

# I. テーラーメイド医療に資する抗体医薬・ T細胞医薬創出のための基盤技術の開発

富山大学・大学院医学薬学研究部 免疫学講座 教授 村口 篤

## 【背景・目的】

がんの治療法として、外科的手術、放射線治療、抗ガン剤治療などが一般的である。しかし、これらの治療に効果がみられない場合、免疫システムを用いた治療（ペプチドワクチン療法、抗体医薬、免疫細胞療法など）が試みられている。免疫システムは個々の患者により異なること、さらに、がんの性質も個々の患者で様々であることから、免疫学的治療は個々の患者に応じた治療、すなわち、テーラーメイド医療として行われることが望ましい。しかし、従来、がん患者のリンパ球を使って、がんの特異的な抗体やTリンパ球を取得するためには、2~3ヶ月を要していたことから、せっかくがんの特異的な抗体やTCRが取得できても、がんが進行してしまうため、元の患者の治療に応用することは困難であった。

我々は、近年、ヒトのBリンパ球から抗原特異的ヒト抗体を1週間弱で取得するシステム（ISAAC法）（図1）（Jin A et al, 2009; Jin A et al, 2011; Kishi H et al, 2012）を開発した。さらに、最近、抗原特異的T細胞受容体（TCR）を最短10日以内に検出・取得するシステム（hTEC10法）（図2）（Kobayashi E et al, 2013; Kobayashi E et al, 2014）を開発した。それぞれの技術は、世界的に権威のある科学雑誌Nature Medicineに発表し、大きな反響を生んだ。本研究では、これらの技術の事業への応用を視野に入れながら、これらの技術をさらに最適化することにより、個々の患者に最適な抗体医薬やTCR遺伝子を短期間で、しかも確実に取得・提供できるシステムを作り出すことを目的とする。

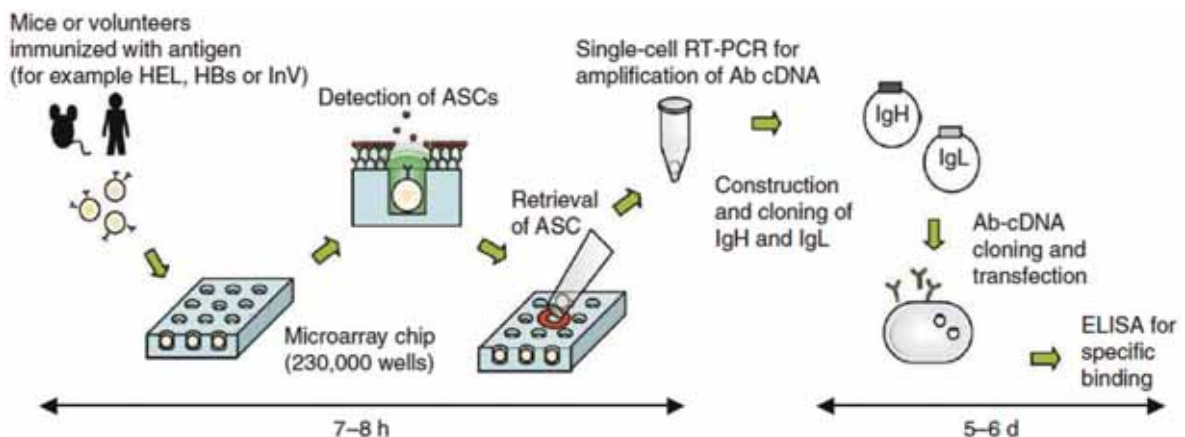


図1 ISAAC法（Jin A et al, Nature Medicine, 2009より転載）

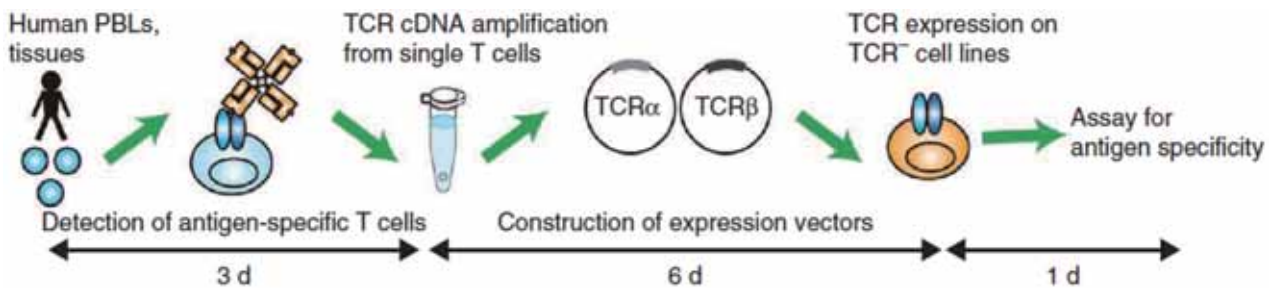


図2 hTEC10法 (Kobayashi E et al, Nature Medicine, 2013より転載)

### 【各班の概要】

村口は、ヒト末梢血T細胞を用いて、抗原ペプチドに特異的に反応し、サイトカインを産生する細胞を、細胞チップを用いて検出できることを示した。

浜名は、がん特異的 TCR を取得するために用いる hTEC10 法をさらに使いやすくするために、改良を施した。その結果、従来の hTEC10 法に較べて、さらに高率に TCR を増幅でき、取得した TCR が抗原に反応するかを、従来法では10日かかったのに比較して、改良した方法では、最短 4 日間で抗原特異性を検証できるようになった。

岸は、昨年度構築した抗原が未知の TCR の抗原を同定するためのレポータ細胞を用いて、モデルシステムで抗原が同定できる可能性を示した。

小澤は、ウサギ ISAAC システムを用いて、がんの増殖に関与する ErbB2, 特にリン酸化された ErbB2 分子に対する抗体を作製するために、ウサギを免疫し、ISAAC システムを用いてリン酸化 ErbB2 分子に対するウサギモノクローナル抗体を取得した。

