移行上皮癌を抗原として得られた上皮特異的 モノクローナル抗体 EH14の検討

愛媛大学医学部泌尿器科教室 (主任: 竹内正文教授)

織田 英昭 濱田 斉 鍋嶋 晋次
横山 雅好 岩田 英信 竹内 正文

STUDY OF A MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST NEW EPITHELIAL MEMBRANE ANTIGENS ON TRANSITIONAL CELL CARCINOMA

Hideaki Oda, Hitoshi Hamada, Shinji Nabeshima, Masayoshi Yokoyama,
Hidenobu Iwata and Masafumi Takeuchi

Department of Urology, Ehime University School of Medicine
(Director: Prof. M. Takeuchi)

Immunizing mice with a transitional cell cancer (TCC) tissue in the renal pelvis, we produced a monoclonal antibody (EH14) against new epithelial antigens. After the mice were immunized repeatedly, their splenic cells were harvested and fused with NS/1 myeloma cells. The normal kidney tissue of the same patient was used on Dot blots to select the hybridoma. As a result, one hybridoma whose antibody (EH14) reacted very strongly with TCC but only faintly with normal kidney tissue or normal bladder mucosa was obtained. On immunohistochemistry, EH14 stained all of the 29 TCC tissues. EH14 also stained uterus cancer (7/7) and gastric cancer (6/6) as well as the normal squamous cell and many types of the normal epithelium. All of the lymphnodes containing metastatic bladder cancer were strongly stained with EH14. EH14, however, did not stain interstitial tissues, muscles and sarcomas. The molecular weight of the antigen recognized by EH14 was 14KD and 28 KD on Western blot analysis, and the antigen was stable with formalin or ethanol. The antigen was not the same as that reported previously, and may be useful as a histological marker of TCC.

Key words: monoclonal antibody, transitional cell carcinoma, epithelial membrane antigen

要旨: 今回われわれは、腎盂移行上皮癌を抗原とし、上皮特異的抗原を認識するモノクローナル抗体 EH14 (IgM. kappa) を得た。免疫した BALB/c マウス脾細胞とマウスミエローマ細胞 (NS/1) を細胞融合させ、スクリーニングは Dot ELISA にて行い、移行上皮癌に反応し、同一患者の正常腎組織には反応しない抗体を得た。免疫組織学的検討では、EH14は29例の移行上皮癌に強く反応し、正常の腎組織の一部と移行上皮には弱く反応した。また子宮癌 (7/7) 胃癌 (6/6) とも反応した。またリンパ節転移移行上皮癌とも強く反応したが、肉腫、リンパ腫、あるいは肝、結腸、膵、食道の癌には反応しなかった。EH14は Western blot 解析にて分子量14KD と28KD の抗原を認識しており、ホルマリンやエタノールに安定であった。

EH14は、今までに報告された上皮特異抗原とは異なるものであり、移行上皮癌の組織学的検索に有用であると考えられた。

キーワード: モノクローナル抗体, 移行上皮癌, 上皮膜抗原

緒 言

近年腫瘍免疫の発達, 特にモノクローナル抗体作製

により腫瘍関連抗原の研究がさかんに行われるようになった。その中で移行上皮癌に対するモノクローナル

抗体の作製も行われ、1983年には Grossman¹⁾がはじめて移行上皮癌に反応する抗体を報告し、また他にも散見される^{2)~4)}。抗体作製時に免疫原として主に培養膀胱癌細胞や新鮮膀胱癌細胞を用いるが、よい抗体を求めるには抗体産生ハイブリドーマの選択方法が問題となる。今回われわれは、腎盂腫瘍(移行上皮癌 G2)を免疫原として、マウスハイブリドーマを作製して、スクリーニングとして、移行上皮癌に反応し正常腎に反応しないモノクローナル抗体 EH14を得、その特異性を検討したので報告する。

対象と方法

1) マウスの免疫とハイブリドーマのスクリーニング

腎盂癌手術摘出標本を直ちに 4℃の RPMI-1640 に容れ癌と正常腎を分離した。ついでそれぞれの組織を 0.5mM Phenylmethylsulfonyl fluoride 入り 10mM リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) にて 100mg/ml の濃度とし、ホモジナイザーにて細胞を破壊し、-80℃にて保存した。

