

03D0868A

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に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 垣生 園子

平成16（2004）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		
黄色ぶどう球菌外毒素に対するヒト抗体産生のハイブリドーマ作製		
垣生 園子 -----	11	
生物活性抗体が認識するエピトープの解析		
瀧 孝雄 -----	15	
機能的抗体が認識するエピトープに基づいたヒト B 細胞由来抗体の作製		
亀谷 美恵 -----	19	
III.研究成果の刊行に関する一覧表-----		23
IV.研究成果の刊行物・別刷-----		24

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）=18,000,000

研究期間（西暦）=2001-2003

研究年度（西暦）=2003

主任研究者名=垣生園子（東海大学医学部）

分担研究者名=瀧孝雄（大塚製薬株式会社分子医科学研究所）, 亀谷美恵（東海大学医学部）,

研究目的=病原体やその産物、あるいは変異細胞（腫瘍細胞）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 はマウス部分であるタンパク成分の一部あるいは糖鎖を残しているため、ヒト型化抗体ではあるが完全なヒト型抗体とは言い難い。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異を起こすので、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。これら問題を克服することをめざして、本研究プロジェクトでは以下の試みをおこなっている。

(i)ヒト型抗体作製のための免疫源として、有効な生物活性が明らかな抗体のエピトープを含むものを選択・探索する。このアプローチは同時に有効なワクチン開発に繋がると考える。(ii)樹立を試みてきたヒト免疫系再構築マウスに改良を加え、ヒト B 細胞が産生する抗原特異的抗体を得、機能を保持した抗体の大量作製を目指してヒト・ハイブリドーマの作製に挑戦する。本年度は、昨年度までに同定した機能抗体のエピトープ候補の解析、および決定したエピトープを免疫して、有用な抗体を作製することを目指す。さらに、細菌が産生する外毒素をモデルとして、ヒト免疫系再構築マウスにおけるヒト B 細胞による抗体産生の亢進を計る。

研究方法=生物活性をもつ抗体が認識する生体成分上のエピトープ決定：昨年フェージランダムペプチドからスクリーニングした抗体のエピトープ候補である antigen mimicking peptide を基に、

（1）機能抗体が認識する Plasmodium falciparum の構成分子 SERA と MSA およびヒト乳ガン等に発現している Her-2 分子のペプチドをアミノ酸配列のホモロジーから探索する。抗 HER-2 マウス-ヒトキメラ抗体（CH401）の場合は、エピトープが N:140-370 近傍にあることが示唆されているので、同領域配列から 10 残基ずつ、ついで 2 残基ずつずらして 20 残基ペプチド 22

種類を合成し、CH401 と結合するペプチドをまず ELISA にて解析する。この方法で同定されたペプチドを、昨年ファージランダムペプチドから検索した CH401 と反応する 4 種類の antigen mimicking peptide とアミノ酸配列のホモロジー検索を GENENTYX を用いて行う。マラリア抗体のエピトープに関しては、SERA および MSA の配列から、昨年エピトープとして同定した antigen mimicking peptide と共通のチープを検索した。(2) 決定した分子のペプチドについて、当該抗体との結合を antigen mimicking peptide と比較する。マラリアの場合は、20 人の患者血清および健常人血清を用いて、Her-2 の場合は、CH401 抗体とおよび市販の抗 Her-2 抗体を用いて比較する。(2) ヒト B 細胞によるエピトープに対する抗体産生誘導：上記エピトープとして決定したペプチドを MAP 化し、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、経時的に採血して抗原特異的抗体化の上昇を ELISA で解析する。ヒト免疫再構築 NOG マウスは、ヒト臍帯血 CD34+細胞を分離して照射 NOG マウスに移植して作製しておく。(3) 抗体産生のヒト B 細胞のハイブリドーマ作製：最近英国のグループにより開発された効率よく抗体産生を維持するヒトミエローマ細胞株 (Karpas 707H) を用い、(2) で作製した NOG マウス由来の B 細胞と融合して、ハイブリドーマを作製する。ハイブリドーマ培養液中の抗体価を ELISA で測定する。(4) 黄色ぶどう球菌が産生する外毒素でトキシックショックを引き起こす TSST-1 に対する抗体作製：免疫源とする TSST-1 は Toxin Technology Inc.より精製 TSST-1 を購入したものをを用いた。TSST-1 は他の MAP ペプチドと同様に FAC 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、経時的に採血して抗体の力価を ELISA で測定した。

結果と考察= (A) 研究成果：(1) Her-2 分子のうち、エピトープを含むと推測されている N:143-370 から重複合成した 20 アミノ酸残基 22 種類のうち、アポトーシス誘導抗体 (CH401) と特異的に反応するペプチドは N:167-175(ILWKDIFHK) であることが、ELISA によるスクリーニングで明らかとなった。昨年度ランダムペプチドライブラリーを用いて同定した 4 種類の antigen mimicking peptide との相同性を解析したところ、1 クローンが N:167-175 中の N:173(F)/174(H)とアミノ酸が一致した。これは、N:167-175 が CH401 のエピトープであることを支持する。(2) 熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 成分である SERA および MSA が昨年度同定した antigen mimicking peptide と高いホモロジーを示したのは、SERA N:27-41, MSA2 N:48-62 と N:85-111 ペプチドであった。これらは、患者血清と特異的に反応することが、確認された。(3) 同定した CH401 抗体のエピトープはマウスおよびヒト MHC class II のアンカリングモチーフと相同性を示した。(4) エピトープに特異的完全型ヒト抗体を作製するため、ヒト免疫系再構築 NOG マウスに上記で決定された MAP 化ペプチドを免疫し、マウス血清内に抗原特異的ヒト IgM 抗体の産生を検出した。Her-2 ペプチドに関しては、ワクチン使用を視野に入れ、ヒト免疫系再構築マウスに Her-2 発現腫瘍細胞を移植すると共に同ペプチドで免疫したところ、殆どが IgM であったが、血清中に 10 倍以上の高い抗体価を認めた (5) これら抗体産生ヒト B 細胞は、最近開発されたヒトミエローマ細胞株と融合して、ハイブリドーマを樹立した。(6) 免疫したヒト免疫系再構築 NOG マウスの抗原特異的ヒト抗体産生能は、通常マウスに免疫した際のマウス抗体に比し力価が低い。この点を解消するためおよび感染発症抑制抗体を得るため、スーパー抗原の性状を有するぶどう球菌外毒素 TSST-1 で免疫した。スーパー抗原が MHC 拘束性無く多数の T 細胞クローンを強く活性化できるためである。その結果、免疫した NOG

