辜丸絨毛上皮癌細胞株に対するモノクローナル抗体

東京慈恵会医科大学 山 崎 春 城
(主任: 町田豊平) 町 田 豊 平

A MONOCLONAL ANTIBODY TO A TESTICULAR CHORIOCARCINOMA CELL LINE

Haruki Yamazaki and Toyohi Machida

Department of Urology, The Jikei University School of Medicine

(Director: Prof. T. Machida)

Monoclonal antibodies were developed in order to define tumor-associated antigens or differentiation antigens of human testicular choriocarcinoma by fusing SP2/0-Ag14 mouse myeloma with splenocytes from BALB/c mice immunized with testicular choriocarcinoma cell line JHTK-1. Solid-phase enzyme immunoassay (EIA) using glutaraldehyde-fixed cultured cell lines as targets was carried out for antibody screening. After cloning a selected hybridoma culture, we succeeded in isolating a monoclonal antibody (Cho. 1) which recognized an antigen expressed predominantly in choriocarcinoma cell lines. By quantitative absorption assay, Cho. 1 bound with normal chorion and testicular choriocarcinoma tissues, i.e., normal and malignant trophoblastic tissues, but not with normal testis, seminoma, embryonal carcinoma or yolk sac tumor tissues. By solid-phase radioimmunoassay (RIA), Cho. 1 did not bind with well-known marker antigens such as human chorionic gonadotropin (HCG), pregnancy specific β_1 -glycoprotein (SP1) or α -fetoprotein (AFP). In conclusion, we believe that Cho. 1 recognizes a trophoblast-specific antigen that is different from placental antigens such as HCG and SP1. Cho. 1 may be useful clinically as a new agent for the diagnosis and treatment of testicular choriocarcinoma.

要旨: 辜丸胚細胞性腫瘍における新しい免疫学的な診断・治療法を開発する目的で辜丸腫瘍細胞株に対するモノクローナル抗体を作製した。これはヒト辜丸絨毛上皮癌細胞株を免疫した BALB/c マウスの脾細胞とマウス骨髄腫 SP2/0-Ag14を細胞融合したハイブリドーマより得られた。ハイブリドーマ抗体のスクリーニングおよび特異性の検討は、絨毛上皮癌細胞株をふくめた13種のヒト培養細胞株を標的とした酵素免疫測定法(EIA)を用いて行い、絨毛上皮癌細胞株にほぼ特異的に結合するモノクローナル抗体を分離した。このモノクローナル抗体(Cho. 1と命名する)は吸収試験では正常辜丸およびセミノーマ、胎児性癌、ヨークサック腫瘍の各辜丸腫瘍組織では吸収されなかったが、正常絨毛膜および辜丸絨毛上皮癌組織すなわち正常および悪性の栄養胚葉により吸収された。また Cho. 1はラジオイムノアッセイ(RIA)では、human chorionic gonadotropin (HCG), pregnancy specific α_1 -glycoprotein (SP1), α -fetoprotein (AFP) および carcinoembryonic antigen (CEA) などの腫瘍マーカーとの結合は認められなかった。以上の結果、Cho. 1は HCG, SP1 などの既知の腫瘍マーカーとは異なる物質で栄養胚葉細胞(トロホブラスト)に特異的なある胎盤抗原を認識すると考えられた。モノクローナル抗体 Cho. 1は、辜丸絨毛上皮癌における新しい診断・治療薬として臨床応用の可能性が示唆された。

結 言

Köhler と Milstein¹⁾が免疫細胞の細胞融合法を確立して以来、モノクローナル抗体法は画期的な技術として脚光を浴び、癌研究の領域において腫瘍関連抗原や分化関連抗原の検索のために白血病、結腸癌、メラノーマおよび脾癌などの多くの腫瘍に対するモノクローナル抗体が精力的に作製されており、泌尿器科領

域でも多くのモノクローナル抗体が報告されている。そのうちの幾つかのモノクローナル抗体は、癌の血清診断、放射免疫局在診断および特異的免疫療法などに臨床応用されている²⁾³⁾。

