抗イディオタイプ・モノクローナル抗体

辻崎正幸^{*1)}, 今井浩三・本谷 聡・日野田裕治・谷内 昭^{*2)}*Analysis of anti idiotypic monoclonal antibodies and their application in tumor immunology*

Id-anti-Id interaction constitutes an immune network that is involved in the regulation of the immune response. We prepared several anti-Id mAb to anti-CEA mAb MA 208 which was found to recognize the peptide of CEA. These anti-Id mAb were then used for idiotope mapping and for developing anti-anti-Id antibodies to analyze the Id network system relating to CEA. Anti-anti-Id mAb M 7-625 antisera (Ab 3) reacted with purified CEA in binding assay and in Western blot analysis, and competed with Ab1 binding to CEA.

It is indicated that Ab2 mimicks the structure of the epitope in CEA which was recognized with Ab1. These serologic findings suggest that anti-Id mAb M 7-625 carries the internal image of the Ag. According to the amino acid sequences of CDR 1, 2, and 3 of the mAb M 7-625 variable region, there exists a homology of amino acid sequences between CDR 2 in the H chain (5 amino acids of 10) and CDR 3 in the L chain (3 amino acids of 9) of mAb M 7-625 and domain III of CEA (545-554).

Internal image bearing anti-Id antibodies may be useful for the induction of a host's immune response against tumors.

Masayuki Tsujisaki^{*1)}, Kohzoh Imai・Satoshi Motoya・Yuji Hinoda・Akira Yachi^{*2)}

key words : *idiotype network system,
anti-idiotypic monoclonal antibodies, internal image of antigen*

idiotype network theory は免疫学に大きな impact を与えたばかりでなく、自己免疫疾患、レセプター病などの病因解析にも導入され成果を得ている。さらに細菌感染あるいは HIV を含むウイルス感染症¹⁾、寄生虫感染に対するワクチン実験に成功を収めている。

一方、腫瘍におけるイディオタイプ研究が散見されるが、筆者らは、これまでに抗イディオタイプ(Id)モノクローナル抗体(MoAb)を各種の腫瘍関連抗原系において確立し、癌の診断・治療への応用の可能性について検討を行ってきた。本稿では、筆者らの成績を加えつつイディオタイプ研究を概観し、腫瘍免疫におけるイディオタイプ・ネットワークの有用性について述べたい。

イディオタイプ・ネットワーク

(1) イディオタイプ(idiotype)とは

抗体が抗原と特異的に結合するのは、抗体の可変部領域(variable region)、特に超可変部領域(hypervariable region)が抗原表面に存在する抗原決定基(エピトープ)を認識するための異なった構造を持つことに由来する。このような抗体の異なった構造、すなわち抗体の個々の“顔”をイディオタイプと定義する。さらに、このイディオタイプはエピトープと相補的構造にあるパラトープと多くのイディオトープの集合体として形成されている(図1)。

(2) Idiotype network theory

Jerne はこれらのイディオタイプを介して免疫系が調節され、生体の恒常性維持を担っている可能性を考え、以下の3点からなる idiotype network theory を提唱した。

① 抗体分子はパラトープを介して他者のエピ

^{*1)} Department of Internal Medicine Tenshi Hospital 天使病院内科

^{*2)} Department of Internal Medicine(Section 1), Sapporo Medical College 札幌医科大学第一内科学教室

図1 抗原と抗体可変部領域におけるイディオタイプ構造

トープを認識すると同時に、イデオトープを介して認識される(二面性)。

② エピトープあるいはイデオトープはパルトープに対し刺激的に作用し、イデオトープに対する抗イディオタイプ反応は抑制的に作用する(ホメオスタシス)。

③ 免疫系が種々のイデオトープとパルトープ間の相互作用を基盤としたネットワークを形成することによりバランスを保っており内部抗原が相互に認識し、認識されることにより免疫系の拡がりを維持している。よって外来抗原は平衡が保たれているネットワークを乱すものとして位置付けし、免疫系は外へ向けられた系ではなく内部に向けられた相互作用により成立している。

この仮説は今日、免疫学の基本概念として受け入れられており、免疫系の調節機構において idio-type network が重要な役割を担っていることは疑いがない。

