

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	https://hdl.handle.net/11094/37126
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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	よね	だ	あき	ひろ
	米	田	光	宏
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9 1 2 2		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，アイン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 由来の繊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. 1 (7R1) 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とマウス骨髄腫細胞株X63-Ag8-6, 5, 3 とをポリエチレングリコールを用いて融合させ, 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ンを選別し, クローニングを繰り返して最終的に4クローンの 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 耐性サブクローン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10cm 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、2A10, 3H9, 6G12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q22までの間に存在し、5G9の認識する抗原遺伝子は長腕上q23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、2A10, 3H9, 6G12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。