

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07293

研究課題名（和文）患者B細胞を用いたモノクローナル抗体作製とその臨床応用

研究課題名（英文）Production of monoclonal antibodies using B cells derived from patients and their clinical application

研究代表者

高松 博幸（Takamatsu, Hiroyuki）

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：70401932

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、抗HLA抗体を産生している患者B細胞と細胞アレイを用いてこれまで作製ができなかった新規抗HLAモノクローナル抗体の作製を行った。これまでに作製に成功した抗HLA-B61とBw4モノクローナル抗体に加えて、A33, B13, B35, B48, B53, B54等のHLA抗原と反応する新規モノクローナル抗体産生遺伝子組換え細胞を作製した。これらのモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー検査で微小残存病変、同種造血幹細胞移植後のキメラリズム解析、免疫抑制療法が奏効しやすい再生不良性貧血の診断が可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに白血球の血液型であるHLAの一部に対するモノクローナル抗体は通常の実験動物に免疫をする方法では作製することができなかった。本研究では患者B細胞と細胞アレイを使用することによって、新規抗HLAモノクローナル抗体を初めて作製できた。今回作製に成功した新規の抗HLAモノクローナル抗体を用いることで簡便にごく少数の血液がん細胞を検出することができ、再発の早期診断が可能になった。また、免疫抑制療法が効きやすい再生不良性貧血の患者も同定可能になった。

研究成果の概要（英文）：In this study, using peripheral B cells derived from donors and cell-arrays we have created novel monoclonal antibodies that could not be made using conventional methods. In addition to monoclonal antibodies against HLA-B61 and Bw4, we could create recombinant cells that secrete antibodies against HLA-A33, B13, B48, B53 and B54 and so on. Using these novel monoclonal antibodies, we can monitor minimal residual disease, chimerism after allogeneic stem cell transplantation and identify patients with aplastic anemia who respond to immunosuppressive treatments by flow cytometry.

研究分野：腫瘍学

キーワード：HLA モノクローナル抗体 微小残存病変 造血器腫瘍 多発性骨髄腫 再生不良性貧血

1. 研究開始当初の背景

近年、同種造血幹細胞移植後のキメリズム解析のために HLA に対するモノクローナル抗体が使用されている。しかし、抗 HLA-B61 抗体など、一部の HLA 分子に対するモノクローナル抗体については、HLA 分子の多型のためにマウスに精製 HLA 蛋白質を免疫しても抗体価が上昇せず、作製困難であることがわかっていた。今回、抗 HLA 抗体を高力価に保有する患者の末梢血・骨髄中の B 細胞を利用した抗 HLA モノクローナル抗体作製法を立案した。一方、長期間分子学的完全寛解(molecular complete remission: mCR)を維持している多発性骨髄腫患者血清中には種々の自己抗体 (抗 sperm associated antigen 8 (SPAG8)抗体等)が検出されることを、これまでに蛋白質アレイを用いた網羅的解析で明らかにした。その自己抗体のうち、SPAG8 が正常血液細胞では発現がなく、骨髄腫細胞に発現していることを見いだした(平成 27-29 年科研費基盤研究(C), 15K08644)。

2. 研究の目的

本研究では、「抗 HLA/SPAG8 抗体を高力価に保有する患者の B 細胞を利用した抗 HLA-mAbs/抗 SPAG8-mAbs の作製は可能か」という問いのもと、富山大学免疫学教室で開発された細胞マイクロアレイ ([Ozawa T and Kishi H et al. Nature Medicine, 2009](#)) を用いて、患者血清に検出される抗 HLA 抗体や抗 SPAG8 抗体を産生する B 細胞を効率よく分離し、診断・治療用モノクローナル抗体として開発することを目的とした。

