抗ヒト・メラノーマモノクローナル抗体のイディオタイプ解析

——遊離メラノーマ関連抗原検出への応用——

辻崎正幸・今井浩三・得地 茂・菱川法之・谷内 昭^{*1)}、日馬幹弘^{*2)}*Idiotypic analysis of anti-melanoma associated antigen monoclonal antibody ; Application of anti-idiotypic monoclonal antibody to detect shedding melanoma associated antigen**antibody, idiotypic mapping, inhibition of idiotypic-anti-idiotypic interaction*

In order to establish a new assay to detect shedding tumor associated antigens, anti-idiotypic monoclonal antibodies were prepared against monoclonal antibody 149. 53 which reacted with human high molecular weight-melanoma associated antigen. Serological characterization of anti-idiotypic monoclonal antibodies suggested that these monoclonal antibodies recognized private and distinct idiotopes of monoclonal antibody 149. 53. Idiotypic mapping of monoclonal antibody 149. 53 showed that there might be at least three idiotopes on it ; one idiotope at a combining site, one at a non-combining site and another at an intermediate site.

A new assay to detect shedding antigens is based on the inhibition of idiotypic-anti-idiotypic interaction. Anti-idiotypic monoclonal antibody against near combining site showed high % inhibition of idiotypic-anti-idiotypic interaction, while anti-idiotypic monoclonal antibody against non-combining site did not. The results of this assay were correlated significantly with those of double determinant immuno assay. The assay requires only one epitope of a given antigen, while double determinant immuno assay requires two distinct epitopes that are spatially far from each other on the same antigenic molecule. And therefore it may be useful for detection of shedding antigen.

Masayuki Tsujisaki・Kohzoh Imai・
Shigeru Tokuchi・Noriyuki Hishikawa・
Akira Yachi^{*1)}, Mikihiro Kusama^{*2)}

Key words : Detection of shedding tumor associated antigen, anti-idiotypic monoclonal

idiotypic network system が、免疫応答の調節に重要な役割を果たしているという基本概念が受け入れられつつある。これまでに筆者らは、抗HLA^{1,2)}、抗ヒトメラノーマ抗体(MAA)³⁻⁶⁾および抗癌胎児性蛋白(CEA)⁷⁾モノクローナル抗体(MoAb)に対する抗イディオタイプ(Id)抗体の解析を進めてきた。これらを用いて、抗体の抗原結合部位上のイディオタイプ・マッピング、抗 Id-MoAb により誘導される抗・抗 Id 抗体の解析、さらに、抗 Id 抗体に存在する抗原の内部イメージ(internal image)について検討し、抗 Id 抗体の癌治療への応用の可能性に関し、検討を加えてきた。今回、抗 Id 抗体を癌診断に応用可能か否かについて検討した。

担癌患者血清中に存在する遊離腫瘍関連抗原は、腫瘍マーカーとして癌診断に利用されている。従来の遊離抗原検出法としては、標識抗体を用いた double determinant immunoassay (DDIA), enzyme immunoassay (EIA), あるいは reversed passive hemagglutination (RPHA) などが確立されている。しかし、これらの検出法は抗原分子上に存在する二つの異なったエピトープを捉えるか、あるいは複数の同一エピトープの発現が必要であった。筆者らは一つのエピトープを介する idiotypic-anti-idiotypic interaction を利用した新しい腫瘍抗原検出法を開発したので報告する。

方 法

(1) モノクローナル抗体

MoAb 149.53, 225.28, 653.25, 763.74 および

^{*1)} Department of Internal Medicine, Sapporo Medical College 札幌医科大学第一内科学教室

^{*2)} Department of Surgery, Tokyo Medical College 東京医科大学外科学教室

902.51 は既報⁹⁾に示すように、280 kd および 400 kd 以上の 2 種の major component からなる同一のヒト高分子メラノーマ関連抗原(HMW-MAA)分子を認識している。

(2) 交差阻止試験(cross-inhibition assay)

