マウス・メラノーマ抗原. その免疫学的特性, 部分化学構造と遺伝子

谷口 克^{*,a} 平林義雄^b

千葉大学医学部,^a 千180 千葉市亥鼻 1-8-1, 静岡薬科大学,^b 千422 静岡市小鹿 2-2-1

Mouse Melanoma Antigen. Its Immunological Properties, Partial Structure and Genes

MASARU TANIGUCHI^{*,a} and YOSHIO HIRABAYASHI^b

School of Medicine, Chiba University,^a 1-8-1 Inohana, Chiba, 280, Japan and
Shizuoka Pharmaceutical College,^b 2-2-1 Oshika Shizuoka, 422, Japan

The immunological and chemical properties of melanoma antigens have been analysed by using C57BL/6 derived B16 melanoma cells. Cytotoxic T lymphocytes or helper T cells involved in the positive immune responses were easily induced by the antigen on the cell surface, whereas soluble melanoma antigens secreted into the culture medium selectively stimulate and induce antigen-specific suppressor T cells. Furthermore, the soluble antigen works as an inhibitor for the blocking of the cytotoxic T cell activity. Therefore, the soluble melanoma antigen stimulates the negative immune response in order for tumor cells to escape from immune system. By using two syngeneic monoclonal antibodies against the soluble melanoma antigens (M2590 and M562), we found that the melanoma antigen was composed of GM3 (NeuAc) in association of proteins. M2590 recognized GM3 carbohydrate moiety with cross-species specificities, while M562 reacts with the protein with species specific melanoma antigenic determinant. M2590 can react with the extracted GM3 from normal cells, not with normal cells expressing GM3 on the cell surface. Thus, this suggests that the tertiary structure of GM3 on melanoma cells is different from that of normal cells.

Finally, we succeeded in cloning of the genomic deoxyribonucleic acid (DNA) which contains genes encoding melanoma antigen with species specific determinant (M562). The B16-melanoma DNA cosmid libraries were constructed with the shuttle vector pCV103. They were infected into ED8767 *E. coli*, and then transfected into the human melanoma cell line P-36 by protoplast fusion with polyethylene glycol. The transfectants were selected in the presence of mycophenolic acid, stained with FITC-labeled M562, and selected by FACS. Total DNA was isolated from the transfectants, and the B16 genomic DNA clones were rescued by the *in vitro* packaging with lysogenic bacterial extracts. pD2-7 (34.8 kb) reproducibly expressed M562 determinants in the p-36 human melanoma cells.

Keywords—soluble melanoma antigen; GM3 (NeuAc) ganglioside; suppressor T cell; genomic DNA cloning; pCV103 vector; monoclonal antibody

1. はじめに

腫瘍の免疫学的監視機構 免疫系は、外来異物の侵入のみならず、生体に起こるさまざまな変異を認識し、それを排除するように働いている。当然、がん化した細胞も免疫系によって正常細胞と区別され排除される。すなわち、免疫系は外来からの異物のみならず、生体の内なる変化に対処するための監視機構でもある。

大別して2つの系統に区別できる。その1つは、抗体蛋白が免疫反応を担う抗体産生系であり、その2は、抗体のような可溶性分子を介する反応でなく、細胞が反応の主体となる免疫系で、細胞免疫系である。このうち、腫瘍細胞の排除に関係する反応系は細胞性免疫系であり、抗体が腫瘍排除に直接関わっている証拠は少ない。

腫瘍免疫に関与する細胞免疫は、単一の細胞系から構成されるのではなく、少なくとも複数の、しかも独立したシステムが発動していると考えられている。その1つはキラーT細胞 (CTL: cytotoxic T lymphocyte) 系であ

る。この反応系の最も特徴的なことは、抗原刺激を必要とし、更にこの反応系の誘導から発現に至るまでの過程は抗原特異的であることである。

これに反して、抗原非特異的な細胞傷害機構も、免疫学的監視機構の一翼を担っている。これらの多くは、リンフォカイン誘導型のキラー細胞系で腫瘍細胞を選択的に傷害、破壊するが、抗原特異性を示さないキラー細胞系である。末梢リンパ球や脾細胞をリンフォカイン (IL-2) とともに培養するだけで、腫瘍細胞を破壊する機能を持つキラー細胞が誘導される。CTL と異なって抗原刺激をまったく必要としない。