男性生殖器腫瘍の代表的なものの一つである辜丸胚細胞性腫瘍は、胎芽の発生と類似し多分化能を有することから多彩な組織像を示すことが特徴であり、この

ため胎芽発生に関連した腫瘍関連抗原や分化関連抗原の存在が推測されており^{4)~7)}, モノクローナル抗体による検索が大いに期待されている。

最近, 当教室では睾丸絨毛上皮癌細胞株の樹立⁸⁾に成功しているが, 今回, われわれは本細胞株を用い睾丸胚細胞性腫瘍に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。この分離したモノクローナル抗体についてその特異性を検討するとともに, 睾丸腫瘍における臨床応用の可能性について言及する。

材料と方法

モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体は, Oi, V.T. ら⁹⁾の方法に準じて作製した。その詳細はすでに報告したとおりである¹⁰⁾。

1) 免疫

モノクローナル抗体作製のための免疫原としてヒト睾丸絨毛上皮癌細胞株 JHTK-1⁸⁾を使用した。約 2×10^6 個の JHTK-1 細胞を BALB/c マウスの腹腔内に 3 ~ 4 回, 2 週毎に注射し, 最終免疫後 3 日目で脾臓を摘出し脾細胞を調整した。

2) 細胞融合

10^6 個の脾細胞と 10^7 個のマウス骨髓腫 SP2/0-Ag14 を 50% ポリエチレングリコール 1,000 (和光純薬) 溶液中で細胞融合した。これを 50ml の増殖培地 (20% 牛胎児血清加 RPMI 1,640 培地, Flow 社) に懸濁し, 200 μ l ずつ 96 孔組織培養プレート (Limbro 社) に分注し, 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。翌日より培養液を HAT 培地に交換し脾細胞と骨髓腫との融合細胞, すなわちハイブリドーマのみを選択的に増殖させた (HAT selection)。

3) 抗体活性の測定

ハイブリドーマ培養上清の抗体活性の検出は, 0.2% glutaraldehyde で 96 孔組織培養プレートに固定された各種ヒト培養細胞株に対する培養上清の結合反応性を調べることによった。用いたヒト培養細胞株 (JHTK-1 以外は大日本製薬より購入) は 13 種である (Table 1)。測定方法は solid-phase EIA (indirect

Table 1 Human cultured cell lines used for antibody screening

JHTK-1	testicular choriocarcinoma
Bewo	gestational choriocarcinoma
PA-1	ovarian teratocarcinoma
A549	lung adenocarcinoma
IMR-32	neuroblastoma
ZR-75-1	breast cancer
PANC-1	pancreatic cancer
Hela	cervical cancer of the uterus
COLD-201	colon cancer
IM-9	lymphoblast
HT-1197	bladder cancer
HT-1080	fibrosarcoma
CCD-8Lu	lung, diploid

method) である (Fig. 1)¹¹⁾。培養上清は 50 μ l を使用し標的細胞と室温で 4hr 反応させた。酵素反応は, 標識抗体として 400 倍希釈ペルオキシダーゼ抗マウス IgG 複合体 (Sigma 社) 100 μ l (室温, 2hr), 反応基質溶液 (0.1 M クエン酸緩衝液 pH 4.5, 10ml; orthophenyldiamine, 10mg; 30% H₂O, 4 μ l) 200 μ l を使用して行い, 10min 後に, 1NHCl を 2ml 入れたテストチューブ中に反応液を移して発色を停止させた。分光光度計を用いて波長 492nm での吸光度 (A_{492}) を測定した。なお $A_{492} \geq 0.3$ を抗体陽性として十分に高い親和性を示す抗体を選択した¹¹⁾。

4) ハイブリドーマのクローニングと腹水腫瘍化

注目したハイブリドーマは, BALB/c マウスの胸腺細胞を feeder layer として限界希釈法によりクローニングを行った。またハイブリドーマの腹水腫瘍化は, プリスタンで前処置した 6 週齢以上の BALB/c マウスに $2 \sim 5 \times 10^6$ 個のハイブリドーマを腹腔内に注射移植して行った。また必要なハイブリドーマは液体室素中で凍結保存した。

モノクローナル抗体の特異性の検討

分離したモノクローナル抗体の特異性を詳細に検討するために, モノクローナル抗体と正常・腫瘍組織との反応性を吸収試験を用いて, また各種の腫瘍マ

Fig. 1 Solid-phase enzyme immunoassay for screening.

