ヌードマウス移植ヒト肝癌に対する抗フェリチン
抗体の集積性と抗腫瘍効果

宇根良衛・佐藤裕二・Saiful Alam・秦 温信・内野純一*

Study on the accumulation and antitumor effect of antiferritin antibody against human hepatoma implanted in nude mice

Accumulation and antitumor effect of anti-ferritin antibody on the liver cancer implanted in nude mice were studied. Human hepatocellular carcinoma strain (HC-4) was implanted on the back of Balb/c nu/nu mice. The following day after implantation, ^{131}I labeled antiferritin antibodies were administered intraperitoneally. Thirds and 7th days after administration, whole body scintigraphy was done and on the 10th days rats were sacrificed to measure the relative radioactivities of each organs.

Furthermore, tumor growth rates were calculated. As the results, all of mono and polyclonal antibodies were well accumulated to the tumor tissue both of on day 3rd. and day 7th. Tumor growth curves were depressed in the groups of antibodies injection compared with normal IgG group. In conclusion ferritin may have a possibility to be a target of imaging of human hepatoma and targeting immunotherapy.

Yoshie Une・Yuji Sato・Saiful Alam・
Yoshinobu Hata・Junichi Uchino*

肝細胞癌に対する特異的細胞性免疫反応の存在を示唆する研究は多いが、いまだ臨床応用可能なものはない。その原因として、ヒト肝細胞癌は膜抗原にしても抗原性が弱く、また、腫瘍によって異なった抗原性を有することによると考えられる。

一方、腫瘍の産生する蛋白を標的とした免疫療法が試みられている。肝細胞癌では、その代表的なものとして α -fetoprotein (AFP)、CEA および ferritin などがあり、AFP を target とした tar-

getig immunochemotherapy は、一部臨床応用も試みられているが、効果は期待されたほどではない。

最近、悪性腫瘍患者に血清 ferritin 値の上昇が高率にみられるとの報告があり、肝細胞癌も例外ではない^{1,2)}。また、その生化学的、免疫学的多様性も判明しつつあり³⁾、さらに ferritin が細胞性免疫能を抑制する作用があるとの報告⁴⁾もあり、興味をもたれている。

以上の観点から、筆者は、肝細胞癌に対して ferritin を標的とした免疫療法および imaging の可能性を、肝癌移植ヌードマウスに対し、抗 ferritin ポリクローナル、およびモノクローナル抗体を用い、実験的に検討したので報告する。

方 法

(1) 実験動物および腫瘍

週齢 6～8 週の BALB/c nu/nu マウスの背部皮下に、当科で移植継代しているヒト肝細胞癌 HC-4 を移植した。

移植法は、腫瘍径が約 1 cm のものを細切りメシにし、その約 0.2 ml をマウス背部皮下に注入移植した。90 日目移植マウスの移植 4 週目の血清フェリチン濃度は 38 ng/ml であり、非移植マウスは 3 ng/ml であった。抗フェリチンポリクローナル抗体による免疫組織化学染色では、フェリチンは肝癌細胞質内に染色された(図 1)。

(2) 抗フェリチン抗体

抗フェリチンポリクローナル抗体 1 種 (rabbit immunoglobulin to human, Lot 075, Code A 133, DAKO)、およびマウスモノクローナル抗体 3 種 (4H216C2, 4H531C58, 4H656C90, ABOTT 社より供与、いずれも IgG) をクロラミン T 法により

* 1st. Department of Surgery Hokkaido University
School of Medicine 北海道大学医学部第一外科学教室

図1 抗フェリチンポリクローナル抗体による免疫組織化学染色。フェリチンは肝癌細胞質内に染色された。(×200)

^{131}I 標識を行った。

また、コントロールとして正常マウス IgG を用いた。これら1種のポリクローナル抗体、3種のモノクローナル抗体、正常マウス IgG の比放射能を約 $3\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ に調整した。各群とも $n=3$ とした。

