抗体からのヒト型化の作製も進んでいるが、現存する Mab の多くはマウス部分を残している。従って、安全性や効率の面から問題がある。（2）病原体は種類によっては激しく変位を起こすので、単に病原体の構造タンパク質に対する抗体では、有効である保証はない。昨年までの研究プロジェクトにより、ヒト造血幹細胞を用いたヒト免疫系を再構築したモデル動物を開発し、（1）の課題は基本的に克服できると考えられた。現在、モデルにさらなる改良をくわえつつ、実際に免疫を施行して抗体作製を進めている。また、（2）の課題解決として、感染症の症状は示さないが病原体に反応する抗体のキャリアー血清を利用して、生物活性の高い抗体を認識するエピトープを antigen-mimicking peptide として同定し、それに対する抗体を作製することに挑戦している。本年度は、昨年度同定したペプチドを用いて実際に免疫をして、理想的抗体作製を展開する。また一方では、より良い抗体産生ができるモデルマウスの改良も続ける。

研究方法=（1）antigen-mimicking peptide に対する抗体作製とその特異性の検討：昨年の研究成果により得られたマラリアおよび erbB2 に対する antigen-mimicking

peptide の 8 量体 (タンデムリピート) を大腸菌の発現ベクターに構築して大量に得る。それらを、まずマウスに complete Freund adjuvant と共に免疫して得られた抗原特異的抗体 (マラリア原 *Plasmodium falciparum* の表面抗原、MSP-1, MSP-2, RESA あるいは erbB2 発現細胞) を、ELISA および flow - cytometer にて解析する。

(2) 抗体産生における antigen-mimicking peptide のワクチン効果の検討: erbB2 発現腫瘍移植マウスに erbB2 antigen-mimicking peptide を免疫して、移植腫瘍に特異的に反応する抗体価の上昇誘導を試みる。

(3) 黄色ぶどう球菌や A 群溶連菌によって引き起こされるトキシックショック症候群 (TSS) に関与する外毒素 TSST-1 に対する抗体作製: TSST-1 を購入し、マウスおよびヒト免疫系再構築 NOG マウスに免疫し、経時的に抗 TSST-1 抗体価を ELISA で検討する。また、NOG マウスから得たヒト B 細胞を EB ウイルスでトランスフォームし、単クローン抗体を得る。

(4) ヒト幹細胞起源の違いによる免疫系再構築モデル内で分化する B 細胞の解析: 異なる 3 種類の CD34+ 細胞 (臍帯血、成人骨髄、成人末梢血由来) を NOG マウスに移植して、CD5+B 細胞の出現を指標にして、ヒト B 細胞の分化の状態を調べる。また、各モデル動物に DNP-KLH を免疫し、抗原特異的抗体の血清中力価を ELISA にて解析する。

(5) ヒト内在性レトロウイルス HERVclone4-1 の転写と DNA methylation の解析: 患者および SLE 患者の末梢血単核細胞を DNA methylation inhibitor (5-azaC) と 4 8 時間培養後、total RNA 単離して cDNA を得る。5-aza C 処理、未処理の cDNA について RP-PCR を施行する。

結果と考察= (A) 研究成果: 熱帯熱マラリアの無症候患者から得た血清中と高い特異性を示した 4 種類の malaria antigen-mimicking peptide を BALB/c マウスに免疫すると、8 - 10 週目に同ペプチドに対する高い抗体価 (IgM, IgG1) が血清中に検出された。それらはまた、*Plasmodium falciparum* 由来の抗原と反応した。ハイブリドーマを樹立して得た培養液を用いて解析したところ、当該抗体はマラリア虫体に存在する抗体とも結合することが、確認された。ただし、これら培養上清は *Plasmodium falciparum* に対する中和活性は認められなかった。ついで、ヒト免疫系再構築 NOG マウスに同抗体を免疫したところ、免疫原である antigen-mimicking peptide に対する IgM の抗体を血清中に検出できた。Apoptosis を誘導可能な抗 erbB2 抗体より得た erbB2 antigen-mimicking peptide をマウスに投与すると、erbB2 発現腫瘍移植単独に比較して、同腫瘍と反応する抗体産生が亢進した。現在同抗体の apoptosis 活性を検討中である。以上に結果は、ファージペプチドランダムライブラリーによってスクリーニングした antigen-mimicking peptide は、生物活性が高い患者血清中に存在する抗体が認識するエピトープである可能性が高いことを、当該ペプチドを免疫することによって抗原特性の件から示したことになる。また、同ペプチドはワクチン効果も有することが示唆された。

細菌外毒素である TSST-1 を BALB/c マウスおよびヒト免疫系再構築 NOG マウスにアジュヴァントと共に免疫すると、TSST-1 に特異的抗体が前者では IgG1 と IgM レベルで、後者では IgM で血清中に検出された。後者の B 細胞を EB ウイルスでトランスフォームした培養液にも同様の特異性が見られた。トキシックショックをもたらす細胞外毒素である TSST-1 はスーパー抗原の性状を持つため、生物活性の高い抗体が生体内で産生されにくいとされている。しかし、マウスを宿主とすると、アジュヴァントを使用することができ、そこで得られた中和抗体は、ヒト B 細胞由来であるならば治療に有用となる。NOG マウス内でヒト臍帯血 CD34+細胞から分化する B 細胞の多くは (~80%)、CD5 発現をしていることが脾臓と末梢血内で認められた。しかし、骨髄ではその割合は 30% 以下であった。胎児や乳幼児に CD5+B 細胞が比較的多く検出されることを考慮し、成人骨髄および成人末梢血中から得た CD34+細胞を使用して実験したが、結果はいずれの起源の CD34+細胞を用いても同様であり、CD5+B 細胞の分化は、その起源に限定されて誘導されるのでないことを明らかにした。この成果は、今後のヒト免疫系再構築作製により広い門戸を開くことになる。