カーとの反応性を solid-phase RIA を用いて測定した。

1) 吸収試験

モノクローナル抗体と各種ヒト組織抗原との結合反応性の検討は、モノクローナル抗体が組織のホモジネートにより吸収されるか否かにより行った。組織ホモジネートは Starling, J.J. ら¹²⁾の方法により調整した。測定操作は、抗体吸収を種々の重量のホモジネートに希釈モノクローナル抗体溶液100 μ lを加えて4 $^{\circ}$ C, 90min 反応させて行い、次に反応液の上清に残った抗体活性を前述の睾丸絨毛上皮癌細胞株 JHTK-1 を標的とした solid-phase EIA で測定した (Fig. 1)。

抗体吸収に用いたヒト正常および腫瘍組織は、正常睾丸 (4 検体)、セミノーマ (4 検体)、胎児性癌 (1 検体)、ヨークサック腫瘍 (JGT-1 ヌードマウス可移植性ヒト睾丸腫瘍株¹³⁾)、肝転移巣より得た睾丸絨毛上皮癌 (1 検体) および妊娠性絨毛膜 (妊娠 7~9 週, 3 検体) であった。なお、各組織検体は使用直前まで-80 $^{\circ}$ C に保存した。

2) RIA

モノクローナル抗体と各種の腫瘍マーカーとの反応性は solid-phase RIA (direct method)¹⁵⁾を用いて測定した。検討したマーカー抗原は、栄研イムノケミカルより供与された HCG, SP1, HPL (human placental lactogen), AFP, CEA, β_2 -microglobulin, ferritin, NSE (neuron specific enolase) および PAP (prostatic acid phosphatase) であり、またこれらのマーカー抗原を吸着させる固相にはポリスチレンボール (明和) を使用した。

マーカー抗原の固相化は、5ml の精製抗原溶液 (20~200 μ g/ml) とポリスチレンボールを 4 $^{\circ}$ C, 1 昼夜反応させて行った。測定操作は、抗原吸着ポリスチレンボールと¹²⁵I-標識モノクローナル抗体 (ハイブリドーマ培養上清の 50% 飽和硫酸アンモニウム分画をクロアミン T 法で標識した¹⁴⁾) とを 4 $^{\circ}$ C, 1 昼夜反応させたのち、ポリスチレンボールに結合した放射活性を r・シンチレーションカウンターで測定した。なお、positive control として無固定の睾丸絨毛上皮癌細胞 JHTK-1 を、negative control として無固定の肺腺癌細胞 A549 を用いた。この場合、テストチューブ中で標的細胞10⁶個と¹²⁵I-標識抗体とを 4 $^{\circ}$ C, 2hr 反応させ、遠心 (500 $\times$ g, 10分間) 分離後、標的細胞に結合した放射活性のみを測定した。

Fig. 2 Binding of monoclonal antibody (Cho. 1) to cultured human cells.

結 果

睾丸絨毛上皮癌細胞株 JHTK-1 に対するハイブリドーマ抗体

睾丸絨毛上皮癌細胞株 JHTK-1 を免疫されたマウスの脾細胞とマウス骨髓腫 SP2/0-Ag14 との細胞融合実験を 5 回行った。ハイブリドーマ培養上清の抗体活性を、まず JHTK-1 細胞を標的とした solid-phase EIA でスクリーニングした。その結果、51 孔の培養上清が JHTK-1 細胞に対して抗体陽性であった。さらに細胞型を異にする肺腺癌細胞株 A549 を標的細胞とした solid-phase EIA を行ったが、51 孔のうち 2 孔のハイブリドーマ培養上清からは抗体活性は検出されなかった。