(3) 投与方法、シンチグラフィーおよび臓器放射活性

腫瘍移植翌日に $10\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した放射標識抗体 (^{131}I -抗フェリチン抗体, IgG にして $10\mu\text{g}$, ^{131}I にして $30\mu\text{Ci}$) を腹腔内投与し、3日目および7日目に島津社 whole body scanner SC 1050W および Ohio-nuclear 社 Sigma 410 により全身スキャンを施行した。なお、放射標識抗体投与5日前より、マウスに0.1%ルゴール液を給水瓶より任意摂取させた。

また、腫瘍移植後10日目に脱血屠殺し、血液、肝、脾、腎、肺の単位重量当りの放射活性を測定した。測定はアロカ・オートウェルガンマシステム 860 を用いた。腫瘍組織と各臓器の放射活性の比率を算出し、腫瘍特異性の指標とした。

(4) 抗腫瘍効果

移植後経日的に背部皮下の腫瘍の長径と短径を計測し、体積 $= 1/2 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$ として算出した。

図2 シンチグラフィー

いずれの抗体も IgG に比し、腫瘍移植部位に強い集積像が得られた。

成績

(1) シンチグラフィー

いずれの抗体も IgG に比し、腫瘍移植部位に強い集積像が得られた。

集積はポリクローナル1種、モノクローナル群3種とも3日目では、腫瘍とその周囲の心血管、肝などに集積がみられたが、7日目では、より強く腫瘍部位に限局する傾向であった。また、ポリクローナルとモノクローナル抗体間に差はみられなかったが、モノクローナルの 4H656C90 抗体は、やや他より集積性が鮮明であった(図2)。コ

表 1 各臓器放射比活性

antibody ratio	IgG	4H216C2	4H531C58	4H656C90
tumor/blood (g) (m/l)	1.13 ±0.07	1.38 ±0.13	1.77 ±0.31	3.88 ±0.72
tumor/liver	4.33 ±1.02	5.37 ±0.56	4.98 ±1.52	26.5 ±3.31*
tumor/spleen	2.14 ±0.53	3.44 ±0.23	6.49 ±1.75	0.10 ±2.18*
tumor/kidney	3.72 ±1.19	6.15 ±0.97	7.36 ±1.63	16.8 3.06
tumor/lung	2.91 ±0.59	4.88 ±0.67	5.57 ±1.58	14.9 ±4.01

モノクローナル抗体 3 種は IgG に比し、いずれも腫瘍に高い放射活性を示し、特に 4H656C90 は、肝、および腎との比率ともにもっとも高く、有意に他の 2 抗体を上回った。

* $P < 0.05$ vs IgG (mean $\pm$ SE, $n = 3$)

ントロールとして用いた IgG 群は 7 日目、腫瘍、肝、心血管と思われる部位に広く集積し、さらに、ルゴールブロックが不十分なためか、頸部にも集積がみられた。

また、いずれの群も投与された腹腔内の刺入部位の集積はみられなかった。

(2) 臓器放射活性

モノクローナル抗体 3 種は IgG に比し、いずれも腫瘍に高い放射活性を示し、特に 4H656C90 は肝、および腎との比率ともにもっとも高く、有意に他の 2 抗体を上回った(表 1)。また、ポリクローナル抗体群は、7 日目のシンチグラフィー後死亡したため検討できなかった。

以下の抗腫瘍効果について、同様に検討不能であった。

(3) 抗腫瘍効果

移植 3 日目の腫瘍体積は IgG 投与群が $672 \pm 30 \text{ mm}^3$ ($\chi \pm \text{SE}$, $n = 3$ 以下同じ)であった。4H656C90 は $350 \pm 37 \text{ mm}^3$ で有意に小さかった。他の二つのモノクローナル抗体群は、対照群よりやや低値ではあったが、有意ではなかった。6 日目の体積は 4H216C2 群において $311 \pm 29 \text{ mm}^3$ ともっとも低値であったが、各群とも有意差はなかった。8 日目、10 日目の体積は、抗体投与の 3 群とも増殖の抑制がみられ、高い有意差を示した。特に 10 日目では 4H656C90 および 4H531C58 で強く抑制された(図 3)。

