

Title	卵巣癌に対するモノクローナル抗体（SH-9）の作製とその性質
Author(s)	前田, 裕子
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39633
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 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	前 田 裕 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 0 5 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 8 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	卵 巢 癌 対 する モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 (SH - 9) の 作 製 と そ の 性 質
論 文 審 査 委 員	(主 査) 教 授 三 村 務 (副 査) 教 授 真 弓 忠 範 教 授 馬 場 明 道 教 授 田 中 慶 一

論 文 内 容 の 要 旨

Bast et al.によりヒト卵巣癌培養細胞を免疫原として樹立されたマウス・モノクローナル抗体OC125が認識する抗原CA125は、ヒト漿液性嚢胞腺癌に比較的特異的で、婦人科領域において血清診断および治療効果判定等で非常に有用な腫瘍マーカーとされている。しかし、CA125は子宮内膜症や妊娠初期、また月経期での血清中の増加が知られ、診断上、問題点が多いとされている。

本論文では、CA125を恒常的に産生するヒト卵巣漿液性嚢胞腺癌由来の細胞株 (SHIN - 3) を樹立し、この培養上清中に分泌されるCA125抗原の低分子画分に着目し、卵巣癌に特異的に反応する新たなモノクローナル抗体を作製し、その生化学的並びに免疫組織学的性状について検討した。

腫瘍細胞から遊離される腫瘍マーカーの性状を分析する上で目的とする腫瘍マーカー産生能を有する樹立株を得ることは重要である。そこで、56歳の卵巣漿液性嚢胞腺癌患者より採集した腫瘍部組織を0.25% trypsinで細胞分散し培養を開始した。Rough-cloning法により継代を続け、約7ヶ月後に均一な上皮性細胞集団を得た。さらにlimiting dilutionによるsingle cell cloningを2回行い、培養開始後23ヶ月で増殖能およびマーカー (CA125およびTPA) 産生能が安定したので、この細胞株をSHIN - 3と命名した。細胞は小型で多稜形ないし短紡錘形を呈し、敷石状配列を示しながら容易にpile upする傾向があった。さらに核クロマチンの粗大凝集像および不整形な核小体は、細胞学的に悪性基準を満たす異型像を呈し、染色体分析においても染色体の異数性が確認され、また異種動物移植において増殖可能であるという点から、SHIN - 3株は、悪性腫瘍細胞の基準を満たすことが確認できた。

そこでSHIN - 3細胞株を用いて培養上清中に分泌されるCA125活性を有する画分 (CA125抗原; OC125と反応する抗原) の性質について検討を行った。細胞は無血清培地で培養し、集めた上清を半飽和硫酸塩析により濃縮後、SDS-PAGEおよびWestern blottingを行い、活性画分を分離した。SDS, 2ME非含有10M urea sample bufferに溶解し一次元電気泳動をおこなった結果、従来の報告と同様に分子量200KDa以上の高分子複合体に免疫活性が認められた。さらにSDS, 2ME存在下で泳動したところ、分子量50KDa付近の低分子にも活性が認められた。次いで二次元電気泳動を行ったところ、抗CA125抗体がpH7.3付近に等電点をもつ分子量49KDaと50KDaのスポットと反応する

ことが確認された。また蛋白変性を目的とする種々の物理学的および化学的処理により CA125 免疫活性が減少し、同時に種々の protease 処理により免疫活性が消失したことから SHIN-3 細胞が産生する CA125 抗原が、蛋白性のものであることが判明した。

SHIN-3 細胞が産生する CA125 抗原において低分子画分に免疫活性が確認されたことは新しい知見であった。そこでこの低分子画分についてその性状を明らかにするためにこの低分子蛋白に対するモノクローナル抗体を作製した結果、IgG1 抗体 2 つ、IgM 抗体 3 つを得た。SHIN-3 細胞との反応性の強い IgG1 抗体を SH-9 と命名した。Immunoblotting の結果、還元下で OC125 が分子量 200KDa 付近の低分子と反応しているのに対し、SH-9 は分子量 50KDa 付近の 3 本のバンドを認識していた。また非還元下で SH-9 はかなりの高分子に反応性が認められた。以上により OC125 の認識する抗原と SH-9 の認識する抗原とは相違すると考えられた。更に¹²⁵I でラベルした SH-9、OC125 を用いて CA125 抗原への競合阻害反応を行ったところ、両抗体の競合は観察されなかった。また SH-9 は粘液性卵巣癌に陽性率が高い CEA (carcino-embryonic antigen) と競合が認められなかった。このことより SH-9 のエピトープが OC125 や CEA のそれとは相違することが示された。