### 【結論】

以上、各研究班は計画に沿って順調に成果を挙げている。本研究をさらに進めていくことで、がん患者のリンパ球から、がん治療のための TCR 遺伝子を迅速・確実に取得・作製することができるようになり、がん治療用の抗体医薬の作製も進展すると期待される。これらの医療材料を元の患者の治療に応用することができるようになれば、がんの免疫学的テーラーメイド治療が可能になると期待される。

## I - 1 T細胞 ISAAC の開発

富山大学・大学院医学薬学研究部 免疫学講座 教授 村口 篤

### 【目的】

我々が最近開発した、hTEC10法は、フローサイトメータを用いて、ペプチド刺激に反応してサイトカインを産生するTリンパ球を検出することにより、抗原ペプチド特異的Tリンパ球を検出することができる (Kobayashi E et al, 2013)。しかし、その感度は高くなく、頻度の低いウイルス等の抗原に特異的なTリンパ球はバックグラウンドノイズの中に埋もれてしまい、ヒト末梢血リンパ球中において、抗原特異的Tリンパ球を直接検出することは困難であった。そのため、抗原ペプチド特異的Tリンパ球を検出するためには、2週間程度リンパ球をウイルス等の抗原で刺激しながら培養し、抗原特異的Tリンパ球を増殖させてから、検出する必要があった。我々は、最近、予備的検討にて、Bリンパ球に応用していたISAAC法 (Jin A et al, 2009; Jin A et al, 2011; Kishi H et al, 2012) で用いた細胞チップをT細胞に応用すると、*in vitro*での培養を必要とせずに、ヒトより調製した末梢血Tリンパ球から直接ウイルス等の抗原に特異的なT細胞を検出できることを示唆するデータを得ている。今後、細胞チップを用いて抗原特異的T細胞を検出する方法をT細胞ISAAC法と呼ぶこととする。本研究では、hTEC10法とT細胞ISAAC法の良い点を組み合わせて、より感度の高い、抗原特異的Tリンパ球の検出する方法を確立することを目的とする。今年度は、ヒト末梢血リンパ球の中から、細胞チップを用いて、抗原特異的Tリンパ球を検出できるか検証することを目的に研究を行った。

### 【方法】

#### 1) 細胞チップ

図1に示すように、ちょうどリンパ球が1個入る大きさ・形状の微小ウェルが規則正しく約4.5万个から23万个、1×2cm四方の範囲に配置されたチップ (マイクロウェルアレイチップ) を用いた。

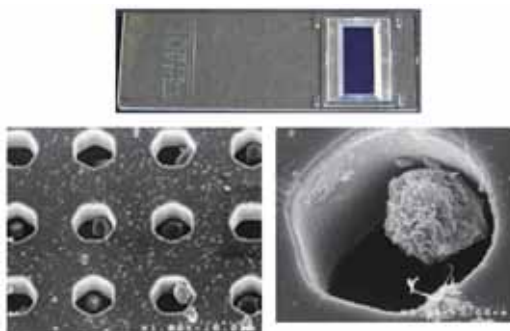


図1 マイクロウェルアレイチップ

(上) マイクロウェルアレイチップの全体像。

(下左) 拡大したマイクロウェルの電子顕微鏡像。

(下右) 1リンパ球が1ウェルに入っている電子顕微鏡像。

## 2) ヒト末梢血リンパ球由来 T 細胞

ポジティブコントロールとして、これまでに EB ウイルスの BRLF-1 由来 T 細胞の存在をフローサイトメトリーにて確認している HLA-A24 陽性の健常人ボランティア B の末梢血リンパ球を用いた。末梢血リンパ球は、ヒト CD8+ T リンパ球分離キット (EasySep, Stemcell 社) 用いて CD8 陽性 T 細胞を分離し、T 細胞 ISAAC に用いた。

## 3) T 細胞-ISAAC

細胞チップの表面にヒト IFN- $\gamma$  特異的抗体をコートし、その後、余分なタンパク質が非特異的に結合しないようにブロッキングを施した。このように前処理した細胞チップに、生きたヒト末梢血由来 CD8 陽性 T 細胞を播種し、ウェルに入らなかった余分な細胞を洗い去り、生きた T 細胞を各ウェルに 1 個ずつ配置させた。その後、チップ上に抗原である BRLF-1 由来ペプチドを加え、約 6 時間培養した。この 6 時間の間に T 細胞が抗原で刺激され、IFN- $\gamma$  を分泌する。分泌された IFN- $\gamma$  はウェルからチップ表面へ拡散していき、チップ表面にコートされた IFN- $\gamma$  特異的抗体にトラップされる。次に、蛍光標識した別の IFN- $\gamma$  特異的抗体を加え、チップ表面にトラップされている IFN- $\gamma$  に結合させた。その蛍光標識 IFN- $\gamma$  特異的抗体の結合を蛍光顕微鏡で観察した。

## 【結果と考察】

### 1) T 細胞 ISAAC 法による BRLF-1 特異的 T 細胞の検出

健常人ボランティア B の末梢血リンパ球より分離した CD8 陽性 T 細胞を、IFN- $\gamma$  特異的抗体をコートしたマイクロウェルアレイチップに播種した。次に、チップ上の細胞に EB ウイルス由来 BRLF-1 ペプチドあるいは LMP2 ペプチドを添加し、6 時間培養した。培養後、IFN- $\gamma$  を分泌した細胞のスポットを、蛍光顕微鏡を用いて観察した。図 2 に示すように、未刺激あるいは LMP2 ペプチドによる刺激では IFN- $\gamma$  分泌のスポットは観察されなかった。一方、BRLF-1 ペプチドで刺激した細胞では IFN- $\gamma$