図 3 腫瘍増殖曲線

8 日目、10 日目の体積は抗体投与の 3 群ともに 4H656C90 および 4H531C58 は 10 日目で強い抑制を示した。

考 按

肝細胞癌においては、腫瘍特異抗原は少なくともいまだ臨床応用を可能とするものはみいだされてない。したがって、現時点では肝癌に対して試みられている免疫療法は、生体の低下した細胞性免疫機能を改善することにより、細胞障害性をもった cytotoxic cell を腫瘍に集積させ、抗腫瘍効果を発揮させようとするものと⁵⁾、腫瘍細胞のある種の抗原物質を標的とした targeting immunotherapy に大別される。最近では、抗体と抗癌剤を結合させたものを投与する targeting immunochemotherapy も行われるようになった。

肝細胞癌の産生する抗原となりうる物質としては、AFP, CEA, ferritin などがあげられる。AFP は、肝細胞癌においてはもっとも有用な腫瘍マーカーとして用いられてきた。また、1973 年、塚田ら⁶⁾が抗 AFP 抗体を培養液中に添加することにより、ラット腹水肝癌細胞の増殖が抑制されることをみいだして以来、AFP を標的とした治療法の実験的および臨床的研究が行われてきた。教室でも 15 例の肝細胞癌に対し、adriamycin 結合抗 AFP 抗体を肝動注し、なんらかの有効性を認めた⁷⁾。しかし、AFP は肝癌細胞の分泌蛋白であり、組織内よりも血中に多く存在するので、その抗体

を投与する場合、それを中和するに足る大量の抗体が必要となる。このことは抗癌剤との結合物を作成するさいに結合比の関係で実際上の問題となる。

ferritin は、正常人で微量ながら血中に証明される鉄結合蛋白であり、感染症、肝障害、悪性腫瘍、輸血などの種々の病態で血中に増加する¹⁾。また、ferritin は均一の物質ではなく、basic(肝型)と asidic(心型)のサブユニットからなっている。各種病態によってこれらのサブユニットの比率は異なり、生化学的、免疫学的に差異が認められている。

森ら⁸⁾は、肝癌 ferritin および正常肝 ferritin をヒト肝組織より精製し、そのおのおのに対する抗血清を作製し、肝、肺、乳腺、睪丸などの組織に対してその特異性を検討した。その結果、正常組織は概して正常肝 ferritin とよく反応するが、肝癌 ferritin 抗血清とはごく弱い反応しか示さず、腫瘍組織はこれと逆であったという。

また、浅川らは⁹⁾、正常肝 ferritin と肝細胞癌 ferritin それぞれのサブユニットについて western blot 法を用いた比較検討で、免疫学的に、H, L 以外のサブユニットバンドの存在を示唆する所見が得られたとしている。このようなことより、肝細胞癌の血清 ferritin 上昇の機序として、肝細胞障害により肝細胞から逸脱する ferritin、悪性腫瘍に伴う感染などとともに、肝細胞癌固有の異常 ferritin の産生が考えられる。

一方、Hann ら⁴⁾によると、神経芽腫患者の血中 ferritin は、stage IV s ではすべて正常であるが、stage IV の患者は上昇した例が多く、また、末梢の E-ロゼット形成をみると stage IV s は正常で、stage IV では抑制されているという。これらの事実より、彼らは、神経芽腫患者で血中に増加する ferritin には細胞性免疫能の抑制効果があるとしている。