モノクローナル抗体と各種ヒト培養細胞株との反応性

睾丸絨毛上皮癌細胞株 JHTK-1 とは結合するが肺腺癌細胞株 A549 には結合しない 2 種のハイブリドーマ抗体が得られたが、各々のハイブリドーマ培養をクロニングし、一つのハイブリドーマクローンを得た。

このクローンが分泌するモノクローナル抗体 (Cho. 1 と命名した) と 13 種のヒト培養細胞株との結合性を solid-phase EIA で検討した。その成績を Fig. 2 に示す。Cho. 1 は睾丸絨毛上皮癌細胞株 JHTK-1 と強く結合した。そして妊娠性絨毛上皮癌細胞株 BeWo とも比較的強く反応し、その結合活性は JHTK-1 の 40% 以上であった。他の細胞株との反応性は、子宮頸癌細胞株 Hela と 25% の弱い結合性を示すものの、胚細胞性の奇型腫細胞株 PA-1 を含めて他の細胞株との結合性は 8% 以下であった。従って、Cho. 1 は、Hela と僅かに

Fig. 3 Absorption test of monoclonal antibody (Cho. 1) with normal and malignant tissue homogenates.

Fig. 4 Binding of monoclonal antibody (Cho. 1) to tumor marker antigens by solid-phase RIA.

交差反応するものの、妊娠性・非妊娠性を異にすることなく絨毛上皮癌細胞株に対して優位な結合反応性を示した。

なお、Cho. 1の抗体価（最大結合の50%を示す抗体希釈濃度）は、培養上清では $\times 130$ 、マウス腹水では $\times 20,000$ であった。またイムノグロブリン・サブクラスはIgG 2a（タイピング用キット/大日本製薬を使用）であった。

吸収試験

絨毛上皮癌細胞株に強く反応するCho. 1の特異性を、正常および腫瘍組織を用いた吸収試験を行い更に検討した。その成績をFig. 3に示すが、Cho. 1は睾丸絨毛上皮癌および正常妊娠絨毛膜組織によって強く吸収されたが、逆に正常睾丸、セミノーマ、胎児性癌およびヨークサック腫瘍のいずれの組織でも吸収されな

かった。従って、Cho. 1は正常および悪性の栄養胚葉（トロホブラスト）組織に特異的な結合反応性を示した。

Cho. 1とマーカー抗原との反応性

モノクローナル抗体のCho. 1と既知の腫瘍マーカーとの反応性の有無をsolid-phase RIAを用いて検討した（Fig. 4）。Cho. 1は、睾丸腫瘍の腫瘍マーカーであるHCG、AFPを初めとしてSP1、CEA、 β_2 -microglobulin、ferritinなどの各種腫瘍マーカーとの反応性は全く認められなかった。

以上の成績からみてCho. 1は、栄養胚葉細胞（トロホブラスト）に特異的であるが絨毛上皮癌に対する既知の腫瘍マーカー（HCG、SP1など）とは異なる新しい胎盤抗原を認識するものと考えられた。

考 案

睾丸胚細胞性腫瘍の生化学的マーカーとしてのAFPやHCGは、その診断に重要な意味を持っているが、非セミノーマ性腫瘍の60～80%が陽性を示すに過ぎない。それはいずれのマーカーもある方向へ分化した腫瘍の細胞型を表現しているためである。すなわちAFPはヨークサックへの分化を、HCGはトロホブラストへの分化を示しているのみである¹⁶⁾。従って多分化能を有する睾丸胚細胞性腫瘍の診断においてはその他の細胞型に対応する腫瘍マーカーも必要である。またこうしたマーカー抗原の発見は特異的免疫療法などの睾丸腫瘍の新しい治療法の開発につながる可能性も有している。

このような意味から、われわれは睾丸胚細胞性腫瘍の診断あるいは治療成績を向上させる目的でハイブリドーマ法を応用しモノクローナル抗体を作製してきた。本研究では、ヒト睾丸絨毛上皮癌細胞株に対するモノクローナル抗体を作製し、絨毛上皮癌の腫瘍マーカーであるHCG、SP1などとは異なる物質でトロホブラストに特異的なある胎盤抗原¹⁷⁾を認識するモノクローナル抗体（Cho. 1）を分離した。