各 MoAb の認識するエピトープの異同を検討するために、50 μ l の培養メラノーマ細胞 Colo 38 (2×10^5 /ml) に過剰量の cold inhibitor である抗 MAA MoAb を 50 μ l 加え、4°C 1 時間反応させた。洗浄後、¹²⁵I-標識 MoAb (1×10^5 cpm/well) を加え、1 時間反応させ、洗浄後、結合 cpm を測定し、対照との間で%阻止率を算出した。

(3) MoAb 149.53 に対する抗 IdMoAb の作製

200 μ g の精製抗 MAA MoAb 149.53 を glutaraldehyde を用いて、keyhole limpet hemocyanin と結合した後、Freund's adjuvant に懸濁し、BALB/c マウス腹腔内に同系免疫した。1 週間隔で 3 回免疫したあと、型のとおり細胞融合を行い、つぎに示す assay によりスクリーニングした。

(4) 抗 Id MoAb の解析

① F(ab')₂ 結合反応

MoAb 149.53 の F(ab')₂ fragments を 0.1 M 炭酸緩衝液(pH 9.5)により 0.1 mg/ml に調整し、100 μ l を 96 穴塩化ビニルプレートに加え、16 時間インキュベートし付着させた。0.05% Tween 20 加 PBS で 3 回洗浄した後ハイブリドーマ培養上清 100 μ l を加え、4°C 5 時間反応させた。洗浄後、¹²⁵I-標識抗マウス IgG-Fc 抗体 (1×10^5 cpm/well) を加え、4°C 3 時間反応させた。Tween 20 加 PBS により 5 回洗浄後、標識抗体の結合 cpm を γ -counter により測定した。

② Sandwich assay

F(ab')₂ 結合反応と同様に、MoAb 149.53 の完全免疫グロブリンを炭酸緩衝液により、0.1 mg/ml に調整し、塩化ビニルプレートに固相化した。洗浄後、ハイブリドーマ培養上清を加え、4°C 5 時間反応させたあと、MoAb 149.53 の¹²⁵I-標識物を反応させ、その結合能を γ -counter により測定した⁹⁾。

③ Inhibition assay

¹²⁵I-標識 MoAb (1×10^5 cpm/well) 50 μ l をハイブリドーマ上清 50 μ l と 4°C 2 時間インキュ

ベートしたあと、target cell 2×10^5 /well を加え、4°C 1 時間反応させた。PBS で 5 回洗浄後、結合 cpm を測定した。%阻止率は対照の結合 cpm でサンプルでの結合 cpm を除して算出した。

(5) 遊離腫瘍関連抗原

遊離抗原として 3×10^5 /ml に調整した各種培養細胞を、3 日間培養したあと、上清を分離して利用した。

(6) Double determinant immunoassay (DDIA)

既報^{10,11)}に準じ抗 MAA MoAb 結合プレートに遊離 MAA を加え、4°C 5 時間反応させ、洗浄後¹²⁵I-標識抗 MAA MoAb (1×10^5 cpm) を加え、その結合能を測定した。

(7) 抗イディオタイプ抗体による抗原の検出

抗 Id MoAb (0.1 mg/ml, bicarbonate 溶液) をプレートに加え、4°C 16 時間付着させ、抗 Id MoAb 結合プレートを作製した。遊離 MAA を含む培養上清 50 μ l および¹²⁵I-標識抗 MAA MoAb 149.53 50 μ l (1×10^5 cpm) を 4°C 16 時間ブレインキュベーションしたあと、この混合物を上記プレートに加えた。4°C 2~3 時間反応後、0.05% Tween 20 加 PBS にて洗浄し、well 中に結合した radioactivity を測定した。¹²⁵I-標識 MoAb 149.53 の抗 Id 抗体への反応が MAA により阻止される%値は、実験群の radioactivity を、対照である MAA を含まない Daudi 細胞培養上清の成績で除して算出した。

結果

(1) 抗 MAA MoAb の認識するエピトープ

既報⁹⁾に示すように SDS-PAGE の結果から、MoAb 149.53, 225.28, 653.25, 763.74, および 902.51 は同一の高分子メラノーマ関連抗原(HMW-MAA)分子を認識している。さらに、これらの MoAb が認識するエピトープの異同を検討するため、交差阻止試験を行った。表 1 に示すごとく、MoAb 149.53, 763.74, および 902.51 は他の MoAb により MAA への結合阻止を受けないが、MoAb 225.28 および 653.25 は抗原への結合をたがいに強く阻止していた。