腫瘍免疫における抗イディオタイプ抗体の応用

腫瘍免疫における抗 Id 抗体の応用は広い範囲にわたっている(表1)。

血中に存在する腫瘍関連抗原(tumor associated antigen, TAA)の検出、あるいは宿主が TAA に対する抗体を産生する場合にも、その抗体の検出が可能であり、新しい癌診断アプローチになる。

一方、イディオタイプ解析に基づく抗原あるいは抗体の構造の検索が可能であり、さらに最大の関心事であるところの癌治療への応用の可能性も期待されている。

表1 腫瘍免疫における抗イディオタイプ抗体の応用

1) <u>analysis of fine structure</u>
Idiotype mapping of antibody
Analysis of internal image
2) <u>diagnosis</u>
Detection of circulating tumor associated antigen(TAA), anti-TAA antibody and immune complex
3) <u>therapy</u>
Induction of humoral and cellular immunity vaccination

(1) 抗イディオタイプ抗体を利用した癌診断
抗 Id 抗体を用いて血清中に存在する遊離 TAA, 抗 TAA 抗体、および両者が結合した免疫複合体の新しい検出法の開発を試みた。

癌胎児性抗原(CEA)について、抗 Id MoAb を用いて血中 CEA²⁾、宿主が産生する抗 CEA 抗体さらに CEA-抗 CEA 抗体からなる免疫複合体の測定系を確立した。

(2) 抗 Id MoAb を用いた CEA 抗原の検出
遊離型 CEA 抗原の検出には、既報³⁾に示すごとく抗 CEA MoAb 5 B 3 の抗原結合部位に関係した抗 Id MoAb T 4-305 を用いた。この独自の抗原検出法は、idiotype-anti-idiotypic interaction の阻止率をみるものであり、従来法の double determinant immunoassay(DDIA)とは異なっている(図2)。

そこで、CEA 産生および非産生各種培養細胞の培養上清を用いて、存在する遊離 CEA 量を測定した。図3に示すように抗 Id MoAb を用いた阻止反応は DDIA 法の結果と有意の相関関係を示し、抗原量を反映していると考えられた。

一方、精製 CEA を用いて抗 Id 抗体阻止反応系を適応すると、直線関係が得られ、阻止率は遊離 CEA 量に比例して増加していた。

(3) 抗 CEA 抗体および CEA・抗 CEA 抗体複合体の検出

一方、抗 Id MoAb を用いて患者血清中の抗 CEA 抗体を測定する系を確立し、悪性疾患、主に消化器癌患者について検討した。抗 CEA 抗体を認める症例は10~50万分の1と、まれであることが以前に報告されているが、筆者らの系でも進行癌では抗 CEA 抗体を認める例はほとんどなかつ

図 2 遊離型腫瘍関連抗原の検出法

a : DDIA 法(星印は ^{125}I -標識 anti CEA Ab)b : 抗 Id 抗体を用いた inhibition assay(星印は ^{125}I -標識 anti CEA MoAb)

た。しかし、遊離抗体ではなく免疫複合体として検出される例が見出され、興味深い。

Fuchs ら⁴⁾は CEA の免疫複合体について報告しているが、筆者らは抗 Id 抗体を用いた免疫複合体の新しい検出法を確立することができたため、いかなる腫瘍関連抗原が担癌宿主に抗体産生を誘導するのかについて検討し癌に対する免疫応答の機序解析に今後、応用することを考えている。

イディオタイプ・ネットワークシステムの解析

CEA 抗原系におけるイディオタイプ解析を抗イディオタイプ・モノクローナル抗体を多数確立し以下のごとく行った⁵⁾。

(1) 抗イディオタイプモノクローナル抗体の作製

抗 CEA MoAb MA 208 をマウスに同系免疫し型のごとく細胞融合を行った。固相化 CEA と ^{125}I -標識 MoAb MA 208 の結合阻害をみる inhibition assay により、MoAb MA 208 の抗原結合部位のイディオトープを認識する抗 Id 抗体産生ブリドーマのスクリーニングをした。得られた 5 種の ^{125}I -標識抗 Id MoAb を用い、MA 208 との反応性および各種 MoAb との交差反応性を検討した。それぞれの抗 Id MoAb は免疫原である