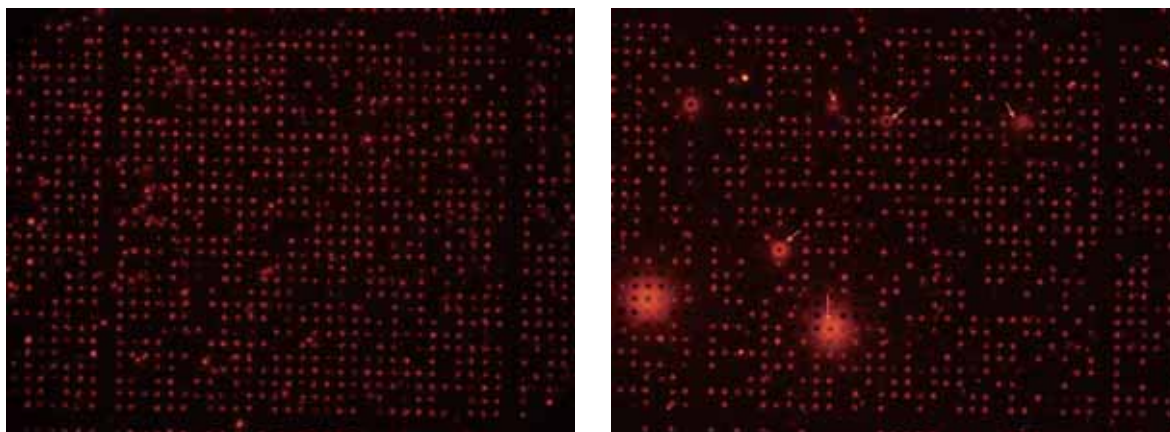


図 2 抗原に応答してサイトカインを分泌するヒト T リンパ球の、T 細胞 ISAAC 法を用いた検出。  
左：LMP2 ペプチド刺激。右：BRLF-1 ペプチド刺激。

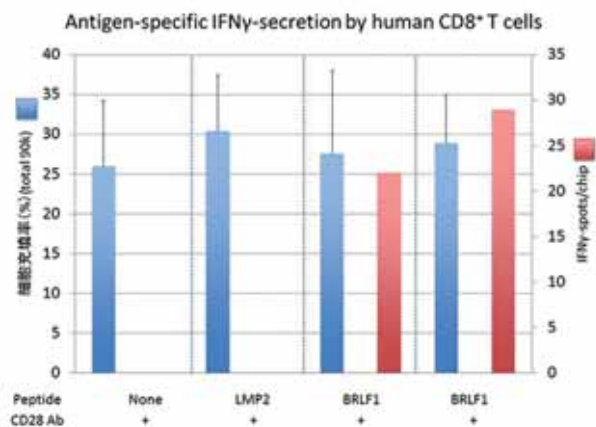


図3 抗原特異的サイトカイン分泌ヒト T 細胞の T 細胞 ISAAC 法による検出

マイクロウェルアレイチップ上に播種したヒト CD8+ T 細胞を LMP2 ペプチドあるいは BRLF-1 ペプチドで刺激し、IFN- $\gamma$  分泌のスポットを観察・計数した。

青色カラム：細胞充填率。赤色カラム：IFN- $\gamma$  分泌スポット数。

分泌のスポットが観察された。スポットを計数した結果を図3に示す。これまでに、ペプチド/HLA-A24分子複合体のテトラマーを用いて、フローサイトメトリーにて解析した結果では、健常人ボランティア B の CD8 陽性 T 細胞では、BRLF-1 特異的 T 細胞は検出されたが、LMP2 特異的 T 細胞は検出されていなかった。したがって、T 細胞 ISAAC を用いて抗原特異的 T 細胞を検出した結果と、フローサイトメトリーを使って抗原特異的 T 細胞を検出した結果は、同様であることがわかった。

### 【結論と今後の展望】

以上の結果より、ヒト T リンパ球を用いて、抗原に特異的に反応する CD8 陽性 T 細胞を、T 細胞 ISAAC 法にて検出できることが明らかになった。

フローサイトメータを用いたサイトカイン分泌細胞の検出では、バックグラウンドノイズが観察され、抗原ペプチドに反応する細胞の頻度が低い場合、特異的なシグナルがバックグラウンドノイズに埋もれてしまう。そのため、生体から単離したリンパ球を直接用いた解析では、抗原特異的 T 細胞をフローサイトメトリーを用いて検出することは困難であり、抗原特異的 T 細胞をフローサイトメトリーを用いて検出するためには、T 細胞を2週間ほど抗原ペプチドで刺激し増殖させる必要があった。T 細胞 ISAAC 法による解析では、抗原非特異的なスポットは全く観察されなかったことから、フローサイトメータによる解析に比べて、T 細胞 ISAAC 法のバックグラウンドノイズはほとんど0に近く、存在頻度の低い抗原特異的 T 細胞も検出できる。今後は、T 細胞 ISAAC 法を用いて、抗原特異的 T 細胞を検出し、その TCR を取得することができるか、検証していく予定である。

## I - 2 がん特異的T細胞検出システムの改良

富山大学・大学院医学薬学研究部 免疫学講座 助教 浜 名 洋

### 【目的】

我々が、最近 Nature Medicine に報告した hTEC10 法は、既知の抗原ペプチドに反応する T 細胞を同定し、その T 細胞受容体 (TCR) を取得する方法である (Kobayashi E et al, 2013)。T 細胞の抗原ペプチドは、抗原提示細胞上に発現している human leukocyte antigen (HLA) 分子の上に結合して、細胞表面に提示される。現在の研究・臨床試験の主流は、既知の抗原ペプチド特異的 T 細胞を用いたがん免疫療法が主体である。

HLA 分子は多型性に富んだ分子であり、各個人により、そのアミノ酸配列 (ハプロタイプ) が異なる。特に、ペプチドが結合する部分および TCR と相互作用する部分のアミノ酸配列が異なる。その結果、ハプロタイプが異なると、HLA 分子上に結合するペプチドも異なってくる。HLA のハプロタイプは民族によっても偏りがある。その結果、日本なら日本、欧米なら欧米で多いハプロタイプに研究が偏る傾向がみられる。すなわち、日本では、HLA-A24 分子に結合するペプチドおよびそれに反応する T 細胞の解析が主であり、欧米では、HLA-A2 分子に結合するペプチドおよびそれに反応する T 細胞の解析が主である。従って、がんの免疫療法においても、HLA-A24 あるいは HLA-A2 以外のハプロタイプを持つ患者はがん免疫療法の恩恵に与ることができない。

一方で、現在、がん抗原ペプチドが特定されていないがんが多数存在し、そのようながんに反応する TCR を取得し、治療に応用したいという高いニーズがある。本研究では、hTEC10 法を改良し、抗原が未知のがんに反応する TCR を取得できるシステムを構築することを目的とする。