マウスの血清中抗体価は亢進したが、アイソタイプはやはり IgM が主体であった。

(B) 考察：(1) 生物活性をもつ抗体として無症候マラリア患者の血清あるいはアポトーシス活性をもつ抗 Her-2 抗体を用いて、ファージペプチドライブラリーからスクリーニングした antigen mimicking peptide は、実際熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の構成成分である SERA および MSA あるいは Her-2 の特定ペプチドと共通のモチーフをもつことを示し、同手段は目的とする抗体のエピトープを決定する有用な手段であると考えられる。(2) ここで同定されたエピトープは免疫されたヒト免疫系再構築マウス内でヒト B 細胞に特異抗体産生を誘導した。この抗体がエピトープ決定に使用された抗体と同様な機能を持つことが期待されるが、産生された抗体は殆どが IgM であるためか、抗体価が低いためか、現在までのところ、マラリアおよび Her-2 発現細胞に関して、各々に中和活性および細胞死誘導が検出されていない。本年度の研究でヒト B 細胞のハイブリドーマが樹立され、力価の高い単クローン抗体獲得が予測されるので、後者の問題は解消されるであろう。(3) ぶどう球菌の外毒素 TSST-1 は MHC 拘束性なく T-B 細胞の相互作用をブリッジするが、その場合でも、現存のヒト免疫系再構築 NOG マウスでは、IgM 抗体が主体であった。昨年の成果で示したように、B1 細胞の優位な分化増殖が大きな要因かと考えられる。目的とする抗原特異的で有用な機能をもつ IgG 抗体を得るためには、B1 細胞の分化を抑制し B2 細胞の優位なマウスを作製することが、課題として残った。

結論=生物活性 (マラリア発症抑制、あるいはアポトーシス誘導能) をもつ抗体を基に、ファージランダムペプチドライブラリーからスクリーニングした antigen-mimicking peptide は、抗体が認識するタンパク由来のペプチド (マラリア: SERA 27-41, MSA2 48-62 と N85-111, Her-2: 167-175) と高いホモロジーを持ち、エピトープ探索の有用な手段であることを示した。これらペプチドは、ヒト免疫系再構築 NOG マウスに免疫すると、ヒト B 細胞は抗原特異的 IgM 抗体を産生した。さらにこれら B 細胞は、ヒトミエローマ細胞株 (Karpas 707H) と融合し、抗体産生を持続した。以上の方法により、ヒト B 細胞産生の抗原特異的 IgM 抗体が単クローンレベルで量産できることが判明した。

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

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中には、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機能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。本年度は、上記のような機能抗体として過去2年に検索してきたマラリア抗体に加えて、アポトーシス活性を持つ抗体を解析し、本プロジェクト研究の方向性と有用性の確認を進め、以下の成果を得た。（1）昨年度ファージペプチドライブラリーのスクリーニングにより、生物活性を有する抗体のエピトープ候補として同定した antigen-mimicking peptide を基に、配列のホモロジーと抗体結合能を指標に、当該抗体のエピトープを解析した。その結果、熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* の表面抗原分子の SERA(N: 27-41)と MSA2(48-62, および 95-111)ペプチドおよび Her-2 分子のペプチド(N:167-175)は、すでに同定した antigen mimicking peptide とホモロジーが高く、機能抗体が認識する生体分子上のエピトープであることが、判明した。（2）決定されたペプチド各々を MAP 化してヒト免疫系再構築 NOG マウスにアジュヴァントと共に免疫し、抗原特異的 IgM 抗体を得た。免疫源として使用した MAP 化ペプチドのうち、Her-2 ペプチドはワクチンとして有用であることを、Her-2 陽性腫瘍細胞との併用免疫で示した。（3）免疫された NOG マウス由来のヒト B 細胞を最近開発されたヒトミエローマ細胞株 (Karpas707H) と融合して、ヒト gM 抗体産生のハイブリドーマ樹立・持続に成功した。（4）黄色ぶどう球菌産生の外毒素でトキシックショックを引き起こす TSST-1 をアジュヴァントと共に上記ヒト免疫系再構築 NOG マウスに免疫し、IgM 抗体を得た。免疫 NOG マウス内のヒトB細胞を（2）で述べた方法にヒト/ヒトハイブリドーマを作製した。現在力価の高い単クローン抗体を選択中である

研究分担者 瀧 孝雄 大塚製薬株式会社  
医科学研究所所長  
亀谷美恵 東海大学医学部  
助手

#### A. 研究目的

病原体やその産物、あるいは変異細胞（腫瘍細胞）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 はマウス部分であるタンパク成分の一部あるいは糖鎖を残しているため、ヒト型化抗体ではあるが完全なヒト型抗体とは言い難い。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異を起こすので、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。これら問題を克服することをめざして、本研究プロジェクトでは以下の試みをおこなう。

(i)ヒト型抗体作製のための免疫源として、有効な生物活性が明らかな抗体のエピトープを含むものを選択・探索する。このアプローチは同時に有効なワクチン開発に繋がると考える。(ii)樹立を試みてきたヒト免疫系再構築マウスに改良を加え、ヒト B 細胞が産生する抗原特異的抗体を得、機能を保持した抗体の大量作製を目指してヒト・ハイブリドーマの作製に挑戦する。本年度は、主として(ii)に焦点を絞る。

#### B. 研究方法

(1) マラリア原虫 (Plasmodium falciparum) に対する生物活性をもつ抗体或いは抗 Her-2 キメラ抗体にエピトープに対す

るヒト B 細胞由来抗体の産生誘導：各エピトープの MAP 化ペプチドをアジュヴァントと共に、ヒト免疫系再構築 NOG マウス（実験ごとにヒト CD34+臍帯血移植にて作製）に免疫し、経時的に血清を用いて各ペプチド特異的抗体産生状態を ELISA にて検索する。