以上の成績から、MoAb 225.28 と 653.25 の認識するエピトープは、同一かあるいは非常に近接

表 1 epitopes on the high molecular weight-melanoma associated antigen^{*1)}

inhibitor	¹²⁵ I-labelled monoclonal antibodies				
	149.53	225.28	653.25	902.51	763.74
149.53	92 ^{*2)}	7	4	5	3
225.28	10	91	89	8	3
653.25	7	87	90	11	4
902.51	0	4	9	94	2
763.74	3	9	4	1	95

*1) Cultured melanoma cells were coated with a excess of cold MoAb and then tested for their ability to bind ¹²⁵I-labelled MoAb.

*2) The results were expressed as % inhibition.

表 3 characteristics of anti-idiotypic MoAbs MF9-10, MK1-180 and MK1-104 to anti-HMW-MAA MoAb 149.53

	anti-idiotypic monoclonal antibody		
	MF9-10	MK1-180	MK1-104
binding to F(ab') ₂ fragments of MoAb 149.53	15,320 cpm	6,650 cpm	14,630 cpm
sandwich assay with MoAb 149.53	12,830 cpm	170 cpm	2,830 cpm
% inhibition of MoAb 149.53 binding to MAA	95%	38%	3%
idiotype mapping on MoAb 149.53	combining site	non-combining site	non-combining site

しているが、他の 3 種の MoAb は、それぞれ異なったエピトープを認識することが示唆された。

(2) double determinant immunoassay による遊離抗原の検出

遊離 MAA 分子(メラノーマ細胞 Colo38 培養上清)の検出を、同一分子上のエピトープを認識する抗 MAA MoAb を用いた double determinant immunoassay(DDIA)を利用して検討した。異なった 5 種の抗 MAA MoAb を用いた種々の combination における遊離抗原検出を試みると、表 2 に示すごとく、MoAb 149.53—225.28, 149.53—653.25, 149.53—902.51, 149.53—763.74, 225.28—763.74, および 653.25—763.74 の combination により MAA の検出が可能であった。

一方、同一の MoAb を catcher および tracer

表 2 double determinant immunoassay with combination of five anti-HMW-MAA MoAbs^{*1)}

coating MoAb	¹²⁵ I-labelled MoAb				
	149.53	225.28	653.25	902.51	763.74
149.53	0.2 ^{*2)}	39.1	6.2	7.0	22.0
225.28	5.2	0.6	0.4	2.0	5.1
653.25	8.9	0.6	0.3	2.4	11.3
902.51	5.1	2.4	1.7	0.6	1.7
763.74	9.4	15.0	6.0	2.8	0.3

*1) Spent media of human cultured melanoma cell Colo 38 were added to anti-MAA MoAb coated plate and incubated 5 hours at 4°C. Following three washings, ¹²⁵I-labelled anti-MAA MoAb was added and incubated for 3 hours, then tested for its binding activity.

*2) The results were expressed as bound cpm × 10⁻³

として用いた場合、検出不能であり、また、エピトープが同一あるいは近接している MoAb 225.28 と 653.25 の combination では検出できなかった。そのほか MoAb 225.28—653.25, 225.28—902.51, 653.25—902.51, および 902.51—763.74 の combination でも検出できなかった。

以上の成績は、MoAb が認識するエピトープは MAA 分子上に 1 個あるいは少数しか存在しないこと、さらにエピトープが同一あるいは近接している MoAb を用いた combination による DDIA の場合、抗原検出ができないことを示唆していると考えられた。この成績より、それぞれの MoAb が認識するエピトープは、図 1 に示すように、149.53 は他のエピトープと離れて存在し、225.28(653.25 も同一部位)と 902.51, 902.51 と 763.74 のエピトープは近接した位置関係にあると推測された。

(3) MoAb 149.53 に対する抗イディオタイプ MoAb の解析

精製抗 HMW-MAA MoAb 149.53 を同系免疫し、型のごとく細胞融合し、抗 Id MoAb を作製した。スクリーニング法として MoAb 149.53 の F(ab')₂ fragments 結合反応, sandwich assay, および inhibition assay を用いた。得られた抗 Id MoAb から代表的な MoAb MF9-10, MK1-180, および MK1-104 を選び、各 assay におけ

