

## 学位論文題名

Analysis of epitopes of mouse monoclonal antibodies  
against human alpha-fetoprotein

(ヒト AFP に対するマウスモノクローナル抗体のエピトープの解析)

## 学位論文内容の要旨

$\alpha$ -フェトプロテイン(Alpha-fetoprotein: AFP)は胎児期に肝臓、卵黄嚢で産生されるが、出生後はその産生は停止する。肝癌、卵黄嚢癌で再び産生されるため、信頼性の高い腫瘍マーカーとして臨床診断に用いられると共に基礎的な研究に広く応用されている。ヒト AFP に対する抗体、特にモノクローナル抗体は免疫測定などさまざまな研究方法に繁用されている。ヒト AFP に対するモノクローナル抗体は多数の研究室で産生されているが、しかし、それらが認識するエピトープの構造や性状は不明な点が多い。本研究では、酵母に産生させた AFP およびその各ドメインを用いて 36 種のモノクローナル抗体のドメイン局在を検討した。また合成ペプチドを用いてエピトープの同定を検討した。

## 材料と方法

1. マウス抗ヒト AFP モノクローナル抗体: AFY1-AFY6 の 6 種は当研究室作成した。残りの 30 種は ISOBM (International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine) の TD-2 AFP Workshop に寄託されたものである。
2. 発現プラスミドの作製: PCR 法により AFP と各ドメイン或いは連続ドメインをコードする cDNA を作成し、酵母発現ベクター pNW033 に挿入した。
3. リコンビナント AFP タンパクの発現: 作製したプラスミドを酵母細胞 20B12KR16 にアルカリ金属法で導入した。この系ではリコンビナントタンパクは細胞外へ分泌される。形質転換コロニーを SD 選択培地で増殖させた後、YPD で二日間培養し、培養上清を回収した。リコンビナント AFP の産生は放射免疫測定方法で確認した。得られたリコンビナント AFP タンパクの抗原特性は Western blotting とゲル内二重免疫拡散法で検討した。
4. ELISA: 96 well plate に各抗体を固定し、リコンビナント AFP タンパクを含む培養液を反応させた。これにウサギ抗ヒト AFP 血清を反応させたのち、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体を用いて結合した抗体を検出した。
5. ペプチド合成及びピン ELISA: マルチピンペプチド合成法により、連続した重複ペプチドを合成した後、ピン ELISA でペプチドエピトープに対する抗体の結合活性を調

べた。

## 結 果

1. AFP 全分子(ドメイン 1-2-3), AFP の各ドメイン 1, 2, 3 及び連続した2個のドメイン 1-2, 2-3 に対応する6の発現プラスミド pNWHAFP, pNWH1, pNWH2, pNWH3, pNWH12, pNWH23 を作製した。酵母に導入すると、リコンビナントタンパク YH, H1, H12, H23, H3 は発現したが、H2 は発現しなかった。Western blotting では、H3 は予想分子量より小さかったが、他のリコンビナントタンパクは予想される移動度を示した。これらリコンビナントタンパクを用いて、ELISA により抗体エピトープの存在ドメインを検討した。13 種の抗体はヒト AFP(YH)の他、H1, H12 と強く反応したが、H23 と H3 と反応しなかった。これら抗体認識するエピトープはドメイン1に存在すると考えられた。17 種の抗体は YH, H3 と強く反応したが、そのうち 16 種は H23 にも反応する事から、これら抗体認識するエピトープはドメイン3に存在すると考えられた。残りの6種の抗体エピトープは特定できなかった。しかし、これらのうち、ISOBM-112 については Abelev らの報告と合わせて考えるとドメイン3に存在すると思われる。また、ISOBM-93 と ISOBM-98 については、Taketa らは糖鎖に関連すると報告しており、エピトープは糖鎖が存在するドメイン2にあると思われる。

2. 抗 AFP 血清を用いたゲル内二重拡散免疫法では、H1 と H12 の間では沈降線が完全に融合して、抗原性の違いは認められないので、ドメイン2の抗原活性は低いと考えられる。H3 と H23 の間抗原性の差異を認めたが、H3 の分子量が計算値より小さく、また不均一であり、その分解が考えられたので、本質的なものでないと思われた。なお、36 種の抗体のうちエピトープが確実に同定出来た 30 種のエピトープの存在ドメインはすべてドメイン1かあるいはドメイン3であった。AFP の抗原活性は主にドメイン1とドメイン3が担っていると考えられる。

3. 合成オクタペプチドに対するモノクローナル抗体の反応性を検討した。AFY6 以外の抗体はいずれもが有意な反応をしなかった。AFY6 はオクタペプチド C<sup>175</sup>KAENAVE<sup>182</sup> と強く反応した。この反応は AFP によって阻害された。C<sup>175</sup>KAENAVE<sup>182</sup> 中心にさまざまなペプチドを合成し、AFY6 抗体との反応性を調べた結果、エピトープはアミノ酸配列 A<sup>177</sup>ENAVE<sup>182</sup> が基本活性に必要であり、上記のオクタペプチドで十分な活性を示した。