睾丸胚細胞性腫瘍に関連するモノクローナル抗体については、既にいくつかのものが報告されているSolter, D.ら⁶⁾は、1978年にSSEA-1 (stage-specific mouse embryonic antigen) を認識するモノクローナル抗体を分離した。SSEA-1はヒト胎児性癌に発現することから睾丸腫瘍の新しいマーカーとして注目されたが、その後の研究ではヒト正常組織や結腸癌などの癌組織にも広く分布する抗原であることが判明している¹⁸⁾。また Monaghan, P. ら⁷⁾は、1982年ヌードマウス

可移植性ヒト睾丸胚細胞性腫瘍株を用い胎児性癌に対するモノクローナル抗体を作製した。そのなかで胎児性癌組織の腺房構造などの特異的な組織構造と反応するモノクローナル抗体や胎児性癌と腎細胞癌のみに反応する特徴的なモノクローナル抗体を分離している。

さらにトロホプラストに対するモノクローナル抗体も作製されている^{19)~22)}。免疫原として妊娠性絨毛上皮癌細胞株などが用いられているが、正常のトロホプラストと反応する幾つかのモノクローナル抗体が確立されている。

しかし、いずれのモノクローナル抗体も特異性などの問題のために実際には臨床応用されるには至っていない。

ところで、われわれのモノクローナル抗体 Cho. 1 の認識する胎盤抗原は、弱いながらも非絨毛細胞由来である子宮頸癌細胞株 Hela にも発現されている (Fig. 2)。このため認識する抗原がトロホプラストに特異的でないとも考えられる。しかし、一般にある腫瘍細胞は胎盤抗原を異所性に産生することがあり、これを oncoplacental antigen と呼んでいるが、Hela 細胞も HCG、胎盤性 alkaline phosphatase などの胎盤抗原を異所性産生することが知られている²³⁾。従って胎盤抗原を認識する Cho. 1 が Hela 細胞と交差反応しても不合理ではない。

モノクローナル抗体を腫瘍の血清診断、放射免疫検出法や免疫療法へ臨床応用する際には、認識抗原の局在性は重要な問題である。一般に、細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体は、細胞内抗原や分泌性抗原に対するものと比較してその抗体結合部位が細胞表面に存在するため、腫瘍の放射免疫局在診断法や免疫療法への応用には有利である。われわれの Cho. 1 は、glutaraldehyde で固定された細胞のみならず無固定の生細胞にも同様に結合することから (Fig. 4)、その認識抗原は細胞表面に存在すると考えている。従って、Cho. 1 の臨床応用として、本抗体を睾丸胚細胞性腫瘍患者に投与することにより、絨毛上皮癌成分の転移部位を画像診断する可能性や、通常の化学療法に抵抗性を示した睾丸腫瘍症例に対して抗体治療する可能性も考えられる。

結 語

ハイブリドーマ技術を応用し、睾丸胚細胞性腫瘍の分化関連抗原に対するモノクローナル抗体 (Cho. 1) を分離した。Cho. 1 は細胞表面に局在する未知のトロホプラスト特異抗原を認識すると考えられることが