以上の本年度結果は、生体に感染あるいは毒性等の危険要因を与えることなく、生物活性を有した抗体作製の tool としての基盤ができたことを意味する。

なお、SLE の患者数を増やし、昨年に続き HERV clone4-1 の転写が同患者では高いことを RT-PCR で示すと同時に、demethylating agent である 5-aza と培養しても gag mRNA 発現に変化がないことを確認した。HERV とは独立して SLE 患者に CMV 感染が PCR にて見いだされた。今後をこれら CMV 抗体のエピトープ同定に向けて患者の血清中の抗体価を調べる。ただし、血清中の抗 HERV clone 4-1 を着実に検出する方法開発ができなかったことは、本期間中に SLE 患者の血清を目的とした抗 HIV 抗体のエピトープ探しに役立てることが困難である可能性を推測させる。

(B) 考察：無症候キャリアーから得た血清をファージペプチランダムライブラリーによってスクリーニングして得た antigen-mimicking peptide は、患者が抗原特異的に産生した抗体のエピトープである可能性が極めて高いことを、当該ペプチドを免疫することによって抗原特異性の面から示した。また、IgM タイプではあるがヒト免疫系再構築 NOG マウス内でヒト B 細胞によって同様の抗体が産生され得ることを明らかとした。これらの結果は、antigen-mimicking peptide によって得た抗体の生物活性の検討を、ハイブリドーマ等の樹立によって単クローン抗体を作製しながら今後精力的に進める希望をもたらした。また、感染症ではないが、乳ガンや消化器腫瘍細胞に発現が高い erbB2 に antigen-mimicking peptide が抗体産生能の促進に有用であるとする本年度の成果は、ワクチンへの未知を開いたものと評価できる。また、ヒト免疫系再構築 NOG マウスに必要とされる CD34+細胞としてその起源に拘束がないことを明らかにしたことは、今後の本モデル作製の範囲を広げる有用な情報となった。従って、本年度の結果は、生体に感染あるいは毒性等の危険要因をもたらすことなく、生物活性を有した有用な抗体作製の tool としての

基盤ができたことを意味する。

なお、SEL 患者における HERV clone4-1 に対する抗体の同定が、予想外に技術的に困難であったため、同ウイルスに対する抗体と交叉すると報告されている HIV 抗体のエピトープ検出は大幅に遅れており、この研究期間中に同抗体作製は可能性が極めて低くなった。

結論=無症候キャリアーから得た血清を基に得たファージペプチランダムライブラリーによってスクリーニングして得た antigen-mimicking peptide は、患者が抗原特異的に産生した抗体のエピトープである可能性が極めて高いことを示唆した。すなわち、同ペプチドを免疫することによって、マウスでは IgG1 と IgM、ヒト免疫系再構築 NOG マウス内のヒトB細胞では IgM が、感染限であるマラリア虫体成分と、あるいは腫瘍細胞表面抗原と特異的に反応する抗体として得られた。同ペプチドはまた、ワクチンとして有用であることが、乳ガンや消化器腫瘍細胞に発現が高い erbB2 に対する抗体産生能の促進によって示された。なお、ヒト免疫系再構築 NOG マウスに必要とされる CD34+細胞は、臍帯血、成人骨髄および成人末梢血いずれも同様な B 細胞に分化することを示した。このことは、今後のヒト免疫系モデル作製の範囲を広げる有用な情報となった。

SEL 患者における HERV clone4-1 に対する抗体の同定が、予想外に技術的に困難であったため、同ウイルスに対する抗体と交叉すると報告されている HIV 抗体のエピトープ検出は大幅に遅れており、この研究期間中に同抗体作製は可能性が極めて低くなった。

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

総括研究報告書

感染症発症抑制に関わるヒト B 細胞由来抗体の作製

主任研究者 垣生園子 東海大学医学部 教授

研究要旨

病原菌感染現場における無症候者で高力価な抗体保持から提供された血清には、生物活性が高い抗体の存在が期待される。本研究ではそのような抗体をもとに免疫回避がなされなかった病原体のエピトープを同定し、同一レパートリーに対するヒト型抗体を作成することを目指している。昨年度は、無症候キャリアーから収集した血清を用いてファージペプチドライブラリーからスクリーニングして antigen-mimicking peptide を決定した。本年度は、それらを免疫して抗体を得て、その特異性と活性解析を進めている。これまでに以下の結果を得ている。(1) 通常マウスを用いて、患者血清と特異性の高い4種類の malaria antigen-mimicking peptide をアジュヴァントと共に免疫し、投与抗原およびマラリア虫体表面抗原と反応する血清を得た。ハイブリドーマを作製し、その上清を精製して中和活性を有する抗体を検索中である。(2) 同ペプチドを免疫したヒト免疫系再構成 NOG マウスの血清中にペプチド特異的 IgM 抗体を検出した。(3) erbB2 antigen-mimicking peptide を、erbB2 発現している腫瘍を移植したマウスに前投与すると、抗 erbB2 抗体産生が亢進し、同ペプチドのワクチン効果を示した。(4) 黄色ぶどう球菌の外毒素である TSST-1 をアジュヴァントと共にヒト免疫系再構築 NOG マウスに免疫したところ、比較的高い力価の抗原特異的 IgM 抗体得られた。これらヒトB細胞は EB ウイルスによってトランスフォームし、培養血清により精製を進めている。(6) ヒト免疫系再構築に使用する CD34+細胞は、臍帯血、成人骨髄、成人末梢血いずれを用いても、分化するB細胞は B1 マーカーである CD5 陽性細胞が主となることを示し、当該マウスを免疫した場合 IgM 抗体が優勢となる原因を明らかとした。現在、B2 細胞分化誘導系を開発中である。