免疫方法は、まず移行上皮癌と Freund complete adjuvant (GIBCO Lab.) とをシセル化し BALB/c マウスに腹腔内注射で、2週間間隔で 3~4 回行った。最終免疫は移行上皮癌のみを 10mg 静脈内投与した。その 2 日後にマウスの脾臓を摘出し、脾生細胞を得た。一方マウス骨髄腫細胞は NS/1 を用い、Kohler と Milstein⁵⁾の方法に準じて細胞融合を行った。

第一次スクリーニングとして、ニトロセルロース膜上において Dot blot ELISA を用いた。簡単に述べると、まず凍結保存していた膀胱癌細胞および腎細胞のホモジネイトを 96穴 Biodot (ATTO Corporation) を用いて 0.45μm のニトロセルロース膜に吸着させた後、1% bovine serum albumin (BSA)-PBS で膜の非特異的吸着をブロックした。ハイブリドーマ・コロニー培養上清を 100μl/dot 添加し、室温、1時間インキュベートした。その後ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG および IgM 山羊抗体 (TAGO inc.) と室温、1時間インキュベートし、十分洗浄したのち、ペルオキシダーゼの基質溶液 4-chloro-1-naphthol-H₂O₂ を加え青色に呈色した培養上清を陽性とした。そこで膀胱癌は陽性、正常腎細胞が陰性のコロニーが求めるものであり、限界希釈法にてモノクローナル抗体産生クローンを得た。

2) モノクローナル抗体の精製

クローン化されたハイブリドーマ (5×10⁶個) をあ

らかじめプリスタン投与された BALB/c マウスの腹腔内でさらに増殖させ、腹水を採取し、40%硫酸塩析法⁶⁾にて抗体分画を沈澱させ、0.01M PBS に溶解させた。この溶解液は液体クロマトグラフィー (FPLC, Pharmacia) にて 1つの分画であることが確かめられた。抗体蛋白量は lowry 法⁷⁾にて測定した。

モノクローナル抗体のタイピングは Mouse monoclonal antibody isotyping kit (Amersham International plc.) を使用した。

3) 免疫組織学的検討

手術時摘出標本を凍結切片およびエタノール固定と 10%ホルマリン固定後パラフィン包埋切片を作製した。脱パラしたのち、それぞれの切片を酵素抗体 avidin-biotin-peroxidase complex method (ABC 法)¹⁸⁾にて行なった。

簡単に述べると、まず切片を内因性ペルオキシダーゼをブロックするため、0.3%過酸化水素入りメタオールにて 30分間インキュベートした。PBS で十分に洗浄したあと非特異的反応をブロックするため PBS-BSA (1%) で 1時間室温にてインキュベートした。第 1 次抗体は EH14 と E29 (DAKOPATTS a/s No. M613) を用い室温にて 1時間反応させた。PBS で十分に洗浄したあと EH14 に対しては抗 IgM Kit (Vector) を、E29 に対しては IgG Kit (Vector) を用いて ABC 法を行った。DAB (3,3'-Diaminoben zidine) 反応は 2分間とした。また核染色は Mayer のヘマトキシリン液にて 5分間行った。

4) Western blot 解析

モノクローナル抗体の認識抗原の分子量の決定は Western blot 解析法にて行った。移行上皮癌をクロロフォルム抽出法にて糖タンパクを分離した。簡単に述べると、まず腫瘍を 100mg/ml の濃度でホモジネイトした。このサンプル 0.1ml と 0.4ml のメタノールとを混合し、次いで 0.1ml のクロロフォルムを加え、また 0.3ml の水で十分に振盪したのち 10,000g にて 1分遠沈した。上清を捨てたのち 0.3ml のメタノールを混合し 10,000g にて 2分遠沈し沈澱物を得た。これを 2% sodium dodesyl sulfate (SDS) を含む 0.0625M トリス-塩酸 Buffer に溶解し、グラジエントゲル SDS-PAG プレート 10/20 (第一化学薬品) を用いて電気泳動を行った。その後ニトロセルロース膜に移行させ⁸⁾、PBS-BSA でブロッキングしたあと、EH14 を反応させた。十分に洗浄したあとニトロセルロース膜を山羊抗マウス IgM (TAGO inc.) にて反応させ、DAB 液に