(2) Her-2 抗体産生におけるエピトープのワクチン効果の検討：Her-2 発現腫瘍をヒト免疫系再構築 NOG マウスに移植後 Her-2 peptide で免疫し、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（昨年度までの研究でマウスで確認したので、本年度は、ヒト免疫系再構築 NOG マウスで検討する）。

(3) ヒト・ヒト B 細胞ハイブリドーマの作製：従来、樹立したヒト B 細胞ハイブリドーマは抗体産生能の喪失や形質変化だ問題であった。ヒトミエローマ細胞株 Karpas707H は活性化ヒト B 細胞と細胞融合することが最近報告されたので、同細胞株の供与を受けて、

(1) で得られた抗体産生ヒト B 細胞によるハイブリドーマの作製を試みる。

(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：購入した精製 TSST-1 をヒト免疫系再構築 NOG マウスにアジュヴァントと共に免疫し、経時的に抗 TSST-1 抗体価を ELISA で検討する。また、免疫した 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た後 Karpas707H と細胞融合し、ヒト B 細胞由来の抗 TSST-1 抗体を作製する。

(倫理面への配慮)

目的とする抗体価の高い患者および妊婦には、本研究の重要性と内容を説明すると同時に、大学の倫理委員会の許可のもとに作成された書類を示して同意を得た上で、末梢血或いは臍帯血を採取する。また、採血は、附属病院の医師にて行なわれるので、危険は伴わない。

### C. 研究成果

Her-2 分子のうち、エピトープを含むと推測されている N:143-370 から重複合成した 20 アミノ酸残基 22 種類のうち、アポトーシス誘導抗体 (CH401) と特異的に反応するペプチドは N:167-175(ILWKDIFHK) であることが、ELISA によるスクリーニングで明らかとなった。昨年度ランダムペプチドライブラリーを用いて同定した 4 種類の antigen mimicking peptide との相同性を解析したところ、1 クローンが N:167-175 中の N:173(F)/174(H) とアミノ酸が一致した。これは、N:167-175 が CH401 のエピトープであることを支持する。(2) 熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 成分である SERA および MSA が昨年度同定した antigen mimicking peptide と高いホモロジーが見られたのは、SERA N:27-41, MSA2 N:48-62 と N:85-111 ペプチドであった。これらは、患者血清と特異的に反応することが、確認された。(3) 同定した CH401 抗体のエピトープはマウスおよびヒト MHC class II のアンカリングモチーフと相同性を示した。すなわち、マウスの H-2Ed のモチーフ、第 4/6/9 ポジション (P4/P6/P9) のリジン(K)/イソロイシン(I)/リジン (K)、と完全に一致した。また、ヒト MHC class II HLA-DR のアンカリングモチーフ、P1/P6 は I と I で高い相同性を示した。さらに、P1-9 までのアミノ酸配列については、ARB スコアより算出された Alu algorithm valule が各々 HLA-DR1=9.87, DR4=6.89, DR7=24.42 であり、75% binding の基準値/157, 2.617, 9.106 より高い値をしめした。従って、当該エピトープはマウスおよびヒト MHC class II 分子に高い結合能を有することが示唆された。

### D. 考察

(1) 本年度は、臨床応用に向けた完全ヒト

型 IgM 抗体を抗原特異的に作製するモデルマウスを利用して、in vivo プライムされたヒト B 細胞から抗体を産生できるハイブリドーマ系を確立した。従来、良いヒトミエローマ細胞株がなく、抗体産生のヒト B 細胞の多くはマウスミエローマ細胞株と融合していたが、培養中に抗体産生能が低下あるいは欠損することが多く、ヒト単クローン抗体の量産は困難であった。2001 年にケンブリッジのグループがヒトミエローマ B 細胞株 Karpas707H を開発し、EB および HIV ウイルス感染患者の B 細胞と融合すると、前者に対する IgG 産生のハイブリドーマ樹立に成功した。本年度我々は、同 Karpas707H を用い、目的とする抗原をヒト免疫系再構築 NOG マウスに免疫して得たヒト B 細胞から、世界で最初のハイブリドーマの作製と抗原特異的ヒト抗体作製に成功した。今回のプロジェクトで IgG 抗体が得られなかった最も大きな理由は、現在樹立に成功しているヒト臍帯血移植 NOG マウスでは、脾臓に分化増殖しているヒト B 細胞の多くが IgM 産生の B1 細胞であるため (昨年報告) と考えらる。上記抗体産生とハイブリドーマ樹立の一方で、ヒト B 細胞による IgG 産生誘導系を試みているが、顕著な亢進がみられる系は、この機関中に得られなかった。

(2) 免疫源として用いた無症候キャリアー抗体のエピトープおよび抗 Her-2 抗体エピトープは、MAP 化後免疫してもアジュヴァントと併用したにもかかわらず、十分に高い抗体は得られなかった。しかし、Her-2 の場合にみられるように、非エピトープの部分を含んだ全 Her-2 分子を発現腫瘍と併用した免疫によって、エピトープに対する高い抗体価を誘導できることから、MAP 化ペプチドにキャリアを結合した免疫源による検討が必要かと思われた。

(3) 抗 Her-2 のエピトープを含む MAP 化ペプチドの免疫は、Her-2 発現腫瘍移植個体



の MAP 化ペプチドに対する抗体価を亢進させたことは、エピトープを含む MAP 化ペプチドは、ワクチン効果を持つことが示唆され、今後、ワクチン開発を考える上で、有用な情報となった。

(4) 細菌外毒素である TSST-1 は、単独投与ではアナジーを誘導することが知られている。しかし、アジュヴァントと共に免疫すると、ヒト免疫系再構築 NOG マウスでサイトカインストームを起こしてアナジーを誘導することは無かった。また、IgM であるが抗体産生が誘導され、生物活性があれば有用な治療抗体となる可能性が示唆された。

