

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650607

研究課題名（和文） 癌近傍リンパ節由来ヒトモノクローナル抗体ライブラリーの開発と機能解析

研究課題名（英文） Development and analysis of human monoclonal antibodies derived from patients with cancer.

研究代表者

磯部 正治（ISOBE MASAHARU）

富山大学・大学院理工学研究部・教授

研究者番号：70211050

研究成果の概要（和文）：

癌の進行に伴い癌患者の血清中では、しばしば自己抗体が増加する。これらの抗体の中には、潜在的に癌の診断や治療用抗体の開発に役立つ抗体の存在が期待される。そこで本研究では、われわれが開発した、抗体産生単一細胞からの完全ヒトモノクローナル抗体迅速単離システムを用いて、癌患者由来の抗体産生細胞一個一個から抗体遺伝子を単離し培養細胞で発現させることによって得られた、多数の完全ヒトモノクローナル抗体をライブラリー化し、それぞれの抗体の結合特性や機能を調べることによって、癌細胞との結合能を示す抗体の単離を目指した。得られた癌患者由来のヒトモノクローナル抗体を、癌組織標本に対して免疫組織化学染色を行うことで、癌細胞との結合能を示す抗体のスクリーニングを行った。その結果、得られた抗体の中には、癌細胞に対して高い親和性を示すクローンが確かに存在することを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

It has been known that the elevation of autoantibodies can frequently be observed in patients with cancer along with its progression. Among those some are potentially useful for the development of therapeutic or diagnostic antibodies for cancer. Recent development of our high-throughput isolation system of human monoclonal antibodies enabled us for the construction of antibody libraries from cancer patients derived antibody-producing single cells. The binding specificity of each antibody was examined by staining the cancer tissue from the same patient. After extensive screening we have succeeded in isolation of multiple antibodies that recognize cancer cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：ヒトモノクローナル抗体、免疫学、癌、MAGrahd 法

1. 研究開始当初の背景

現在創薬分野では、癌に対する治療用抗体の開発と、その効用を確認するための診断用抗体の開発ニーズが高まっている。特に治療用

抗体では、標的抗原に対する高い特異性と親和性のみならず、目的に応じた種々の物性や機能性も兼ね揃える必要がある。それらの条件を満たす抗体を開発するためには、まず標

的抗原との結合性を示す抗体を、できるだけ多種類取得することが求められる。現在の治療用抗体開発現場では、ファージディスプレイ法と、長年の実績を持つハイブリドーマ法が主に用いられている。ファージディスプレイ法は抗原を用いた免疫が不要であるという大きな利点を有するが、目的の抗体を単離するためには、良質なファージライブラリーを用いて大規模なスクリーニングを何度も繰り返さなければならない。また得られる抗体の、抗原に対する親和性は一般的に低く、目的の性能を得るために、抗体の親和性向上過程を必要とする。ハイブリドーマ法では、抗体産生細胞の無限増殖能を得るために使用されるミエローマが、マウス、ラットあるいはウサギ用のものしかなく、ヒトの抗体産生細胞の不死化には適用できない。そのためマウスなどから単離されたモノクローナル抗体をヒト化する過程を必要とする。さらにハイブリドーマ法ではミエローマと抗体産生細胞の細胞融合後、ハイブリドーマの選択と単一細胞からのクローン増殖が必要で、抗原との結合性が解析できるまでに少なくとも1ヶ月以上の期間を要し、スクリーニングの結果、陽性クローンがなければ、再度動物の免疫から繰り返さなければならないことから、目的の抗体単離までに長期間を要していた。

これらの欠点を克服するため、抗体産生単一細胞からの抗体遺伝子クローニング法の重要性に近年注目が集まっている。これは、生体内に存在する抗体産生単一細胞から抗体遺伝子を単離し、発現ベクターに組み込み、培養細胞に導入し、培地中に分泌された抗体について抗原との反応性を解析することで目的の抗体を取得する方法である。しかし、抗体産生単一細胞からの抗体遺伝子の単離には技術的困難さが存在し、それらを一つ一つ発現ベクターに組み込むには多大労力と時間を要していた。