今年度は、TCR cDNA を増幅するための RT-PCR 法の改良、およびクローニングした TCR の抗原特異性を迅速・簡便に検証するシステムの開発を行うことを研究目的とした。

### 【方法と結果】

#### 1) TCR cDNA を増幅するための RT-PCR 法の改良

従来の hTEC10 法では、5'-RACE 法を用いて TCR cDNA の増幅を行っていたが、逆転写反応が不完全な cDNA の増幅も起きるため、それを取り除く作業が必要となり、煩雑となっていた。そこで、TCR の Leader 配列を基に作製した Primer (Leader primer) を用いた Multiplex PCR 法による TCR cDNA の増幅を検討した。primer の配列は IMGT ([www.imgt.org](http://www.imgt.org)) より取得した TCR $\alpha$  および TCR $\beta$  の Leader

配列を基に設計した。Leader primer として、ヒト TCR $\alpha$  および  $\beta$  に対して、それぞれ41種類および39種類を作成し、これら全ての primer と TCR の定常領域の primer の混合 primer を用いて単一 T 細胞の RT-PCR を行った。その結果、不完全な cDNA の増幅が無くなり、PCR 産物をダイレクトに解析することが可能となった (図 1)。マウスの TCR に関しても同様に Leader primer を作成し、TCR cDNA の増幅が単一長の PCR 産物として可能となっている。

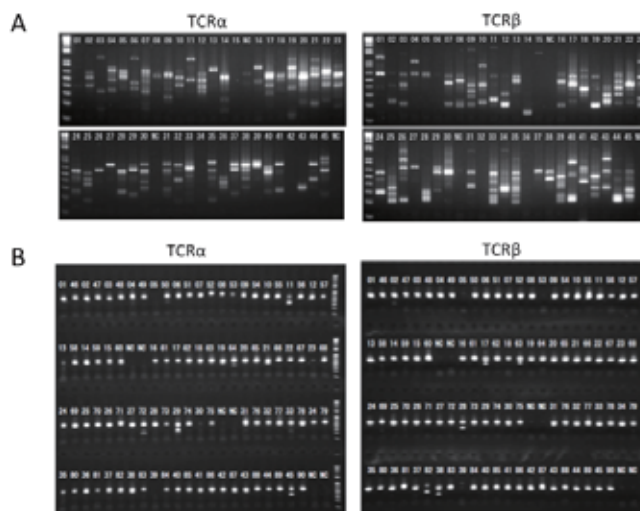


図1. ヒトTCR cDNAの増幅例

A: 従来のhTEC10の5'-RACE法により得られたPCR産物のアガロースゲル電気泳動の結果。  
 B: Leader primerを用いたMultiplex PCR法により得られたPCR産物のアガロースゲル電気泳動の結果。改良した方法では、完全なcDNAが単一バンドとして得られる。

## 2) TCR の抗原特異性を検証するシステムの開発

従来の hTEC10 法では、T 細胞株にレトロウイルスベクターを用いてクローニングした TCR 遺伝子を導入して発現させ、その抗原特異性を解析していた。レトロウイルスの作製は工程数が多く、手間と時間を要するため、より迅速で簡便に TCR の抗原特異性を検証できるシステムが必要となっていた。そこで新しい方法として、遺伝子導入が容易な HEK293T 細胞 (ヒト胎児腎由来細胞) を用いて TCR の抗原特異性を検証できるシステムを作製した。

まず、TCR の活性化をルシフェラーゼの発現誘導でアッセイ可能な 293T-Luc 細胞を作製した。この細胞は、HEK293T 細胞に NFAT-Luciferase, ヒト CD3 ( $\gamma, \delta, \epsilon, \zeta$  の 4 種類), ヒト SYK, ヒト NFAT-C2, ヒト CD8 $\alpha$ , マウス CD8 $\alpha$  およびマウス CD8 $\beta$  の遺伝子を導入した細胞である (図 2)。TCR 遺伝子の導入には Transcriptionally active PCR (TAP) で作製した TAP Fragment を用いた。TAP fragment は、5' 端に CMV の promoter, 3' 端に TK polyA 付加シグナルを PCR により付加した直鎖 DNA で、プラスミドベクターと同様に cDNA からタンパク質を発現させる事が可能である。

ヒト末梢血リンパ球より、EB ウィルス由来ペプチド BRLF-1 と HLA-A24 分子の複合体テトラマーを用い

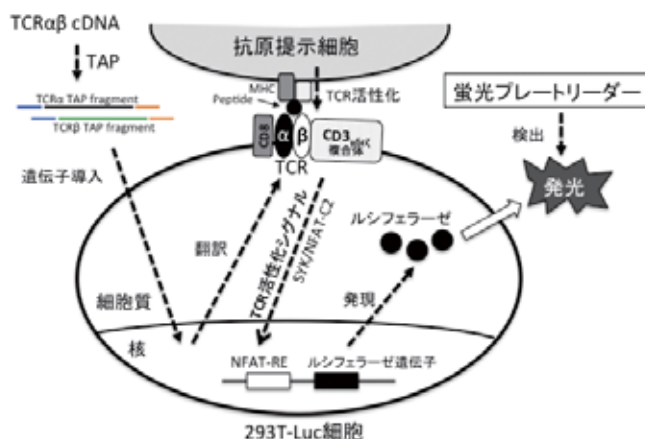


図2 293T-Luc mCD8を用いたTCRの抗原特異性の検証

TCR $\alpha$ およびTCR $\beta$ のTAP fragmentを遺伝子導入試薬で細胞にTransfectionしてTCRを発現させ、抗原提示細胞と共培養する。TCRが活性化されるとルシフェラーゼの発現が誘導され、細胞内にルシフェラーゼが産生される。細胞を溶解し基質を加え、発光を測定しTCRの活性化の有無を判定することで、TCR抗原特異性を検証する。

て回収した T 細胞より、TCR cDNA を単一細胞レベルで回収し、今回作製したシステムを用いて、取得した TCR の抗原特異性を検証した。

その結果、図 3 に示すように、抗原特異的な反応が観察された。また、メラノーマ関連抗原 TRP2 ペプチドで刺激したマウスの脾臓リンパ球より TCR cDNA を回収し、同様に今回作製したシステムを用いて、取得した TCR の抗原特異性を検証した。図 4 に示すように、TRP2 特異的 TCR を取得することができた。以上、TAP fragment を用いることで、TCR を発現可能な DNA を、PCR 産物から大腸菌を用いずにダイレクトに調整することが可能になり、より簡便で迅速な解析が可能となった。

