

Title	A novel monoclonal antibody against squamous cell carcinoma
Author(s)	井上, 正樹
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38731
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	井 上 正 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 0 5 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 6 年 2 月 1 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	A novel monoclonal antibody against squamous cell carcinoma (子宮頸部扁平上皮癌に対する新しいモノクローナル抗体の作製)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 谷 澤 修 (副査) 教 授 羽 倉 明 教 授 青 笹 克 之

論 文 内 容 の 要 旨

目 的

Human papillomavirus (HPV) は今日70種類以上の subtype が発見され、種々の皮膚病変を惹起することが知られている。婦人科領域では、condyloma 等の良性病変を形成する6型11型を代表とする良性型、前癌病変や癌を形成すると考えられている悪性型に分類されている。特に、悪性型の HPV-DNA は極めて高率に子宮頸部癌や前癌病変組織に検出されている。In vitro の実験系でも、悪性型の HPV16型や18型 DNA は E6E7 遺伝子領域に強い形質転換能があり、これら遺伝子領域によってコードされる E6E7 蛋白は癌抑制遺伝子 RB 蛋白や p53 蛋白と結合し、その機能を阻害することも知られている。このように、HPV は子宮癌発生に強く関連しており、臨床的には、HPV 感染を同定することが極めて重要である。しかし、HPV の臨床的同定法には感度や特異性に種々問題があり、未だ、有効な方法は開発されていない。

そこで、私は、HPV 由来蛋白や HPV 感染に直接関連した蛋白を検出する方法には限界があると考え、HPV 感染により形質転換を遂げた宿主細胞に増幅されて出現するであろう癌関連抗原の検出を試み、癌発現のための有用な腫瘍マーカーの開発を目的とした。

方 法

免疫原細胞として、Fisher rat fibroblast cell line (No. 7) に HPV16-DNA E6E7 領域遺伝子を組み込んだ vector をリン酸カルシウム法にて transfect し、形質転換を遂げた細胞 (No. 7 pZipE67) を用いて、マウスを免疫し、被免疫マウス脾細胞とマウス myeloma 細胞と細胞融合させた。Hypoxanthine/aminopterin/thymidine 培地で選択培養後、No. 7 pZipE67細胞に反応し、vector のみを transfect した No. 7 pZipNeo 細胞には反応しない、単クローン抗体 (INS-2) を産生する hybridoma を数回の限界希釈法で得た。本抗体 (INS-2) は IgM で、rat fibroblast 由来細胞で免疫したにも関わらず、人の正常組織には反応せず、癌細胞に反応する事より、臨床応用可能な抗体と考え、その反応性や認識抗原についても検討した。

成績

INS-2抗体は、No.7 pZipE67細胞やCaski細胞の生細胞表面に反応したが、No.7細胞や、No.7 pZipNeo細胞には反応しなかった。INS-2抗体は婦人科臓器のみならず、消化器系臓器、尿路系臓器、血液細胞には反応しなかった。但し、子宮頸部、皮膚、食道の正常扁平上皮の一層の基底細胞にのみ反応した。悪性腫瘍組織では、子宮頸部、食道のすべての扁平上皮癌に反応した。特に、侵潤部の癌細胞膜に強い反応性がみられた。腺癌には由来臓器には関わらず全て反応性はなく、間質系の良性及び悪性腫瘍にも反応性は認めなかった。

INS-2抗体の認識抗原は、immuno-electroblot法でNo.7 pZipE67細胞や子宮扁平上皮癌組織に於て約40K daltonの位置に単一の強いバンドが見られるが、No.7 pZipNeo細胞や腺癌組織に見られず、negative control抗体（抗Lewis b抗体）でもNo.7 pZipE67細胞や子宮扁平上皮癌組織に見られなかった事より、約40K daltonの分子量を有すると判断された。抗原の反応性はsodium periodate, ethanol trypsin, pronase処理で容易に失活するが、neuraminidaseや10% formalineでは失活しない事より、抗原はシアル酸を含まない糖蛋白であると考えられた。Enzymed immunosorbent assay (ELISA)法で、INS-2抗体はcytokeratinには反応せず、組織免疫染色での比較でも、cytokeratinとはその特性が異なっていた。

総括

今回の実験にて得られた単クローン抗体（INS-2）の認識抗原は、HPV-DNAを含まないNo.7 pZipNeo細胞には存在せず、HPV-DNA E6E7遺伝子が導入されたNo.7 pZipE67細胞に発現したこと、あるいは、抗原分子量の違い、組織局在の違いにより、HPVに直接関連したE6E7等の蛋白ではなく、HPV感染により誘発された抗原と考えられる。HPVによる抗原誘発は未知の分野であり、本抗原の解析は、HPVによる他の遺伝子抑制や活性化の研究に道を開くものである。

INS-2抗体は人の扁平上皮癌に特異的に反応し、その前癌病変であるdysplasiaやcarcinoma in situにも反応することにより、腫細胞診断の自動化スクリーニングに利用可能である。また、腺癌や肉腫組織には反応しないことにより、病理診断の鑑別マーカーとなりうる。

論文審査の結果の要旨

子宮頸部癌の原因ウイルスとされるhuman papillomavirus (HPV)の感染の検出には、特異性、感度に問題があり、簡便な検査法は未だ開発されていない。そこで、井上正樹君はHPV感染によって誘発される癌関連抗原に注目し、これに対する単クローン抗体を作製し、臨床応用可能なマーカーの開発を目的とした。本研究によって、得られた抗体はヒトの扁平上皮癌やその前癌病変のみに特異的に反応し、その認識抗原は分子量や組織局在などから全く新しい糖蛋白である。本抗体は腫細胞診断の自動化スクリーニングに利用可能であり、細胞診断自動化システムに道を開くものである。さらに、認識抗原はHPV感染により誘発されたものであり、本研究はHPVによる他の遺伝子制御や活性化の研究の魁をなすものである。

以上のことにより、本研究は学位論文に値するものである。