研究分担者 関川 巖 順天堂大学医学部
助教授

瀧 孝雄 大塚製薬株式会社
医科学研究所所長

A. 研究目的

病原体やその産物が引き起こす様々な生体の病的反応は、抗体で阻止できることが動物実験から明らかとなっている。従って、それら病原体に対するモノクローナル抗体 (Mab) の臨床応用が期待されているが、実用には、以下のような障害がある。(1) マウス・ヒトのキメラ抗体やマウス抗体からのヒト型化の作製も進んでいるが、現存する Mab の多くはマウス部分を残している。従って、安全性や効率の面から問題がある。(2) 病原体は種類によっては激しく変位を起こすので、単に病原体の構造タンパク質に対する抗体では、有効である保証はない。昨年までの研究プロジェクトにより、ヒト造血幹細胞を用いたヒト免疫系を再構築したモデル動物を開発し、(1) の課題は基本的に克服できると考えられた。現在、モデルにさらなる改良をくわえつつ、実際に免疫を施行して抗体作製を進めている。また、(2) の課題解決として、感染症の症状は示さないが病原体に反応する抗体のキャリアー血清を利用して、生物活性の高い抗体を認識するエピトープを antigen-mimicking peptide として同定し、それに対する抗体を作製することに挑戦している。本年度は、昨年度同定したペプチドを用いて実際に免疫をして、理想的抗体作製を展開する。また一方では、より良い抗体産生ができるモデ

ルマウスの改良も続ける。

B. 研究方法

(1) antigen-mimicking peptide に対する抗体作製とその特異性の検討：昨年の研究成果により得られた malaria および erbB2 に対する antigen-mimicking peptide の 8 量体 (タンデムリピート) を大腸菌の発現ベクターに構築して大量に得る。それらを、まずマウスに complete Freund adjuvant と共に免疫して、抗原特異的抗体-マラリア原 *Plasmodium falciparum* の表面抗原 MSP-1, MSP-2, RESA) あるいは erbB2 発現細胞-を、ELISA および flow-cytometer にて解析する。

(2) 抗体産生における antigen-mimicking peptide のワクチン効果の検討：erbB2 発現腫瘍移植マウスに erbB2 antigen-mimicking peptide を免役して、移植腫瘍に特異的に反応する抗体価の上昇誘導を試みる。

(3) 黄色ぶどう球菌や A 群溶連菌によって引き起こされるトキシックショック症候群 (TSS) に関与する外毒素 TSST-1 に対する抗体作製：TSST-1 を購入し、マウスおよびヒト免疫系再構築 NOG マウスに免疫し、経時的に抗 TSST-1 抗体価を ELISA で検討する。また、NOG マウスから得たヒト B 細胞を EB ウイルスでトランスフォームし、単クローン抗体を得る。

(4) ヒト幹細胞起源の違いによる免疫系再構築モデル内で分化する B 細胞の解析：異なる 3 種類の CD34+ 細胞 (臍帯血、成人骨髄、成人末梢血由来) を NOG

マウスに移植して、CD5+B 細胞の出現を指標にして、ヒトB細胞の分化の状態を調べる。また、各モデル動物に DNP-KLH を免疫し、抗原特異的抗体の血清中力価を ELISA にて解析する。

(5) ヒト内在性レトロウイルス HERVclone4-1 の転写と DNA methylation の解析：患者および SLE 患者の末梢血単核細胞を DNA methylation inhibitor (5-azaC) と 48 時間培養後、total RNA 単離して cDNA を得る。5-aza C 処理、未処理の cDNA について RP-PCR を施行する。

C. 研究成果

熱帯熱マラリアの無症候患者から得た血清と高い特異性を示した 4 種類 malaria antigen-mimicking peptide を BALB/c マウスに免疫すると、8-10 週目に同ペプチドに対する高い抗体価(IgM, IgG1) が血清中に検出された。それらはまた、Plasmodium falciparum 由来の抗原と反応した。ハイブリドーマを樹立して得た培養液を用いて解析したところ、当該抗体はマラリア虫体に存在する抗体とも結合することが、確認された。しかし、これら培養上清は Plasmodium falciparum に対する中和活性は認められなかった。ついで、ヒト免疫系再構築 NOG マウスに同抗体を免疫したところ、免疫原である antigen-mimicking peptide に対する IgM の抗体を血清中に検出できた。Apoptosis を誘導可能な抗 erbB2 抗体より得た erbB2 antigen-mimicking peptide をマウスに投与すると、erbB2 発現腫瘍移植単独に比較して、同腫瘍と

反応する抗体産生が亢進した。この結果は、antigen-mimicking peptide がワクチン効果をもつことを示唆する。現在同抗体の apoptosis 活性を検討中である。細菌外毒素である TSST-1 を BALB/c マウスおよびヒト免疫系再構築 NOG マウスにアジュヴァントと共に免疫すると、TSST-1 に特異的抗体が前者では IgG1 と IgM レベルで、後者では IgM で血清中に検出された。後者の B 細胞を EB ウイルスでトランスフォームした培養液にも同様の特異性が見られた。NOG マウス内でヒト臍帯血 CD34+細胞から分化する B 細胞の多くは (~80%)、CD5 発現をしていることが脾臓と末梢血内で認められた。しかし、骨髄ではその割合は 30% 以下であった。胎児や乳幼児に CD5+B 細胞が比較的多く検出されることを考慮し、成人骨髄および成人末梢血中から得た CD34+細胞を使用して実験したが、結果は同様であり、CD5+B 細胞の分化は、その起源に限定されて誘導されるのではないことを明らかにした。SLE の患者数を増やし、昨年に続き HERV clone4-1 の転写が同患者では高いことを RT-PCR で示すと同時に demethylating agent である 5-aza と培養しても gag mRNA 発現に変化がないことを確認した。HERV とは独立して SLE 患者に CMV 感染が PCR にて見いだされた。今後をこれら CMV 抗体のエピトープ同定に向けて患者の血清中の抗体価を調べる。