図 3 遊離 CEA 測定における DDIA と抗 Id 抗体を用いた inhibition assay の関係

MA 208 とのみ特異的に反応し、その他の抗 CEA、抗 NCA および抗 MAA(メラノーマ関連抗原)MoAb などに対して反応性を認めなかった(表 2)。

以上の結果より、それぞれの抗 Id MoAb が認識する epitope は MoAb MA 208 上の抗原結合部位に存在する idiotope であることが示唆された。

(2) 抗・抗イディオタイプ抗体の誘導と、その特異性

5 種の抗 Id MoAb をそれぞれ同系免疫し、抗血清を sandwich assay を用いて解析した。免疫原である抗 Id MoAb と反応する特異的抗・抗 Id 抗体が誘導されていることが示唆されるとともに、M 7-413 と M 7-914 および M 7-049 と M 7-418 に交差反応性を認め、shared idiotope の存在が推測された(表 3)。

(3) 抗原に反応する Ab 1 like Ab 3 の検出

これらの抗 Id MoAb は MA 208 の抗原結合部位を認識していることから MA 208 の paratope を介して、CEA の内部イメージを有する可能性がある。理論上 CEA の内部イメージを持つ抗 Id 抗体から誘導された抗・抗 Id 抗血清中に、もとの抗 CEA MoAb MA 208 と同様の特異性を有する population (Ab 1 like Ab 3) の存在を認めるかを、binding assay および Western blot analysis を用いて検討した。

抗 Id MoAb M 7-625 により誘導された抗血清は、他の抗血清および正常血清と異なり、固相化

表 2 Specificity of monoclonal anti-idiotypic antibodies elicited with anti-CEA MoAb MA208^{*1)}

MoAb	specificity	¹²⁵ I-labeled anti-idiotypic MoAb				
		M7-049	M7-413	M7-418	M7-625	M7-914
MA208	CEA	80.7 ^{*2)}	12.7	46.9	59.8	49.9
5B3	CEA	1.2	0.9	1.0	1.1	0.8
010	CEA	0.5	0.3	0.4	0.3	0.7
YK024	CEA	0.5	0.4	0.3	0.4	0.5
MA503	NCA	0.6	0.4	0.5	0.4	0.7
YH206	Mucin	0.7	0.4	0.5	0.4	0.8
BM2	X-hapten	0.4	0.4	0.4	0.4	0.6
225.28	HMW-MAA	0.6	0.3	0.4	0.4	0.7
HA58	ICAM-I	0.4	0.3	0.3	0.3	0.6
CR11-115	HLA-class I	0.6	0.5	0.4	0.4	0.5
KSI	HLA-A2, A28	0.5	0.4	0.4	0.4	0.5

*1) ¹²⁵I-labeled monoclonal anti-idiotypic antibodies were incubated for 3 hours at 4°C with monoclonal antibodies coated microtiter plates. Then plates were washed and bound radioactivity was counted in a γ -counter.

*2) Results are expressed as cpm $\times 10^3$.

表 3 Analysis of anti-anti-idiotypic antisera generated with anti-idiotypic mAb to anti-CEA mAb MA208

anti-idiotypic mAb(Ab2)	anti-anti-idiotypic antiserum(Ab3)generated with				
	M7-625	M7-413	M7-914	M7-049	M7-418
sandwich assay					
M7-625	22495 cpm*	647 cpm	777 cpm	839 cpm	1001 cpm
M7-413	300	17115	7852	291	499
M7-914	394	5032	21197	524	749
M7-049	659	965	739	11446	4737
M7-418	388	731	423	10434	6991

* Anti-anti-idiotypic antisera were incubated with anti-idiotypic mAb coated on microtiter plates, and then the reactivity of ¹²⁵I-labeled monoclonal anti-idiotypic antibodies was tested in sandwich assay. The results are expressed as bound cpm. Positive results are marked by underlining

CEA と結合反応し(図 4)さらに Western blotting において 200 kd である CEA と反応性を有していた(図 5)。

一方、還元・非還元下で行った Western blot analysis により抗 Id MoAb M7-625 は還元下で MoAb MA 208 との反応性を失った(図 6)。これは CEA 構造が抗 Id 抗体の heavy 鎖と light 鎖の両方に share されていることを推測させた。以上の結果より、抗 Id MoAb M 7-625 は CEA の internal image を有する抗体であることが示唆された。