図 1 spatial relationship among epitopes on MAA recognized with anti-HMW-MAA monoclonal antibodies

← : possible combination of MoAbs to detect HMW-MAA

図 3 effect of incubation time on % inhibition of idiotypic-anti-idiotypic interaction with anti-idiotypic monoclonal antibody MK1-180 (○—○), MF9-10 (●—●) and MK1-104 (▲—▲)

る反応性を検討した。表 3 に示すように 3 者とも $F(ab')_2$ fragments に強い反応性を有していたが、sandwich assay においては MF 9-10 および MK 1-104 は陽性であるが、MK 1-180 は反応性を示さなかった。

一方、MoAb 149.53 が MAA へ結合する反応に対する阻止率をみる inhibition assay において、抗 Id MoAb MF 9-10 は 95%、MK 1-180 は 38% および MK 1-104 は 3% の阻止率を示した。この成績は、MoAb 149.53 上に少なくとも 3 種のイディオトープが存在し、抗原結合部位上、非抗原結合部位上、およびその中間部位にそれぞれ MF 9-10、MK 1-104、および MK 1-180 により認識されるイディオトープが位置することを示唆し

図 2 idiotypic mapping of anti HMW-MAA MoAb 149.53

図 4 relationship between the results of a double determinant immunoassay and those of the inhibition of idiotypic-anti-idiotypic interaction to measure the level of HMW-MAA in spent medium of cultured cell lines

ていた(図 2)。

(4) 抗イディオタイプ MoAb を用いた遊離抗原の検出

① 反応条件の検討

MoAb 149.53 が抗 Id MoAb に結合する反応をメラノーマ抗原が阻止することを利用して、遊離 MAA の検出法確立のための条件設定を試みた。すなわち、プレインキュベーションした¹²⁵I-標識 MoAb 149.53 と遊離 MAA を含むメラノーマ培養細胞 Colo 38 上清の混合物を抗 Id MoAb 固相化プレートに加えたあと、反応時間を変化させ、結合 cpm の時間依存性を検討した。図 3 に示すよ

うに、抗 Id MoAb MK 1-180 および MF 9-10 を用いた場合、反応時間とともに阻止率は減少傾向を示し、阻止率は MoAb MK 1-180 を用いたときのほうが大きかった。一方、非抗原結合部位を認識する抗 Id MoAb MK 1-104 を用いた場合、反応時間に関係なくまったく阻止反応を認めなかった。

以上の成績から、抗 Id MoAb を用いた抗原検出には、MoAb 149.53 の near combining site を認識する抗 Id MoAb MK 1-180 を固相化し、反応時間は 2～3 時間が至適条件と考えられた。

② DDIA との比較

各種培養細胞の上清に含まれる MAA を抗 Id MoAb MK 1-180 を利用した本法および MoAb 149.53(固相化)および MoAb 225.28(¹²⁵I-標識)を用いた DDIA を用いて、それぞれ測定し、両者の関係について検索した。図 4 に示すように、本法による阻止%と DDIA による測定 cpm は強い直線関係が得られた。Student t-test により検定すると、両者は強い正の相関関係(相関係数 $r=0.98$, 危険率 $P<0.01$)を示し、本法の阻止率は遊離抗原量を反映していた。

考 察

ムチン上の糖鎖などのように、同一エピトープが多数発現されている分子であれば、そのエピトープを認識する、1 種類の MoAb を用いた sandwich assay あるいは reversed passive hemagglutination(RPHA)などの系によって検出可能である。しかし、それぞれのエピトープが 1 個あるいは少数しか発現されない HMW-MAA では、同一分子上の異なったエピトープを認識する少なくとも 2 種の MoAb が必要であり、さらに、表 2 に示したように二つのエピトープは離れて存在する必要があると推測される。

しかし一方、今回示した idiotype-anti-idiotype interaction が抗原に阻止されることを応用した抗 Id MoAb によるこの検出法は、抗原結合部位に関係したイディオタイプを認識する抗 Id 抗体が得られれば、一つのエピトープを介しての系であり、容易に抗原を検出する assay を確立できる^{12,13}。また、抗原分子上に一つしか存在しないエピトープの場合、あるいは一つのエピトープ