D. 考察

無症候キャリアーから得た血清をファージペプチランダムライブラリーによってスクリーニングして得た antigen-mimicking peptide は、患者が抗原特異的に産生した抗体のエピトープである可能性が極めて高いことを、当該ペプチドを免疫することによって抗原特異性の面から示した。また、IgM タイプではあるがヒト免疫系再構築 NOG マウス内でヒトB細胞によって同様の抗体が産生され得ることを明らかとした。これらの結果は、antigen-mimicking peptide によって得た抗体の生物活性の検討を、ハイブリドーマ等の樹立によって単クローン抗体を作製しながら今後精力的に進める希望をもたらした。また、感染症ではないが、乳ガンや消化器腫瘍細胞に発現が高い erbB2 に antigen-mimicking peptide が抗体産生能の促進に有用であるとする本年度の成果は、ワクチンへの未知を開いたものと評価できる。また、ヒト免疫系再構築 NOG マウスに必要とされる CD34+細胞としてその起源に拘束がないことを明らかにしたことは、今後の本モデル作製の範囲を広げる有用な情報となった。従って、本年度の結果は、生体に感染あるいは毒性等の危険要因をもたらすことなく、生物活性を有した有用な抗体作製の tool としての基盤ができたことを意味する。

なお、SEL 患者における HERV clone4-1 に対する抗体の同定が、予想外に技術的に困難であったため、同ウイルスに対する抗体と交叉すると報告されている HIV 抗体のエピトープ検出は大幅に遅れ

ており、この研究期間中に同抗体作製は可能性が極めて低くなった。

E. 結論

無症候キャリアーから得た血清を基に得たファージペプチランダムライブラリーによってスクリーニングして得た antigen-mimicking peptide は、患者が抗原特異的に産生した抗体のエピトープである可能性が極めて高いことを示唆した。すなわち、同ペプチドを免疫することによって、マウスでは IgG1 と IgM、ヒト免疫系再構築 NOG マウス内のヒトB細胞では IgM が、感染限であるマラリア虫体成分と、あるいは腫瘍細胞表面抗原と特異的に反応する抗体として得られた。同ペプチドはまた、ワクチンとして有用であることが、乳ガンや消化器腫瘍細胞に発現が高い erbB2 に対する抗体産生能の促進にによって示された。なお、ヒト免疫系再構築 NOG マウスに必要とされる CD34+細胞は、臍帯血、成人骨髄および成人末梢血いずれも同様な B 細胞に分化することを示した。このことは、今後のヒト免疫系モデル作製の範囲を広げる有用な情報となった。

SEL 患者における HERV clone4-1 の発現を再確認した。また、同患者には CMV 感染があることを RNA レベルで示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Chenwangen Li, Kiyoshi Ando, Yoshie Kametani, Masayuki Oki, Masao Hagihara, Kazuo Shimamura, Sonoko

Habu, Shunichi Kato and Tomomitsu Hotta.,
Reconstitution of functional human B
lymphocytes in NOD/SCID mice engrafted
with ex vivo expanded CD34+ cord blood
cells., *Experimental Hematology.*, 30:1036-
1043, 2002

Yuki Saito, Yoshie Kametani, Katsuto
Hozumi, Naoko Amochida, Kiyoshi Ando,
Mamoru Ito, Tatsuji Nomura, Yutaka
Tokuda, Hiroyasu Makuuchi, Tomoo Tajima
and Sonoko Habu., The in vivo development
of human T cells from CD34+ cells in the
murine thymic environment., *Inter.
Immunology.*, 14:1-12, 2002

A. Kumanogoh, K. Suzuki, E. Ch'ng,
C. Watanabe, S. Marukawa, N. Takegahara,
I. Ishida, T. Sato, S. Habu, K. Yoshida,
W. Shi and H. Kikutani., Requirement for the
Lymphorin, CD100, in the Induction of
Antigen-Specific T Cells and the Maturation
of Dendritic Cells., *Jour. of Immunol.*, 169:
1175-1181, 2002

M. Senoo, S. Hoshino, N. Mochida,
Y. Matsumura and S. Habu., Identification of
Novel Protein p59, Which is Expressed at
Specific Stages of Mouse Spermatogenesis
BBRC., 292:992-998, 2002

Wataru Ise, Mamoru Totsuka, Yoshitaka
Sogawa, Akio Ametani, Sotoshi, Hachimura,
Takehito Sato, Yoshihiro Kumagai, Sonoko
Habu, and Shuichi Kaminogawa., Naive
CD4+ T cells exhibit distinct expression patterns
of Cytokines and cell surface molecules on their
primary responses to varying Doses of antigen.,
J. Immunol., 168, 3242-3250, 2002

2. 学会発表

(1) 第32回日本免疫学会総会・学術
集会 2002年12月4日～6日(東京)
大野慎一郎、林卓己、佐藤千春、佐藤健
人、垣生園子、
胸腺細胞分化・系列決定における増殖制
御の意義