### 【考察と今後の展望】

本年度は、hTEC10 の RT-PCR およびクローニングした TCR の抗原特異性を検証する方法の改良を行った。RT-PCR 法の改良により、作業の工程数が半分以下になり、一度に扱えるサンプル数は 2 倍以上になった。また、活性化されていない T 細胞からも増幅が可能となり、増幅効率の向上も認められた。そして、新たに作製した 293T-Luc 細胞と TAP fragment を用いた抗原特異性の検証システムを用いることで、迅速に（最短 4 日間）、そして簡便に抗原特異的なヒトおよびマウスの TCR 遺伝子の取得が可能となった。

今後は、複数のマウスから取得した TRP2 特異的 T 細胞から、抗原特異的な TCR 遺伝子の取得を行い、プロトコルの最適化と実用性を検証していく予定である。

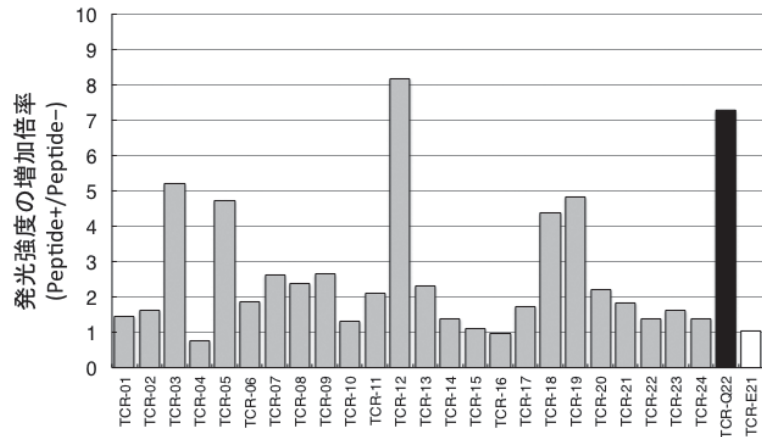


図3 ヒトTCRの抗原特異性の検証

健康人の末梢血リンパ球からEBV BRLF1 peptide/HLA-A24複合体テトラマーを用いてFACSで得たT細胞サンプルを用いて解析を行った。24個のT細胞からRT-PCRによって得られたPCR産物からTAP fragmentを作成し、293T-LucへFuGENE 6で遺伝子導入した。TCR遺伝子を導入した293T-Lucを抗原提示細胞(BRLF1 peptideをパルスしたT2-A24細胞)と共培養した後、ルシフェラーゼアッセイを行った。TCR-Q22はポジティブコントロール、TCR-E21はネガティブコントロール。発光強度の増加倍率が2以上であれば抗原特異的なTCR遺伝子が得られている。

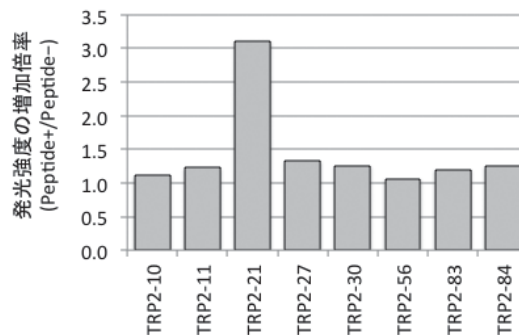


図4 マウスTCRの抗原特異性の検証

マウス脾臓細胞をメラノーマ関連抗原TRP2のpeptideで刺激後、TRP2 peptide/H2Kb複合体テトラマー陽性細胞をFACSでソーティングして得られたT細胞を用いて解析した。8個のT細胞から作製したTCRαおよびTCRβのTAP fragmentを293T LucへTransIT-293を用いて遺伝子導入し、TRP2 peptideおよびEL4細胞で刺激して、ルシフェラーゼアッセイを行った。TRP2-21がTRP2特異的なTCRであることが確認された。



# I - 3 T細胞抗原探索システムの開発

富山大学・大学院医学薬学研究部 免疫学講座 准教授 岸 裕 幸

## 【目的】

がんの免疫学的治療において、新規がん抗原の同定が喫緊の課題である。いかに良い標的を選択するかが、がんの免疫学的治療の成否を握っているからである。現在、用いられている T 細胞の抗原の同定法は非常に複雑な方法で、その時々で、トライアンドエラーで、最適な方法を探しながら行う必要がある。我々は、本研究において、非常にシンプルで確実に機能する「T 細胞抗原探索システム」を開発する。この新規システムの開発により、がん抗原をシンプルに再現性良く同定できれば、新たながんワクチンの開発やがんのテーラーメイド医療にも貢献できる。

今年度は、モデルシステムとして、EB ウイルス由来ペプチドに反応する T 細胞受容体を用い、抗原 cDNA をコントロール cDNA で希釈し、どの程度の頻度の cDNA 由来の抗原を同定できるかを検証する。

## 【方法と結果】

図1に示すように、HLA-A24 cDNA の細胞質部分を CD3 $\zeta$  鎖の細胞質部分と置換した、HLA-A24/ $\zeta$  キメラ遺伝子を作製し、TG40 細胞に遺伝子移入した細胞をレポーター細胞として使用した。

次に、BRLF-1 ペプチドを発現するレトロウイルスベクターを作製した。そのベクターを空のウイルスベクターで希釈し、1倍、10倍、100倍、1,000倍、10,000倍、100,000倍の希釈系列を作り、レポーター細胞に導入した。

