

単クローン抗体による
癌トロホブラスト抗原の検討

(研究課題番号：62570739)

平成元年度科学研究費補助金(一般研究C)
研究成果報告書

平成 2 年 3 月

研究代表者 林 博 章
(旭川医科大学医学部講師)

腫瘍マーカーの開発は、悪性腫瘍の診断、臨床経過の観察、および再発の早期診断に計り知れない恩恵を与えてきた。しかし、絨毛細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体は、未だ不十分である。

そこで、我々の作製した絨毛細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いて悪性腫瘍の組織別分布、および臨床応用への可能性を検討する。

研究組織

研究代表者：林 博章（旭川医科大学医学部産婦講師）
研究分担者：千石一雄（旭川医科大学医学部産婦人科講師）
玉手健一（旭川医科大学医学部助手）

研究経費

昭和62年度	900千円
昭和63年度	800千円
平成元年度	200千円
計	1,900千円

学会発表

イ. 学会誌等

- (1) 山下幸紀：モノクローナル抗体による癌・トロホブラスト抗原の検討、日本産科婦人科学会雑誌、39、8、1230-1240、1987.
- (2) 井上亮一：単クローン抗体により検出される絨毛連抗原のヒト癌組織における発現の分布、日本産科婦人科学会雑誌、40、12、1837-1843、1988
- (3) 卵巣腫瘍におけるras癌遺伝子産物p21発現の免組織学的検討、日本産科婦人科学会雑誌、41、9、1409-1416、1989.

ロ. 口頭発表

- (1) 山下幸紀：モノクローナル抗体による癌・トロホブラスト抗原の検討、第39回日本産科婦人科学会シンポジウム、東京、1987.
- (2) 柳沼裕二、山下幸紀、清水哲也：婦人科腫瘍における悪性腫瘍の癌遺伝子の発現について、第39回日本産科婦人科学会、東京、1987.
- (3) 井上亮一、中村隆文、柳沼裕二、前田康子、山下幸紀、清水哲也：単クローン抗体により検出される絨毛癌関連

抗原のヒト癌組織における発現の分布、第39回日本産科婦人科学会、東京、1987.

- (4) 前田康子、井上亮一、中村隆文、山下幸紀、清水哲也：絨毛(癌)抗原の正常絨毛、胞状奇胎、絨毛癌における発現について、第39回日本産科婦人科学会、東京、1987.
- (5) 林 博章、藤井哲哉、柳沼裕二、萬 豊、葛巻 山、山下幸紀、清水哲也：MTX耐性獲得による細胞表面抗の変化、第40回日本産科婦人科学会、大阪、1988.
- (6) 西村恒則、林 博章、柳沼裕二、萬 豊、山下幸紀、清水哲也：胎盤構成細胞上のHLA抗原および癌・トロホブラスト抗原の発現誘発。第40回日本産科婦人科学会、大阪、1988.
- (7) 柳沼裕二、林 博章、安部政彦、木村広幸、石川睦男、藤田昌弘、山下幸紀、清水哲也：子宮体部病変におけるras癌遺伝子産物p21発現の検討、第39回日本産科婦人科学会、東京、1989.

研究成果

1. 研究目的

細胞の癌化は、正常な分化の異常あるいは逆方向への進行と見なすことが可能である。この点を示唆する一つとして、ある種の癌細胞にみられる癌化による膜抗原のトロホブラスト抗原への変化を挙げるができる。我々はトロホブラスト抗原を検索するために単クローン抗体の作製を試みてきたが、その内いくつかのものがトロホブラストあるいは絨毛癌以外の腫瘍とも特異的に反応することが明らかとなった。これらの単クローン抗体のうちのどれが癌トロホブラスト抗原を検出していると考えられ、それらがどの悪性腫瘍に特異的に存在し、またそれらが患者血液中で検出可能か否か、さらにそれらを検出する単クローン抗体が腫瘍に集積するか否かを検討することで臨床応用への可能性を検討する。

2. 研究成績

(1) 癌・トロホブラスト抗原に対する単クローン抗体の作製

絨毛癌細胞(BeWo, NUC-1, Jar) 1×10^7 個をそれぞれ免疫原としてBALB/cマウスを免疫(1回/週 \times 3、腹腔内投与)し、その脾臓細胞 1×10^8 個とマウスミエローマ細胞 1×10^7 個を、45%polyethylen-glycol 4000の存在下で、Köhler and Milsteinの方法に準じて融合させた。HAT培地でハイブリドーマを培養し、目的とするハイブリドーマを選択するために、クローニングを限界希釈法によるcellular radioimmune assay(CRIA), およびenzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)により繰り返した。その結果、単クローン抗体TM7-3, TM3-8, TM5-1, TM8-13, TM4-5 およびTM3-3が得られ

た。

(資料1)

(2) 単クローン抗体の培養細胞における反応性
検索した絨毛癌細胞株と陽性反応を示した。

上皮性腫瘍細胞株では、HeLaがTM8-13以外のすべての単クローン抗体と反応した。肺癌由来のLuci6は、8株中5株で陽性であった。単クローン抗体の側からみると、TM5-1は、1/6株、TM7-3および3-8は、2/7株に陽性反応がみられた。非上皮性腫瘍細胞株では、巨細胞腫由来のG-1が、今回取り上げた8種類の単クローン抗体すべてと反応した。また、悪性黒色腫由来のMurawskiもTM7-3およびTM3-8以外の単クローン抗体すべてと陽性反応を示した。一方T-リンパ球は、すべての単クローン抗体で陰性、B-リンパ球も、TM4-5およびTM3-3以外の単クローン抗体に陰性であった。