(2) 第32回日本免疫学会総会・学術
集会 2002年12月4日～6日(東京)
片野いくみ、亀谷美恵、平野康之、石川
大、荻野晃一、佐々木茂、瀧孝雄、今井
浩三、徳田裕、垣生園子、

erbB-2 特異的モノクローナル抗体
(mAb) CH401 のエピトープ解析

(3) 第32回日本免疫学会総会・学術
集会 2002年12月4日～6日(東京)
穂積勝人、垣生園子

T細胞分化決定における GATA3 と Notch
シグナルの役割

(4) 第32回日本免疫学会総会・学術
集会 2002年12月4日～6日(東京)
玉内秀一、小沢秀行、伊藤守、寺島正純、
高秀華、穂積勝人、垣生園子、渡辺直熙
Nippostrongylus Brasiliensis 感染 GATA-3
トランスジェニックマウスにおける免疫
応答の検討

(5) 第32回日本免疫学会総会・学術
集会 2002年12月4日～6日(東京)
鈴木大介、妹尾誠、王莉莉、真貝洋一、
垣生園子、

TCR β 遺伝子の再構成順序 (D-J \rightarrow V-DJ)
を規定する機構解析

(6) 第32回日本免疫学会総会・学術
集会 2002年12月4日～6日(東京)
天羽康之、浜田祐子、伊藤守、高秀華、
穂積勝人、寺島正純、垣生園子、増澤幹
男、勝岡憲生、玉内秀一

接触皮膚炎誘導における転写因子 GATA-3 の役割

(7) 第32回日本免疫学会総会・学術集会 2002年12月4日～6日(東京)
小峯起、林啓太郎、関洋一、玉内秀一、穂積勝人、垣生園子、佐竹正延、久保允人

急性骨髄生白血病原因遺伝子 AML-1 のサイトカイン発現制御における役割

(8) 第32回日本免疫学会総会・学術集会 2002年12月4日～6日(東京)
松村啄也、平野康之、亀谷美恵、安藤潔、椎名雅史、伊藤亮治、片野いくみ、齋藤雄紀、伊藤守、上山義人、元吉和夫、垣生園子

ヒト免疫系再構築マウスにおける B 細胞サブセットの解析

(9) 第32回日本免疫学会総会・学術集会 2002年12月4日～6日(東京)
齋藤雄紀、亀谷美恵、松村啄野、伊藤守、上山義人、平野康之、片野いくみ、伊藤亮治、垣生園子

マウス環境下におけるヒト造血幹細胞 T 細胞への機能的分化の解析

(10) 第32回日本免疫学会総会・学術集会 2002年12月4日～6日(東京)
亀谷美恵、片野いくみ、平野康之、垣生園子

IL-6 産生亢進による抗原特異的 IgG 産生抑制作用—TCR-Tg マウスによる解析

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
特になし

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

生物活性抗体が認識するエピトープの解析

分担研究者 瀧 孝雄 大塚製薬株式会社
分子医科学研究所 所長

研究要旨

昨年度の研究により、熱帯熱マラリア無症候の患者血清を用いてファージペプチドライブラリーから同定したエピトープの可能性が高い malaria antigen-mimicking peptide を4種選択し、8量体を大腸菌の発現ベクターに構築して大腸菌で大量生産した。これらをアジュヴァントと共にマウスに免疫し、免疫原ペプチドに特異的な抗体（IgG および IgM 抗体）を得た。これらは、原虫表面抗原とも反応した。次に、同ペプチド抗原4種類を用いてヒト免疫系再構成 NOG マウスを免疫した。得られた抗原特異的抗体は、いずれも IgM 抗体であった。

本年度は新たに、ファージライブラリーから apoptosis 誘導能をもつ抗体から、エピトープ同定をおこなった。同定された複数のペプチドのうち、ヒト HLA-DR にアンカーするペプチドを選択して免疫原としてマウスを免疫し、抗原特異的抗体を得た。現在、上記抗体の生物活性を検討している。また、マウスによる実験結果では、erbB2 陽性腫瘍と共に erbB2 ペプチドを免疫すると、抗体価が著しく上昇し、ワクチン効果が示唆された。

研究協力者 亀谷美恵 東海大学医学部
助手
安藤 潔 東海大学医学部
講師

単に病原体由来の既知の構造タンパクを免疫して作製される抗体では、感染現場における病原体と特異的に反応できない場合や生物活性が失われている場合が多い。本研究では、実際に生体内で生物活性をもつと考えられる抗体を利用して、ファージペプチドライブラリーから、抗体が認識するエピトープの可能性が高い抗原ペプチド（antigen mimicking

A. 研究目的

病原体の種類によっては頻りに突然変異がおこるため、あるいは薬剤耐性を獲得するため、

peptide) を同定し、上記問題点を解消しようとするものである。本年度は、昨年度に同定した熱帯熱マラリア患者抗体を利用して得た malaria antigen-mimicking peptide を実際に免疫して、ヒトB細胞による抗体作製を試みる。また、erbB2 に対する antigen mimicking peptide を得て、同様に抗体作製を試みる。

B. 研究方法

昨年の研究によって、熱帯熱マラリアの無症候患者の血清をもとに、ファージペプチドライブラリーから得た malaria antigen mimicking peptide (分子量約 20KD の 8 量体のタンデムリピート) を、大腸菌の発現ベクターに構築して得た。4 種類のペプチドをアジュヴァントと共にマウスおよびヒト免疫系再構築マウスに免疫し、経時的に採血して ELISA により、抗体価 (免疫原のペプチドおよび虫体表面抗原である MRP-2, RESA に対する抗体) を測定した。

