



Title	ヒト肺小細胞癌関連抗原に対するモノクローナル抗体の作製と、その認識する抗原の性状
Author(s)	井上, 保
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36837
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	井 上 保
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8783 号
学位授与の日付	平成元年7月5日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	ヒト肺小細胞癌関連抗原に対するモノクローナル抗体の作製と、その認識する抗原の性状
論文審査委員	(主査) 教授 大河内寿一 (副査) 教授 岸本 進 教授 濱岡 利之

論文内容の要旨

(目的)

ヒト肺小細胞癌は化学療法・放射線療法に高い感受性を示す一方、早期に再発・転移を生じるため極めて予後の悪い癌の一つである。化学療法・放射線療法後に残存する癌細胞を他の有効な治療法でさらに減少させることができれば肺小細胞癌の予後は飛躍的に改善するものと期待される。種々のマクロファージ活性化物質を用いた非特異的癌免疫療法や interleukin 2 (IL-2) を用いた lymphokine-activated killer (LAK) 療法が数多く試みられているが、当初期待された程の効果は得られていない。すなわち、ヒト癌細胞の多くは活性化マクロファージや LAK 細胞に対し高い感受性を示さないと考えられる。一方、マクロファージや LAK 細胞は抗体依存性細胞傷害 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) の強力な、effector cell である。これらの effector cell に抵抗性の腫瘍に対して ADCC は強力な細胞傷害を発揮し得ることが実験的に確かめられている。近年、種々の癌に対するモノクローナル抗体 (monoclonal antibody : MoAb) が作製され、癌の診断・治療への応用に大きな期待が寄せられている。癌細胞に対し強力な ADCC を誘導し得る MoAb を併用することができれば、従来の非特異的癌免疫療法や、LAK 療法の抗腫瘍効果は飛躍的に増強される可能性がある。本研究では、ヒト肺小細胞癌に対し ADCC を誘導し得る MoAb を作製し、その特異性と認識される抗原の性状について検討した。

(方法)

1. 細胞培養株：ヒト肺腺癌 (A549, PC9)，ヒト肺扁平上皮癌 (QG56)，ヒト肺巨細胞癌 (Lu65, Lu99)，ヒトT細胞白血病細胞 (CEM)，ヒト骨髓性白血病細胞 (HL60)，ヒト肺腺維芽細胞

(OS-Lu99), ヒトT細胞白血病細胞(CEM), ヒト骨髓性白血病細胞(HL60), ヒト肺腺維芽細胞(OS-1F), ヒト神經芽細胞腫(IMR32, NB1), ヒト肺小細胞癌(H69, N231, N857)および大阪大学医学部第三内科で樹立したヒト肺小細胞癌(OS-1, OS-2, OS-3)を使用した。

2. ハイブリドーマの作製: OS-1をFreund's complete adjuvnatとともにBALB/cマウスの皮下に投与し, 5週および6週後にOS-1を再び皮下および腹腔にそれぞれ投与した。最終免疫の4日後に脾臓を採取し, Forsterらの方法に従いマウス骨髓腫(P3-X63-Ag8-U1)と融合させ, ハイブリドーマを作製した。OS-1, H69と結合し, OS-1を得た患者由来の肺腺維芽細胞(OS-1F)およびPC9とは結合しない抗体を産生するハイブリドーマをenzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)で選択した。得られたハイブリドーマを限界希釈法によって2回クローニングした。
3. MoAbの精製: プリステンオイル処置BALB/cマウスの腹腔にハイブリドーマを移植し, 得られた腹水を33%飽和硫酸アンモニウムで塩析させ透析した後, イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル沪過で抗体を精製した。
4. 免疫組織学染色: 生検, 剖検および手術により得られた試料から凍結切片を作製し, Vectastain Elite ABCキットを用いて切片の免疫染色を行った。
5. ヒト肺小細胞癌関連抗原の精製: 遠心分離法で細胞膜を回収し可溶化した後, ゲル沪過およびMoAbを用いたaffinity columnで精製した。
6. SDS-PAGEおよびWestern blotting: 培養細胞の粗細胞膜画分をSDS-PAGEで泳動した後, ニトロセルロース膜に転写しMoAbで免疫染色した。また, affinity columnで精製した抗原を種々の酵素あるいはperiodateで処理した後, SDS-PAGEにかけWestern blottingで抗原の安定性を検討した。
7. LAK細胞の誘導およびADCC: ヒト末梢血単核球にヒトrecombinant IL-2を加えLAK細胞を誘導した。 ^{51}Cr で標識された腫瘍細胞培養株をMoAbと混合し, 洗浄した後LAK細胞を加え4時間培養し上清中の放射活性より細胞傷害活性を算出した。

(成績)

肺小細胞癌(OS-1, OS-2, OS-3, H69, N231, N857), 神經芽細胞腫(IMR32, NB1)と結合し, 肺扁平上皮癌(QG56), 肺腺癌(A549, PC9), 肺巨細胞癌(Lu65, Lu99), T細胞白血病細胞(CEM), 骨髓性白血病細胞(HL60), 肺腺維芽細胞(OS-1F)とは結合しないモノクローナル抗体(ITK-2: IgG₁, κ)を得た。免疫組織化学染色において, ITK-2は肺癌のうち小細胞癌にのみ結合し, 肺扁平上皮癌, 腺癌および大細胞癌とは結合しなかったが, 副腎臓質や脳, 脊髄とも結合した。SDS-PAGE後のWestern blottingでは, この抗原の分子量は62~66kDaであり, 従来の報告(25~40kDaおよび124~165kDa)とは異なっていた。また, この抗原性は蛋白分解酵素, 糖鎖分解酵素およびperiodate処理で消失することから糖蛋白質であると考えられる。肺小細胞癌は, LAK細胞に対し種々の程度の感受性を示すが, ITK-2を結合させることにより肺

小細胞癌に対するLAK細胞の細胞傷害は明らかに増強した。

(総括)

ヒト肺小細胞癌関連抗原に対するモノクローナル抗体 (ITK-2) を作製した。ITK-2 は肺小細胞癌に発現される癌関連抗原のうち neural crest 由来の組織抗原と交差する糖蛋白質を認識すると考えられる。ADCC誘導可能な抗腫瘍 MoAb を併用することにより、LAK療法の抗腫瘍効果はさらに増強される可能性が示唆された。

論文の審査結果の要旨

ヒトの肺小細胞癌は早期に再発または転移し易く、肺癌のなかでも特に悪性度が高い。本研究では、ヒト肺小細胞癌関連抗原に対するモノクローナル抗体 (ITK-2) をマウスで作製した。このITK-2を用いた免疫染色によって、肺小細胞癌の他に、神経芽細胞腫培養株、副腎、脳、脊髄、が染色されたが、肺の腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌および検査し得た他の正常組織は染色されなかった。ITK-2の認識する抗原は発生学的に神経堤 (neural crest) 由来の細胞に存在することが示唆された。すなわち、ITK-2 はヒト肺小細胞癌の鑑別診断に有用であると期待できる。ITK-2 の認識する抗原は Western blotting 法などから分子量62000-66000の糖蛋白質であることが示された。

ITK-2 は肺小細胞癌および神経芽細胞腫培養株に対して lymphokine-activated killer (LAK) 細胞を effector cell とする抗体依存性細胞障害 (ADCC) を誘導した。すなわち、ADCC誘導可能な抗腫瘍モノクローナル抗体を併用することにより、LAK療法の抗腫瘍効果はさらに増強される可能性が示唆された。以上の成績より、本論文は医学博士の学位を授与するに値すると認められる。