



Title	ヒト5番染色体に特異的な細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体の作製と応用～ヒト染色体マーカー抗体として
Author(s)	米田, 光宏
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37126">https://hdl.handle.net/11094/37126</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	よね 米	だ 田	あき 光	ひろ 宏
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9122	号	
学位授与の日付	平成	2年3月24日		
学位授与の要件	医学研究科外科系専攻			
	学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	ヒト5番染色体に特異的な細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体の作製と応用～ヒト染色体マーカー抗体として			
論文審査委員	(主査) 教 授	岡田 正		
	(副査) 教 授	岡田 善雄	教 授	高井新一郎

### 論文内容の要旨

#### 〔はじめに〕

癌化や先天異常における染色体変化の解析、雑種細胞における染色体分析等を行う方法として、染色体分染法、RFLP、アイソザイムによる分析等が行われてきた。ある特定の染色体上の遺伝子産物に対する抗体は、染色体マーカー抗体として利用することができ、少数の細胞の染色体分析が可能であること、特定の染色体を持つ雑種細胞を選択的に回収することに有用である。

以前に、ヒト5番染色体を完全な形でもつ、human-mouse monochromosomal hybrid BG15-6が樹立され、先に述べたような考えから、私は染色体マーカーとして、このBG15-6におけるヒト5番染色体上の遺伝子由来の細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体を作製した。また、この抗体を利用して、ヒト5番染色体を持つ細胞を選択的に回収できることを示した。

#### 〔方法ならびに成績〕

1) モノクローナル抗体の作製：BG15は、neomycin耐性遺伝子pSV2-neoをtransfectしたhuman embryo lung由来の纖維芽細胞をコルセミド処理して得られるmicrocellと、mouse hepatoma cell, BNL I ME A. 7R. I (7RI)とを融合させるという方法(microcell fusion法)によって作製された細胞で、ヒト由来の染色体として5番染色体を単独で持つhuman-mouse monochromosomal hybridである。BG15をサブクローニングし、neomycin耐性クローンBG15-6, BG15-7, BG15-9を得た。BG15-6はヒト5番染色体を完全な形で含んでおり、BG15-7およびBG15-9はその1部を欠失した状態で含んでおり、前者は

5pter-q22, 後者は 5pter-q23 を含んでいた。

このうちヒト 5 番染色体を完全な形で持っている human-mouse monochromosomal hybrid である BG15-6 を Balb/c mouse 皮下に免疫し, その spleen cell とマウス骨髓腫細胞株 X63-Ag8-6, 5, 3 とをポリエチレン glycol を用いて融合させ, hybridoma を得た。assay は hybridoma 培養上清を採取し, そこに含まれる抗体と, BG15-6 およびこれを作るもととなったマウスの肝癌細胞 7RI との結合能を radioimmunoassay によって測定した(binding assay)。BG15-6 と結合し, 7RI とは結合しないクローニングを繰り返して最終的に 4 クローニングの hybridoma を得た。これらを Balb/c マウス腹腔内に注射し, 常法にしたがって腹水を採取し, 硫酸アンモニウム, DEAE-sepharose を用いて精製した。それぞれの抗体を 2A10, 3H9, 5G9, 6G12 と命名した。また抗体のサブクラスはすべて IgG1 であった。

2) 抗原遺伝子の 5 番染色体上の部位: BG15 をサブクローニングして得られた neomycin 耐性サブクローニング BG15-9, BG15-7 を使用し, 前述した binding assay を行った。BG15-9 は 5pter-q23, BG15-7 は 5pter-q22 とヒト 5 番染色体の 1 部を欠失した状態を含んでいるため, これらとの結合を調べることによって抗原遺伝子の染色体上の座を限定した。2A10, 3H9, 6G12 は BG15-9, BG15-7 ともに結合したことから, その抗原遺伝子は 5pter-q22 に存在することが判明した。5G9 は BG15-9 に結合し, BG15-7 とは結合しなかったことから, その抗原遺伝子は 5q23 に存在することが判明した。

3) 間接蛍光抗体法: スライドガラス上に接着培養した細胞を 3.5% ホルムアルデヒドを用いて固定した。hybridoma 培養上清または精製したモノクローナル抗体を 1 次抗体とし, 蛍光標識した抗マウス IgG 抗体を 2 次抗体として染色した。2A10, 3H9, 6G12 は BG15-6 の細胞膜を染色した。

4) FACS (fluorescence activated cell sorter) を用いた 5 番染色体を持つ細胞の選別: BG15-6, 7RI を EDTA を用いて culture dish より回収し, それぞれ  $10^7$  個ずつ混合した。これを前述の 6G12 を使って蛍光標識し, FACS を用いて細胞の選別を行った。相対的な蛍光強度によって細胞は大きく 2 群に分かれ, 蛍光の強い群を P 群, 弱い群を N 群とした。両群の細胞を 10 cm dish にそれぞれ 1000 個ずつ培養し, 2 日後から neomycin 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  存在下で 6 日間選択培養を行い, 細胞を固定後 Giemsa 染色によって染色し, コロニー数を測定した。neomycin による選択を行った場合のコロニー数を行わなかった場合のコロニー数で除した値をコロニー陽性率(ヒト 5 番染色体陽性率)とすると, P 群では 0.99, N 群では 0.05 と P 群で高いコロニー陽性率を示した。このことから P 群を回収することによって, neomycin 耐性遺伝子を組み込んだヒト 5 番染色体を持つ細胞を選別し得ることが示された。

## 〔総括〕

- 1) ヒト染色体マーカー抗体として, ヒト 5 番染色体に特異的な細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体 2A10, 3H9, 5G9, 6G12 を作製した。

- 2) 得られたモノクローナル抗体のうち, 2 A 10, 3 H 9, 6 G 12 の認識する抗原遺伝子はヒト 5 番染色体短腕末端から長腕 q 22までの間に存在し, 5 G 9 の認識する抗原遺伝子は長腕上 q 23に存在することを示した。
- 3) 間接蛍光抗体法による染色像で, 2 A 10, 3 H 9, 6 G 12においては細胞膜にその抗原が存在した。
- 4) モノクローナル抗体 6G12 を用いて, FACSによりヒト 5 番染色体を持つ細胞を選別できることを示した。

### 論文の審査結果の要旨

本研究は, human-mouse monochromosomal hybrid を利用することによって, ヒト 5 番染色体に特異的な細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体を作製し, さらにヒト染色体マーカー抗体として応用するために, FACS を利用してヒト 5 番染色体を持つ細胞の選別を行ったものである。ヒト染色体マーカー抗体を作製する上で新しい方法であり, 疾病の遺伝子変化の解析, 診断を進める上で意義深い。よって学位論文に値する。