

Title	A Human Monoclonal Antibody Derived from Axillary Lymph Nodes of a Breast Cancer Patient Reactive to a Sulfated Glycolipid
Author(s)	馬場, 將至
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38557
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	ば ば まさ し 馬 場 將 至
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 8 2 9 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 Human Monoclonal Antibody Derived from Axillary Lymph Nodes of a Breast Cancer Patient Reactive to a Sulfated Glycolipid (乳癌患者腋窩リンパ節より作製された硫糖抗原を認識する ヒト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】

癌所属リンパ節を用いたヒトモノクローナル抗体の作製は、その認識抗原の解析によって担癌宿主における免疫機構の解明の一助となり得る。さらにそのヒト抗体の人体への投与は、癌の画像診断や免疫療法に有用である可能性を持つ。本研究では、乳癌患者腋窩リンパ節から採取したリンパ球を用いてヒト-ヒトハイブリドーマ法によりモノクローナル抗体を作製し、その認識するエピトープの解析を行なった。

【方 法】

乳癌患者に対して、まず所属リンパ節の免疫応答を高めるため、OK432, 5 KE と fibrinogen, 80mgの混合液を術前腫瘍内注入した。手術時に採取した腋窩リンパ節からリンパ球を分離培養した。このリンパ球とヒト B リンパ芽球様細胞株 (HO-323) を50%ポリエチレングリコール4000を用いて細胞融合し、96wellマイクロプレートにて培養した。ELISA 法により選別したイムノグロブリン産生ハイブリドーマの培養上清について、乳癌細胞株 (MCF-7) との反応性を免疫細胞染色にて調べ、MCF-7 と最も強く反応するハイブリドーマをクローニングしモノクローナル抗体 BMMK-33G を得た。以下の実験はこの BMMK-33G を用いて行なった。

まず BMMK-33G と MCF-7 の細胞膜との反応性をみるために、indirect immunobead test を施行した。具体的には、抗ヒト IgM 抗体が結合したイムノビーズに BMMK-33G を反応させ、さらにそれと培養 MCF-7 細胞を反応させる方法を施行した。次に BMMK-33G の認識する抗原の解析を HPTLC, ELISA 及び competitive cell-binding ELISA にて行なった。さらに、乳癌をはじめとする腫瘍組織ならびに正常組織との反応性を免疫組織染色にて検討した。

【成 績】

540well 中267well と高率にハイブリドーマの形成を認めた。このうち36well が100ng/ml以上, 16well が1 μg/ml以上の IgM を産生していた。この中より MCF-7 と最も強く反応するモノクローナル抗体 BMMK-33G を得た。

Indirect immunobead test では、MCF-7 細胞の周囲に、BMMK-33G を反応させたイムノビーズが付着して

いる像が見られた。これにより BMMK-33G は MCF-7 細胞の膜に反応していることが示された。

認識抗原の解析では、HPTLC 免疫染色で BMMK-33G は糖脂質のうちスルファチド (galactosylceramide-I³-sulfate) に反応した。ELISA でも BMMK-33G がスルファチドに特異的に反応した。また competitive cell-binding ELISA では、スルファチドにて BMMK-33G と MCF-7 との反応がほぼ完全に抑制された。以上より、BMMK-33G が認識するエピトープは、硫酸基を含むガラクトースで構成されている硫糖であることが示された。

免疫組織染色では、BMMK-33G は乳癌の13例全例と反応した。これらの組織では癌巢のほとんど全ての癌細胞が強く染色された。膀胱癌は1例、胃癌は2例の染色結果であるが、全て陽性反応を示した。また良性乳腺腫瘍も12例の全例が陽性を示したが、乳癌に比べてその染色性は弱かった。正常組織では、正常乳腺の腺および乳管上皮が染色されたが、その染色性は乳癌と比べると非常に弱かった。また、腎尿細管上皮や前立腺の腺管上皮なども染色された。

【総括】

1. 乳癌患者腋窩リンパ節から採取したリンパ球を用いて、IgM ヒトモノクローナル抗体 BMMK-33G を作製した。
2. 免疫組織染色では、BMMK-33G は乳癌のほか、膀胱癌、胃癌とも強く反応した。また正常組織では、乳管上皮、腎尿細管上皮、前立腺導管上皮などが反応を示したが、その染色性は乳癌に比べて弱かった。
3. BMMK-33G によって認識される抗原は、硫酸基を持った糖脂質の一つであるスルファチドであることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本研究は、局所免疫療法を受けた乳癌患者の腋窩リンパ節から採取したリンパ球を用いて、ヒト-ヒトハイブリドーマ法によりモノクローナル抗体 BMMK-33G を作製し、その認識するエピトープを解析したものである。BMMK-33G による免疫組織染色では、乳癌、胃癌、膀胱癌などの癌細胞が強く染色された。また良性乳腺腫瘍や一部の正常組織も染色されたが、その染色性は乳癌に比べると非常に弱かった。BMMK-33G によって認識される抗原は糖脂質であり、特に硫酸基を持ったスルファチドに BMMK-33G が強い反応を示した。これらの知見は腫瘍免疫の研究に寄与するばかりでなく、ヒト型モノクローナル抗体の特性を活かして、人体投与による癌の画像診断や免疫療法に応用される可能性があり、学位に値する業績と考える。