

# Antibody Production against Canser-associated Carbohydrate Antigen (DU-PAN-2) Induced by Monoclonal Anti-idiotypic Antibody and Immune Response of the Induced Antibody

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9266">http://hdl.handle.net/2297/9266</a>

## 抗イデオタイプ抗体により誘導される腫瘍関連糖鎖抗原 (DU-PAN-2抗原) に対する抗体産生とその免疫応答

金沢大学がん研究所内科部 (主任: 澤武紀雄教授)

河 上 浩 康

腫瘍関連糖鎖抗原である DU-PAN-2 に対する抗イデオタイプ抗体 (Ab2) を癌の特異的免疫療法に応用しようとして、DU-PAN-2 抗原に対する単クローン抗体 (Ab1) を免疫原としてハイブリドーマ法により単クローン性の Ab2 を作製した。さらに、得られた Ab2 を同系マウスに免疫し、抗・抗イデオタイプ抗体 (Ab3) の誘導を試み、それに伴う免疫応答を検討した。Ab2 は濃度依存性に Ab1 と結合し、DU-PAN-2 抗原と Ab1 の結合を特異的に阻害した。従って、得られた単クローン性の抗イデオタイプ抗体 1-2-4-4 は Ab1 の抗原認識部位であるパラトープ関連イデオトープを認識すると考えられた。さらに、その Ab2 を同系 BALB/C マウスに免疫し、Ab3 を作製した。得られた Ab3 は DU-PAN-2 抗原と Ab1 の結合を特異的に阻害した。また、イムノプロット法により、Ab3 が DU-PAN-2 抗原と特異的に反応することが確認された。これらの結果より、抗イデオタイプ抗体 1-2-4-4 は元の抗原である DU-PAN-2 抗原と相同性を有する内部イメージと称される構造を持ち、DU-PAN-2 抗原に対する抗体産生を誘導することが示唆された。さらに、Ab2 により誘導された Ab3 の免疫学的性状の検討を行ったところ、DU-PAN-2 抗原を発現している KATO III 細胞に対し、補体依存性細胞障害 (complement dependent cytotoxicity, CDC) 活性やキラー細胞活性を示さなかったが、抗体依存性細胞媒介性細胞障害 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 活性を誘導した。以上のように、DU-PAN-2 抗原に対する抗イデオタイプ抗体を抗原として用いることにより、ADCC 活性を有する Ab1-like Ab3 の産生を誘導しえた。このことから、免疫原性の弱い腫瘍関連糖鎖抗原に対しても抗イデオタイプ抗体を応用することにより、イデオタイプ・ネットワークを介して宿主に抗原特異的な免疫応答が誘導され、抗腫瘍効果をもたらす可能性が示唆される。

**Key words** 抗イデオタイプ抗体, モノクローナル抗体, DU-PAN-2, 腫瘍免疫, 糖鎖抗原

Jerne<sup>1)</sup>の提唱したイデオタイプネットワーク理論 (idiotype network theory) によれば、抗体分子 (Ab1) の超可変部位には個々の抗体に特有な複数のアミノ酸配列から成る抗原性を有する構造 (イデオトープ) が存在し、これを認識する抗イデオタイプ抗体 (Ab2) と呼ばれる抗体が誘導される。また、抗イデオタイプ抗体の中には、その可変部位に内部イメージ (internal image) と称される元の抗原のエピトープに相同な構造を有しているものがある。このような内部イメージを種々の疾患に対するワクチンとして応用する可能性が期待されており、実際に、ウイルス、細菌、原虫などの感染症の系では動物モデルにおいて、優れた成果が報告されている<sup>2) 4)</sup>。同様に、癌診療においても内部イメージを有する抗イデオタイプ抗体を元の腫瘍抗原の代用として用い、各種の腫瘍免疫を誘導して癌の治療に、あるいは腫瘍抗原に対する自己抗体の測定に応用しようとする試みも行われている。しかし、このような方向への応用として行われている研究の大部分は、対象抗原が蛋白成分に対してであり、癌特異性が高い糖鎖抗原に対しては、ほとんど報告がない。

DU-PAN-2 抗原は Metzgar<sup>5)</sup> によりヒト膵管癌細胞 (HPAF-1) を免疫原としてハイブリドーマ法により得られた単クローン