これらリンフォカイン誘導型抗原非特異的キラー細胞は単一細胞集団ではなく、NK 細胞 (natural killer) 系や LAK 細胞 (lymphokine-activate killer) 系などを含む。これらのキラー細胞系は、抗原特異性を示す CTL 系と異なり、あらかじめその細胞表面に IL-2 レセプターを表現しているため、抗原刺激を必要とすることなく、培養系に IL-2 を加えると細胞増殖が起こり、分化増殖するものと考えられる。また、LAK 細胞は、NK-抵抗性腫瘍細胞をも傷害し、破壊することから、NK 細胞より広いスペクトラムで標的に対処していると思われる。

このように、腫瘍免疫系は、機能の異なるさまざまな反応系を用意して、生体内に生じた腫瘍細胞を排除するべく免疫学的監視を行っている。しかし、各個別の反応系は、それぞれ独立した反応系のようにみえるが、お互いに関連しながら起こる反応である。他の免疫反応系の多くがそうであるように、腫瘍免疫反応系もまた、抗原認識の初期は CTL 系主導型の抗原特異的反応とクローン性増殖によって細胞傷害性活性のエネルギーを一挙に増殖させ、その際産生されるリンフォカインによって非特異的腫瘍免疫反応系を活性化し、効果的に腫瘍を排除するものと考えられる。

一方、このように腫瘍細胞を排除するように働くいわば“正の免疫”に対して、免疫系にはこれらの反応を抑えるように働く抑制系の細胞機構が存在する。それは抑制 T 細胞系の細胞群であるこれら抑制 T 細胞はキラー T 細胞やヘルパー T 細胞などの正の免疫系の誘導を抑えるため、“負の免疫系”ということができる。この反応系は生体にとってははなはだ不都合極まりないものであるが、腫瘍細胞にとっては生存するための細胞性機構となっている。とくに腫瘍細胞表面の抗原が正の免疫反応系を刺激するのに対して、腫瘍細胞から分泌される可溶性抗原は抑制 T 細胞系を選択的に刺激、活性化する。これによって“負の免疫系”を誘導して正の免疫系からエスケープする。したがって、“負の免疫系”を選択的に誘導できるこの可溶性抗原の性状を解析し、分泌抗原の発現調節を人為的に調節することは腫瘍抗原発現とその免疫系の認識の分子免疫学的機構を解明できるばかりでなく、腫瘍ワクチン化に道を開くものである。

ここでは、マウスメラノーマをモデルに分泌型がん抗原の性状について述べ、そのメラノーマ関連遺伝子の単離についても言及する。

2. 可溶性メラノーマ抗原の免疫学的性状

2-1. 可溶性メラノーマ抗原は抑制 T 細胞を選択的に誘導する 腫瘍免疫系に抑制 T 細胞が存在し、これが免疫学的監視から腫瘍細胞が逃れる最大の機構として注目を集めていることは上述した。

メラノーマ抗原の場合も上述の法則に当てはまる。可溶性メラノーマ抗原を 50% 硫酸で分画したのち、正常マウス脾細胞 (C57BL/6) と 2 日間培養した。細胞はその後よく洗浄し可溶性抗原を除いたのち、再び CTL 誘導系に加え、4 日後 CTL 活性を測定した。その結果、メラノーマに対する CTL 活性は著明に抑制されたのである。同じ操作によっても、アロ抗原に対する CTL 活性は阻止を受けないから、この抑制は抗原特異的である。

したがって、可溶性メラノーマ抗原と正常脾細胞との 2 日間の培養によって抗原特異的な抑制細胞を誘導できることを証明したのである (Fig. 1)。

2-2. 可溶性メラノーマ抗原はキラー T 細胞の活性を阻止する “負の免疫系”を誘導する可溶性抗原の免疫学的性状の中でもう 1 つ重要な活性は、効果相 (effector phase) においてキラー T 細胞の活性を直接阻害することである。すなわち、一次免疫反応系で誘導したキラー T 細胞に、標的細胞である B16 メラノーマ細胞を反応させる際、さまざまな濃度の可溶性メラノーマ抗原 (メラノーマ細胞培養上清) を加えて細胞傷害活性を測定した。その結果、B16 メラノーマに対する細胞傷害活性は濃度依存性に阻害された (Fig. 2)。この阻害は抗原性を異にするアロ抗原に対するキラー T 細胞活性を阻害しないところから、抗原 (メラノーマ) 特異的に起こっていることが分かる。

Fig. 1. Time Course of Suppressor T Cell Induction by Soluble Melanoma Antigen

Fig. 2. Specific Inhibitory Effects of Purified Soluble Melanoma Antigen on Anti-melanoma CTL (Cytotoxic T Lymphocytes) Response