3. 研究の方法

1. 抗 HLA クラス I, -mAbs の作製

患者(ドナー)末梢血や骨髄を用いて mAbs の作製を行う。具体的には、

抗 HLA もしくは抗 SPAG8 抗体産生患者(ドナー) B 細胞をサイトカイン刺激し、CD138 陽性細胞をビーズで分離

細胞アレイ(230000 wells/アレイ)に可溶化 HLA もしくは SPAG8 抗原をコート

細胞アレイに抗体産生細胞をアプライ

3 時間細胞培養し、産生された抗体を蛍光抗体で検出

蛍光顕微鏡を用いて、抗体産生細胞をピックアップ

1 細胞 RT-PCR によって抗体 cDNA を増幅し、遺伝子操作により抗体産生細胞を作製
細胞大量培養によって目的とするモノクローナル抗体を大量に作製する。

2. 抗 HLA クラス I, -mAbs の機能解析

作製した mAbs が HLA 特異的に造血器腫瘍や健常者末梢血細胞に結合するかについてフローサイトメトリーを用いて評価した。

4. 研究成果

これまでに作製に成功した抗 HLA-B61 と Bw4 モノクローナル抗体に加えて、新規の抗 HLA-A33 抗体、抗 HLA-B54 抗体産生細胞等をサイトカインカクテルで刺激した患者末梢血・骨髄細胞から細胞アレイを用いて分離し、その細胞から抽出した DNA を用いて遺伝子組換えを行い、抗 HLA 抗体をクローニング、抗体発現ベクターを構築し、そのトランスフェクションによって HLA-A33, B13, B35, B48, B53, B54 等に対するモノクローナル抗体産生細胞を作製した。一方、大量作製法を確立した抗 HLA-B61 モノクローナル抗体を用いて免疫抑制療法が奏効しやすい再生不良性貧血患者の診断をルーチン検査として行っている。その結果を用いて、HLA-B61 アレルロスを含む HLA ロスを有する再生不良性貧血患者では免疫抑制療法が奏効すること (Haematologica 2020 May 21. doi: 10.3324/haematol.2020.247809) に加えて急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群への移行リスクがないことを報告した (Blood. 2021 Mar 22;blood.2020010586. doi: 10.1182/blood.2020010586)。

また、長期間分子遺伝学的完全寛解(molecular complete remission: mCR)を維持している多発性骨髄腫患者血清中に癌精巢抗原の一つであるSPAG8に対する抗体が検出された。SPAG8は正常血液細胞で細胞表面に発現がないが、3種類の骨髄腫細胞株(RPMI8226, AMO-1, U266)の細胞表面での発現が検出された。しかし、細胞表面でのSPAG8発現は培養条件によって発現が低下することがあり、この原因も解析中である。さらに他の造血器腫瘍細胞株(K562)や前立腺癌細胞株(PC-3)でもSPAG8の発現を確認した。今後は、骨髄腫患者のB細胞を用いて抗SPAG8モノクローナル抗体を作製し、診断・治療に応用する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mizumaki H, Hosomichi K, Hosokawa K, Yoroidaka T, Imi T, Zaimoku Y, Katagiri T, Nguyen MAT, Tran DC, Elbadry MIY, Chonabayashi K, Yoshida Y, Takamatsu H, Ozawa T, Azuma F, Kishi H, Fujii Y, Ogawa S, Tajima A, Nakao S	4. 巻 106
2. 論文標題 A frequent nonsense mutation in exon 1 across certain HLA-A and -B alleles in leukocytes of patients with acquired aplastic anemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 1581-1590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2020.247809	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hosokawa K, Mizumaki H, Yoroidaka T, Maruyama H, Imi T, Tsuji N, Urushihara R, Tanabe M, Zaimoku Y, Nguyen MAT, Tran DC, Ishiyama K, Yamazaki H, Katagiri T, Takamatsu H, Hosomichi K, Tajima A, Azuma F, Ogawa S, Nakao S	4. 巻 -
2. 論文標題 HLA class I allele-lacking leukocytes predict rare clonal evolution to MDS/AML in patients with acquired aplastic anemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2020010586	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 J. Luis Espinoza, Mahmoud I. Elbadry, Kazuhisa Chonabayashi, et. al.	4. 巻 2
2. 論文標題 Hematopoiesis by iPSC-derived hematopoietic stem cells of aplastic anemia that escape cytotoxic T-cell attack	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood Adv.	6. 最初と最後の頁 390-400
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2017013342	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 漆原涼太、高松博幸、中尾眞二
2. 発表標題 多くの多発性髄腫細胞は癌精巢抗原の一つであるSPAG8を発現している
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小澤 龍彦 (Ozawa Tatsuhiko)	富山大学・免疫学・准教授	
研究協力者	岸 裕幸 (Kishi Hiroyuki)	富山大学・免疫学・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------