導入したレポーター細胞を、BRLF-1 特異的 TCRを発現した T 細胞株と共に一晩培養し、活性化マーカー (CD137) の発現を解析した。

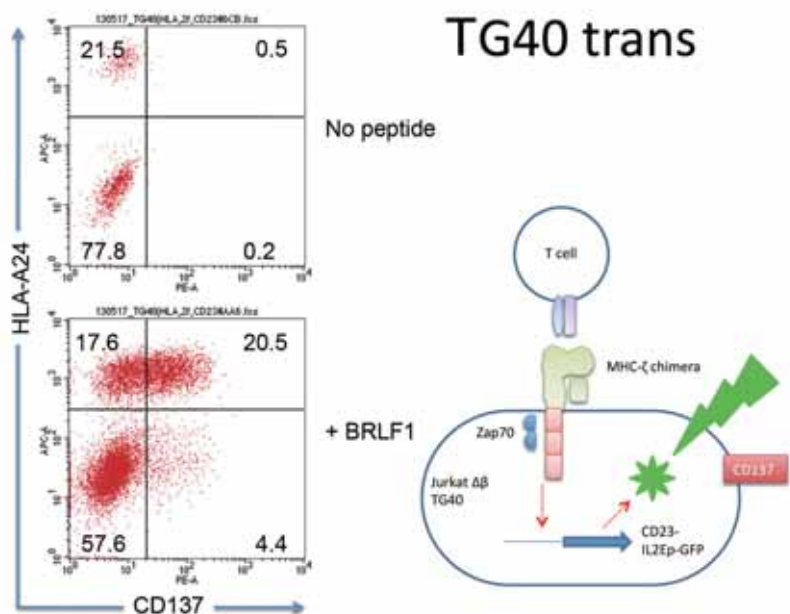


図1 抗原特異的 T 細胞によるリポーター細胞の活性化

その結果、図2に示すように、 $10^4$ 分の1の頻度で抗原ペプチド発現ベクターがレポーター細胞に導入された場合にも、CD137の発現が特異的に増強することが確認された。

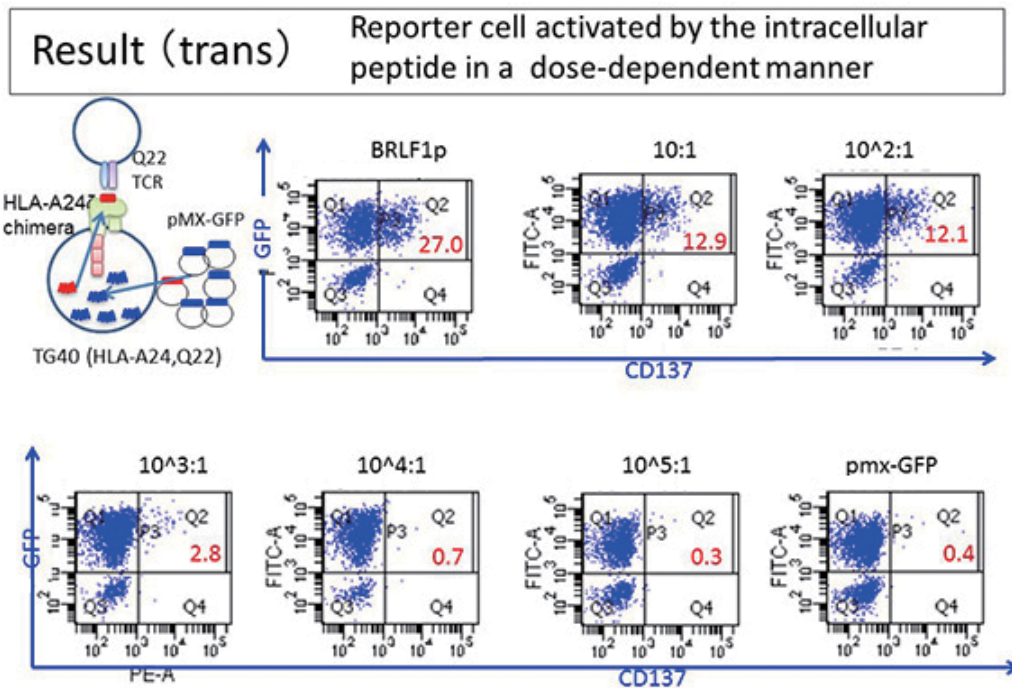


図2 抗原ペプチドベクターの希釈系列に対するレポーター細胞の反応

### 【考察と今後の展望】

実際に、cDNA発現型ライブラリーを作製して抗原のスクリーニングを行う時には、 $10^5$ 程度の独立したクローンを含むライブラリーを作製する必要があることが明らかとなった。今回の結果は、 $10^4$ 個に1個の割合で目的のクローンが存在していれば、レポーター細胞を用いて目的の抗原cDNAを検出できることを示している。従って、 $10^5$ 個のライブラリーを、 $10^4$ 個を1グループとして10グループに分け、それらを解析すれば、目的の抗原が同定できる可能性があるということであり、十分実現可能なシステムが構築できたと考えられる。

今回の結果より、作製したレポーター細胞を用いることで、ペプチド発現ライブラリーより、目的のTCRの抗原ペプチドが同定される可能性が示された。今後、実際のライブラリーを作製して、抗原cDNAが取得できるか、検証していきたい。本研究により、シンプルで信頼性の高い抗原探索システムを作製することができれば、新規がん抗原を同定し、より効果の高いがんワクチンを製造することが可能になる。さらに、個々の患者におけるがん抗原を同定することにより、がんのテーラーメイド医療にも貢献すると期待される。

## I - 4 ウサギ ISAAC を用いた抗体開発

富山大学・大学院医学薬学研究部 免疫学講座 助教 小澤 龍彦

### 【目的】

ウサギの抗体はマウスなどの抗体に較べて、抗原に非常に特異的かつ強力に結合することが知られている。がんの治療においても、がんの特異的に、かつ強力に結合する抗体の開発が必要とされている。我々は、最近、細胞チップを用いて、ウサギ由来モノクローナル抗体を迅速かつ網羅的に取得する「ウサギ ISAAC 法」を開発した (Ozawa T et al, 2012)。本研究では、「ウサギ ISAAC 法」を用いて、がん抗原に対するウサギモノクローナル抗体を作製し、その抗体を用いてがん細胞の傷害や検出法などに応用可能か検証する。