そこで、われわれはこの手法の欠点を克服するため、3種類の新規技術開発を行った。すなわち、1) 小胞体選択的蛍光色素と標識抗原を用いた抗原特異的形質細胞の新規同定(ERIAA)法、2) 多数の抗体産生単一細胞から確実に抗体 cDNA を自動合成するための懸垂液滴アレイ式磁気ビーズ反応(MAGrahd)法、ならびに3) 抗体 cDNA から増幅された抗体可変領域遺伝子断片を一切精製することなしに抗体遺伝子発現ユニットに変換するための標的選択的連結ポリメラーゼ連鎖反応(TS-jPCR)法である。これらの要素技術を用いることで、抗体産生単一細胞からの抗体遺伝子単離、培養細胞での抗体発現、結合能解析を含め、わずか5日間の過程で、目的抗原に特異的なモノクローナル抗体を多数取得することが可能となった。

2. 研究の目的

癌患者の血清中には自己抗体がしばしば検出され、これらの抗体の中には潜在的に癌の抗体療法や診断法の開発に役立つ抗体の存在が期待される。本研究では、われわれが独自に開発した抗体産生単一細胞からの完全ヒトモノクローナル抗体迅速単離システムを用いて、癌患者由来の抗体産生細胞一個一個から抗体遺伝子を単離し、培養細胞で発現させ、得られた完全ヒトモノクローナル抗体をライブラリー化し、個々の抗体の結合特性や機能を調べることによって、癌細胞を認識するヒトモノクローナル抗体単離法の開発を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

癌患者より抗体産生細胞を単離し、セルソーターを用いて形質細胞の表面マーカー等を指標に、シングルセルソーティングを行い単一細胞の分離を行った。それら単一細胞から、独自開発した懸垂液滴磁気ビーズ反応(MAGrahd)法ならびに、自動化のためのロボットアームを用いてcDNAを合成した後、抗体cDNA断片の増幅を行った。得られたヒト抗体cDNAを、独自開発した標的選択的連結PCR法で発現ユニットに組み込んだ後、ヒト由来の293FT細胞に導入し、2日間培養することで培養上清中にヒト抗体を発現させた。培養上清中に分泌された抗体を回収し、保存することで抗体ライブラリーの作製を行った。得られた抗体の特異性を調べるため、患者由来の癌組織や同種の癌細胞株を抗原として免疫染色を行い、癌細胞を認識する抗体の探索を行った。

4. 研究成果

本研究では、われわれが独自に開発した抗体産生単一細胞からの完全ヒトモノクローナル抗体迅速単離システムを用いて、癌患者由来の抗体産生細胞一個一個から抗体遺伝子を単離し、培養細胞で発現させ、得られた完全ヒトモノクローナル抗体をライブラリー化した。癌患者由来の抗体産生細胞を元に単離されたヒトモノクローナル抗体ひとつひとつを、癌細胞株ならびに癌組織標本に対して免疫組織化学染色を行うことで、癌細胞と選択的に結合する抗体のスクリーニングを行った。その結果、得られた抗体の中には、ヒト由来の癌細胞と高い親和性を示すクローンが確かに存在することを見いだした。現在、得られた抗体によって認識される抗原がどのような組織で発現しているのかを解析すると共に、抗原の同定に向けて研究を進めると共に、各抗体の治療用あるいは診断用抗体としての応用可能性について検討を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) Kurosawa, N., Fujimoto, R., Ozawa, T., Itoyama, T., Sadamori, N., and Isobe, M. (2013). Reduced Level of the BCL11B Protein Is Associated with Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *PloS one* 8, e55147.

(2) Kurosawa, N., Yoshioka, M., Fujimoto, R., Yamagishi, F., and Isobe, M. (2012). Rapid production of antigen-specific monoclonal antibodies from a variety of animals. *BMC biology* 10, 80.

(3) Fujimoto, R., Ozawa, T., Itoyama, T., Sadamori, N., Kurosawa, N., and Isobe, M. (2012). HELIOS-BCL11B fusion gene involvement in a t(2;14)(q34;q32) in an adult T-cell leukemia patient. *Cancer genetics* 205, 356-364.

(4) Yoshioka, M., Kurosawa, N., and Isobe, M. (2011). Target-selective joint polymerase chain reaction: a robust and rapid method for high-throughput production of recombinant monoclonal antibodies from single cells. *BMC biotechnology* 11, 75.