性の、抗DU-PAN-2抗体によって認識される糖鎖抗原である。その抗原エピトープはシアル酸を有する糖鎖である<sup>6)</sup>とされているが、その詳細な糖鎖構造は未だ完全には確立されていない。当教室でもこの抗原に早くより注目し、その組織発現の検索や臨床的応用を試みてきた<sup>7) 10)</sup>。現在、本抗原は肺癌を初めとした腺癌組織や胎児腸管組織に高率に発現<sup>10) 11)</sup>し、血中遊離抗原としても存在することから、有力な腫瘍マーカーとして普及している<sup>8)</sup>。この様に、ハイブリドーマ法の導入により、抗原性は弱い、癌特異性の高い糖鎖抗原に対して単クローン抗体の作製が可能となり、多数の有力な糖鎖抗原が腫瘍マーカーとして臨床応用され、癌の血清学的診断法に大きなインパクトを与えた。

一方、このような腫瘍抗原を癌の免疫療法として利用し、癌の治療を目指す研究も活発に行われているが、大きな成果は得られていない。その要因の1つとして、特に、特異性の高い腫瘍関連抗原として用いられている各種糖鎖抗原は一般に免疫原性が弱いのに加え、腫瘍細胞当たりの抗原量が非常に少なく、単離精製抗原を大量に得ることが困難であることなどが挙げられる。

そこで、本研究では BALB/C マウスを用いて作製した糖鎖抗原を認識する抗 DU-PAN-2 単クローン抗体 (Ab1) を同系マウス

平成8年11月29日受付, 平成9年1月10日受理

Abbreviations: ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; BSA, bovine serum albumin; CDC, complement dependent cytotoxicity; CEA, carcinoembryonic antigen; EIA, enzyme immunoassay; FCS, fetal calf serum; HMW-MAA, high-molecular-weight melanoma-associated antigen; LPS, lipopolysaccharide; MoAb,

に免疫することによって内部イメージを有する単クローン性の抗イディオタイプ抗体 (Ab2) を作製した<sup>13)</sup>。得られたAb2を同系マウスに投与することにより、抗・抗イディオタイプ抗体 (Ab3) を誘導し、誘導されるAb3の免疫学的特性を検索し、DU-PAN-2 抗原に対する抗イディオタイプ抗体を癌の治療に応用する可能性を検討しようとした。

### 対象および方法

#### I. 実験に使用した単クローン抗体と抗原

本研究において用いた単クローン抗体 (monoclonal antibody, MoAb) はすべて免疫したBALB/cマウス脾細胞とマウスミエローマ細胞 (NS-1) を細胞融合して作製されたものであり、MoAb DU-PAN-1 (IgG1,  $\kappa$ ) と MoAb DU-PAN-2 (IgM,  $\kappa$ ) (協和メデックス, 東京) は Metzgar<sup>5)</sup> によりヒト膀胱癌培養細胞 HPAF-1 を免疫原として作製された。比較対照に用いた MoAb ST-439 (IgM) (日本化薬, 東京) は Hirohashi<sup>10)</sup> によってヒト胃癌培養細胞 St-4 を免疫原として作製された。また、実験に用いた DU-PAN-2 抗原 (協和メデックス) は Lan<sup>6)</sup> の報告に従って、HPAF-1 ヒト膀胱癌細胞の培養上清より精製したものである。