Fig. 3. Possible Cell Interactions in Tumor Immunity

以上のことを要約すると Fig. 3 に示すような図式が成立する。腫瘍細胞の出現によって、免疫系は発動する。この場合、主としてキラー T 細胞 (CTL) は細胞膜上の抗原によって活性化され腫瘍排除に働くと考えられるが、同時に腫瘍細胞はその腫瘍抗原を細胞表面から可溶性腫瘍抗原として分泌する。その可溶性抗原は、CTL 活性の阻止に働くばかりでなく、積極的に抑制 T 細胞を活性化し、腫瘍細胞を免疫系の攻撃から保護しているのであろうと考えられた。

3. 可溶性メラノーマ抗原の物理化学的性状

免疫学的的に重要な活性を持つこの可溶性腫瘍抗原の性状を解析するために細胞融合法を用いてモノクローナル抗体を作成した。その方法は、C57BL/6 マウス由来 B16 メラノーマ細胞を C57BL/6 に頻回免疫する方法—すなわち同系免疫—によった。その結果、2 種類の特徴的なモノクローナル抗体を作ることができた^{1,2)} (Fig. 4)。その 1 つは、M2590 抗体で多くの種類のメラノーマが共通に保有する種属共通メラノーマ抗原性であり、³⁾ 後述するように GM3 (NeuAc) 糖鎖がその決定基である。もう 1 つの抗体は M562 抗体で、マウス特異的メラノーマ抗原性を認識するもので蛋白分子がそれを構成する。

可溶性メラノーマ抗原はこれら 2 つのモノクローナル抗体が認識する決定基 GM3 (NeuAc) と蛋白分子の複

Fig. 4. Specificity of Syngeneic Mouse Monoclonal Antibodies against B16 (Mouse) Melanoma

合体からなることは, sequential precipitation (連続共沈反応)によって明らかにされた.^{1,2)}したがって,我々は頭初,これらの蛋白分子がメラノーマ抗原である可能性を考えていたが,意外な事実が分かったのである.それは,メラノーマ細胞あるいは,細胞培養上清から M2590 抗体で精製した抗原をクロロフォルム・メタノールで抽出したガングリオシド画分に M2590 抗体と反応する抗原性の多くが存在したことである.⁴⁾すなわち,クロロフォルムメタノール溶液 (2:1 混合) で抽出した糖脂質を薄層クロマトグラフィーで展開した後, M2590 抗体,ペルオキシダーゼ結合二次抗体と反応させた.その結果は Fig. 5 に示すごとく, M2590 は *N*-アセチルノイラミン酸含有ヘマトシド GM3 (NeuAc) と反応したが,脱シアル化合物であるラクトシルセラマイド (CDH),またシアル酸分子種の異なる *N*-グリコシルノイラミン酸含有ヘマトシド GM3 (NeuAc) とは全く反応せずシアル酸分子種を識別した.一方この抗体はシアリルパラグロボシド (NeuAc) とも反応したが,構造的に類似するガングリオ系ガングリオシド GM1, GM2, GD1a, GD3, GD2 とは全く反応しなかった.このことから M2590 抗体の認識するエピトープは NeuAc α 2-3 Gal β 1-4 Glc (又は GlcNAc) であることが強く示唆されたのである. M2590 は,化学合成した GM3 (NeuAc) ガン

グリオシドと反応したが,⁵⁾天然には存在しないと考えられているシアル酸が β 結合した GM3 (NeuAc) と反応しなかったことから, α -*N*-アセチルノイラミン酸部分を認識していることは,ほぼ誤りのないことと思われた.

以上の結果から種属共通メラノーマ抗原は GM3 (NeuAc) であることが強く示唆されたわけであるが,更に進

Ganglioside	Structure of sugar	Activity
GM ₄	●-△	2.7
GM ₃ (NeuAc)	●-△-▲	53.0
GM ₃ (NeuGc)	○-△-▲	0
GM ₂ (NeuAc)	□-△-▲	0
GM ₂ (NeuGc)	○-□-△-▲	0
GM _{1a}	△-□-△-▲	0
GM _{1b}	●-△-□-△-▲	trace
GD _{1a}	●-△-□-△-▲	trace
GD _{1b}	△-□-△-▲	0
GD ₃	●-●-△-▲	0
sialylparagloboside (NeuAc)	●-△-■-△-▲	49.6
sialylparagloboside (NeuGc)	○-△-■-△-▲	0
lactosylceramide	△-▲	0
paragloboside	△-■-△-▲	0

●, NeuAc; ○, NeuGc; △, Gal; ▲, Glc; □, GalNAc; ■, GlcNAc.