抗 Malaria 抗体と同様に apoptosis 誘導能のある erbB2 抗体を利用してファージペプチドライブラリーからペプチドを同定し、免疫して抗体を得た。なお、同ペプチド免疫後 erbB2 発現腫瘍を移植して、抗体価の上昇の有無を調べた。

C. 研究成果

(1) 熱帯熱マラリアの無症候キャリアーの抗体と反応する malaria antigen-mimicking peptide 4 種類を免疫したマウスからは、IgG および IgM の抗体が得られ、ハイブリドーマを作製した。限界希釈前の現在、虫体表面抗原と反応する抗体が 5 種類得られた。しかし、いずれも中和活性の明確な抗体はまだ得られていない。ヒト免疫系再構築 NOG マウスを免

疫下結果、免疫原のペプチドと反応する IgM 抗体が血清中に検出された。

(2) ErbB2 antigen-mimicking peptide 12 種類を免疫したマウスから、抗原特異的抗体が得られた。マウス B 細胞の場合はハイブリドーマを、ヒト B 細胞の場合は EB ウイルスによってトランスフォームして、特異抗体を得たが、apoptosis 誘導のをもつ抗体はまだ得られていない。

(3) 同 erbB2 ペプチドは、erbB2 発現腫瘍を移植した系に予め免疫することで、抗体価の亢進を誘導した。

D. 考察

昨年度同定した antigen-mimicking peptide を免疫することにより、虫体成分あるいは細胞表面抗原 (erbB2) に対する抗体が作製されることが明らかとなった。同ペプチドによって得られた抗体の活性解析は、現在進行中である。

目的とするヒト免疫系再構成 NOG マウスによって得た抗原特異的抗体は、EB ウイルスによるトランスフォームを施行したためと、NOG マウスで分化するヒト B 細胞は CD5+B 細胞が主体であるため (垣生の報告書参照)、すべて IgM であることが、今後の課題として残される。

Antigen-mimicking peptide は抗体産生亢進のワクチンとして利用できずことが示唆された。

E. 結論

抗血清を用いてファージペプチドライブラリーによって同定した antigen-mimicking peptide を個体に免疫することによって、原虫あるいは細胞の分子に対する抗体を誘導できることを証明した。同ペプチドは抗体産生亢

進のワクチンとして有用であることを示した。
同ペプチドをヒト免疫系再構築NOGマウスに
免疫することにより、ペプチド特異的IgM抗
体を誘導できることを、示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

T. Asai^{a,*}, M. Nagatsuka^a, K. Kuromi^a, S.
Yamakawa^a, K. Kurohane^a, K. Ogino^b, M.
Tanaka^b, T. Taki^b, and N. Oku^{a,**}
Suppression of tumor growth by novel
peptides homing to tumor-derived new
blood Vessels. FEBS Lett. 510, 206- 210
(2002)

T. Taki, & N. Oku., Inhibition of tumor
metastasis by liposomes containing glyco-
replica peptides. Methods in Molecular
Biology, 199: Liposome Methods
and Protocols (Ed. By S. Basu & M. Basu)
Human Press, Totowa, NJ pp219-231., 2002

T. Asai, K. Shimizu, M. Kondo, K. Kuromi,
K. Watanabe, K. Ogino, T. Taki, S. Shuto, A.
Matsuda, & N. Oku., Anti-neovascular therapy
by liposomal DPP-CNDAC targeted to
angiogenic vessels. FEBS Letters 520 167-
170., 2002

D. Ishikawa and T. Taki

"Far-eastern blotting and its applications -
Gate to lipidomics -Recent Res. Devel. Anal.
Biochem., 2., 293-302., 2002 :

H. 知的財産権の出願・登録情報

特になし

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

ヒト免疫系再構築 NOG マウスにおけるヒト B 細胞分化の特徴と抗体産生

分担研究者 垣生園子 東海大学医学部 教授

研究要旨

（1）昨年までの研究により、NOD/SCID マウスから NK 細胞機能を除いた NOG マウスの方が、ヒト臍帯血由来の幹細胞の生着率および免疫系細胞の分化効率が良いことを示してきた。本年度は、NOG マウス内で分化するヒト B 細胞の性状を、抗原刺激による抗体産生を軸に解析した。

NOG 内ではヒト CD34+細胞から分化した B 細胞の多くは、B1 細胞のマーカーである CD5 を発現していた。これら NOG マウスを免疫すると、抗原特異的 IgM 抗体は比較的良く上昇したが、IgG 抗体は検出されなかった。CD5+B 細胞は胎児期から乳幼児期に多いとされているので、移植する CD34+細胞の起源を臍帯血、成人骨髄細胞、成人末梢血細胞 3 者で比較してみたが、いずれの起源からも高率に CD5+B 細胞が出現した。NOG の組織別で比較すると、CD5+B 細胞の出現は骨髄では比較的低い、脾臓と末梢血では高率の CD5+B 細胞が出現した。これらヒト B 細胞の分布を持つ NOG マウスを DNP-KLH で免疫すると、血清中に検出される抗原特異的抗体は IgM のみで、IgG 産生は検出限界以下であった。CD5+B 細胞の分布にヒントを得て、ヒト骨髄ストローマ細胞を NOG マウスに移植すると、血清中の IgG レベルが亢進した。現在、抗原特異的抗体の解析を進めている。（2）黄色ぶどう球菌や A 群溶連菌によって引き起こされるトキシックショック症候群（TSS）に関与する外毒素の 1 つである TSST-1 をアジュヴァントと共に免疫することによって、同モデルマウスに抗 TSST-1 に対するヒト IgM 抗体産生の上昇をみた。これらヒト B 細胞を EB ウイルスでトランスフォームし、内容液中に同特異性をも抗体を検出した。