(4) internal image の構造解析

抗 Id MoAb M 7-625 の有する抗原の internal image がどのような構造として CEA 抗原を mimic しているかを検索した⁶⁾。heavy chain および light chain の variable region のクローニングに PCR 法を利用し、cDNA を得、vector に ligation した。V 領域 FR (framework region) 1~3, CDR (complementary determining region) 1~3 の DNA およびアミノ酸配列を決定した。同様に internal image をもたない抗 Id MoAb M 7-049 もクローニングした。

抗 Id MoAb M 7-625, M 7-049 の V_H 領域はそれぞれ subgroup II (A) に属し (図 7), V_L 領域は kappa light chain group 3, および group 5 であった。そこで抗原 CEA と抗 Id MoAb M 7-625, M 7-049 の V_H, V_L 領域のアミノ酸ホモロジー検

索をすると図 8 に示すごとく internal image を有する抗 Id MoAb M 7-625 の V_H・CDR 2 (アミノ酸 NO. 57~66) と CEA domain III (アミノ酸 NO. 545~554) に 5 個のアミノ酸一致を認めた。一方, internal image を持たない抗 Id MoAb M 7-049 は CEA とのホモロジーを有していなかった。図には示していないが, 同様の検索から, M 7-625 の V_L・CDR 3 においても 3 個のアミノ酸一致を認めた。すなわち CEA の構造は抗 Id MoAb の H および L chain の両鎖にまたがって mimic されていることが推測された (図 9)。

図 4 Reactivities of anti-anti-Id antisera generated with anti-Id mAb M7-625 (n=4) and M7-049 (n=4) to purified CEA. Normal serum (n=3) was used as a negative control.

抗イディオタイプ抗体を用いた癌治療

以上示したごとく, 腫瘍関連抗原系においても, 確実にイディオタイプ・ネットワークシステムが存在し, さらに抗 Id 抗体に腫瘍抗原の構造が mimic されていることが示唆された。したがって, 癌治療の一つのアプローチとして抗イディオタイプ抗体の利用が考えられる。

腫瘍に対する抗 Id 抗体の治療法は大きく 2 種に分類できる。一つは passive immunotherapy と

図 5 Western blot analysis of binding activities of anti-anti-idiotypic MoAbs T3-503 (lane 2), T4-202 (lane 3), M7-049 (lane 5), and M7-625 (lane 6) antisera to purified CEA. Lane 1 (anti-CEA MoAb 5B3), lane 4 (anti-CEA MoAb MA208), and lane 7 (preimmune serum) are tested for binding to CEA as controls.

Fig. 6 Western blot analysis for Id-anti-Id interaction. Anti-Id mAb M7-625 (lanes 1 and 2), M7-049 (lanes 3 and 4), and irrelevant mAb 17-1A (lanes 5 and 6) were tested for binding activity with ^{125}I -labeled mAb MA208. Reactivity of anti-Id mAb M7-625 with ^{125}I -labeled anti-mouse Ig antibodies (lanes 7 and 8) was assessed by Western blot (7.5% gel). (Lanes 1, 3, 5, and 7 : reducing condition, lanes 2, 4, 6, and 8 : nonreducing condition : H·L, nonreducing, whole Ig).

しての targeting 療法であり、もう一つは immunomodulation を誘起する active immunotherapy である。

(1) 抗 Id 抗体によるターゲティング療法

単クローン性に増殖する腫瘍である B cell lymphoma では、腫瘍細胞表面に immunoglobulin(Ig)を表現している。この Ig は正常細胞には存在せず、腫瘍細胞クローンに特有な Id を有しているために、一種の腫瘍特異抗原と考えられる。この Id に対して抗 Id 抗体を作製し、投与すれば特異性の面で理想的な targeting 療法となりうる。

この視点にたち、B cell lymphoma 症例に対し、Levy ら⁷⁾は抗 Id MoAb を用いた一連の targeting therapy を施行した。完全寛解例をはじめとして腫瘍縮小を認めるなどの成果を得ている。詳細は他書⁸⁾を参照されたい。

[illegible]

Figure 7 Nucleotide sequence of the VH cDNA of anti-Id mAb M7-625 and M7-049. The subgroups of mAb M7-625 and M7-049 are both group II (A).