チロシンキナーゼ型受容体である ErbB2 は乳がん細胞などのがん細胞で過剰に発現し、がん細胞の増殖に関与している。そのため、ErbB2 はがん細胞に対する分子標的薬のターゲットとして注目されており、ErbB2 の活性調節機構の解明は、分子標的薬に対する感受性や耐性獲得などに関する重要な知見となる。中でも677番目のスレオニン残基 (ErbB2-Thr677) のリン酸化は、ErbB2 シグナルの下流のERK活性に関与している可能性が示唆されており、このErbB2-Thr677のリン酸化を測定することは、ErbB2 の活性評価につながる。

そこで今回我々は、ErbB2-Thr677のリン酸化を特異的に認識できるウサギモノクローナル抗体を作製し、本抗体を用いた乳がん患者の組織染色などから、がん細胞分子標的薬に対する感受性や悪性化の予測プロトコルの確立を目指す。

### 【方法】

平成26年度までに、ErbB2 由来リン酸化ペプチド (p-ErbB2pep) をウサギに免疫し、その血漿を用いた解析より p-ErbB2pep 特異的抗体が誘導されていることが示唆されていた。そのウサギ由来末梢血リンパ球を用いて ISAAC 法による ErbB2 由来リン酸化ペプチド特異的抗体産生細胞の検出を行った。ISAAC 法は Ozawa T et al, 2012 PLoS One に記載されている方法に従って行った。まず、保存していた末梢血リンパ球より、抗ウサギ IgG マイクロビーズ (ミルテニーバイオテク社) と AutoMACS Pro separator (ミルテニーバイオテク社) を用いて IgG 陽性細胞を濃縮した。リンパ球チップ (立山科学) の表面に 1 µg/ml の抗ウサギ IgG Fc抗体 (MP Biomedicals) を乗せ 4°Cで一晩インキュベーションし固相化させた。翌日リンパ球チップの表面をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、0.01%のり

ピディア（日本油脂）を乗せ、室温で1時間インキュベーションし、ブロッキングした。濃縮したIgG陽性細胞をリンパ球チップに播種し、10% FCSを含むRPMI1640培地にて37°C、5% CO<sub>2</sub>の条件下で3時間培養した。培養後、細胞チップをPBSで緩やかに洗浄し、10μg/mlの非リン酸化ErbB2由来ペプチド（ErbB2pep, オペロンバイオテクノロジーズ, 配列：EPLTPSGAMP）を加えて室温で30分インキュベーションし、ErbB2pepに結合する抗体をブロッキングした。その後PBSで軽く洗浄し、ビオチン標識したp-ErbB2pep（オペロンバイオテクノロジーズ, 配列：EPLpTPSGAMP, pTはリン酸化スレオニン）を加えて室温で30分インキュベーションした。その後PBSで軽く洗浄し、1μg/mlのCy3標識ストレプトアビジン（シグマ-アルドリッチ）を加えて室温で30分インキュベーションし、p-ErbB2pep抗体産生細胞の検出を行った。その後PBSで洗浄し、1μMのCell Trace Oregon Green（モレキュラープローブ）を加えて室温で5分インキュベートし、細胞を染色した。染色したリンパ球チップを蛍光顕微鏡（BX51WI, オリンパス）で観察し、マイクロマニピュレーター（TransferMan NK2, エッペンドルフ）を用いて細胞の回収を行った。回収した個々の細胞由来の抗体遺伝子の増幅は、Ozawa T et al, 2012 PLoS One に記載されている single-cell RT-PCR 法に従った。

### 【結果及び考察】

2.8 x 10<sup>6</sup> 個の末梢血リンパ球より9.4 x 10<sup>5</sup> 個のIgG陽性細胞を集めた。ISAAC法を用いて抗p-ErbB2pep抗体産生細胞の検出を行った結果、細胞チップに充填できたおおよそ3万個のIgG陽性細胞より50個（0.15%）の細胞でスポットが観察され、これらスポットより29個の細胞を回収した（図1）。これら細胞の抗体遺伝子の増幅を行った結果、20個の細胞より抗体遺伝子のH鎖とL鎖の両方の可変領域を得た（図2）。

### 【結論と今後の展望】

p-ErbB2-pepを免疫したウサギ由来末梢血リンパ球より、多数のp-ErbB2pep特異的スポットが観察され、これらの細胞から多くの抗体遺伝子を得る事ができた。今後この遺伝子をクローニングして抗体を作製し、抗原であるp-ErbB2pepと結合するかの検証を行う。