#### E. 結論

本年度は、臨床応用に向けた完全ヒト型 IgM 抗体を抗原特異的に作製するモデルマウスを利用して、in vivo でプライムされたヒト B 細胞から抗体を産生できるハイブリドーマ系を世界で初めて確立した。

(1) 生物活性のある抗体が認識するエピトープを決定し、それを含む MAP 化ペプチドを、ヒト臍帯血 CD34+細胞を移植して作製したヒト免疫系再構築 NOG マウスに免疫して、抗原特異的ヒト IgM 抗体産生誘導に成功した。用いた抗原は、昨年までの研究により熱帯熱マラリアの無症候性キャリアから得た血清を基に決定したエピトープ、および Her-2 発現細胞をアポトーシスに誘導する抗体のエピトープを含む MAP 化ペプチドである。後者については、この MAP 化ペプチドはワクチン効果を誘導することも示した。また、ぶどう球菌産生の外毒素 TSST-1 については、ペプチドでなくタンパク質を用いてヒト免疫系再構築マウスに特異抗体産生を誘導した。

(2) 上記 3 種類の抗原に対する抗体産生のヒト B 細胞は、最近開発されたヒトミエロマ細胞株を融合を試み、IgM 産生のヒトハイブリドーマを樹立した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1 : Hozumi K, Negishi N, Suzuki D, Abe N, Sotomaru Y, Tamaoki N, Carolina M, David Ish-Horowicz, Habu S., Delta-like-1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo.
- 2 : Tamauchi H, Terashima M, Ito M, Maruyama H, Ikewaki N, Inoue M, Gao X, Hozumi K, Habu S., Evidence of GATA-3-dependent Th2 commitment during the in vivo immune response *Int Immunol.* 2004 Jan; 16(1): 179-87.
- 3 : Matsumura T, Kametani Y, Ando K, Hirano Y, Katano I, Ito R, Shiina M, Tsukamoto H, Saito Y, Tokuda Y, Kato S, Ito M, Motoyoshi K, Habu S., Functional CD5+ B cells develop predominantly in the spleen of NOD/SCID/gammac(null)(NOG) mice transplanted either with human umbilical cord blood, bone marrow, or mobilized peripheral blood CD34+ cells. *Exp Hematol.* 2003 Sep;31(9):789-97.
- 4 : Komine O, Hayashi K, Natsume W, Watanabe T, Seki Y, Seki N, Yagi R, Sukzuki W, Tamauchi H, Hozumi K, Habu S, Kubo M, Satake M., The Runx1 transcription factor inhibits the differentiation of naive CD4+ T cells into the Th2 lineage by repressing GATA3 expression. *J Exp Med.* 2003 Jul 7;198(1): 51-61. Epub 2003 Jun 30.
- 5 : Watanabe N, Tamauchi H, Ozawa H, Ito M, Ovary Z, Habu S., Th2 immune responses in GATA-3-transgenic mice infected with *Heligmosomoides polygyrus*. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003 Jun;131 Suppl 1:11-4.
- 6 : Hozumi K, Abe N, Chiba S, Hirai H, Habu S., Active form of Notch members can enforce T lymphopoiesis onlymphoid progenitors in the monolayer culture specific for B cell development.

J Immunol. 2003;170(10):4973-9.

## 2. 学会発表

### 1. Kyoto T Cell Conference

2003年6月27日～28日（京都府）

鈴木大介、王莉莉、妹尾誠、垣生園子 TCR  
β 遺伝子の再構成順序と対立遺伝子排除

### 1. 第7回基盤的癌免疫研究総会

2003年7月17日～18日（東京都）

亀谷美恵、片野いくみ、斎藤雄紀、佐々木  
茂、今井浩三、徳田裕、垣生園子  
抗 erbB-2 抗体 CH401 のエピトープペプチ  
ドを用いた予防的ワクチンモデル

### 2. 第53回日本アレルギー学会総会

2003年10月23日～25日（岐阜県）

田下浩之、山下直美、石田博文、長瀬洋之、  
中野純一、玉内秀一、垣生園子、大田健  
気道過敏性発現における Th2 細胞の役割の  
解析—GATA-3 と OVATCR ダブルトラン  
スジェニックマウスでの検討

### 3. 第33回日本免疫学会総会・学術集会

2003年12月8日～10日（福岡）

阿部奈津美、穂積勝人、平井久丸、千葉滋、  
垣生園子 T細胞初期分化誘導における  
Notch リガンド D11-4 の役割

### 5. 第33回日本免疫学会総会・学術集会

2003年12月8日～10日（福岡）

鈴木大介、王莉莉、妹尾誠、垣生園子 TCR  
β 遺伝子の再構成順序（D-J→V-DJ）と対  
立遺伝子排除

### 1. 第33回日本免疫学会総会・学術集会 2003

年12月8日～10日（福岡）

佐藤健人、大野慎一郎、林卓巳、佐藤千春、  
河府和義、佐竹正延、垣生園子 CD/4CD8  
系列決定における AML/Runx の役割

### 2. 第33回日本免疫学会総会・学術集会

2003年12月8日～10日（福岡）

河府和義、内納隆治、渡邊利雄、佐藤健人、

垣生園子、佐竹正延 センス・ミスセン  
スに過剰発現させた Runx3 転写因子による  
胸腺 CD8+細胞の分化への影響

### 8. 第33回日本免疫学会総会・学術集会

2003年12月8日～10日（福岡）

穂積勝人、根岸（餅田）尚子、玉置憲一、  
垣生園子、OWEN Michael D11-1 誘導  
遺伝子欠損マウスにおけるリンパ球分化の  
解析

### 9. 第33回日本免疫学会総会・学術集会

2003年12月8日～10日（福岡）

亀谷美恵、畑幸恵、片野いくみ、遠山加奈  
恵、垣生園子 TSST-1 を用いて誘導した  
アナジー T細胞の IL-2 プロモーター領域に  
おけるヒストンアセチル化の解析