Fig. 5. Specific Binding Activity of M2590 Monoclonal Anti-melanoma Antibody with Cross-Species Reactivity on Various Gangliosides

Fig. 6. Fragmentation Diagram of Melanoma GM3

んで、抗体から精製したメラノーマ抗原を用いて化学構造の決定を試みた。メチル化糖の分析、グリコシターゼによる糖のアノマー・結合順序等の分析結果から抗原の化学構造は、NeuAc α 2—3 Gal β 1—4 Glc-Cer であると決定された (Fig. 6). 更に GM3 の分子種組成は fast atom bombardment mass spectrometry によって明らかにされたところによると、M-1-イオンは m/z 1263, m/z 1261, m/z 1235, m/z 1207, m/z 1279, m/z 1151 であり、GM3 (NeuAc) の d 18 : 1 スフィンゴシンにそれぞれ脂肪酸 C 24 : 1, C 22 : 0, C 18 : 0, C 16 : 0 が付着していることが示された。これはヒトやマウスの正常組織に広く分布する極めて平凡なガングリオシドと同じ化学組成であるが、なぜメラノーマ特異的腫瘍抗原として検出されるのかその詳細は推測の域を出ない。

ヒト赤血球表面には GM3 (NeuAc) が発見されていることは古くから知られているが、M2590 抗体はヒト赤血球と反応できない。すなわち、M2590 抗体は immunoglobulin M (IgM) 抗体であり抗体 1 分子に補体が結合するだけで十分に溶血を起こす働きを持つにもかかわらずこの抗体は反応できなかった。しかし、赤血球から抽出した GM3 (NeuAc) とは M2590 抗体は反応した。したがって、正常及び腫瘍細胞はともに GM3 を産生しているが、細胞表面上に表現される場合、三次構造の相違が問題となるものと思われる。

このような糖脂質糖鎖の三次構造を決定する因子としては蛋白分子の関与、糖脂質分布状態の相違などが考えられる。更に GM3 (NeuAc) に類似した全く新しい糖脂質の関与も否定できない。

4. 可溶性メラノーマ抗原蛋白成分の発現に關与する Genomic Deoxyribonucleic Acid (Genomic DNA) のクローン化

可溶性メラノーマ抗原を構成するもう 1 つの重要な構成要素である蛋白成分の発現をコントロールする遺伝子を単離し、その発現機構を調べるために M562 モノクローナル抗体を用いて genomic DNA のクローン化を試みた。

その原理は Fig. 7 に示すように、マウスメラノーマ細胞から全 DNA を抽出し、適当な大きさに切断した後、マウス抗原を表現していないヒトメラノーマ細胞に遺伝子を導入し、発現させる。これら transfectant のなかからマウスメラノーマ抗原 M562 を発現する細胞を FITC 結合 M562 抗体による染色、FACS による選別によって分画した後これらの細胞からマウス DNA を *in vitro* packaging 法でレスキューする方法である。

4-1. Genomic DNA ライブラリーの作成 B16

Fig. 7. Strategy of Cloning of Genomic DNA Controlling Cell Surface Products

Fig. 8. Experimental Protocol for Construction of Genomic DNA Libraries of B16 Melanoma

メラノーマ細胞 (マウス) から DNA を単離した後 *Mob* I 制限酵素で部分消化した。これをショ糖密度勾配法によって 40 kb の大きさの DNA 断片を集め、pCV 103 コスミド・ベクターの *Bam* HI 部位に組み込んだコスミド・ライブラリーを作成した (Fig. 8)。このライブラリーの検定を行ったところ B16 マウスメラノーマ細胞ゲノムの全長 (約 3 × 10⁸ kb) の約 550% の長さをカバーしていることが判明した。

4-2. ライブラリー DNA のヒト・メラノーマ細胞株への導入と発現 上記方法で作成した B16 DNA ライブラリーを形成するファージを ED8767 (大腸菌) に導入した。コスミド・ライブラリーを含むプラスミドをクロマイ (CM) 処理で大腸菌内で増殖させた後、プロトプラスト法 (PEG1500 を使用) を用いて約 20 μg の DNA を 10⁷ ヒトメラノーマ細胞 (P-36) に導入した。ミコフェノール酸 (10 μg/ml) 中で 2 週間培養することによって transfectant (マウス DNA を持つヒトメラノーマ) を選別した。この transfectant は更に FITC 結合 M562 抗体で染色した後 FACS で選別を繰り返した。その結果、5—7 回目の FACS 選別では明らかに M562 陽性細胞数が増加し (Fig. 9), M562 陽性細胞からマウス DNA を *in vitro* packaging により回収した。

