糖脂質の免疫によって得られた, 前立腺に 特異性を示すモノクローナル抗体

東北大学泌尿器科学教室 (主任: 折笠精一教授)

佐藤 信 福士 泰夫 大山 力
斎藤 誠一 折笠 精一

仙台徳州会病院泌尿器科

栃 木 達 夫

東北大学薬学部衛生化学教室 (主任: 橋本嘉幸教授)

菅原 邦夫 益子 高 橋本 嘉幸

PROSTATE SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY GAINED BY GLYCOLIPID IMMUNIZATION

Makoto Satoh, Yasuo Fukushi, Chikara Oyama, Seiichi Saitoh and Seiichi Orikasa

Department of Urology, Tohoku University School of Medicine

(Director: Prof. S. Orikasa)

Tatsuo Tochigi

Department of Urology, Sendai Tokusyukai Hospital

Kunio Sugawara, Takashi Masuko and Yoshiyuki Hashimoto

Department of Hygienic Chemistry, Pharmaceutical Institute, Tohoku University

(Director: Prof. Y. Hashimoto)

Extraction of glycolipid component from hypertrophic and cancerous prostatic tissue were performed using chloroform-methanol solution and isopropanol-hexan-solution. The extract was separated into the "upper phase" and "lower phase" by Folch's fractionation technic. Each fraction was conjugated with acid treated salmonella minesota and then it was injected subcutaneously, intra-peritoneally and finally intravenously to BALB/c mice. Spleen cells from immunized mice were fused with P3X63, and antibody APG1 was obtained. APG1 shows a preferential reactivity towards prostatic tissue by the immunohistochemical analysis. Furthermore, the immunohistochemical analysis using enzyme and acid treated tissue and TLC immunostaining indicate that this monoclonal antibody specifically recognizes the sialylglycochain expressed in the prostatic tissue.

Key words: monoclonal antibody, glycolipid, prostata

要旨: 前立腺癌, 前立腺肥大症組織より, クロロホルム-メタノール系, イソプロパノール-ヘキサノール水系を用いて糖脂質分画を抽出した。抽出した糖脂質を Folch 分配法により upper と lower 成分に分け, そのおのおのを酸処理したサルモネラミネソタと conjugate, BALB/c マウスの皮下と腹腔内に, 最後に尾静脈に注射して免疫した。このマウス脾細胞とマウスミエロマ P3×63を細胞融合することにより, 前立腺上皮の糖鎖抗原と特異的に反応するモノクローナル抗体 APG1が得られた。APG1(IgG3)は種々のヒト組織を用いた免疫組織学的検討から, 前立腺組織に組織特異性を有することが確認された。

また, 前立腺肥大症組織の酵素処理及び酸処理後の染色, さらに前立腺組織から抽出した糖脂質を用いた TLC-immunostaining の結果より, APG1はシアル酸を含む糖鎖構造を認識することが示唆された。

キーワード: 前立腺, モノクローナル抗体, 糖脂質

緒 言

疎水性の“セラミド”と親水性の“糖鎖部分”からなる両親媒性の複合糖質である糖脂質が、細胞表面膜微量構成成分として細胞の発生、分化そして生理活性物質の受容体機能、細胞相互間の細胞社会的機能などを担う重要な物質として注目を集めている¹⁾。われわれもすでに、腎の分化抗原として存在する糖鎖抗原が、腎腫瘍の悪性度を反映して消長していることを報告してきた^{2)~4)}。前立腺疾患に関しては各種のマーカーの有用性が検討されているが⁵⁾、われわれは糖鎖抗原に着目した。前立腺肥大症、前立腺癌組織より抽出した糖脂質をマウスに免疫、前立腺組織に存在する糖鎖抗原に特異的に反応するモノクローナル抗体の作成を試みた。

実験材料および実験方法

(前立腺組織より糖脂質の抽出)

前立腺癌全摘標本2例(stage C, stage D1)と前立腺肥大症摘出標本1例より、糖脂質分画を抽出した。摘出標本にクロロホルム-メタノール系(CM 1:2, CM 1:1, CM 2:1)、及びインプロパノール-ヘキサノン-水系(IHW 55:25:20)を加え、EXCELL-AUTO-HOMOGENIZERを用いて、おのおのの液中で15分×2ずつホモジナイズを繰り返し、次いでロータリーエバポレーター-ROTAVATOR RE120Nで乾燥させた。これにCM 2:1を加えて溶かし、Folchの分配法⁶⁾にてupper phaseとlower phaseに分け、それぞれをロータリーエバポレーターで乾燥させた。その後、upper phaseは、蒸留水にて48時間透析を施行し、さらに凍結乾燥を加え乾燥させた。upper phaseの粗糖脂質は、DEAE-Sephadex A-25カラムを用いてクロロホルム-メタノール-水系(CMW 30:60:8)、メタノールによりシアル酸を含む酸性糖脂質分画と、B液(CM 0.5M sodium acetate 30:60:8)によりシアル酸を含まない中性糖脂質分画に分けた⁷⁾⁸⁾。lower phaseは、アセチル化により極性を下げたのち、フロリジルカラムを通して脱アセチル化後、DOWEX50W-X8を用いてpHを6~7に調整した⁹⁾。