#### II. 単クローン抗イディオタイプ抗体 (Ab2) の作製

MoAb DU-PAN-2 (Ab1) は DEAE-セファロース・ファーストフロー・カラム (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いたイオン交換クロマトグラフィーにて精製した。精製した Ab1 を Primi<sup>14)</sup> の報告に従って *Salmonella typhi* 由来のリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) W (Difco, Detroit, USA) と結合させ、Ab1 20  $\mu$ g 相当分を 1 週間間隔で計 4 回、初回はフロイント完全アジュバント (Freund's complete adjuvant) (Sigma, St. Louis, USA) と共に、2 回目以降はフロイント不完全アジュバント (Freund's incomplete adjuvant) (Sigma) と共に懸濁し、BALB/c マウスの腹腔内に注射した。最終免疫より 4 日目にその脾細胞をマウスミエローマ細胞 SP2/0 と 50% ポリエチレングリコール (polyethylene glycol, PEG) 1500 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を用いて融合させた。その後、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン (hypoxanthine-aminopterin-thymidine, HAT) 培養液 (Flow laboratories, Mclean, USA) にて 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養し、得られたハイブリドーマの上清を用いて、DU-PAN-2 抗原と抗 DU-PAN-2 抗体との抗原抗体反応阻害活性を III 項で述べる酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay, EIA) にて測定し、特異的クローンの選択を行った。ついで 限界希釈法によるクローニングを繰り返してハイブリドーマ株を確立した。確立したハイブリドーマ株を BALB/c マウス腹腔内に移植し、増殖させ、得られた腹水からプロテイン A-セファロース 4B (Pharmacia) アフィニティークロマトグラフィーを用いて抗体を精製した。

また、ハイブリドーマの培養上清とウサギ抗マウス IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM (Zymed, San Francisco, USA) との反応性を EIA にて検討し、免疫グロブリンのサブクラスを決定した。

#### III. DU-PAN-2 抗原抗体反応阻止試験

1. DU-PAN-2 抗原抗体反応阻止試験による単クローン抗体 (Ab2) のスクリーニング

DU-PAN-2 抗原測定キット (協和メデックス) 中の抗 DU-PAN-2 抗体 (Ab1) を固相化した 96 穴マイクロタイタープレートに各ウェルに、ハイブリドーマ培養上清 (Ab2) 50  $\mu$ l を注入し、30°C, 2 時間反応させた。プレートを生理食塩水にて洗浄後、DU-PAN-2 抗原値が高値である癌患者血清を 100  $\mu$ l ずつ各ウェルに加え 30°C, 2 時間反応させた。続いてキットの酵素標識抗体 100  $\mu$ l を加え 30°C, 1 時間反応させ、最後に発色剤にて発色させマイクロプレートリーダーにて 660 nm での吸光度を測定した。

#### 2. 抗イディオタイプ抗体による抗原抗体反応阻止試験

精製 DU-PAN-2 抗原 (2  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ l をポリスチレンビーズ (積水化学, 東京) に固相化し、3% ウシアルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Sigma) 加 0.1 M リン酸緩衝塩化ナトリウム液 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH 7.4) にて 30°C, 2 時間ブロッキングを行った。段階的に希釈した単クローン性抗イディオタイプ抗体 (monoclonal anti-idiotypic antibody, Mono-Id) (Ab2) 100  $\mu$ l と、クロラミン T 法にてヨード化した<sup>12)</sup> 標識 DU-PAN-2 抗体 (Ab1) 100  $\mu$ l ずつを 24 穴反応トレイ (ダイナボット, 東京) の各ウェルに加え混和し、30°C, 1 時間反応させた。その後ビーズを各ウェルに加え、30°C, 3 時間反応させた。PBS にてビーズを洗浄後、ビーズに残っている放射活性をガンマカウンター (アロカ, 東京) にて測定した。

#### IV. 抗イディオタイプ抗体の抗 DU-PAN-2 抗体に対する結合活性

0.1 M 炭酸重炭酸緩衝液 (pH 9.5) にて 20  $\mu$ g/ml に希釈した Ab2 を 96 穴マイクロタイタープレート (Coster, Cambridge, UK) に 1 ウェル当たり 100  $\mu$ l ずつ注入し、4°C, 一夜培養により固相化した後、3% BSA 加 0.1 M PBS にて 2 時間反応させブロッキングを行った。洗浄後、段階的に希釈した MoAb DU-PAN-2 (Ab1) または対照に用いた MoAb (MoAb ST-439, IgM,  $\kappa$ ) を加え、3 時間反応させた後に ペルオキシダーゼ結合羊抗マウス IgM (Cappel Antibodies, West Chester, USA) を反応させた。0.02% 2,2'-アジノジ-(3-エチルベンズチアゾリン)-6'-スルホン酸 [2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline)-6'-sulfonic acid, ABTS] (和光純薬, 大阪) を加えた 0.1 M クエン酸リン酸緩衝液 (pH 5.3) と等量の 0.03% 過酸化水素水を混じたものを発色基質としてウェルに加え、マイクロプレートリーダー-MTP-22 型 (コロナ電気, 茨城) を用いて 412 nm における吸光度を測定した。