### 10. 第33回日本免疫学会総会・学術集会

2003年12月8日～10日（福岡）

玉内秀一、天羽康之、伊藤守、寺島正純、  
浜田祐子、増澤幹男、勝岡憲生、  
GATA-遺伝子誘導トランスジェニックマウ  
スを用いた接触皮膚炎モデルにおける Th2  
型免疫反応の関与と治療

### 11. 第33回日本免疫学会総会・学術集会

2003年12月8日～10日（福岡）

伊藤亮治、亀谷美恵、椎名雅史、片野いく  
み、垣生園子、伊藤守 ヒト CD34+細胞  
移植 NOD/scid γ null マウスにおける濾  
胞樹状細胞の解析

### 12. 第33回日本免疫学会総会・学術集会

2003年12月8日～10日（福岡）

武井英理子、亀谷美恵、玉内秀一、石川雅  
一、西島正博、垣生園子 細菌性スーパ  
ー抗原 TSST-1 を用いた妊娠末期マウス子  
宮内胎仔死亡モデルの確立

### 13. 第33回日本免疫学会総会・学術集会

2003年12月8日～10日（福岡）

片野いくみ、亀谷美恵、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 抗 c-erbB-2 抗体 CH401 のエピ

トープペプチドによるワクチン効果

14. 第26回日本分子生物学会

2003年12月10日～13日（神戸市）

鈴木大介、妹尾誠、真貝洋一、垣生園子

T細胞抗原受容体 $\beta$ （TCR $\beta$ ）遺伝子における再構成順序および対立遺伝子排除の機構解析

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

## 分担研究報告書

### 黄色ぶどう球菌外毒素に対するヒト抗体産生のハイブリドーマ作製

分担研究者 垣生園子 東海大学医学部 教授

#### 研究要旨

目的の項で述べるような理由から、トキシックショックを引き起こすぶどう球菌産生の外毒素である TSST-1 タンパクをヒト免疫系再構築 NOG マウスにアジュヴァントと共に免疫した。TSST-1 は強いスーパー抗原性を有するため、MHC の拘束性無く多くの T 細胞を活性化し、同時に B 細胞との相互作用も密になることから、IgG 抗体の産生を期待したが、優位に上昇した抗原特異的抗体は殆ど IgM であった。しかし、抗体価はマラリア原虫成分や Her-2 分子の MAP 化ペプチドによる免疫の場合より高かった。これら免疫した NOG マウスの B 細胞を Karpas707H と融合してヒト・ヒトハイブリドーマを樹立し、TSST-1 特異的 IgM 抗体を培養液中に検出した。現在、力価の高い単クローン抗体を選択中である。

#### A. 研究目的

これまでの研究成果から、ヒト免疫系再構築 NOG マウスによる抗体産生は、MAP 化ペプチドによる免疫では総じて抗体価上昇が低い上、抗原特異的抗体の殆どが IgM 抗体である傾向にある。この点を改善することを目指して、次の理由からトキシックショックを引き起こすぶどう球菌産生の外毒素 TSST-1 に対するヒト B 細胞由来の抗体産生を試みた。

(1) TSST-1 はスーパー抗原である。スーパー抗原は、TCR と MHC class II に結合することによって、MHC の拘束性なく T-B 細胞相互作用を導入できるので、T 細胞ヘルプを受けた B 細胞は IgG 抗体を産生可能となり得る。また、高い抗体産生能が得られる。(2)

TSST-1 分子はタンパクレベルで商品化されて

いる。それらタンパク分子を利用して免疫することによって、ペプチドの場合より力価の高い抗体が得られる可能性がある。また、黄色ぶどう球菌は院内感染に猛威を振るうことがあるので、そのヒト型抗体は治療面からも有用である。

#### B. 研究方法

TSST-1 は Toxin Technology Inc.より購入したものをを用いた。

CD34 陽性ヒト臍帯血を移植して作製したヒト免疫系再構築 NOG マウスに、FCA をアジュバントとして TSST-1 を投与し、2週間ごとに FIA をアジュバントとした追加免疫を行っ

た。これら NOG マウスについて経時的に採血を行い、力価の ELISA によるチェックを行った。6 回の免疫の後、力価の高いマウスについて最終免疫の 4 日後に脾臓を摘出し、B 細胞を EBV トランスフォーメーション後あるいは LPS で刺激後 Karpas707H との細胞融合を行った。これらの細胞のうち抗原特異的抗体産生細胞を ELISA によりスクリーニングした。

(倫理面への配慮)

目的とする抗体価の高い患者および妊婦には、本研究の重要性と内容を説明すると同時に、大学の倫理委員会の許可のもとに作成された書類を示して同意を得た上で、末梢血或いは臍帯血を採取する。また、採血は、附属病院の医師にて行なわれるので、危険は伴わない。

#### C. 研究成果

免疫した NOG マウス血清中には、ヒト抗 TSST-1 抗体が検出された。その力価はマラリア原虫や Her-2 分子の MAP 化ペプチド免疫の場合より約 10 倍高かったが、通常マウスを免疫して得られるマウス抗 TSST-1 抗体の 1/500 以下であった。また、大部分が IgM であることが ELISA により示された。

免疫 NOG マウスの脾臓 B 細胞は、Karpas707H との細胞融合によりハイブリドーマを形成し、培養上清中に血清中以上の力価を示す抗原特異的 IgM 抗体を産生している。

#### D. 考察

TSST-1 は MHC の拘束性なく多くの T 細胞を活性化し、また B 細胞との相互作用を密にするにもかかわらず、TSST-1 免疫による NOG マウスによる抗原特異的 IgG 産生は殆ど検出限界以下であった。その原因の 1 つとして、ヒト T 細胞の絶対数が少ないことが挙げられよう。脾臓におけるヒトリンパ球中の T・B 細胞の割合はかなり生理的条件に近いが、NOG マウス脾臓には non-T,B 細胞の数が多く、スーパー抗原をもってしても T-B cell

interaction の頻度は低い可能性がある。2 つ目の理由は、やはり分化したヒト B 細胞が B1 細胞が優位を占めるためであろう。B1 細胞は IgM のみを産生するが、その抗原への親和性については不明である。IgG 抗体にこだわらずに、産生された IgM 抗体の機能を解析することが、今後の展開に重要であろう。