CEA	Domain III	538	G I Q N S V S A N R S D P V T L D	554
M7-625	CDR2	50	R M N F Y T G C A E F D P N F K D	66
M7-649	CDR2	50	L I N F Y T G G T N Y N Q K P F K G	66
MOPC104E	CDR2	50	D I N F N N G G T S Y N Q K F K G	
M7-625	CDR3	99	G N F G Y F D V	106
M7-649	CDR3	98	W G P G F S F D Y	107
MOPC104E	CDR3	99	D Y D Y F D V	106

Figure 8 The compared sequences of the VH-CDR2 or CDR3 of internal image bearing anti-Id mAb M7-625, internal image nonbearing anti-Id mAb M7-049, irrelevant mAb MOPC 104E and CEA domain III

The subgroup of these three mAb is group II (A). The amino acid sequences (nos. 57-66) within VH · CDR2 of anti-Id mAb M7-625 are unique and different from those of irrelevant mAb MOPC 104, and furthermore those AA are identical to those of CEA domain III. However, those of VH · CDR3 of mAb M7-049 are unique, but no homologous to CEA is found.

625 V _H CDR2	50	RMNPFYNGAIRFDPNFKD	66

CEA	538	GIQNSVSANRSDPVTLDVLY	557

625 V _L CDR3	89	QQSNEDPFT	97

图 9 The compared sequences of the VH·CDR2 and VL·CDR3 sequence of anti-Id mAb M7-625 and the third domain of CEA

The amino acids marked by asterisk are identical.

図 10
癌免疫療法の新しい
アプローチ

図 11 Idiotypic network system in tumor associated antigen

(2) 抗 Id 抗体を用いた免疫誘導療法

上述の targeting therapy は MoAb を腫瘍細胞表面に特異的に結合させたあと、補体、T細胞とともに CDC, ADCC などの cytotoxic mechanism による臨床効果を期待するものであった。

これに対し、抗 Id 抗体を投与することにより生体に immunomodulation を与える active im-

muno-therapy は、腫瘍特異的な宿主自身の抗体産生(液性免疫)、あるいは特異的な T cell 系の誘導(細胞性免疫)を惹起するなど、イディオタイプを介した免疫応答を利用しようというものである。

① 抗 Id 抗体療法の特徴

抗 Id 抗体を用いた免疫療法は図 10 に示すように、抗原・非特異的免疫応答を宿主に誘導する BRM(biological response modifier)と抗原特異的な抗体を受働免疫し、抗体の抗原への直接結合を介した抗腫瘍効果をねらう targeting therapy をあわせたようなアプローチである。

② 腫瘍関連抗原系におけるイディオタイプ・ネットワークシステム

図 11 に腫瘍抗原をめぐるイディオタイプ・ネットワークについて示した。ある腫瘍関連抗原を認識する抗体(Ab 1)を免疫すると、Ab 1 特異的な抗 Id 抗体(Ab 2)が誘導される。これら抗 Id 抗体・Ab 2 の中には Ab 1 の paratope を介して抗原の内部イメージ(internal image of antigen)を持つ Ab 2 が存在する。理論上、抗原の internal image を有する抗 Id 抗体を免疫することにより誘導される抗・抗 Id 抗体(Ab 3)には、もとの抗原と反応し、Ab 1 と同様の特異性を有する抗体(Ab 1 like Ab 3)の population が含まれる。よって、internal image を有する Ab 2 を免疫すれば抗原に反応する Ab 3 を誘導することが可能とな

り、抗腫瘍機序を期待できる。この場合、Ab 2 は液性免疫のみならず抗原特異的 helper T cell⁹⁾、CTL¹⁰⁾ などの抗腫瘍T細胞の誘導をも可能にしているという報告もある。