4-3. Transfectant からのマウス DNA の回収 pCV103 ベクターには *cos* 配列があり、したがってヒトメラノーマ DNA をもつ B16 DNA が transfectant に挿入されている場合はこの *cos* 配列をもつ DNA が 2 個以上タンデムに並んで挿入されている場合、packaging mixture と混ぜ合わせることによって *cos* 配列をもつ B16 DNA を λ ファージ中に組み込ませることが可能となり、マウス DNA を回収できる。これを更に ED8767 大腸菌に感染させたのちクローン化して調べた。その結果、感染大腸菌から 26 個のクローン化 DNA が採取され、それぞれの遺伝子を *Eco* RI 消化した DNA の示す電気泳動パターンから分類した結果、26 個のクローン化 DNA は 3 種類の DNA に大別されることが分かった。これを pD2-1, pD2-2, pD2-7 と名づけた。

4-4. クローン化 Genomic DNA によるメラノーマ抗原 (M562) の発現 上記 3 つのクローン化 genomic DNA をそれぞれ P-36 ヒトメラノーマ細胞に導入し、M562 メラノーマ抗原の発現を FACS により解析した。pD2-1 及び pD2-2 を導入しても M562 抗原の発現はなかったが、pD2-7 の導入によって M562 抗原の発現が見られた (Fig. 10)。このことから pD2-7 genomic DNA にはメラノーマ抗原を発現に関する遺伝子が存在することが分かった。

Fig. 9. Selection and Enrichment of Primary Transformants Expressing M562 Determinants of Mouse Melanoma Antigen

M562, monoclonal anti-melanoma (IgM); T141, control monoclonal antibody (IgM).

Fig. 10. Expression of Mouse Melanoma M562 Determinants on Human Melanoma Cell Line (P-36) by Transfection with pD2-7 B16 Genomic DNA

5. おわりに

M562 モノクローナル抗体が認識するメラノーマ抗原は CTL の抗原認識にも関与する。したがって、その遺伝子構造を解析し発現の機構を解明することは腫瘍抗原を発現から免疫系の認識に至るまでのプロセスを遺伝子レベルで解き明かすための理想的なモデルシステムになる。

一方、M562 メラノーマ抗原の発現に関与する遺伝子を含む pD2-7 DNA には、もう 1 つの生物活性を持つことが明らかにされた。それは、pD2-7 DNA を L 細胞や NIH3T3 細胞に導入した場合にはこれらの細胞をトランスフォームさせることができたのである。トランスフォームさせる活性は L 細胞において強いが pD2-7 DNA の導入された NIH3T3 を 10^3 から 10^4 個をヌードマウス皮下に注射するだけで腫瘍を形成した。また pD2-7 DNA には、2 つの異なった遺伝子 (18S と 13S messenger ribonucleic acid が検出される) が存在し、complementary DNA クローンを単離し、上述の生物活性がどの遺伝子によって支配されているか検討中である。

謝辞 本研究は千葉大学医学部免疫学 高橋一昭博士 (抑制 T 細胞の解析)、小野久米夫博士 (可溶性抗原による CTL 活性の抑制)、田川雅敏博士、沖津 明博士、伊藤俊広技官、今井賢治博士、菅野雅元博士 (メラノーマ抗原遺伝子のクローン化) の協力によりなされたものである。

引用文献

- 1) S. Wakabayashi, T. Saito, N. Shinohara, S. Okamoto, H. Tomioka, M. Taniguchi, *J. Invest. Dermatol.*, **83**, 128 (1984).
- 2) M. Taniguchi, S. Wakabayashi, *Jpn. J. Cancer Res. (GANN)*, **75**, 418 (1984).
- 3) S. Wakabayashi, M. Taniguchi, T. Tokuhisa, H. Tomioka, S. Okamoto, *Nature (London)*, **294**, 748 (1981).
- 4) Y. Hirabayashi, M. Tagawa, A. Hayashi, Y. Matsubara, M. Matsumoto, M. Taniguchi, *J. Biol. Chem.*, **260**, 13328 (1985).
- 5) Y. Hirabayashi, T. Ogawa, M. Matsumoto, M. Tagawa, M. Taniguchi, *Biochem. Biophys. Acta.*, **875**, 126 (1986).