ら、睾丸絨毛上皮癌の診断・治療への応用が期待される。

本研究の一部は昭和58、59年度文部省科学研究費補助金 (課題番号58570667) によった。

文 献

- 1) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495—497, 1975.
- 2) 前田敏宏, 渡辺 武: モノクローナル抗体の癌研究への応用. *Oncologia*, 1, 128—139, 1982.
- 3) 谷内 昭, 高橋利忠: モノクローナル抗体と癌—基礎と臨床—. 1-530, サイエンスフォーラム, 東京, 1985.
- 4) Kemler, R., Babinet, C., Eisen, H. and Jacob, F.: Surface antigens in early differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 4449—4452, 1977.
- 5) Stern, P.L., Willison, K.R., Lennox, E., Galfre, G., Milstein, C., Sechen, D. and Zeigler, A.: Monoclonal antibodies as probes for differentiation and tumor-associated antigens: A Forssman specificity on teratocarcinoma stem cells. *Cell*, 14, 775—783, 1978.
- 6) Solter, D. and Knowles, B.B.: Monoclonal antibodies defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 5565—5569, 1978.
- 7) Monaghan, P., Reghavan, D., McLinney, R.A.J., Moshakis, V., Sullivan, A., Dinsdale, E. and Neville, A.M.: Tumor markers and testicular cancer. in *Markers for Diagnosis and Monitoring of Human Cancer*, Colnaghi, M.I., Buraggi, G.L. and Ghione, M., 213—229, Academic Press, New York, 1982.
- 8) 山崎春城, 小寺重行, 町田豊平: HCG 産生ヒト睾丸絨毛上皮癌細胞株 JHTK-1 の樹立とその性状. 第44回日本癌学会総会記事, 186, 1985.
- 9) Oi, V.T. and Herzenberg, L.A.: Immunoglobulin-producing hybrid cell line. in *Selected Methods in Cellular Immunology*, Mishell, B.B. and Shiigi, S.M., 351—372, W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1980.
- 10) 山崎春城, 西 信三: α -フェトプロテインに対するモノクローナル抗体. ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体. 渡辺 武, 251—267, R & D プランニング, 東京, 1982.
- 11) Kennet, R.H.: Enzyme-linked antibody assay with cells attached to polyvinyl chloride plates. in *Monoclonal Antibodies*, Kennet, R.H., McKearn, T.J. and Bechtol, K.B., 376—377, Plenum Press, New York, 1980.

- 12) Starling, J.J., Seig, S.M., Beckett, M.L., Schellhammer, P.F., Ladaga, L.E. and Wright, G.L. Jr.: Monoclonal antibodies to human prostate and bladder tumor-associated antigens. *Cancer Res.*, **42**, 3084—3089, 1982.
- 13) 町田豊平, 三木 誠, 柳沢宗利: ヒト男子生殖細胞腫瘍の研究: ノードマウス可移植性ヒト AFP 産生睾丸腫瘍の確立. *日泌尿会誌*, **72**, 1527—1533, 1981.
- 14) Nishi, S. and Yamazaki, H.: Monoclonal antibodies against AFP: Application in immunoassay and affinity chromatography. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **417**, 452—458, 1983.
- 15) Bechtol, K.B.: Radioimmunoassay. in *Monoclonal Antibodies*, Kennet, R.H., McKearn, T.J. and Bechtol, K.B., 381—382, Plenum Press, New York, 1980.
- 16) Mosstofi, F.K. and Price, E.B. Jr.: Tumors of germ cell origin, in *Tumors of the Male Genital System*, 2nd series, fascicle 8, 7—20, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D. C., 1973.
- 17) Seppälä, M.: Oncodevelopmental antigens in gynecological cancer. in *Oncodevelopmental Markers*, Fishman, W.H., 373—393, Academic Press, New York, 1983.
- 18) Shin, Z.R., McIntyre, L.J., Knowles, B.B., Solter, D. and Kim, Y.S.: Expression of a carbohydrate embryonic antigen, stage-specific embryonic antigen-1, in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res.*, **44**, 1142—1145, 1984.
- 19) Lipinski, M., Park, D.R., Rouse, R.V. and Herzenberg, L.A.: Human trophoblast cell-surface antigens defined by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 5147—5150, 1981.
- 20) Sunderland, C.A., Redman, C.W.G. and Stirrat, G.M.: Monoclonal antibodies to human syncytiotrophoblast. *Immunol.*, **43**, 541—546, 1981.
- 21) Johnson, P.M., Cheng, H.M. and Molloy, C.M.: Human trophoblast specific surface antigens identified using monoclonal antibodies. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **1**, 246—251, 1981.
- 22) Loke, Y.W. and Day, S.: Monoclonal antibody to human cytotrophoblast. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **5**, 106—108, 1984.
- 23) Ghosh, N.K. and Cox, R.P.: Production of human chorionic gonadotropin in Hela cell cultures. *Nature*, **259**, 416—417, 1976.
(1986年8月26日受付, 特別掲載)