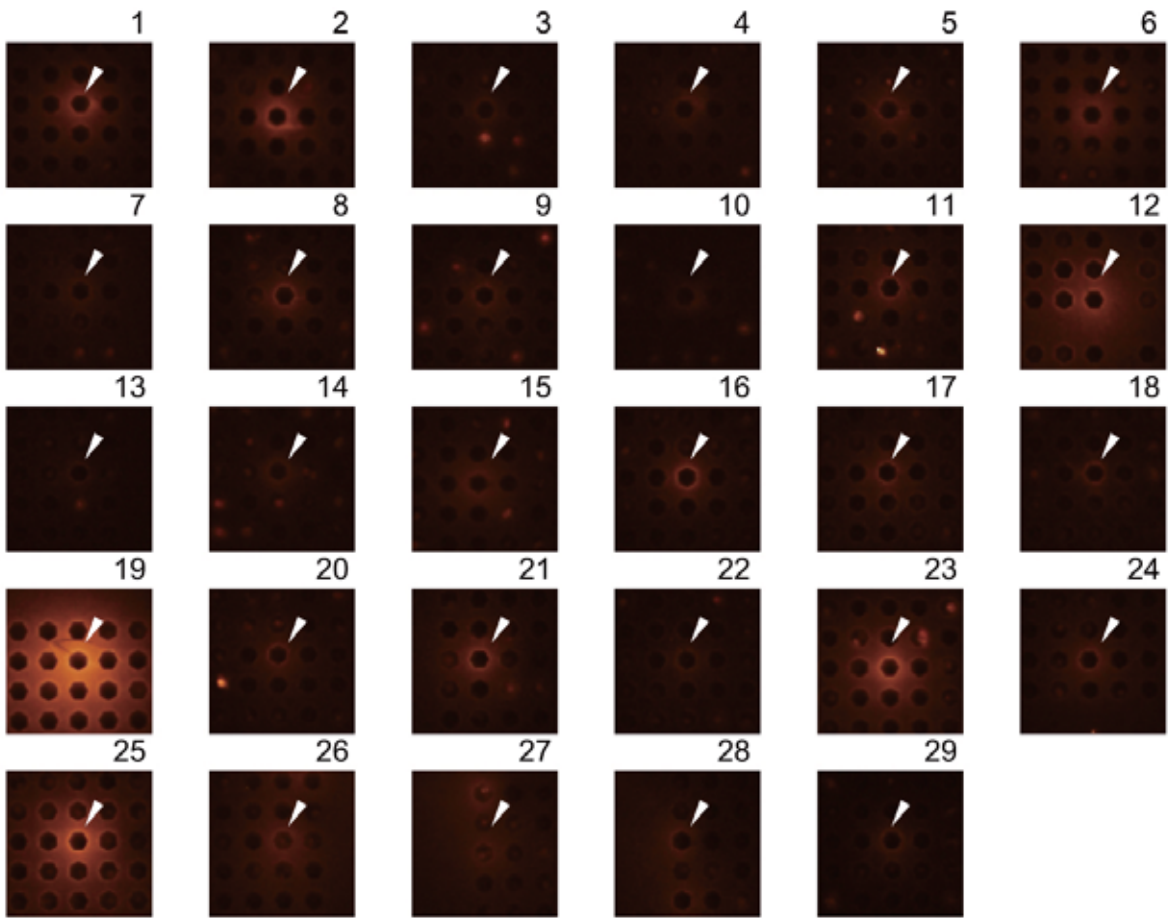


図 1 ISAAC にて検出し、細胞が回収できたスポット

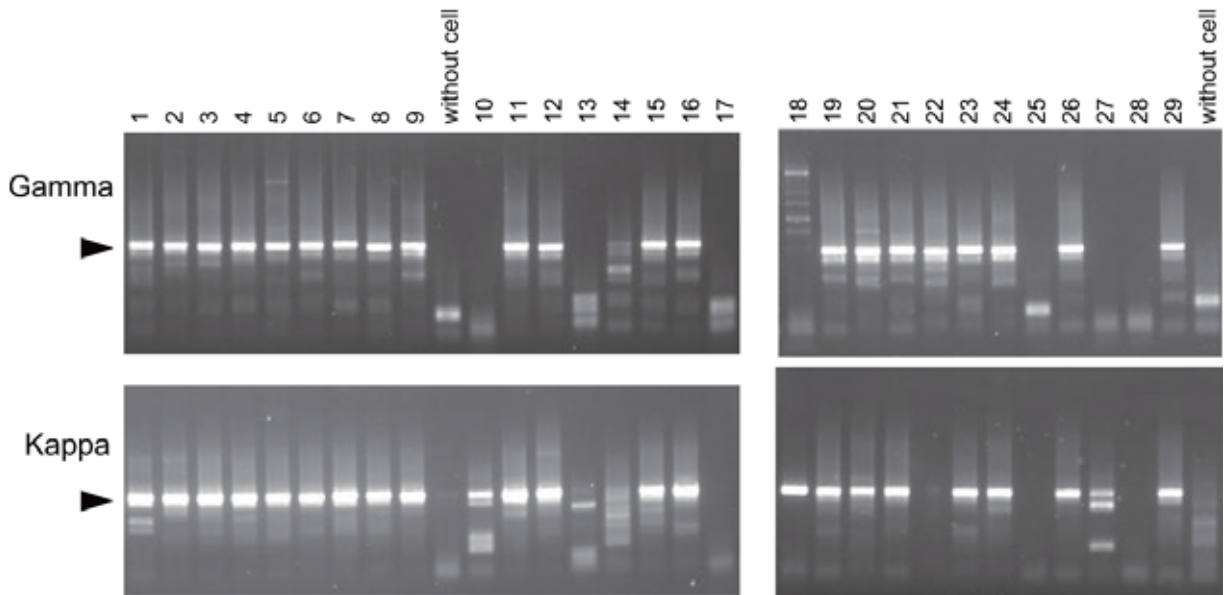


図 2 回収した細胞を用いた抗体遺伝子の増幅

## 【参考文献】

- 1 Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Kondo S., Kinoshita K., Kadowaki S., Takahashi K., Sugiyama T., \*Kishi H. and Muraguchi A. A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. *Nature Medicine*, 15:1088-1092, 2009.
- 2 Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Kishi H., Muraguchi A. Rapid isolation of antigen-specific antibody-secreting cells using a chip-based immunospot array. *Nature Protocol* 6:668-676, 2011.
- 3 Kishi H., Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Muraguchi A. Screening of antigen-specific antibody-secreting cells. *Methods Mol Biol.* 853:141-150, 2012.
- 4 Ozawa T., Piao X., Kobayashi E., Zhou Y., Sakurai H., Andoh T., Jin A., Kishi H., Muraguchi A. A novel rabbit immunospot array assay on a chip allows for the rapid generation of rabbit monoclonal antibodies with high affinity. *PLoS One.* 7:e52383, 2012.
- 5 Kobayashi E., Mizukoshi E., Kishi H., Ozawa T., Hamana H., Nagai T., Nakagawa H., Jin A., Kaneko S., Muraguchi A. A novel cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days. *Nature Medicine*, 19:1542-1546, 2013.
- 6 Kobayashi E., Kishi H., Muraguchi A. A novel system for cloning human TCRs: Cutting short the way to TCR-based anticancer therapy. *Oncoimmunology.* 3:e27258, 2014.
- 7 Kobayashi E., Kishi H.\*, Ozawa T., Horii M., Hamana H., Nagai T., Muraguchi A. Retroviral vectors for homologous recombination provide efficient cloning and expression in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 444: 319-324, 2014.
- 8 Mou Z, Li J, Boussoffara T, Kishi H, Hamana H, Ezzati P, Hu C, Yi W, Liu D, Khadem F, Okwor I, Jia P, Shitaoka K, Wang S, Ndao M, Petersen C, Chen J, Rafati S, Louzir H, Muraguchi A, Wilkins JA, Uzonna JE. Identification of broadly conserved cross-species protective Leishmania antigen and its responding CD4<sup>+</sup> T cells. *Science Translational Medicine.* 7: pp. 310ra167, 2015.