て染色を行った。またマーカーはコマジンプール染色を行った。

結 果

ハイブリドーマの選択では、Fig. 1にあるようにDot blots ELISAにて腫瘍に反応し、腎に反応しない

クローン(↓)を選択した、次いで膀胱癌組織をABC法にて染色し、膀胱癌と反応するモノクローナル抗体EH14を選択および精製した。EH14のサブクラスはIgM kappa typeであった。Fig. 2はWestern blot解析の結果を示したものである。No. 1はマーカーであるNo. 2~4は移行上皮癌から得られたペレットであるが、14KDと28KDにバンドが認められた。

免疫組織学的検索では、Fig. 3に示すように、移行上皮癌は、粘膜下層に浸潤している腫瘍細胞も含めて強く染色された。一方正常移行上皮(↓)はそれらに比し弱く染色された。Fig. 4は移行上皮癌(G3)のE29(左)、EH14(右)の染色性を比較したものである。E29に比べEH14は腫瘍全体に強く染色されていることがわかる。Table 1は、EH14ですべて強陽性に反応した移行上皮癌22症例(G1: 3例, G2: 4例, G3: 15例)におけるE29の反応性を示したものである。強陽性は1例、陽性は4例であり、移行上皮癌に対しEH14はE29より強い親和性が認められた。また、Grade間で反応の強度は無関係であった。Fig. 5は移行上皮癌(G3)のリンパ節転移像である。左はヘマトキシリン・エオジン染色であり、右はEH14による染色である。腫瘍は全て茶褐色で染色され転移巣は一目瞭然である。Fig. 6は膀胱癌の肝転移巣であるが、肝組織等は染色されず移行上皮癌のみが染色された。

Table 2は種々の腫瘍についてEH14との反応を検討したものである。移行上皮癌は29例(G1: 4例, G2: 6例, G3: 19例)すべて強陽性(++)でありGradeに関係なく染色された。そのほか子宮癌、胃癌、前立腺癌、胎児性癌、卵巣癌、皮膚癌(扁平上皮癌)は、移行上皮癌ほどではないが、すべて陽性であるのに対し、肺癌、食道癌、結腸癌、甲状腺癌、肉腫、リンパ腫、神経腫瘍は染色されなかった。

正常臓器に対する反応性をTable 3に示したが膀胱移行上皮、気管上皮、子宮扁平上皮、皮膚が陽性(+)

Table 1 Reactivity of E29 to transitional cell carcinoma on immunohistochemistry

Reactivity	Number of cases
#	1*
+	4
±	11
-	6
Total 22	

* All tumors were strongly stained with EH14.

Fig. 3 移行上皮癌 (G2~3) と正常膀胱上皮との反応. 移行上皮癌とは強陽性像を示すが, 正常膀胱上皮 (↓) は弱陽性像を示している. (ABC 法)

Fig. 4 移行上皮癌 (G3) の反応. 左は E29 による染色で陽性像 (+), 右は EH14 による染色で強陽性像 (++) . (ABC 法)

Fig. 5 移行上皮癌(G3)の反応, 左はヘマトキシリンエオジン染色, 右はEH14による染色, (ABC法)

Fig. 6 移行上皮癌の肝転移像, (ABC法)

Table 2 Reactivity of EH14 with human tumors by immunoperoxidase staining (ABC method)

Tumor	Positive Rate	Reactivity
Transitional cell carcinoma	29/29	±* ¹
Uterus	7/7	+~±
Lung	2/2	±
Breast	1/1	±
Stomach	6/6	+~±
Prostate	3/3	±~±
Skin	1/1	+
Testicle (Embryonal Cell carcinoma)	1/1	+
Ovary	1/1	+
Pancreas	0/2	
Esophagus	0/2	
Colon	0/2	
Liver	0/2	
Thyroid	0/2	
Sarcoma	0/6	
Lymphoma	0/4	
Nerve	0/2	

*¹ All tumor cells were strong stained.