まとめ

以上示したごとく、腫瘍抗原系において、抗 Id 抗体は腫瘍関連抗原、これに対する抗体および免疫複合体の検出などの癌診断に応用することができる。また、イディオタイプ・マッピングを主体とした抗体あるいは抗原の構造解析を可能にする。さらに CEA を用いた解析から、腫瘍関連抗原系においても idiotypic network system が成立し、血清学的検査およびクローニングから、ある特定の抗 Id 抗体が抗原の internal image を有することが示唆された。

一方、*in vivo* 実験において internal image を有すると考えられる抗 Id MoAb がメラノーマ同系移植腫瘍に対し、部分的なワクチン効果を認めること¹¹⁾、あるいは Ferrone ら¹²⁾が悪性メラノーマ患者に抗 Id MoAb を用いた phase I trial を行い治療効果を認めるなどの報告がある。このように抗 Id 抗体による active immunotherapy は、idiotypic network system を介して宿主に antigen specific immunomodulation を与える可能性があり、今後、癌免疫療法の一つとして期待される。

文 献

- 1) Zhou, E.-M., Lohman, K. L., Kennedy, R. C.: Administration of noninternal image monoclonal anti-idiotypic antibodies induces idiotypic-restricted responses specific for human immunodeficiency virus envelope glycoprotein epitopes. *Virology* 174, 9-17, 1990.
- 2) 辻崎正幸, 日馬幹弘, 今井浩三・他: 抗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.
- 3) Tsujisaki, M., Imai, K., Tokuchi, S., Masuya, J., Ishida, T., Adachi, M., Hinoda, Y., Hanzawa, Y., Yachi, A.: New assay to detect shedding antigen with use of anti-idiotypic monoclonal antibodies. *J. Clin. Lab. Analysis* 5: 14-20, 1991.
- 4) Fuchs, C., Krapf, F., Kern, P. et al.: CEA-containing immune complexes in sera of patients with colorectal and breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 26: 180-184, 1988.
- 5) Tsujisaki, M., Imai, K., Tokuchi, S., Hanzawa, Y., Ishida, T., Kitagawa, H., Hinoda, Y., Yachi, A.: Induction of antigen-specific immune response with use of anti-idiotypic monoclonal antibodies to anti-carcinoembryonic antigen antibodies. *Cancer Res.* 51: 2599-2604, 1991.
- 6) Tsujisaki, M., Hinoda, Y., Tokuchi, S., Hanzawa, Y., Arimura, Y., Masuya, J., Kitagawa, H., Okochi, E., Shimamura, T., Hamuro, J., Imai, K., Yachi, A.: The analysis of internal image-bearing anti-idiotypic monoclonal antibody in relation to CEA. *J. Immunol.* 150: 508-516, 1993.
- 7) Meeker, T. C., Lowder, J., Maloney, D. G., Miller, R. A., Thielemans, K., Warnke, R., Levy, R.: A clinical trial of anti-idiotypic therapy for B cell malignancy. *Blood* 65: 1349-1363, 1985.
- 8) Brown, S. L., Miller, R. A., Levy, R. et al.: Treatment of B-cell lymphomas with anti-idiotypic antibodies alone and in combination with alpha interferon. *Blood* 73: 651-661, 1989.
- 9) Saeki, Y., Chen, J. J., Shi, L. et al.: Idiotypic-specific T helper clones recognize a variable H chain determinant. *J. Immunol.* 144: 1625, 1990.
- 10) Raychaudhuri, S., Saeki, Y., Chen, J. J. et al.: Tumor specific idiotypic vaccines: II. Analysis of the tumor-related network response induced by the tumor and by internal image antigens (Ab 2 β). *J. Immunol.* 139: 271, 1987.
- 11) 陣野原庸治, 辻崎正幸, 榛沢義昭, 得地 茂, 石田禎夫, 舩谷治郎, 本谷 聡, 日野田裕治, 今井浩三, 谷内 昭: メラノーマ抗原系における抗イディオタイプのワクチン効果. *DDS* 8: 27-31, 1993.
- 12) Mittelman, A., Chen, Z. J., Yang, H., Wong, G. Y., Ferrone, S.: Human high molecular weight melanoma-associated antigen (HMW-MAA) mimicry by mouse anti-idiotypic MoAb MK 2-23: Induction of humoral anti-HMW-MAA immunity and prolongation of survival in patients with stage IV melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 466-470, 1992.