#### E. 結論

MAP 化ペプチドに変わってタンパク分子を免疫したが、ヒト免疫系再構築マウスが産生する抗原特異的抗体は、殆ど IgM であった。免疫に使用したタンパク分子は黄色ぶどう球菌産生の外毒素でスーパー抗原の性状をもつので、MHC 拘束性を越えて多くの T 細胞活性化が期待されたが、抗原特異的抗体価は MAP ペプチドの場合より亢進したが、抗体のアイソタイプは IgM のままであった。これら抗体産生の B 細胞はヒト・ヒトハイブリドーマを形成し、比較的高い力価の IgM を産生している。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1 : Hozumi K, Negishi N, Suzuki D, Abe N, Sotomaru Y, Tamaoki N, Carolina M, David Ish-Horowicz, Habu S., Delta-like-1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo.
- 2 : Tamauchi H, Terashima M, Ito M, Maruyama H, Ikewaki N, Inoue M, Gao X, Hozumi K, Habu S., Evidence of GATA-3-dependent Th2 commitment during the in vivo immune response *Int Immunol.* 2004 Jan; 16(1): 179-87.
- 3 : Matsumura T, Kametani Y, Ando K, Hirano Y, Katano I, Ito R, Shiina M, Tsukamoto H, Saito Y, Tokuda Y, Kato S, Ito M, Motoyoshi K, Habu S., Functional CD5+ B cells develop predominantly in the spleen of NOD/SCID/gammac(null)(NOG) mice transplanted either with human umbilical

cord blood, bone marrow, or mobilized peripheral blood CD34+ cells. *Exp Hematol.* 2003 Sep;31(9):789-97.

4 : Komine O, Hayashi K, Natsume W, Watanabe T, Seki Y, Seki N, Yagi R, Sukzuki W, Tamauchi H, Hozumi K, Habu S, Kubo M, Satake M., The Runx1 transcription factor inhibits the differentiation of naive CD4+ T cells into the Th2 lineage by repressing GATA3 expression. *J Exp Med.* 2003 Jul 7;198(1): 51-61. Epub 2003 Jun 30.

5 : Watanabe N, Tamauchi H, Ozawa H, Ito M, Ovary Z, Habu S., Th2 immune responses in GATA-3-transgenic mice infected with *Heligmosomoides polygyrus*. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003 Jun;131 Suppl 1:11-4.

6 : Hozumi K, Abe N, Chiba S, Hirai H, Habu S., Active form of Notch members can enforce T lymphopoiesis onlymphoid progenitors in the monolayer culture specific for B cell development. *J Immunol.* 2003;170(10):4973-9.

## 2. 学会発表

### 1. Kyoto T Cell Conference

2003年6月27日～28日（京都府）  
鈴木大介、王莉莉、妹尾誠、垣生園子 TCR  $\beta$  遺伝子の再構成順序と対立遺伝子排除

### 2. 第7回基盤的癌免疫研究総会

2003年7月17日～18日（東京都）  
亀谷美恵、片野いくみ、斎藤雄紀、佐々木茂、今井浩三、徳田裕、垣生園子  
抗 erbB-2 抗体 CH401 のエピトープペプチドを用いた予防的ワクチンモデル

### 3. 第53回日本アレルギー学会総会

2003年10月23日～25日（岐阜県）  
田下浩之、山下直美、石田博文、長瀬洋之、中野純一、玉内秀一、垣生園子、大田健  
気道過敏性発現における Th2 細胞の役割の

解析—GATA-3 と OVATCR ダブルトランスジェニックマウスでの検討

### 4. 第33回日本免疫学会総会・学術集会

2003年12月8日～10日（福岡）  
阿部奈津美、穂積勝人、平井久丸、千葉滋、垣生園子 T細胞初期分化誘導における Notch リガンド D11-4 の役割

### 5. 第33回日本免疫学会総会・学術集会

2003年12月8日～10日（福岡）  
鈴木大介、王莉莉、妹尾誠、垣生園子 TCR  $\beta$  遺伝子の再構成順序（D-J $\rightarrow$ V-DJ）と対立遺伝子排除

### 6. 第33回日本免疫学会総会・学術集会

2003年12月8日～10日（福岡）  
佐藤健人、大野慎一郎、林卓巳、佐藤千春、河府和義、佐竹正延、垣生園子 CD/4CD8 系列決定における AML/Runx の役割

### 7. 第33回日本免疫学会総会・学術集会

2003年12月8日～10日（福岡）  
河府和義、内納隆治、渡邊利雄、佐藤健人、垣生園子、佐竹正延 センス・ミスセンスに過剰発現させた Runx3 転写因子による胸腺 CD8+細胞の分化への影響

### 8. 第33回日本免疫学会総会・学術集会

2003年12月8日～10日（福岡）  
穂積勝人、根岸（餅田）尚子、玉置憲一、垣生園子、OWEN Michael D11-1 誘導遺伝子欠損マウスにおけるリンパ球分化の解析

### 9. 第33回日本免疫学会総会・学術集会

2003年12月8日～10日（福岡）  
亀谷美恵、畑幸恵、片野いくみ、遠山加奈恵、垣生園子 TSST-1 を用いて誘導したアナジー T細胞の IL-2 プロモーター領域におけるヒストンアセチル化の解析

### 10. 第33回日本免疫学会総会・学術集会

2003年12月8日～10日（福岡）  
玉内秀一、天羽康之、伊藤守、寺島正純、浜田祐子、増澤幹男、勝岡憲生、

GATA-遺伝子誘導トランスジェニックマウスを用いた接触皮膚炎モデルにおける Th2 型免疫反応の関与と治療

11. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会

2003 年 12 月 8 日～10 日（福岡）

伊藤亮治、亀谷美恵、椎名雅史、片野いくみ、垣生園子、伊藤守 ヒト CD34+細胞移植 NOD/scid  $\gamma$  null マウスにおける濾胞樹状細胞の解析

12. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会

2003 年 12 月 8 日～10 日（福岡）

武井英理子、亀谷美恵、玉内秀一、石川雅一、西島正博、垣生園子 細菌性スーパー抗原 TSST-1 を用いた妊娠末期マウス子宮内胎仔死亡モデルの確立

13. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会

2003 年 12 月 8 日～10 日（福岡）

片野いくみ、亀谷美恵、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 抗 c-erbB-2 抗体 CH401 のエピソードペプチドによるワクチン効果

14. 第 26 回日本分子生物学会

2003 年 12 月 10 日～13 日（神戸市）

鈴木大介、妹尾誠、真貝洋一、垣生園子 T細胞抗原受容体  $\beta$  (TCR  $\beta$ ) 遺伝子における再構成順序および対立遺伝子排除の機構解析

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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

昨年度までの研究により、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エピトープ候補として同定した malaria antigen -mimicking peptide 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。また、生物活性としてアポトーシス誘導能をもつ抗ヒト erbB-2 (Her-2)抗体（CH401）のエピトープを、ファージペプチドライブラリーから同定した。＜本年度は、機能抗体のエピトープとして熱帯マラリア原虫（plasmodium falciparum）の成分（SERA, MSA2）のペプチドおよび Her-2 のペプチドを、antigen-mimicking peptide をリファレンスとして、同定した。その結果、N:140-370 近傍にあることが示唆されている CH401 マウス・キメラ抗体のエピトープは、同領域の 20 残基ペプチドを合成してエピトープ決定をおこない、N:167-175 であることが、ELISA によるスクリーニングで明らかとなった。一方 Plasmodium falciparum では、SERA2 N:7-41, MSA2 N:48-62 および MSA2 N:95-111 が昨年同定した antigen-mimicking peptide と高いホモロジーを示し、機能抗体のエピトープであることが明らかとなった。これらの結果は、ファージペプチドライブラリーを利用して同定した antigen mimicking peptide は、生物活性をもつ抗体のエピトープ決定に有用な手段とありうることを明らかにした。

研究協力者 安藤 潔 東海大学医学部  
講師

A. 研究目的

病原体の種類によっては頻繁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、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 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、機能抗体が認



識するタンパク分子のエピトープを antigen mimicking peptide と共通のモチーフを探索することによって、決定することをめざす。具体的には、無症候の熱帯熱マラリア患者血清およびアポトシス活性をもつ抗 Her-2 抗体が認識するエピトープを、マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 成分である SERA, MSA と Her-2 分子から、昨年同定した antigen-mimicking peptide と比較しながら同定する。

## B. 研究方法

(1) CH401 マウス-ヒトキメラ抗体のエピトープは N:140-370 近傍にあることが示唆されているので、同領域配列から 10 残基ずつ、ついで 2 残基ずつずらして 20 残基ペプチド 22 種類を合成し、CH401 と結合するペプチドを ELISA にて解析した。この方法で同定されたペプチドを、昨年フェージランダムペプチドから検索した CH401 と反応する 4 種類の antigen mimicking peptide とアミノ酸配列のホモロジー検索を GENENTYX を用いて行った。(2) マラリア抗体のエピトープに関しては、SERA および MSA の配列から、昨年エピトープとして同定した antigen mimicking peptide と共通のモチーフを検索した。ついで、候補ペプチドを 20 人の患者血清および健康人血清を用いて、反応性の比較を ELISA でおこなった。

(倫理面への配慮)

目的とする抗体価の高い患者および妊婦には、本研究の重要性と内容を説明すると同時に、大学の倫理委員会の許可のもとに作成された書類を示して同意を得た上で、末梢血或いは臍帯血を採取する。また、採血は、附属病院の医師にて行なわれるので、危険は伴わない。

## C. 研究成果

(1) Her-2 分子のうち、システインリッチ

ドメイン-1 を含む N:143-370 から重複合成した 20 アミノ酸残基 22 種類のうち、アポトシス誘導抗体 (CH401) と特異的に反応するペプチドは N:163-183 領域配列に認められた。さらなる詳細な解析を、同領域配列の前後 2 残基ずつずらした 20 残基の合成 MAP ペプチドを作製して進めた。その結果、CH401 の抗原エピトープ配列は N:167-175(ILWKDIFHK)であることが、ELISA によるスクリーニングで明らかとなった。昨年度ランダムペプチドライブラリーを用いて同定した 4 種類の antigen mimicking peptide との相同性を解析したところ、1 クローンが N:167-175 中の N:173(F)/174(H)とアミノ酸が一致した。これは、N:167-175 が CH401 のエピトープであることを支持する結果である。(2) 本研究が目指す抗体を産生するためには、同定したエピトープは MHC class II に提示される必要がある。そこで、今回同定したエピトープ領域と MHC class II アンカリングモチーフとの相同性を検討した。その結果、マウスの H-2Ed のモチーフ、第 4/6/9 ポジション (P4/P6/P9) のリジン(K)/イソロイシン(I)/リジン (K)、と完全に一致した。また、ヒト MHC class II HLA-DR のアンカリングモチーフ、P1/P6 は I と I で高い相同性を示した。さらに、P1-9 までのアミノ酸配列については、ARB スコアより算出された Alu algorithm valule が各々 HLA-DR1=9.87, DR4=6.89, DR7=24.42 であり、75% binding の基準値/157, 2.617, 9.106 より高い値をしめした。従って、当該エピトープはマウスおよびヒト MHC class II 分子に高い結合能を有することが示唆された。(3) 熱帯熱マラリア原虫の成分に関しては、昨年同定した antigen mimicking peptide と共通のモチーフが、SERA N:27-41, MSA2 N:48-62 と N:95-111 に見いだされた。これらは、患者血清と特異的に反応することが、確認された。

#### D. 考察

ファージペプチドライブラリーからエピトープ候補として同定した antigen-mimicking peptide を基盤に、機能と配列から抗体認識分子のタンパクのエピトープを同定した。マラリアの場合は患者血清から antigen-mimicking peptide を基に、マラリア原虫表面抗原の配列との相同性から決定した。予測されていた約 200 アミノ酸残基から絞り込んでエピトープとなるペプチドを同定し、それらはファージペプチドライブラリーから同定した antigen mimicking peptide と相同性をもっていた。これらの結果は、今後生物活性をもつ抗体に対するエピトープ探索に貴重な情報を提供した。同時に、生物活性を持つ抗体作製にも有用な手段と考える。