Table 3 Reactivity of EH14 with human tissues by immunoperoxidase staining (ABC method)

Tissue	Positive Rate	Reactivity
Transitional cell	5/5	+* ¹
Bronchus	3/3	+
Uterus	4/4	+
Skin	1/1	+
Kidney	4/4	±* ²
Prostate	3/6	±
Thyroid	0/2	
Liver	0/4	
Esophagus	0/2	
Stomach	4/5	±
Adrenal gland	0/2	
Cerebrum	0/2	
Fetus* ³		
Kidney	1/1	±
Stomach	1/1	±
Testis	1/1	±
Pancreas	1/1	±
Adrenal	0/1	
Liver	0/1	
Brain	0/1	

*¹ Only epithelial components were stained.*² Occasionally a few areas of epithelial cells were stained.*³ 25-week-old fetal tissues were used for the assays.

を示し、また腎や前立腺等の一部の上皮細胞のみが染色された。25週の無脳症にて死亡した胎児の検討も行ったが、成人と異なり胃上皮が陽性の所見を示し、睪丸、脾は一部のみが染色された。

考 察

ある種の癌細胞には癌特異的抗原があるとの報告がある。ヒト移行上皮癌の抗原性に関しては、腫瘍の悪性度の上昇にともない ABH 血液型抗原の消失すること⁹⁾、癌化に伴い Thomsen-Friedenreich 抗原が出現し¹⁰⁾、それが膀胱腫瘍の再発率に関係があること¹¹⁾¹²⁾が報告されている。膀胱組織特異抗原の存在¹⁰⁾および膀胱癌特異的ではないが関連抗原を認識するモノクローナル抗体³⁾¹³⁾の報告も散見される。また膀胱癌特異抗原を認識することを示唆する抗体⁴⁾の報告もなされている。

モノクローナル抗体を作製する場合、目的とする抗原に特異性の高い抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングが極めて重要であり、HLA 抗原系や他の抗原と交叉反応を除去するため、リンパ球を使つての ELISA 法あるいは組織学的に検索する方法が多く用いられている。Schaefer ら¹⁴⁾は腎癌と正常腎とをホモジネイトし、ELISA 法にてハイブリドーマを選択し、腎癌に対するモノクローナル抗体を作製した。われわれは腎盂癌で移行上皮組織と腎組織を同時に用い、前述した簡便なスクリーニング法にて移行上皮癌に強く反応する EH14 を得ることができた。この手技はスクリーニングの段階で極めて有用であると思われる。

EH14 では Fig. 3 に示したように正常移行上皮より移行上皮癌が強く染色された。また Table 1, 2 に示したように膀胱癌ほど強くはないが、子宮癌や胃癌などとも反応した。また正常扁平上皮や気管上皮にも反応し、EH14 は上皮特異抗原を認識しているように思われた。上皮特異抗原に関しては、Hyderman らは人乳の脂肪球被膜 (human milk fat globule mem-brane) から得られた乳腺上皮に存在する分子量 50KD の glycoprotein を epithelial mem-brane antigen (EMA) と名付けこれに対するモノクローナル抗体 E29 が報告された¹⁵⁾¹⁶⁾。そこでわれわれはこの抗体と比較すべく免疫組織学的に検討したが、Fig. 4 に示すように E29 は膀胱腫瘍全体でなく、その細胞群周囲が特に染色され、EH14 とは異なるパターンであり、また Table 1 に示したように移行上皮癌でも染色されないものも多かった。また上皮抗原として Keratin-

Protein も報告されているが¹⁷⁾この分子量は40~67 KDであり, EH14の認識する抗原とは異なったものである。この抗原は移行上皮癌に強く表出されるものであり, またホルマリンに対し安定であるため標本検索に有用と考えられた。

また, 膀胱癌のリンパ節を14例について検討したところ, HE染色で認められた転移巣はすべて強陽性に染色され (Fig. 5), 微小リンパ節転移の検索にも有用であると考えられた。

結 語

腎盂癌 (移行上皮癌, G2) を抗原として得られたモノクローナル抗体 EH14について検討を行い, 以下の如き結果を得た。

1) ハイブリドーマの選択時に移行上皮癌と同一患者の正常腎組織を用い, Dot blots ELISA 法にてスクリーニングを行ったが, この方法は簡便かつ効率が良いと思われた。