(ハイブリドーマの作成)

酸性糖脂質分画と中性糖脂質分画を混ぜ合わせたupper phaseとlower phaseは、それぞれの抽出時の標本湿重量5gに対し、Galanosらの方法¹⁰⁾によってあらかじめ酸処理した1mgのSalmonella minnesotaのPBS浮遊液をconjugate、400 μ lずつ小チューブに分

注して保存した。これを1回400 μ lずつ、7週齢、雄のBALB/cマウスに5日毎に初めの2回は皮下と腹腔内に、最後の1回は静脈内に計3回免疫した。最終免疫3日後に、50%ポリエチレングリコール1,540を用いて脾細胞(3×10^7)とマウスミエローマP3 $\times$ 63 Ag 8.653 (3×10^6)を、細胞融合させた。

HyMedium 606培地(コージン株式会社)を用いてselectionのあと、数種のハイブリドーマを得た。

(ハイブリドーマのスクリーニング)

1. ニトロセルロース膜上でのハイブリドーマの抗体産生有無の確認

各ハイブリドーマの培養上清を3 μ lずつニトロセルロース膜上にスポットし、1%スキムミルクにて室温で1時間ほどブロッキングした。次いでPBSで洗浄後、rabbit anti mouse Ig (DAKO社)を1%BSA-PBSで100倍希釈したものに室温で1時間浸し、PBS、0.05%Tween PBS、にて3回ずつ洗浄。HRP-PA (Horseradish peroxidase 標識 protein A)に室温で1時間浸したあと同様に洗浄し、0.01% H_2O_2 、0.25mg/ml DABを用いて免疫染色した。

2. ハイブリドーマ産生抗体と糖脂質との反応

前立腺組織より抽出した糖脂質を、抽出時標本湿重量1gあたりクロロホルム:メタノール=2:1の液1mlに溶解し、その3 μ lずつをニトロセルロース膜にスポットし抗原とした。次いで1%スキムミルクで室温1時間、ブロッキング後、1.で抗体産生が確認されたハイブリドーマの培養上清を3 μ lずつ抗原スポット上に乗せ、室温で1時間反応させた。PBS 0.05%Tween PBSで洗浄後、1.と同様の手順でrabbit anti mouse Ig, HRP-PA, 0.01% H_2O_2 0.25mg/ml DABを用いて発色させた。

3. 免疫組織化学的スクリーニング

病理解剖あるいはTUR-Pで得られた前立腺癌組織、前立腺肥大症組織、正常前立腺組織の薄切凍結切片による組織標本を作成した。切片は、室温にてアセトン(5分)固定、1%スキムミルク1昼夜ブロック後、糖脂質との反応が確認されたハイブリドーマ培養上澄みを1時間反応させ、洗浄後ビオチン化抗マウスIgウサギ血清、続いてAB complex (Vector)と1時間ずつ反応させ、0.01% H_2O_2 、0.25mg/ml DABにて発色させた。

(ハイブリドーマのクローニング)

96well plateを用いて、限界希釈法(limiting dilution method)にてクローニングを行った(図1)。

図1 Immunization method

(免疫染色)

1. 培養細胞の免疫染色

KU 1 (ヒト膀胱癌の培養系)¹¹⁾, MKN 7 (ヒト胃癌の培養系)¹²⁾, A431 (ヒト子宮癌の培養系), MethA (BALB/c マウス由来の繊維芽肉腫の培養系), HCV 29 (ヒト正常膀胱粘膜の培養系), PC 3 (ヒト前立腺癌の培養系)¹³⁾, 以上の細胞を5.0000/ml になるように希釈, テラサキプレートに20 μ l/well ずつまき12~24時間培養した。PBS にて洗浄後, アセトン-メタノール 1:1 溶液にて5分間固定した。PBS にて3回洗浄後ハイブリドーマの培養上清を20 μ l ずつ加え37 $^{\circ}$ C 45分間反応させた。次いで2次抗体として1%BSA-PBS で100倍希釈した FITC 標識抗マウス Ig 20 μ l ずつ加え, 遮光して45分間37 $^{\circ}$ C で反応させた。PBS で洗浄後, 蛍光顕微鏡で観察した。