しか存在しない低分子の場合でも、assay を確立することが可能であるなど、有用な手法となりうると考えられる。

文 献

- 1) Perosa, F., Tsujisaki, M., Ferrone, S.: Syngeneic anti-idiotypic antisera to murine monoclonal antibodies to monomorphic and polymorphic determinants of HLA Class I antigens. *J. Immunol.* 138: 2202-2207, 1987.
- 2) Tsujisaki, M., Sakaguchi, K., Igarashi, M., Richiardi, P., Perosa, F., Ferrone, S.: Fine specificity and idiotypic diversity of the murine anti-HLA-A2, A28 monoclonal antibodies CR 11-351 and KSI. *Transplantation* 45: 632-639, 1988.
- 3) Kusama, M., Kageshita, T., Tsujisaki, M., Perosa, F., Ferrone, S.: Syngeneic anti-idiotypic antisera to murine anti human high molecular weight melanoma associated antigen monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 47: 4312-4317, 1987.
- 4) Tsujisaki, M., Kusama, M., Perosa, F.: Syngeneic polyclonal and monoclonal anti-idiotypic antibodies to murine anti human high molecular weight-melanoma associated antigen and anti HLA monoclonal antibodies (ed. Kano, K., Mori, S.). *Cellular, molecular & genetic approaches to immunodiagnosis and immunotherapy*. Univ. of Tokyo press, 1987, 251-258.
- 5) 今井浩三, 辻崎正幸, 谷内 昭: 抗腫瘍関連抗原モノクローナル抗体のイディオタイプマッピング. *癌と化学療法* 15: 1051-1059, 1988.
- 6) 辻崎正幸, 今井浩三, 得地 茂, 菱川法之, 谷内 昭, 日馬幹弘: 抗ヒトメラノーマ・モノクローナル抗体のイディオタイプ解析. *Drug Delivery System*, 3: 22-29, 1987.
- 7) 辻崎正幸, 得地 茂, 菱川法之, 小野晃裕, 今井浩三, 谷内 昭: 抗 CEA モノクローナル抗体のイディオタイプ解析と免疫応答. *Drug Delivery System* 3: 399-404, 1988.
- 8) Giacomini, P., Veglia, F., Cordiali Fei, P., Rehle, T., Natali, P. G., Ferrone, S.: Level of a membrane-bound high-molecular-weight melanoma-associated antigen and a cytoplasmic melanoma-associated antigen in surgically removed tissues and in sera from patients with melanoma. *Cancer Res.* 44: 1281-1287, 1984.
- 9) Tsujisaki, M., Kusama, M., Sakaguchi, K.: A sandwich assay to detect and characterize syngeneic anti-idiotypic antibodies to murine anti-HLA and tumor associated antigen monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 95: 47-55, 1986.
- 10) Giacomini, P., Ng, A. K., Kantor, R. R. S., Natali, P. G., Ferrone, S.: Double determinant immunoassay to measure a human high-molecular-weight melanoma-associated antigen. *Cancer Res.* 43: 3586-3590, 1983.

- 11) Sakaguchi, K., Ono, R., Tsujisaki, M., Richiardi, P., Carbonara, A., Park, M. S., Tonai, R., Terasaki, P. T., Ferrone, S. : Anti-HLA-B7, B27, Bw42, Bw54, Bw55, Bw56, Bw67, Bw73 monoclonal antibodies : Specificity, idiotypes and application for a double determinant immunoassay. *Human Immunology* 21 : 193-207, 1988.
- 12) Potocnjak, P., Zavala, F., Nussenzweig, R., Nussenzweig, V. : Inhibition of idiotype-antiidiotype interaction for detection of a parasite antigen. *Science* 215 : 1637-1639, 1982.
- 13) 辻崎正幸, 日馬幹弘, 今井浩三, 得地 茂, 山本公雄, 谷内 昭 : イディオタイプモノクローナル抗体による遊離腫瘍関連抗原の検出. *医学のあゆみ* 142 : 251-252, 1987.