#### E. 結論

アポトーシス活性をもつ抗体、およびマラリア発症を抑制する抗体が認識するエピトープを、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 との相同性を基盤にスクリーニングすることにより、決定した。これらペプチドはマラリア患者血清と特異性を持って反応した。また、同エピトープは、MHC class II との結合部位を有していた。これらの結果は、同エピトープは MHC class II による抗原提示が可能であり、抗体産生亢進のペプチド抗原およびワクチンとして有用であることを示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1: Kondo M, Asai T, Katanasaka Y, Sadzuka Y, Tsukada H, Ogino K, Taki T, Baba K And Oku N.  
Anti-neovasucular therapy by liposomal drug targeted to membrane tyre-1 matrix metalloproteinase.

Int. J. Cancer, 108, 301-306 (2004)

##### 2. 学会発表

###### 1. 第 5 回生命化学研究会シンポジウム

2003 年 1 月 10 日 京都大学化学研究所  
瀧 孝雄 ファージライブラリーから創薬へのアプローチ

###### 2. 日本薬学会 2003 年 3 月 27 日

清水広介、布施千秋、浅井知浩、田中俊樹、荻野晃一、瀧 孝雄、難波幸弘、奥 直人 腫瘍性新生血管傷害療法確立に向けたリポソーム製剤によるがん退縮機構の解明

###### 3. 日本薬学会 2003 年 3 月 27 日

近藤雅美、浅井知浩、荻野晃一、瀧 孝雄、塚田秀夫、馬場一彦、周到 智、松田 彰、田中俊樹、徳富浩二、佐塚泰之、園部 尚、奥 直人：MT1-MMP 標的化 DDS 製剤による腫瘍新生血管傷害療法

###### 4. 第 19 回日本 DDS 学会、Drug Delivery Syst. 2003 年 6 月 20 日

清水広介、布施千秋、浅井知浩、田中俊樹、荻野晃一、瀧 孝雄、難波幸弘、奥 直人：瘍新生血管傷害療法によるがん腫瘍分布の解析

###### 5. 8<sup>th</sup> Liposome Research Days Conference (©Berlin) 2003

Oku N, Asai T, Watanabe K, Kuromi K, Ogino K, Taki T: Anti-neovascular therapy by use of liposomes targeted to angiogenic vessels.

###### 6. 第 12 回日本がん転移学会学術集会

2003 年 6 月 27 日

高田美紀、清水広介、浅井知浩、荻野晃瀧 孝雄、馬場一彦、田中俊樹、奥 直人：新規 DDS 製剤を用いた腫瘍新生血管療法によるがん転移抑制

###### 7. 8<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 6<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine

(©Greece) 2003年10月18日

Oku N, Takeda A, Asai T, Watanabe K,  
Ogino K, Taki T: Anti neovascular  
therapy by use of liposomes modified  
with neovessel targeted peptide.

8.第25回生体膜と薬物の相互作用シンポ

ジウム 2003年11月14日

高田美紀、清水広介、浅井知浩、荻野晃一、  
瀧 孝雄、馬場一彦、田中俊樹、難波幸  
弘、奥 直人：新規抗がん封入りポソーム製  
剤を用いた腫瘍新生血管療法によるがん治  
療と転移転抑制

9. Glyco-Neurobiology: Glycolipids,

Glycoproteins and Glycoforms

2004年2月10日

Taki T., Preparation of ganglioside  
replica peptides with phage-displaye  
peptide library and their functions

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

分担研究報告書

機能的抗体が認識するエピトープに基づいたヒト B 細胞由来抗体の作製

分担研究者 亀谷美恵 東海大学医学部 助手

研究要旨

生物活性をもつ抗体あるいは抗血清が認識するエピトープを決定して、その MAP 化ペプチドを用いて、同機能をもつ抗体をヒト B 細胞に産生させることを目指している。研究分担者滝により、昨年および本年度に 2 種類の抗体（抗 Her2 および抗マラリア）が認識するエピトープが決定された。それらエピトープを含むペプチドをヒト免疫系再構築 NOG に免疫し、ヒト B 細胞が産生する完全ヒト型抗原特異的抗体を得ることを試み、以下の成果を得た。（1）各 MAP 化ペプチドをアジュヴァントと共に免疫すると、ヒト免疫系再構築 NOG マウスの血清中にペプチド特異的 IgM 抗体を検出した。（2）Her-2 の場合は、Her-2 発現腫瘍を移植したマウスに投与すると、抗 Her-2 抗体産生が亢進し、同ペプチドのワクチン効果が確認された。（3）ヒト B 細胞由来の完全ヒト型抗体の大量獲得を目指し、最近開発されたヒトミエローマ細胞株 Karpas707H を用いて細胞融合を行い、ヒト・ヒトハイブリドーマの樹立を試みた。その結果、（1）で述べたエピトープ特異的 IgM 抗体を継続して産生するハイブリドーマを、マラリア原虫成分および Her-2 に対して得た。

研究協力者 安藤 潔 東海大学医学部  
助教授

A. 研究目的

生物活性のある抗体が認識するエピトープを決定と、それらをモデル動物に免疫することによって、生体防御に有用な機能的抗体を効率よく得ることが可能となる。上記条件のエピトープ決定は分担研究者によって進められている。後者の抗体獲得には、臨床応用を考

えるとヒト B 細胞が産生する抗体が、安全性と効率の面から理想的である。我々は、これまでの研究でヒト臍帯血由来 CD34+細胞を免疫不全マウス（T、B、NK 細胞を欠損する NOG マウス）に移植することによって同マウス内にヒト免疫系を再構築することに成功している。従って、研究分担者滝によって得られたエピトープをヒト免疫系再構築 NOG マウスに免疫するところによって、有用な生物活性をも