2. 種々のヒト組織に対する免疫組織染色

凍結切片, あるいパラフィン切片を用いたが, 凍結切片は, 前述と同様にして行った。パラフィン切片は, キシレンで5min $\times$ 3回為パラ後エタノール系にて脱出し, スキムミルクによるブロック後は凍結切片と同様に行った。いずれの染色も, 内因性ペスオキシダーゼ除去のため0.3%過酸化水素メタノールによる処理を5分間, 培養上清による反応後に追加した。

(抗体認識抗原の性状解析)

1. 酵素処理, 過ヨウ素酸ナトリウム処理による免疫組織化学的検討での認識抗原の性状解析

前立腺肥大症組織の凍結薄切片を5分間アセトンに

て固定し, 下記の処理をした後, ABC 法 (Vector) で免疫染色した。

a) ノイラミニダーゼ (半井化学) 0.25unit/ml と, pH 5.5, 20mMol acetate buffer 中で37 $^{\circ}$ C 1時間反応させる。

b) 上記に, 0.05%濃度になるようにコール酸を加えたものと反応させる。

c) コントロールとして20mMol, acetate buffer pH 5.5のみにて, 37 $^{\circ}$ C 1時間反応させる。

d) 酸処理として, NaIO₄を5mMol の濃度にした PBS buffer 中で, 4 $^{\circ}$ C 1時間反応させる。

2. HPTLC 上でのラジオイムノステイニング

正常前立腺組織, 前立腺肥大症組織, 前立腺癌組織より抽出した糖脂質を, 抽出前湿重量換算で upper phase は0.2g, lower phase は0.1g をベーカー製 HPTLC プレート上にスポットした。

upper phase は, ganglioside fraction, neutral fraction に関し, 各々 C:M:0.5%CaCl₂=60:40:9 にて展開, Lower phase は C:M:W=60:25:9 にて展開した。5%BSA (0.05%PBS pH 7.4) 内に浸して, 2時間ブロッキング後, APG 1を1昼夜反応させた。5%BSA (0.05%PBS pH 7.4) にて, ゆっくり揺らしながら, 5min $\times$ 5回洗浄した後, rabbit anti mouse Ig に浸し室温で2時間反応させた。同様に洗浄後, ¹²⁵I-protein A に浸し1時間反応させた。乾燥後, X線フィルムを重ね, 暗箱内で2昼夜露光し現像した。

3. 糖脂質分画と APG1 の ELISA による検討

前立腺肥大組織より抽出した, 糖脂質の upper phase の ganglioside, neutral の各 fraction に関し, 抽出時湿重量5mg 換算量を50 μ l のエタノールに溶解, 96穴塩化ビニール平底プレートに固相化, 各ウエルを1%スキムミルクにて, ブロッキングを1時間施行した。以下洗浄は, PBS にて3回, Tween PBS にて3回行いながら, APG 1培養上清 (室温1時間), ペルオキシダーゼ標識抗マウス Ig ウサギ血清 (室温1時間) を順次加え, OPD (0.4mg/ml, O-phenylenediamine/0.1M citrate-phosphate buffer pH 5.0, 0.01% H₂O₂) (SIGMA 社) で発色させた。反応は1N 硫酸にて停止させ, EIA Reader (EASY READER EAR400) で492nm における吸光度を測定した。

結 果

1. ハイブリドーマのスクリーニング

糖脂質の免疫で得られたハイブリドーマのうち, 特

表 1 Reactivity to cultured cell

Cell line	APG 1	FH6 ³⁾
A 431 (uterine tumor)	—	+
KU 1 (bladder tumor)	—	++
MKN 7 (gastric cancer)	—	++
HCV 29 (normol bladder)	—	—
PC 3 (prostatic tumor)	—	+
MethA (fibrosarcoma mouse BALB/C)	—	—

表 2 APG 1 Reactivity to tissues

TCC: transitional cell carcinoma, wel: 高分化腺癌, mod: 中分化腺癌, por: 低分化腺癌

Tissues	Positive rate
normal prostata (frozen section)	2/2
prostata hypertrophy (frozen section)	5/5
prostata hypertrophy	7/7
prostata carcinoma (wel)	1/2
prostata carcinoma (mod)	0/2
prostata carcinoma (por)	0/4
normal bone marrow	0/2
nomal liver	0/4
normal spleen	0/4
normal bladder	0/3
bladder tumor (TCC grade3)	0/3
normal intestine	0/4
normal lung	0/4
lung tumor (small cell carcinoma)	0/2
normal pituitary gland	0/2
normal stomach	0/3
normal spleen	0/4
normal pancreas	0/4
esophageal cancer	0/2
normal colon	0/4
normal testis	0/4
testicular tumor (embryonal carcinoma with seminoma)	0/3
skeletal muscle	0/3
renal tumor	0/4