(資料1)

(3) 単クローン抗体の正常および絨毛性疾患における反応性
妊娠各期、絨毛性疾患の絨毛細胞表面の抗原を免疫組織学的方法およびflow cytometryで測定した。

(イ) flow cytometryで測定した結果：妊娠各期の絨毛ではいずれの時期でも反応する細胞が存在したが全体の細胞に対する陽性細胞の割合は妊娠が進むに連れて減少した。胞状奇胎でも陽性細胞が認められた。

以上より、(i) 絨毛癌に特異的な単クローン抗体と反応する抗原は、正常絨毛、胞状奇胎、絨毛癌のいずれにも存在した。(ii) 正常絨毛の抗原量には、妊娠期による差は、認められなかった。(iii) 抗原量は、絨毛癌で増加する傾向が観察された。

(ロ) 免疫組織学的検討：正常妊娠絨毛細胞に対するTM5-1の反応性は、syncytiotrophoblastに一致して強く発現を認めた。TM7-3、3-8のそれは、cytotrophoblastに非常に弱く観察された。TM8-13のそれは、妊娠初期のsyncytiotrophoblastに認められ微量であった。また、non-villus trophoblastの一部に認められた。これらの単クローン抗体で認識される抗原は、Interferon処理で発現亢進されなかった。

(4) 単クローン抗体の正常組織における反応性

2例の成人と2例の胎児の各種臓器組織(16種)について酵素抗体法による抗原の発現を検討した。その結果、成人臓器と胎児臓器における反応性は、全く同一パターンを示した。その反応分布は腎尿細管の一部と膵臓膵管上皮に観察された。

(資料2)

(5) 単クローン抗体のヒト悪性細胞における反応性

悪性腫瘍(絨毛癌 2、子宮癌 26、卵巣癌 22、腎癌 6)と良性腫瘍(子宮筋腫 8、卵巣腫瘍 8)を対象とした。その結

果、(i) 子宮頸癌のうち扁平上皮癌と反応せず、(ii) 子宮内膜癌は、分化度に関連して高分化腺癌に認められる傾向を示した。(iii) 卵巣癌、特に非ムチン性上皮癌に反応した。(iv) TM7-3, TM3-8の悪性腫瘍組織での両抗体の反応性は、同様のパターンを示した。
(資料3)

(6) 単クローン抗体に反応する抗原の血中での同定および腫瘍組織への集積性

6-8週齢のヌードマウス皮下に、 1×10^7 BeWo細胞を移植し 1×1 cm程度に増大したころ、クロラミンT法で 131 Iを標識した単クローン抗体(50μ Ci)を尾静脈から注射し、3日目から連日6日目までガンマカメラにてマウスを撮影し、シンチグラフィを行なった。また、 125 I標識した単クローン抗体を移植されたヌードマウス尾静脈へ注射し3-4日後に屠殺し全身オートラジオグラフィを施行した。3日目から腫瘍部位に明らかなhot areaが認められた。また、摘出組織の測定値においても選択的な集積が観察された。これらの結果は、全身オートラジオグラフィの写真上でも確認できた。
(資料4)

(7) 多剤耐性獲得に伴う膜抗原変化

P-glycoproteinと多剤耐性獲得化現象の関係が注目されている。そこで、婦人科培養細胞株から各種抗癌剤耐性株を分離し、P-glycoproteinの抗原レベルおよびその耐性克服を試みた。Kuramochiよりcisplatin耐性株(K-cis)、BeWo, SCH, よりMethotrxate耐性株(B-R, S-R)、cisplatin耐性株(B-cis, S-cis)、VP1623耐性株(B-V, S-V)を樹立した。各種抗癌剤の感受性はMTT assayを用いて行なった。P-glycoproteinに対する抗体(鶴尾博士より分与)とTM5-1抗体を第一抗体としてflow cytometryを施行した。C a拮抗剤verapamileとr-gultamiylcysteine synthetaseの阻害剤buthioine sulfoxim(BSO)を各抗癌剤と併用添加した。

樹立した耐性株は、IC50の比較からK-cis;約10倍、B-R;約100倍B-cis;約20倍、B-V;約25倍、の耐性を獲得している。またBeWoとSCHは、同様の耐性の程度であった。TM5-1抗体に対する抗原は、KuramochiがCDDP耐性獲得にともない、明らかにその発現が増加するこよみとめたが、逆にBeWoでは、その発現は減少した。BeWoのP-glycoproteinの発現は、B-R、B-cis、B-Vにおいては数%の高輝度細胞が認められたが、平均強度、peak channelに変化はなかった。

CDDP0.001-100 μ M, BSO50-100 μ M 併用添加下が、殺細胞効果に差は観察されなかった。

今回、樹立した抗癌剤耐性細胞株は、耐性獲得とP-glycoprotein発現に関係が認められなかった。