(5) Kurosawa, N., Yoshioka, M., and Isobe, M. (2011). Target-selective homologous recombination cloning for high-throughput generation of monoclonal antibodies from single plasma cells. *BMC biotechnology* 11, 39.

[学会発表] (計 11 件)

①単一細胞からのハイスループットな抗体遺伝子/T細胞受容体遺伝子のクローニング及び発現システムの開発(High throughput cloning and expression of immunoglobulin genes/T-cell receptor genes from single cells.) 吉岡 めぐみ, 黒澤 信幸, 磯部 正治: 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 23 日

② Magnetic-beads Reaction through Arrayed Hanging-Drops (MAGrahd) for high-throughput amplification of immunoglobulin genes from single B cells. Nobuyuki Kurosawa, Megumi Yoshioka and Masaharu Isobe: Antibody Engineering (San Diego, CA USA) 2011 年

12 月 4 日

③ Target-selective homologous recombination cloning (TS-HR) for high-throughput generation of monoclonal antibodies from single plasma cells. Rika Fujimoto, Megumi Yoshioka, Nobuyuki Kurosawa and Masaharu Isobe: Antibody Engineering (San Diego, CA USA) 2011 年 12 月 4 日

④ Target-selective joint polymerase chain reaction (TS-jPCR): A robust and rapid method for high-throughput production of recombinant monoclonal antibodies from single cells. Megumi Yoshioka, Nobuyuki Kurosawa and Masaharu Isobe: Antibody Engineering (San Diego, CA USA) 2011 年 12 月 4 日

⑤ TS-jPCR 法を用いた単一細胞からのハイスループットな組換えモノクローナル抗体作製法の開発 (Target Selective-joint Polymerase Chain Reaction for High-throughput Generation of Recombinant Monoclonal Antibodies from Single Cells) 吉岡 めぐみ, 黒澤 信幸, 磯部 正治: 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13 日

⑥ Semi-Automatic Cloning and Expression of Immunoglobulin Genes from Single-Plasma Cells for High-Throughput Generation of Monoclonal Antibodies. Masaharu Isobe: PEP TALK The Protein Science Week PIPELINE4 (San Diego, CA USA) 2012 年 1 月 9 日招待講演

⑦ BCL11B 蛋白質発現減少は成人 T 細胞白血病の発症に関与する。黒澤 信幸, 藤本 理加, 磯部 正治: 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日

⑧ A robust and rapid system for high-throughput generation of recombinant monoclonal antibodies from a variety of species. Masaharu Isobe, Megumi Yoshioka, Rika Fujimoto and Nobuyuki Kurosawa: Antibody Engineering (San Diego, CA USA) 2012 年 12 月 3 日

⑨ Antigen-specific plasma/plasmablast cells identification from a variety of animals for the production of monoclonal antibodies. Nobuyuki Kurosawa, Megumi Yoshioka, Rika Fujimoto and Masaharu

Isobe: Antibody Engineering (San Diego, CA USA) 2012年12月3日

⑩モルモット抗体可変領域遺伝子レパートリーの解析 (Analysis of immunoglobulin variable gene repertoire from the guinea pig.) 吉岡 めぐみ, 成瀬 輝芳, 黒澤 信幸, 磯部 正治: 第 85 回日本生化学会大会 2012年12月16日

⑪様々な動物からの迅速な抗原特異的モノクローナル抗体作製法の開発 (Rapid production of antigen-specific monoclonal antibodies from a variety of animals.) 黒澤 信幸, 吉岡 めぐみ, 藤本 理加, 磯部 正治: 第 85 回日本生化学会大会 2012年12月16日

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 形質細胞または形質芽細胞の選択方法, 目的抗原特異的な抗体の製造方法, 新規モノクローナル抗体

発明者: 黒澤信幸、磯部正治 (各 50%)

権利者: 国立大学法人富山大学 (100%)

種類: 特許

番号: PCT/JP2010/064994 (全指定)

出願年月日: 平成 24 年 3 月 28 日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 1 件)

名称: 反応治具及び反応方法、並びに cDNA 合成方法

発明者: 磯部正治、黒澤信幸 (各 50%)

権利者: 立大学法人富山大学 (100%)

種類: 特許

番号: 第 5244130 号

取得年月日: 平成 25 年 4 月 12 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

磯部 正治 (ISOBE MASAHARU)

富山大学・大学院理工学研究部・教授

研究者番号: 70211050