次に、Ab2 が Ab1 の可変部領域 (Fab フラグメント) と反応しているかを確認するために、Onoue<sup>15)</sup> の方法にて Ab1 から Fab フラグメントを以下のように分離した。Mercuri-papain 結晶 (Sigma) と 0.01 M システインと 0.002 M 2Na EDTA を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を 37°C で培養した後、それに Ab1 を混合し、30 分反応させた後、セファデックス G25 カラム (Pharmacia) を用いて、Fab フラグメントを溶出した。IgM を含む分画は硼酸緩衝液 (borate-buffered saline) にて透析し、パパインを不活化して以下の実験に用いた。Fab 分画は、IV 項に記載した装置を用いて SDS-PAGE で分離を確かめた。次に、Fab 分画をマイクロタイタープレートに各ウェル 100  $\mu$ l ずつ注入して固相化し、3% BSA 加 0.1 M PBS でブロッキングした。各ウェルは洗浄後、段階的に希釈した Ab2 を加え 3 時間反応させた後に、ペルオキシダーゼ標識羊抗マウス IgG Fc 分画 (Cappel Antibodies) を加え、前

monoclonal antibody; Mono-Id, monoclonal anti-idiotypic antibody; PEG, polyethylene glycol; PBS, phosphate-buffered saline; PVDF, polyvinylidene difluoride

に述べたと同様の方法で発色させて吸光度を測定した。

#### V. 抗イディオタイプ抗体 (Ab2) による抗・抗イディオタイプ抗体 (Ab3) の誘導

Primi<sup>14)</sup>の方法で LPS とカップリングした Ab2 の 20  $\mu\text{g}$  を 1 週間間隔で計 4 回同系の BALB/c マウス腹腔内に注入した。最終免疫後 3 日目に抗血清を採取し、Ab3 抗体の特性分析に用いた。また、Ab2 とは異なるエピトープと反応する MoAb DU-PAN-1 を Ab2 と同様の投与量と方法で投与し、得られた抗血清を対照として用いた。

#### VI. 抗・抗イディオタイプ抗体 (Ab3) を検出するサンドイッチアッセイ

Ab2 を免疫して得られた抗血清中の Ab3 の Ab2 に対する反応性は、固相化 Ab2 とビオチン化 Ab2 によるサンドイッチ法で確かめた。すなわち、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度の精製 Ab2 を 96 穴プレートの各ウェルに吸着させて固相化し、1% BSA 添加 0.1 M PBS (pH7.0) でブロッキングした後、段階的に 0.1 M PBS (pH7.0) で希釈した Ab2 を免疫して得られた抗血清と室温、2 時間反応させた。あらかじめ、Ab2 を 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  (pH8.2) にて透析後、そこへ、N-ヒドロキシスクシンイミド-ビオチン (N-hydroxysuccinimidobiotin, 和光純薬) を 120  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の割合で加え、室温、4 時間反応させてビオチン化 Ab2 を調整した。次いで、ウェルを洗浄後、ビオチン化 Ab2 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加えて 4°C、16 時間反応させた。さらに、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン・ビオチン複合体 (Vector, Burlingame, USA) を加えて反応させた後に、0.02% ABTS 加 0.1 M クエン酸リン酸緩衝液 (pH5.3) と等量の 0.03% 過酸化水素水を混じたものを発色基質として発色させ、412 nm における吸光度を測定した。

#### VII. 抗・抗イディオタイプ抗体 (Ab3) による DU-PAN-2 抗原抗体反応阻止試験

精製 DU-PAN-2 抗原をポリスチレンビーズ (積水化学) に固相化し、1% BSA 加 0.1 M PBS (pH7.0) にてブロッキングした。クロミンT法で標識した 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度の <sup>125</sup>I 標識 Ab1 50  $\mu\text{l}$  および段階的に希釈した抗・抗イディオタイプ血清 (Ab3) を反応トレイ (ダイナポット) に加え混和し、30°C、2 時間反応させた後、ビーズを加えて吸着させた。その後、PBS にてビーズを洗浄後ガンマーカウンター (アロカ) にてビーズの放射活性を測定した。