## 結 論

1. リコンビナント AFP プロテインを用いた実験より、36 種のマウス抗ヒト AFP モノクローナル抗体のエピトープうち、13 種のエピトープはドメイン1に、17 種のエピトープはドメイン3に存在する事を明らかにした。ヒト AFP のエピトープの多くがドメイン1とドメイン3に存在し、ドメイン2の抗原活性は低いものと思われ。

2. AFY6 が認識するエピトープは合成ペプチドを用いた実験より、ドメイン1に存在する、C<sup>175</sup>KAENAVE<sup>182</sup> のオクタペプチドに存在することが明らかになった。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦  
副 査 教 授 西 信 三  
副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

## Analysis of epitopes of mouse monoclonal antibodies against human alpha-fetoprotein

(ヒト AFP に対するマウスモノクローナル抗体のエピトープの解析)

アルファフェトプロテイン (AFP) は胎児期に肝臓、卵黄嚢で産生されるが、出生後はその産生が停止する。しかし、肝癌、卵黄嚢癌で産生されるため、信頼性の高い腫瘍マーカーとして臨床診断に用いられると共に基礎的な癌研究に広く応用されている。しかし、AFPの詳細な構造や生物学的活性にはなお不明な点が多い。AFPに対するモノクローナル抗体はそれらの研究のまた抗原構造の解析の重要な手段である。

申請者は、本研究で36モノクローナル抗体のエピトープの局在をリコンビナントAFPドメインを作製し検討した。また合成ペプチドを用いて抗体のエピトープを同定した。AFP分子全体(ドメイン1-2-3: YH), AFPの各ドメイン(1: H1, 2: H2, 3: H3)及び連続した2個のドメイン(1-2: H12, 2-3: H23)に対応する6個の酵母発現分泌プラスミド pNWHAFP, pNWH1, pNWH2, pNWH3, pNWH12, pNWH23を作製した。プラスミドを酵母細胞20B12KR16にアルカリ金属法で導入した。形質転換コロニーをSD選択培地で増殖させた後、YPDで二日間培養した。リコンビナントAFPの産生は培養上清の放射免疫測定方法で確認した。リコンビナントタンパクYH, H1, H12, H23, H3は発現したが、H2は発現しなかった。得られたリコンビナントAFPタンパクを部分精製しその性状を検討した。Western blottingでは、H3は予想分子量より小さかったが、他のリコンビナントタンパクは予想される移動度を示した。抗AFPポリクローナル血清を用いたゲル内二重拡散免疫法ではドメイン1とドメイン3はそれぞれ特異な抗原性を有する事またドメイン2の抗原性は低いとの結果が得られた。

96孔プラスチックマイクロタイタープレートを用いる酵素免疫測定法(ELISA)によりモノクローナル抗体のドメイン局在を検討した。固相に吸着させ各リコンビナントAFPにモノクローナル抗体を反応させ次いでペルオキシンダーゼ結合抗マウスIgG抗体を反応させた。結合した抗体量は酵素活性より求めた。13抗体はYHの他、H1, H12と強く反応したが、H23とH3と反応しなかった。これら抗体認識するエピトープはドメイン1に存在すると考えられた。17抗

体は YH, H23, H3 と反応しその認識するエピトープはドメイン3に存在すると考えられた。しかし6抗体エピトープは特定できなかった。エピトープが確実に同定出来た30抗体のエピトープはドメイン1かドメイン3であり、AFP の抗原活性へのドメイン2の寄与は低いと考えられる。

また、マルチピンペプチド合成法により、ドメイン1に属する8個のアミノ酸から成る87ペプチドを合成した。固相に結合させたペプチドへの各抗体の反応性を ELISA で検討した。ある1種 (AFY6) 以外の抗体はいずれもが有意な反応をしなかった。AFY6 はオクタペプチド C<sup>175</sup>KAENAVE<sup>182</sup> と強く反応した。この反応は AFP で阻害された。C<sup>175</sup>KAENAVE<sup>182</sup> 中心にさまざまな19ペプチドを合成し、AFY6 抗体との反応性を調べた。エピトープはアミノ酸配列 A<sup>177</sup>ENAVE<sup>182</sup> が基本活性に必要であり、かつ、上記のオクタペプチドで最大の活性を示した。

今回、当教室の6抗体および世界の12研究室から提供された30抗体をリコンビナントタンパクで検討し29抗体のエピトープドメインを同定した。また、合成ペプチドを用いAFY6抗体のエピトープがアミノ酸175-182にあることを明らかにし、競合反応などによるエピトープのさらなる局在化を可能にした。

今回の研究はリコンビナントAFP断片化ドメインの作製の初めての報告であり、AFPの機能の局在などに応用可能であろう。

口頭発表に当たって、副査石橋輝雄教授よりリコンビナントタンパクの化学的性状、抗原活性及びエピトープドメインの同定の方法論について質問があった。また主査小林邦彦教授よりドメイン2の抗原性が低い理由、合成ペプチドを用いる方法の利点と限界及び幾つかの抗体のエピトープを同定しえなかった理由について質問があった。申請者は概ね妥当な回答をしたが、その場で答えられない部分に対しては後日文書で回答し、その内容もまた概ね妥当であった。

審査員一同は、これらの成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるに資格を有するものと判定した。