



Title	A Cancer-Reactive Human Monoclonal Antibody Derived from a Colonic Cancer Patient Treated with Local Immunotherapy
Author(s)	柳生, 俊夫
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38510
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	柳生俊夫
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 10831 号
学位授与年月日	平成 5 年 5 月 11 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	A Cancer-Reactive Human Monoclonal Antibody Derived from a Colonic Cancer Patient Treated with Local Immunotherapy (局所免疫療法を受けた大腸癌患者より作製された腫瘍反応性ヒト型モノクローナル抗体)
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞 (副査) 教授 濱岡 利之 教授 谷口 直之

論文内容の要旨

【目的】

癌細胞と反応するヒト型モノクローナル抗体は、癌の診断や治療への応用が期待されるが、安定して抗体を産生する有用なヒト・ヒトハイブリドーマを作製することは容易ではない。本研究は、癌に対する局所免疫療法が、臨床的に有用なヒト・ヒトハイブリドーマの樹立に役立つことを示すとともに、この療法をうけた大腸癌患者から得られたヒト型モノクローナル抗体が認識する抗体の性状を明らかにすることを目的とした。

【方法】

大腸癌患者に対し、経内視鏡的に OK-432 (5 KE)/fibrinogen (80mg) 混合液を術前に腫瘍内投与し、手術時に摘出した領域リンパ節よりリンパ球を採取した。このリンパ球をヒト B リンパ芽球細胞 HO-323 と 50% ポリエチレングリコール下に細胞融合し、ハイブリドーマを作製した。これらのハイブリドーマのうち培養上清中に 100ng/ml 以上のイムノグロブリン産生を認めるクローンを選択し、その培養上清を用いて大腸癌細胞株 (LS-174T, LoVo) および大腸癌組織を免疫染色した。また、大腸癌細胞株 (LS-174T) の膜蛍光染色で細胞表面抗原との反応性を検討した。こうして選択した 1 クローン (YJ-37) について、抗体を精製・ビオチン化し、直接法による免疫染色で種々のヒト組織との反応を検討した。組織切片の過ヨウ素酸、トリプシン、ノミラミニダーゼ処理による YJ-37 の反応性変化から、抗原の性状を検討し、さらに薄層クロマトグラフィー (TLC) で展開した O 型赤血球や胎盤からの糖脂質に対する反応性を調べた。そして、人工的に合成された種々の糖鎖との反応性を ELISA 法で調べて、このヒト型モノクローナル抗体が認識する抗原構造を検討した。

【成績】

手術前に局所免疫療法を受けた 4 人の大腸癌患者の領域リンパ節から、計 353 個のハイブリドーマが得られ、うち 116 個が 100ng/ml 以上のイムノグロブリンを産生し、31 個 (すべて IgM) は免疫染色によるスクリーニングで大腸癌との反応性が確認された。一方、局所免疫を受けていない 4 人の患者からは、高濃度のイムノグロブリンを産生するクローンや大腸癌と反応するクローンを樹立することは困難であった。

大腸癌に強く反応した9クローンを選び、大腸の正常組織と癌組織との反応を調べたところ、5クローンが癌とのみ反応することが分かった。膜蛍光染色の結果、これらのクローンはすべて癌細胞の膜抗原を認識していることが分かった。これら5クローンのうちの1クローン(YJ-37)を選択し、イムノグロブリン(IgM)を精製・ビオチン化して、直接法で種々のヒト組織を免疫染色した結果、大腸癌(7/19)、胃癌(3/6)、子宮体部癌(1/2)、大腸腺腫(7/13)に反応が認められたが、癌に隣接する正常組織は染色されなかった。

YJ-37の認識する抗原はその反応性が過ヨウ素酸やノイラミニダーゼ処理で減弱し、トリプシン処理で変化のことより、シアル酸を含む糖鎖であることが示唆された。そこでO型赤血球や胎盤より抽出した種々の糖脂質との反応をTLC免疫染色を用いてスクリーニングしたところ、sialyl-iに対し強く反応し、sialyl-paraglobosideにも弱く反応することが分かった。合成糖鎖に対する反応をELISA法で調べた結果、YJ-37はsialyl-paraglobosideやその1型異性体の糖鎖構造を認識していることが分かった。

【総括】

1. OK-432/fibrinogen局所免疫療法は、ヒト型モノクローナル抗体の作製効率を高めることが示された。
2. 局所免疫療法を受けた大腸癌患者の領域リンパ節を用いて作製されたヒト型モノクローナル抗体(YJ-37)は正常組織とは反応せず、大腸癌および大腸腺腫、胃癌、子宮体部癌と選択的に反応した。
3. YJ-37の認識する抗原は、癌細胞表面に存在し、シアル酸を含むラクト系列の糖鎖であることが示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、BRMによる局所免疫療法を受けた担癌患者の領域リンパ節リンパ球を用いることにより、癌表面抗原に対するヒト・ヒトハイブリドーマが効率よく樹立できることを示したものである。また、大腸癌患者の領域リンパ節リンパ球を用いて樹立したハイブリドーマの産生するヒト型モノクローナル抗体が大腸癌、胃癌、子宮体部癌(いずれも分化型腺癌)と選択的に反応し、その認識する抗原がsialyl-Le^a、sialyl-Le^xの前駆物質であるシアル酸を含むラクト系列の糖鎖であることを明らかにしている。

これらの知見は、今後の腫瘍免疫の研究に資するところが大きく、学位に値する業績と考える。