抗 HLA 抗体陽性患者リンパ球を用いた抗 HLA モノクローナル抗体の作製

高松博幸

金沢大学医薬保健研究域医学系 血液·呼吸器内科

【研究の背景】

近年、同種造血幹細胞移植後のキメリズム解析や再発検出のために HLA (Human Leukocyte Antigen=ヒト白血球抗原)に対するモノクローナル抗体が作製され、研究・検査に使用されている。しかし、抗 HLA-B61 抗体など、一部の HLA 分子に対するモノクローナル抗体については、HLA 分子の多型のために、トランスジェニックマウスに精製 HLA 抗原を免疫しても抗体価が上昇せず、作製困難である。一方、血液内科では頻回輸血や妊娠によって抗 HLA 抗体価の高い患者を診断することを経験する。今回、HLA 抗体高力価の患者のリンパ球を利用した抗 HLA モノクローナル抗体作製法を立案した。

【目 的】

抗 HLA 抗体陽性患者リンパ球を用いてヒト型抗 HLA モノクローナル抗体を作製し、その機能を確認する。

【方 法】

- (1)サイトカイン刺激した抗HLA抗体産生細胞を培養する。
- (2) 富山大学の村口、岸らが開発した「微細チップを利用した抗体産生細胞を同定・回収するシステム」(Kishi H, Muraguchi A, et al. Nature Med 2009)を利用して、ヒト型抗HLAモノクローナル抗体を作製する。

【結 果】

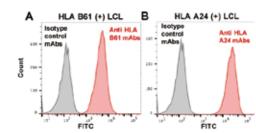
(1)抗HLA-B61抗体陽性ドナーの末梢血を用いた抗HLA-B61モノクローナル抗体(抗HLA-B61mAbs)の作製

抗HLA-B61抗体が陽性であったドナーの末梢血から分離した単核球をサイトカインカクテル及び10%FCS含有RPMI 培地で培養し、単核球からCD138陽性単核球を分離した。次に、可溶化したHLA-B61抗原をコートした細胞アレイに CD138陽性単核球を播種した後に、Cy3標識抗ヒトIgG抗体を用いて特異的抗体の存在を検出した。検出できたスポット(ウェル)から細胞を回収し、回収した細胞由来の遺伝子から抗HLA-B61抗体遺伝子のクローニングを行った。その抗HLA-B61抗体遺伝子をExpi293F細胞に導入して抗HLA-B61mAbsを産生させた。

(2)抗HLA-B61mAbsを用いたHLA-B61抗原陽性血球とHLA-B61抗原陰性血球の検出

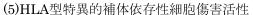
(1)で作製した抗HLA-B61mAbs、及び比較対照のモノクローナル抗体(抗インフルエンザ抗体)をFITCで標識して、 HLA-B61抗原陽性もしくは陰性B-LCL(B-リンパ芽球様細胞株)の検出をフローサイトメトリーで行った結果、コントロール抗体では検出できなかったのに対して、本研究の抗体は明瞭にHLA-B61抗原陽性B-LCLを検出することができた(図1A)。

一方、HLA-B61抗原陰性B-LCLを用いた場合には、コントロール抗体 と抗HLA-B61抗体とで差異は見られなかった。また、ヒト被験者由来の 末梢血を用いてHLA-B61抗原陽性もしくは陰性細胞の検出を試みた 結果、フローサイトメトリーで明瞭にHLA-B61抗原陽性リンパ球を検出 することができた(図2A及びB)。



- (3)抗HLA-A24モノクローナル抗体(抗HLA-A24 mAbs)の作製
- (1)と同様にして、抗HLA-A24抗体陽性ドナーの末梢血から抗HLA-A24抗体遺伝子を単離し、抗HLA-A24 mAbsを作製した。
- (4)抗HLA-A24mAbsを用いたHLA-A24抗原陽性血球とHLA-A24抗原 陰性血球の検出

FITC標識した抗HLA-A24mAbsを用いて、フローサイトメトリーでHLA-A24抗原陽性B-LCLを検出することができた(図1B)。



(1)で作製した抗HLA-B61mAbsの機能を検討した。HLA-B61陽性B-LCL細胞(HLAタイプB*35:01/40:02もしくはB*40:02/40:06) 又はHLA-B61陰性B-LCL細胞(HLAタイプB*51:01/52:01もしくはB*44:03/52:01)を、抗HLA-

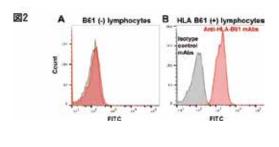
100% 80%

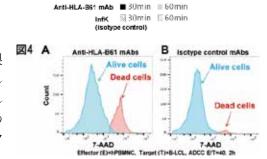
5056

B61mAbs (10μ g/ml)及び補体源として10%ヒト血清を含むRPMI培地中で培養し、さらに7-AADで染色してフローサイトメトリーで細胞傷害活性を調べた。図3に、30分間又は60分間インキュベートした後のHLA-B61陽性又は陰性細胞の生存率を示す。その結果、HLA-B61陽性B-LCL細胞に対しては細胞傷害活性が認められたのに対して、HLA-B61陰性B-LCL細胞に対しては認められず、抗体による細胞傷害活性がHLA型特異的であることが実証された。

(6)HLA型特異的抗体依存性細胞傷害活性

HLA-B61陽性B-LCL細胞 (target (T))をRPMI培地に加え、(1)で作製した抗HLA-B61mAbs (20μ g/ml)及びエフェクター細胞 (effector (E))としてヒト末梢血単核球 (E/T比 40)を添加して反応させた後、7-AADで染色してフローサイトメトリーで細胞傷害活性を調べた。その結果、図4Aに示すように明瞭な細胞傷害活性が認められた。なお、陰性対照のアイソタイプモノクローナル抗体では細胞傷害活性は認められなかった(図4B)。





Parient 3 Patient 4 (B*51:01/52:01) (B*44:00/52:01)

Patient 1 Patient 2 (B*35:0140:02) (B*40:0240:06)

【考 察】

現在、作製困難とされているヒト型抗 HLA モノクローナル抗体を、ヒト被験者由来の単核球を用いて迅速に作製し、検査等に使用することができた。従来のモノクローナル抗体の作製は、多大な時間と費用を要するものであったが、本方法によれば、約 1-2 ヶ月間で作製できることが確認できた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究の方法で作製した抗体を用い、同種造血幹細胞移植後の正常造血の回復や血液腫瘍の微小残存病変を簡便にモニタリングし、治療成績を向上させることが可能になる。また、HLAクラスII抗原は、B細胞系などの一部の血液細胞にのみ発現しているため、本研究の方法で作製できる抗HLAクラスIIモノクローナル抗体は、B細胞系腫瘍の有望な治療薬になり得る。なお、本研究結果を用いて下記の特許出願を行うことができた。

【参考・引用文献】

【発明者】<u>高松博幸</u>、材木義隆、中尾眞二、小澤龍彦、岸裕幸、【出願人】国立大学法人金沢大学長、国立大学法人富山大学長、【発明の名称】とト抗HLAモノクローナル抗体の作製方法。特願 2016-176718。