

氏名	林 卓 馬
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲 第 1157 号
学位授与の日付	平成30年 3 月11日
学位論文題名	Phage display法を用いた多中心性骨肉腫細胞に対する抗体単離 ー新しいハイスループット法を用いてー
指導教授	山 田 治 基
論文審査委員	主査 教授 原 田 信 広
	副査 教授 寺 田 信 樹
	教授 守 瀬 善 一

論文内容の要旨

【緒言】

骨肉腫の亜型に肺転移に先行して多発骨病巣を有するものがあり、多中心性骨肉腫 (Human multicentric osteosarcoma : HMOS) と呼ばれている。HMOSの病態はいまだに不明な点が多いが、非常に強い骨親和性による特殊な多発骨転移であるとされている。以前我々は、HMOSの1例を経験し、多中心性骨肉腫の先行病変株(HMOS-A)および後発病変株(HMOS-P)を樹立したことを報告した。一方、細胞表面抗原を網羅的にスクリーニングする方法としてPhage display法がある。Phage display法は 1×10^{11} 種類のクローンからなる完全ヒト型の抗体を用いて特定の抗原や未知の抗原に対する抗体単離が可能である。しかし、1種類の細胞のスクリーニングで数百種類の抗体が得られるため、それらを一一つ解析するには膨大な労力を必要とする。今回我々は、HMOS-P細胞株に対して、Phage display法を用いて網羅的なスクリーニングを行い、得られた抗体の反応性をCellular ELISA法を用いて簡便に定量化する方法を考案し、HMOS細胞に特異的な抗体を選別したため報告する。

【方法】

HMOS-P細胞株に対してPhage display法を用いて網羅的スクリーニングを行った結果、95種類の抗体が得られた。その抗体をCellular ELISAで定量化を行い、蛍光強度が10,000 a.u.以上を強陽性と判定した。強陽性となった抗体はNo.10, 12, 17, 19, 43, 77の6種類であった。この6種類の抗体をHMOS-AとHMOS-P及び市販の骨肉腫細胞株MNNG-HOS、MG63、Saos 2 に反応させて、Cellular ELISAとFlow cytometryで解析した。そしてCellular ELISAで定量した蛍光強度(Median)とFlow cytometryの蛍光強度(Geo Mean)の相関性をSpearmanの順位相関係数で調べた。また、前述の6種類の抗体を用いて、HMOS-Pと当科で採取した骨肉腫の組織切片に対して組織染色を行った。さらに、HMOS-A, HMOS-P,

MNNG-HOSに対してRNA microarrayを施行し、mRNAの発現について解析した。

【結果】

Cellular ELISAではNo.12, 17, 19, 77の抗体がHMOS細胞株に対してのみ強陽性となった。Flow cytometryでも、ELISAと同様にNo.12,17,19,77の抗体がHMOS細胞株に対して反応が強く、骨肉腫細胞株に対しては弱かった。Cellular ELISAで定量した蛍光強度(Median)とFlow cytometryの蛍光強度(Geo Mean)の相関係数は0.898であり、非常に強い相関関係を認めた。組織染色ではHMOSの組織標本ではすべての抗体が陽性であったが、骨肉腫ではNo.10のみが陽性であった。RNA microarrayでは46種類のgeneがMNNG-HOSよりもHMOS-AおよびHMOS-Pに強く発現していた。

【考察】

我々が考案したCellular ELISA法は簡便でHigh-through putであり、反応強度を定量化できる点で新しく、Flow cytometryの結果と高い相関関係を認めており、抗体を選別するために有用と考えた。No.12, 17, 19, 77の抗体はHMOSの両細胞株で陽性であるが、一般的な骨肉腫細胞株では陰性でありHMOSに特異的な抗体と判定した。組織染色でもこれらの抗体はHMOS-Pで陽性であった。RNA microarrayでは、MNNG-HOSと比較してHMOS-AおよびHMOS-Pに共通して発現が高いGeneは46種類であり、これらの中にHMOSの病態を規定する因子が存在する可能性を考えた。

【結語】

Phage display法を用いてHMOS-Pの細胞表面抗原に対する網羅的なスクリーニングを行い、HMOSに特異的な抗体を得た。

Cellular ELISA法による抗体選別を独自の方法で行い、その結果はFlow cytometryのGeo Meanと強い相関関係を示した。

論文審査結果の要旨

多中心性骨肉腫は骨肉腫の亜型で、肺転移に先行して多発骨病変を有する稀な腫瘍である。本論文では、当大学が保有する多中心性骨肉腫の後発病変細胞株(HMOS-P)に対してPhage display法を用いて細胞表面抗原に対する網羅的なスクリーニングを行い、HMOS-Pに特異的に結合する抗体を単離した。得られた抗体の反応性を独自の工夫をしたCellular ELISA法を用いて定量化し、HMOS-P細胞株に強陽性抗体を選択した。得られた6種類の抗体を多中心性骨肉腫先行病変細胞株(HMOS-A)および市販の骨肉腫細胞株(MNNG-HOS、MG63、Saos2)に反応させて、Cellular ELISAとFlow cytometryで解析した。Cellular ELISAの結果とFlow cytometryの結果は強い相関関係を認め、Cellular ELISAで蛍光強度の定量化が可能であることを証明した。

本論文は、抗体治療薬や腫瘍の骨転移抑制への応用が期待される多中心性骨肉腫細胞株に特異的な抗体を単離し、また、Phage display法のDownstream analysisをCellular ELISAで行い、同解析法が簡便であるにもかかわらずHigh-through putである上に反応性の定量化が可能であることを明らかにしたものである。審査の結果、本論文は学位論文に十分に値するものと判断された。