研究協力者 穂積勝人 東海大学医学部
講師
松村拓也 防衛医科大学校
大学院生

A. 研究目的

昨年の研究でヒト免疫系再構築のために有用な動物として開発した NOG マウスは、ヒト未

熟細胞の生着率およびT細胞を含めた免疫細胞の分化効率が高いことが解った。一方、これまでの報告で臍帯血移植では、一過性にCD5+B細胞が分化するとされている。B細胞中のB1サブセットはCD5を発現することが知られており、IgM抗体と特定の抗原にしか反応しないとされている。臍帯血中あるいは胎児期のB細胞の多くはCD5+B細胞である。従って、CD34+細胞の起源によってCD5+B細胞の出現が異なるか否かを検討した。B1細胞の出現を低下させることは、本プロジェクトの目的である生物活性の強い抗体を得る一助となると推測したからである。また、同マウスを利用して、ヒト生体内では比較的抗体産生が容易でないスーパー抗原の性質をもつ細菌外毒素に対して、アジュヴァントと共に免疫して中和抗体を得ることを試みる。

B. 研究方法

(1) インフォームドコンセントのもとに、ヒト免疫系の再構築に用いる幹細胞として臍帯血、成人骨髄細胞および末梢血を得て、抗体マグネティックビーズおよび細胞自動解析装置を用いてCD34+細胞を分離した。

(2) これらCD34+細胞を昨年開発したNOGマウスに移植し、分化するB細胞について各種細胞表面マーカーで染色して分化段階を決定した。(3) ヒト免疫系再構築NOGマウスをDNP-KLHで免疫し、経時的に血清中の抗体価をELISAにて測定して、その抗体産生能を検討した。(4) 採取した成人骨髄細胞の一部を2-3日培養し、付着細胞を骨髄ストローマ細胞とする。(3) TSST-1をalumと共にヒト免疫系再構築NOGマウスに免疫し、経時的に採血して、抗体価を測定する。

C. 研究成果

(1) CD19+細胞(B細胞)中、CD5陽性の割合は、脾臓と末梢血ではCD34+細胞を移植後から増加し、8週以上は80%以上であった。これらCD5+細胞はCD20+IgM+IgD+細胞が大部分であり、成熟B細胞であった。骨髄ではCD5+CD19+細胞の割合は少なく30%前後であった。

(2) これらヒトCD34+細胞を移植後8週間のNOGマウスをDNP-KLHとalumと共に免疫すると、かなり高い力価の抗体を血清中に検出できた。しかし、いずれのNOGマウス血清も抗原特異的に上昇した抗体は、IgMタイプであった。

(3) NOG骨髄で分化したヒトB細胞には、CD5+細胞が少ないことから、ヒト骨髄ストローマ細胞特異的CD5発現機能が考えられた。採取した骨髄細胞から得たストローマ細胞をNOGマウスに移植すると、血清中のIgG分画が上昇した。

(4) アジュヴァントと共にTSST-1で免疫すると、抗原特異的抗体が通常マウスではIgG1とIgMタイプが、ヒト免疫系再構築NOGマウスではIgMが血清中に上昇した。

NOGマウス由来ヒトB細胞をEBウイルスでトランスフォームすると、培養上清中に抗TSST-1IgM抗体が面出された。

D. 考察

ヒト幹細胞を3種類の臓器—臍帯血、成人骨髄、成人末梢血—から得て、昨年開発したNOGマウスに移植したところ、いずれもCD5+B細胞が主体の分化を示した。CD5+B細胞は、胎児期に多数出現するB1サブセットに属する細胞と報告されているが、NOGの系を使用するかぎり、成人由来のCD34+細胞の同じ形質の細胞となった。この結果は、今後少なくとも

もヒト B 細胞の分化を誘導する系において、幹細胞の起源の拘束される必要がないことを示唆し、モデル作製により広い道を開いた。スーパー抗原の性状をもつ細菌外毒素に対する抗体は、アジュヴァントの使用ができるマウスを利用すれば、容易に抗体産生を誘導できることを示した。アジュヴァント利用ができないヒト個体におきたトキシックショックの中和抗体獲得には、ヒト免疫系再構築 NOG マウスは良いモデルと考える。

E. 結論

(1) ヒト CD34+細胞はその起源に拘束されることなく、マウス内で分化する B 細胞の多くは CD5 陽性である。骨髄に CD5+細胞が少なく、ヒト骨髄ストローマ細胞の移植が IgG 産生細胞を促進することを示唆する結果を得た。今後この系改良を発展させ、ヒト免疫再構成 NOG マウスによる IgG 産生系を完成させるヒントとなった。(2) スーパー抗原の性状をもつ細菌外毒素 TSST-1 に対する抗体産生は、アジュヴァントを使用することにより亢進させることができ、ヒト免疫系再構築 NOG マウスにおいても、抗体産生を誘導できた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Chenwangen Li, Kiyoshi Ando, Yoshie Kametani, Masayuki Oki, Masao Hagihara, Kazuo Shimamura, Sonoko Habu, Shunichi Kato and Tomomitsu Hotta.,
Reconstitution of functional human B lymphocytes in NOD/SCID mice engrafted with ex vivo expanded CD34+ cord blood

cells., *Experimental Hematology.*, 30:1036-1043,2002

Yuki Saito, Yoshie Kametani, Katsuto Hozumi, Naoko amochida, Kiyoshi Ando, Mamoru Ito, Tatsuji Nomura, Yutaka Tokuda, Hiroyasu Makuuchi, Tomoo Tajima and Sonoko Habu., The in vivo development of human T cells from CD34+ cells in the murine thymic environment., *Inter. Immunology.*, 14:1-12,2002