に upper phase で得られた153株中 2 株に抽出した糖脂質と前立腺組織に反応が得られた。このうち、後に述べる免疫組織学的検索により前立腺上皮に特異的に反応したものを APG1 とした。サブクラスは IgG3 であった。

2. 各種培養細胞との反応

アセトン-ホルマリン固定の染色で 6 種類の培養細胞との反応を検討したが、染色陽性株は 1 例も認められなかった (表 1)。

3. 免疫組織化学的反応

前立腺肥大症組織, 高分化の前立腺癌組織, 正常前

表 3 (Neuraminidase, NaIO₄) treatment of BPH tissue

Treatment	Reactivity
Neuraminidase + Na acetate buffer + Na cholate acid	—
Neuraminidase + Na acetate buffer	—
Na acetate buffer	+
NaIO ₄	—
No treatment	+

立腺組織の腺上皮は, apical portion (腺腔内腔面) の部分の細胞膜が特に強く, 細胞質全体も淡く染まり, 腺上皮以外の部分には, 反応を示さなかった。

分化度の低い前立腺癌では反応性が認められず, 前立腺以外の正常組織, 腫瘍組織にも反応性は認められなかった。

また, 前立腺肥大症組織で, 凍結切片に比べパラフィン切片では反応性が弱かった (図 2, 表 2)。

4. 抗体認識抗原の性状解析

1) 前立腺肥大症組織の過ヨウ素酸 Na 処理, ノイラミニダーゼ処理によって, その染色性は失われた。pH 5.0 の酸処理のみでは, 染色性に, 変化は認められなかった (表 3)。

2) HPTLC 上でのラジオイムノアッセイ

正常前立腺, 前立腺肥大症, 前立腺癌の各組織の ganglioside fraction の GD3 付近のバンド以下に数本の反応が認められた (図 3)。

3) 抽出した糖脂質と APG 1 の ELISA での検討

前立腺肥大症より抽出した糖脂質のうち, ganglioside fraction にのみ, その反応性が認められた。

考 察

近年, 腫瘍マーカーの多くが, そのエピトープを糖鎖構造に有していることがあきらかとなってきた。泌尿器科領域においても, 従来, ALP, AFP, 胎盤性 ALP, HCG, β HCG 等, いくつかの腫瘍マーカーが用いられ前立腺に関しても ACP, PAP, γ sm 等がある。しかし, これらの多くが蛋白部分にエピトープを有する抗原と考えられ, 前立腺における糖鎖の変化を抗原として捕えた研究は, ほとんど認められない¹⁴⁾。われわれは, 糖鎖抗原が, 泌尿器系臓器の分化や癌化にともない大きく変化するという事実に着目し, まず前立腺における糖鎖の発現パターンを調べるとともに, これに対するモノクローナル抗体の作成を研究の第一段階とした。

図2 ヒト前立腺肥大症組織のABC染色：腺腔内腔面の細胞膜が特に強く、細胞質全体も淡く染色されている。(×100)

図3 TLC-immunostaining

Normal：正常前立腺，PH：前立腺肥大症，PK：前立腺癌

糖鎖抗原としては、糖脂質を前立腺組織より抽出して用いた。糖鎖に対するモノクローナル抗体を効率よく作成するため、抽出した糖脂質を直投免疫源として用いた¹⁵⁾。

得られた抗体のスクリーニングは、crudeな糖脂質に対する反応である程度分別したあと、最終的には組織に対する反応を重視した。この方法によりほぼ間違いなく糖鎖を認識する抗体を得ることができる。

得られた抗体 APG 1 (IgG 3) は、ヒト前立腺に対する臓器特異性を有する抗体であると考えられた。さらに前立腺に対する陽性反応が、パラフィン切片では極端に減弱することから、糖脂質抗原が染色過程のおそらく加水の段階で、失われるものと考えられ、本抗体によって認識される糖鎖は、糖蛋白よりも主として糖脂質として存在する可能性が高いと考えられた。