抗 ferritin 抗体を腫瘍マーカーとして、*in vitro* の検査のみならず治療に応用できる可能性を示唆したのは、Order ら^{9,10)}である。抗ヒト肝 ferritin 抗体に ¹³¹I をラベルし、肝癌患者に投与したところ、抗体は腫瘍部分に集積し、しかも腫瘍の縮小を認めたという。

抗体の癌 ferritin に対する特異性や、¹³¹I の腫

瘍集積性ならびに肝毒性の問題など解決されなければならないが、ferritin は AFP と異なり、血中よりも腫瘍内に多く存在する蛋白であり、標的としては AFP より適しており、その有用性が期待される。筆者らも臨床応用を目標として、ferritin を標的とした imaging および免疫療法の可能性を実験的に検索した。今回、筆者らの使用した抗体は、3種類ともヌードマウス移植腫瘍に特異的に集積し、腫瘍の増殖を有意に抑制した。肝癌に対する imaging と targeting immunotherapy、ひいては immunochemotherapy の両面からみて、将来大いに期待のもてる治療法となると考えられる。

結 語

ヌードマウス移植ヒト肝癌に対して、¹³¹I ラベル抗フェリチンモノクローナル抗体3種、およびポリクローナル1種を投与し、その集積をみた。その結果、いずれの抗体もコントロールに比し高い腫瘍集積性を示し、さらに腫瘍の増殖を有意に抑制した。肝癌に対するフェリチンを標的とした imaging および targeting immunotherapy、さらには immunoradio あるいは immunochemotherapy の臨床的応用の可能性が示唆された。

本論文の要旨は第4回日本 DDS 研究会において発表した。

文 献

- 1) 吉井正雄, 中島言子, 森田隆司, 鳥塚莞爾: 二抗体法 Ferritin [¹²⁵I]-RIA キットによる血中 ferritin 値測定の検討. ホルモンと臨床 30: 95-99, 1982.
- 2) Zhou, X., Detolla, L., Custer, R. P., Thomas, W.: Iron, Ferritin, Hepatitis B surface and Core Antigens in the Livers of Chinese Patients With Hepato cellular Carcinoma. Cancer 59: 1430-1437, 1987.
- 3) Asakawa, H., Mori, W.: Iso-ferritins from Tumorous and Non-tumorous Humans Liver. Jpn. J. Cancer Res. 76(2): 95-98, 1985.
- 4) Hann, H. W. L. et al.: Inhibitory effects of isoferitin and non-tumor tissues on E-rossette formation. Lancet 2: 43, 1984.
- 5) Roseberg, S. A. et al.: Observations on systemic administration of autologous-lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. N. Engl. J. Med. 313: 1485-1492, 1985.

- 6) Tsukada, Y. et al.: Effect of conjugate of anti-alpha-fetoprotein serum on some cultured tumor cells. *Int. J. Cancer* 13:187-195, 1974.
- 7) 内野純一, 宇根良衛, 佐藤裕二: 癌における腫瘍マーカー. 2. 各種マーカー, AFP. 外科卒後教育セミナー. (日本外科学会教育委員会編), 中外医学社, 1986, p1949.
- 8) 森 亘, 岡 輝明, 浅川英男: 臓器所在 Ferritin にみられる癌化と分化. *日本医師会雑誌* 91(11): 2346-2349, 1984.
- 9) Stanley, E. O., Stillwagen, G. B., Klein, J. L., Leichner, P. K., Stanley, S. S., Fishman, E. K., David S. E., Haulk, T., Kopher, K., Kathy, F., surdyke, M., Self, S., Leibel, S.: Iodine 131 Antiferitin, A New Treatment Modality in Hepatoma: A Radiation Therapy Oncology Group Study. *J. of Clinical Oncology* 3(12): 1573-1582, 1985.
- 10) Order, S. E., Klein, J. L., Leichner, P. K.: Antiferitin IgG Antibody for Isotopic Cancer Therapy. *Oncology* 38: 154-160, 1981.