A.Kumanogoh, K.Suzuki, E.Ch'ng, C.Watanabe, S.Marukawa, N.Takegahara, I. Ishida, T.Sato, S.Habu, K. Yoshida, W.Shi and H.Kikutani., Requirement for the Lymphorin, CD100, in the Induction of Antigen-Specific T Cells and the Maturation of Dendritic Cells., *Jour. of Immunol.*, 169: 1175-1181,2002

M.Senoo, S.Hoshino, N.Mochida, Y.Matsumura and S.Habu., Identification of Novel Protein p59, Which is Expressend at Specific Stages of Mouse Spermatogenesis BBRC., 292:992-998, 2002

Wataru Ise, Mamoru Totsuka, Yoshitaka Sogawa, Akio Ametani, Sotoshi, Hachimura, Takehito Sato, Yoshihiro Kumagai, Sonoko Habu, and Shuichi Kaminogawa ., Naive CD4+ T cells exhibit distinct expression patterns of Cytokines and cell surface molecules on their primary responses to varying Doses of antigen., *J.Immunol.*, 168, 3242-3250, 2002

(1) 学会発表

(1) 第32回日本免疫学会総会・学術集会
2002年12月4日～6日(東京)
大野慎一郎、林卓己、佐藤千春、佐藤健人、垣生園子、
胸腺細胞分化・系列決定における増殖制御の

意義

(2) 第32回日本免疫学会総会・学術集会

2002年12月4日～6日(東京)

片野いくみ、亀谷美恵、平野康之、石川大、
荻野晃一、佐々木茂、瀧孝雄、今井浩三、徳
田裕、垣生園子、

erbB-2 特異的モノクローナル抗体 (mAb)

CH401 のエピトープ解析

(3) 第32回日本免疫学会総会・学術集会

2002年12月4日～6日(東京)

穂積勝人、垣生園子

T細胞分化決定における GATA3 と Notch シグ
ナルの役割

(4) 第32回日本免疫学会総会・学術集会

2002年12月4日～6日(東京)

玉内秀一、小沢秀行、伊藤守、寺島正純、高
秀華、穂積勝人、垣生園子、渡辺直熙

Nippostrongylus Brasiliensis 感染 GATA-3 トラ
ンスジェニックマウスにおける免疫応答の検
討

(5) 第32回日本免疫学会総会・学術集会

2002年12月4日～6日(東京)

鈴木大介、妹尾誠、王莉莉、真貝洋一、垣生
園子、

TCR β 遺伝子の再構成順序 (D-J \rightarrow V-DJ) を規
定する機構解析

(6) 第32回日本免疫学会総会・学術集会

2002年12月4日～6日(東京)

天羽康之、浜田祐子、伊藤守、高秀華、穂積
勝人、寺島正純、垣生園子、増澤幹男、勝岡
憲生、玉内秀一

接触皮膚炎誘導における転写因子 GATA-3 の
役割

(7) 第32回日本免疫学会総会・学術集会

2002年12月4日～6日(東京)

小峯起、林啓太郎、関洋一、玉内秀一、穂積
勝人、垣生園子、佐竹正延、久保允人

急性骨髄生白血病原因遺伝子 AML-1 のサイト
カイン発現制御における役割

(8) 第32回日本免疫学会総会・学術集会

2002年12月4日～6日(東京)

松村啄野、平野康之、亀谷美恵、安藤潔、椎
名雅史、伊藤亮治、片野いくみ、齋藤雄紀、
伊藤守、上山義人、元吉和夫、垣生園子

ヒト免疫系再構築マウスにおける B 細胞サブ
セットの解析

(9) 第32回日本免疫学会総会・学術集会

2002年12月4日～6日(東京)

齋藤雄紀、亀谷美恵、松村啄也、伊藤守、上
山義人、平野康之、片野いくみ、伊藤亮治、
垣生園子

マウス環境下におけるヒト造血幹細胞 T 細胞
への機能的分化の解析

(10) 第32回日本免疫学会総会・学術集会

2002年12月4日～6日(東京)

亀谷美恵、片野いくみ、平野康之、垣生園子
IL-6 産生亢進による抗原特異的 IgG 産生抑制
作用—TCR-Tg マウスによる解析

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
特になし

分担研究報告書

SLE 患者血清の検討

分担研究者 関川 巖 順天堂大学 助教授

研究要旨

昨年は、SLE 発症と密接な関連があるとして報告してきた HERV clone 4-1(human endogenous retrovirus family)の存在を mRNA のレベルで報告したが、本年はさらに症例を加えて検討した。結果は、昨年同様に SEL 患者の末梢血にのみ HERV vclone-4 の発現が検出された。その発現亢進は、methylation inhibitor によって変化を受けなかった。SEL 患者と類似の症状を示す患者に CMV 感染が認められることを、PCR にて明らかにした。

A. 研究目的

SLE 患者は HIV 感染に対して抵抗性があることが知られている。その機序として、HIV 遺伝子と HERV clone-1 は高い相同性をもつため、同患者に検出される HERV clone 4-1(human endogenous retrovirus family)に対する抗体が HIV 抵抗性の要因ではないかと推測されている。そこで、HIV 無症候キャリアーの血清中の抗 HIV 抗体の代替として、抗

HERV clone-4 が高い SLE 患者の血清を使用して、将来抗 HIV 活性のある抗体が認識するエピトープを同定することを目指している。しかし、血清中の抗 HERV clone 4-1 の検出 (Western blot) に疑問がもたれてきたので、昨年度から HERV clone-4-1 陽性患者の同定は RT-PCR に切り替えその信憑性の検討を続けている。

B. 研究方法

(1) HERV clone-4 発現の mRNA レベ