そこで、この M-Ab が認識する抗原エпитープについてさらに詳細な検討を加えた。まず、過ヨウ素酸処理で抗原性が消失することは、糖鎖抗原がエпитープであることを裏付ける結果であった。また、neuraminidase によっても反応性が消失することから、抗原は認識される構造中にシアル酸を有することがうかがえる。この点は HPTLC プレート上に展開した糖脂質のうち、immunostaining によって、ganglioside fraction の一部に抗体が、反応することとも一致する。以上の結果から、この抗体の認識する抗原は、前立腺組織特異性を有する ganglioside であろうと考えられる。また、糖脂質に主として存在するとすれば、ganglio-series に属する ganglioside であろうと考えられる。今後、抗原の同定についても検討を進める必要があらうと思われた。ganglioside は従来、細胞の分化、成長及び腫瘍の悪性度と深くかかわりを有していることが知られている¹⁶⁾。今回得られた M-Ab の反応性は、正常前立腺、前立腺肥大症、高分化型の前立腺癌においてより強く認められており、この抗原は前立腺の分化抗原として出現している可能性が高い¹⁷⁾。この点は今後、多くの前立腺癌において検討を重ねることにより、病理的分化度、あるいはホルモン依存性の有無との関連において大いに興味のもたれる研究課題である。

結 語

1. 前立腺組織より抽出した糖脂質を抗原として、mouse モノクローナル抗体 APG 1 を作製した。
2. APG 1 は前立腺に特異的に分布する、シアル酸を含む糖鎖構造を認識することが示唆された。

稿を終えるにあたり、組織標本を、提供していただいた、東北大学病理部の皆様に深謝致します。なお、本論文の要旨は第47回日本癌学会総会において報告した。

文 献

- 1) Hakomori, S.: Glycosphingolipids. *Sci. Am.*, 254, 32—41, 1986.
- 2) Fukushi, Y., Nudelman, E., Levery, S.B. and Hakomori, S.: Novelfucolipids accumulating in human adenocarcinoma. *J. Urol.*, 259, 10511—10517, 1984.
- 3) 福士泰夫, 斎藤誠一, 折笠精一: 腎細胞癌における Le^x(SSEA-1) 抗原群の発現: 腫瘍分化度及び予後との相関についての検討. *日泌尿会誌*, 79, 1090—1095, 1988.
- 4) Fukushi, Y., Ohtani, H. and Orikasa, S.: Expression of lacto series type 2 antigens in human renal cell carcinoma and its clinical significance. *JNCl.*, 81, 352—358, 1989.
- 5) 秋元 晋, 赤倉功一郎, 島崎 淳: 前立腺癌における腫瘍マーカー(前立腺酸性フォスファターゼ, γ -セミノプロテイン, 前立腺特異抗原)の検討. *泌尿紀要*, 34, 1389, —1396, 1988.
- 6) Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497—509, 1957.
- 7) Ledeen, R.W. and Yu, R.K.: Gangliosides: structure, isolation, and analysis. *Method Enzymol.*, 83, 139—191, 1982.
- 8) Laine, R.A., Stellner, K. and Hakomori S.: Isolation and characterization of membrane glycolipids. *Methods Membrane Biol.*, 2, 205—224, 1974.
- 9) Saito, T. and Hakomori, S.: Quantitative isolation of total glycosphingolipids from animal cells. *J. Lipid. Res.*, 12, 257—259, 1971.
- 10) Galanos, C., Luderitz, O. and Westphal, O.: Preparation and properties of antisera against the lipid-A component of bacterial lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.*, 24, 116—122, 1971.
- 11) Yajima, T.: Monolayer culture of human urinary bladder tumors. II. *Jpn. J. Urol.*, 61, 805—831, 1970.
- 12) Motoyama, T., Hojo, H. and Watanabe, H.: Comparison of 7 cell lines derived from human gastric carcinomas. *Acta Pathol. Jpn.*, 36, 65—83, 1986.
- 13) Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F. and Jones, L.W.: Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC3). *J. Urol.*, 17, 16—23, 1979.

- 14) Hakomori, S.: Aberrant glycosylation in cancer cell membrane as focused on glycolipids: Overview and perspectives. *Cancer Res.*, **45**, 2405—2411, 1985.
- 15) 福士泰夫, 阿部和夫: 糖脂質に対するモノクローン抗体その1. モノクローン抗体の作製, 蛋白質. 核酸酵素, **32**, 1363—1370, 1987.
- 16) Nojiri, H., Takaku, F., Terui, Y., Miura, Y., Saito, M.: Ganglioside GM3: Anacidic membrane component that increases during macrophage-like cell differentiation can induce monocytic differentiation of human myeloid and monocytoid leukemic cell lines HL-60 and U937. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 782—786, 1986.
- 17) 福士泰夫: 腫瘍組織から抽出した糖鎖構造を認識するモノクローナル抗体. *BoOmedia*, **2**, 61—65, 1987.

(1989年11月2日受理)