

つ抗体を得ることを目指している。さらに、得られた抗体を機能を保持したまま大量に獲得するためには、ヒト・ヒトハイブリドーマが望まれるが、これまでに長期にわたって機能を維持するヒトハイブリドーマは無かった。本研究では、最近開発されたヒトミエローマ細胞株を用いて、上記マウスで得られたヒトB細胞産生細胞のハイブリドーマ樹立も試みる。

## B. 研究方法

(1) 熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) に対する生物活性をもつ抗体或いは抗 Her-2 キメラ抗体が認識する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 マウスに免疫する。同マウスは実験ごとにヒト CD34+ 臍帯血を移植して作製する。免疫した NOG マウスは経時的に採血し、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 で免役し、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通常マウスで確認したので、本年度は、ヒト免疫再構築 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の問題であった。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。

(倫理面への配慮)

危険は伴わない。

## C. 研究成果

アポトーシス誘導可能な抗 Her-2 抗体よりエピトープとして同定した Her-2 N:167-175MAP 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 マウスに免疫すると、免疫源特異的抗体が血清中に検出された。この殆どは IgM であった。当該 NOG マウスに、MAP 化ペプチドに加えて Her2 発現腫瘍細胞を移植すると、MAP 化ペプチド単独の場合に比較して、抗体価が 10 倍亢進した。この際、低力価ではあるが、IgG 抗体も検出された。この結果は、MAP 化ペプチドがワクチン効果をもつことを示唆する。

(2) 上記免疫 NOG マウスより得たヒトB細胞はヒトミエローマ細胞株 Karpas707H と融合し、培養液中に十分な力価の Her-2MAP 化ペプチドに特異的 IgM 抗体を産生した。現在まで 20 週が経過するが、産生能の低下や欠如は見られていない。すなわち、ヒト免疫系再構築 NOG マウスを免疫して獲られたヒトB細胞ハイブリドーマが産生する世界初の抗原特異的ヒト抗体が得られた。また、同ハイブリドーマ由来の抗体は、Her-2 発現細胞を明確に染色することを Flowcytometer の解析で確認した。

(3) 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 種類の malaria antigen-mimicking peptide と高いホモロジーをもつマラリア原虫成分 SERA および MSA2 のペプチドを MAP 化し、ヒト免疫系再構築 NOG マウスに免疫すると、同ペプチドに特異的な IgM 抗体が ELISA により血清中に検出された。しかし、これら血清の IgM 分画の *Plasmodium falciparum* に対する中和活性は明確でなかった (Ig 分画による中和活性は、群馬大学の鈴江博士および大阪大学の堀江博士に依頼して解析した)。その 1 つの理由として血清中の IgM 抗体価が低かったことが考え

られたため、抗 Her-2 の場合と同様に Karpas707H との細胞融合によりハイブリドーマを樹立し、培養液中に MAP 化ペプチドに対する IgM 抗体を得た。現在それら抗体の活性を検討すべく量産を試みている。

#### 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 細胞から抗原特異的抗体を得、それら B 細胞のハイブリドーマを確立した。従来、有用な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が可能であることを報告した。本年度我々は、同 Karpas707H を入手し、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、この期間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。

#### 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産生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。(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ー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. 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 (9):789-97

### 2. 学会発表

#### 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）

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

#### 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）

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

#### 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）

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

#### 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）

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

## G. 知的所有権の取得状況

特になし

## 別紙 5

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	16(1)	179-87	2004
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.	31(9)	789-797	2003
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.	198(1)	51-61	2003
Hozumi K, Abe N, Chiba S, Hirai H, Habu S.	Active form of Notch members can enforce T lymphopoiesis on lymphoid progenitors in the monolayer culture specific for B cell development.	J. Immunol.	170(10)	4973-4979	2003
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

200300868A

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、P23の研究  
成果の刊行に関する一覧表をご参照ください。