2) EH14はIgM kappa type で分子量14KDと28KDの抗原を認識し, この抗原はホルマリンやエタノールに安定であった。

3) EH14は移行上皮癌29例全て強陽性を示し, また正常移行上皮や扁平上皮とも陽性を示し上皮特異抗原を認識する抗体と考えられた。

4) EH14は移行上皮癌の浸潤度およびリンパ節や他臓器転移の検索に有用であると考えられた。

文 献

- Grossman, H.B.: Hybridoma antibodies reactive with human bladder carcinoma cell surface antigens. *J. Urol.*, 130, 610-614, 1983.
- Nathrath, W.B.J., Detheridge, F. and Franks, L. M.: Species cross-reacting epithelial and urothelial specific antigens in human fetal, adult and neoplastic bladder epithelium. *J.N.C. I.*, 63, 1323-1327, 1979.
- Fradet, Y., Cordon-Cardo, C., Thomsen, T., Daly, M.E., Whitmore, W.F. Jr., Lloyd, K.O., Melamed, M.R. and Old, L.J.: Cell surface antigens of human bladder cancer defined by mouse monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, 224-228, 1984.
- 高橋伸也, 高橋信好, 高橋浩一, 小泉幸弘, 川口俊明, 富樫繁也, 鈴木唯司, 舟生富寿: 膀胱癌モノクローナル抗体の研究. *日泌尿会誌*, 78, 791-801, 1987.
- Kohler, G. and Milsterin, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 494-497, 1975.
- 中村 弘, 杉浦 勉: 抗体の精製とクラスに分画. *免疫生化学研究法*, p. 11-17, 1986.
- Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 749-767, 1951.
- Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 4350, 1979.
- Limas, C. and Lange, P.: Altered reactivity for A,B,H antigens in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. A study of the mechanisms involved. *Cancer*, 46, 1366-1373, 1980.
- Coon, J.S., Weinstein, R.S. and Summers, J.L.: Blood group precursor T-antigen expression in human urinary bladder carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, 77, 692-699, 1982.
- Yokoyama, M., Ohoka, H., Oda, H., Oda, T., Utsumi, S. and Takeuchi, M.: Thomsen-Friedenreich antigen in bladder cancer tissues detected by monoclonal antibody. *Acta Urol. Jpn.*, 34, 255-258, 1988.
- 織田英昭, 小田剛士, 横山雅好, 竹内正文, 大岡啓二, 内海 爽: Thomsen-Friedenreich antigen に対する monoclonal antibody と soybean agglutinin による膀胱腫瘍抗原の検索. *日泌尿会誌*, 79, 713-718, 1988.
- Young, D.A., Prout, G.R. and Lin, C.W.: Production and characterization of mouse monoclonal antibodies to human bladder tumor-associated antigens. *Cancer Res.*, 45, 4439-4446, 1985.
- Schaerfe, T., Becht, E., Kaltwasser, R., Thueroff, J.W., Jacobi, G.H. and Hohenfellner, R.: Tumor-specific monoclonal antibodies for renal cell carcinoma. *Eur. Urol.*, 11, 117-120, 1985.
- Hyderman, E., Steele, K. and Ormerod, M.G.: A new antigen on the epithelial membrane: Its immunoperoxidase localisation in normal and neoplastic tissues. *J. Clin. Pathol.*, 32, 35-39, 1979.
- Hyderman, E., Strudley, I., Powell, G., Richardson, T.C., Cordell, J.L. and Mason, D.Y.: A new monoclonal antibody to epithelial membrane antigen (EMA)-E29. A comparison of its immunocytochemical reactivity with polyclonal anti-EMA antibodies and with another monoclonal antibody, HMFG-2. *Br. J. Cancer*,

- 52, 355—361, 1985.
- 17) Pinkus, G., Ehteridge, C.L. and O'connor, E.M.: Are keratin proteins a better tumor marker than epithelial membrane antigen? *Am. J. Clin. Pathol.*, 85, 269—277, 1986.
- 18) Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29, 577—580, 1981.
- (1989年12月27日受理)
-