SH-9 の臨床応用の可能性を検討するため、SH-9 固相化ビーズを用いたサンドイッチ IRMA で患者血清を測定したが、血清中には明確な反応が見られなかった。そのため従来のような血清診断にただちに利用できるものではないと判明した。このことより SH-9 抗原が膜近辺にある糖蛋白として存在し、遊離としては検出困難な性状を有する可能性があると考えられた。

そこで各種組織での SH-9 の反応性を観察し、OC125 との組織分布を比較したところ、正常組織では、OC125 と同様、子宮頸管腺と肺の気管支腺に強い反応が認められた他、胃腺窩上皮にも反応したが、OC125 の反応する妊娠初期および増殖期の子宮内膜では陰性であった。また腫瘍組織では粘液性卵巣腫瘍の良性、中間、悪性群それぞれにおいて 100% の反応性が観察され、OC125 が陽性であった子宮内膜症、子宮膜癌および卵巣漿液性腫瘍に対して陰性を示した。更に SH-9 は OC125 と同様に肺腺癌に 100% の陽性反応が認められたが、OC125 では反応しない肺の重層扁平上皮癌の一部にも陽性反応が観察された。このことより SH-9 は OC125 とは違い、妊娠、性周期、子宮内膜症などの偽陽性を示さないことを特徴とし、粘液性卵巣腫瘍を鑑別する際の腫瘍マーカーとして、また肺癌の腫瘍マーカーとしても役立つ可能性があることが判明した。

従って、SH-9 の今後の臨床応用としては、組織分布の特性および SH-9 を非遊離型抗原とした場合の特徴を生かして、アイソトープ標識抗体を用いた画像診断や、抗体単独もしくは、抗体に抗癌剤や毒素を結合させる癌のミサイル療法などが考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は新たに樹立したヒト卵巣漿液性嚢胞腺癌由来の細胞株 (SHIN-3) を用いて、卵巣癌に特異的に反応するモノクローナル抗体を作製し、腫瘍マーカーとして患者血清診断に用いるための生化学並びに免疫組織学的基礎研究を行ったもので、以下の知見を得ている。

- 1) 二種類の腫瘍マーカー (CA125, TPA) を産生するヒト卵巣漿液性嚢胞腺癌由来の細胞株 (SHIN-3) を樹立した。
- 2) SHIN-3 細胞が産生する CA125 抗原の性状分析の結果、pH7.3 付近に等電点をもつ分子量 49,000 と 50,000 の低分子画分に免疫活性が確認された。
- 3) SHIN-3 細胞由来の CA125 の低分子蛋白に対するマウスモノクローナル抗体の作製を試み、還元下でこの低分子画分のみを認識する SH-9 抗体 (IgG1) を得た。
- 4) ABC法を用いた SH-9 の免疫組織学的検索では、正常組織において、気管支腺、子宮頸管腺とのみ反応した。腫瘍病変では、主として卵巣腫瘍に、その他肺の扁平上皮癌および腺癌に陽性反応を見た。

5) SH-9とOC125との免疫染色結果の比較では、SH-9は粘液性卵巣腫瘍に陽性率が高くOC125の反応する子宮膜症や漿液性嚢胞腺癌での反応は認められず、SH-9のOC125は全く異なる染色特異性を示した。

6) 競合阻害反応の結果よりCA125分子上でのSH-9とOC125のエピトープは互いに異なることが判明した。

7) SH-9を用いた血清診断の検討では、患者血清中の遊離抗原としてのSH-9抗原は検出できなかった。

以上、SH-9の組織分布の特性より、粘液性卵巣腫瘍や肺癌を識別するマーカーとして利用できる可能性があり、アイソトープ標識抗体を用いた画像診断での臨床応用への可能性も示され、腫瘍マーカーの研究に大きく寄与するものであり、博士論文として価値あるものと認める。