#### VIII. SDS-PAGE とウエスタンブロットアッセイ

スラブゲル電気泳動装置 KS-8000 SE 型 (マリソル産業, 東京) を用いて、精製 DU-PAN-2 抗原 10  $\mu\text{g}$  を 7.5% SDS ポリアクリラマイドスラブゲルにて 100 V の定電圧下にプロモフェノールブルーの泳動度を指標にして電気泳動を行い、続いて、Towbin らの方法<sup>16)</sup>に従って、ゲルメンブラン転写装置 KS-8460 型 (マリソル) を用いて、6 V の定電圧下で 2 時間通電し、ポリ弗化ビニリデン (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜 (Milipore, Bedford, USA) に転写した。PVDF 膜を抗 Ab2 抗血清 (Ab3)、抗 DU-PAN-1 MoAb 抗血清または Ab1 (抗 DU-PAN-2 MoAb) と 4°C、一夜反応させ、洗浄後、ペルオキシダーゼ標識羊抗マウス IgM あるいはペルオキシダーゼ標識羊抗マウス IgG (Cappel Antibodies) と反応させた。その後、*o*-フェニレンジアミン (*o*-phenylenediamine, OPD) (和光純薬) と 0.03% 過酸化水素を混和したものを発色基質溶液として用い染色した。また転写元のゲルを 0.1% アミドブラック 10B (和光純薬) にて染色し、転写位置を確認した。

#### IX. 抗イディオタイプ抗体 (Ab2) により誘導される免疫反応

#### の検討

BALB/c マウスに LPS と結合した Ab2 10  $\mu\text{g}$  を 2 週間隔で計 3 回腹腔内に免疫し、その抗血清 (Ab3) を用いて DU-PAN-2 抗原産生細胞である胃癌培養株 KATO III 細胞に対する抗体依存性細胞媒介性細胞障害 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 活性と補体依存性細胞障害 (complement dependent cytotoxicity, CDC) 活性を検討した。さらに、Ab2 で免疫した脾細胞のキラー細胞 (killer cell) 活性と Ab2 との反応性も測定した。

ADCC 測定の際、エフェクター細胞 (effector cell) として用いる腹腔マクロファージは、BALB/c マウスを屠殺した後、0.34 M ショ糖を含む生理食塩水 5 ml を注射器にて腹腔に注入後、マッサージして注射器内に回収した。その液を 3% ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (Gibco, Gran Island, USA) 添加 RPMI1640 培地 (Gibco) で全量 20 ml とし、遠心管に移し、1200 rpm、5 分遠心した。上清を吸引後、20 ml RPMI1640 培地を加えて再度遠心したものの沈渣をヒポキサンチン-チミジン (hypoxanthin-thymidine, HT) 培地に加えて、細胞浮遊液 ( $2.5 \times 10^6$  個/ml) を作製した。これを 96 穴マイクロプレートに 100  $\mu\text{l}$ /ウェルずつまいて、炭酸ガス培養装置 (5%) にて 37°C、一夜培養して用いた。

キラー細胞活性測定の際にエフェクター細胞として用いるリンパ球は、BALB/C マウスを屠殺した後、脾臓を摘出し、5 ml の HT 培地内で細胞をほぐし、金属メッシュ (NBC 工業, 大阪) で濾過した後、フィコール-ヒバカー液 (比重 1.077) (Nyegaad, Oslo, Norway) 上に静かに重層させ、400 rpm で 20 分間遠心後、中間層を採取し 2% FCS 添加 RPMI 1640 培地で 3 回洗浄し、単核球を分離した。炭酸ガス培養装置 (5%) にて 37°C、1 時間静置後、同様の培地に浮遊させ用いた。

#### 1. ADCC 活性

測定には <sup>51</sup>Cr 放出試験 (<sup>51</sup>Cr-release test) を用いた。腹腔マクロファージは既述のように作製し、標的細胞 (target cell) として用いる KATO III 細胞との比を 100 : 1 に調製した。標的細胞 ( $10^6$ ) をあらかじめ 100  $\mu\text{Ci}$  の <sup>51</sup>Cr (New England Nuclear, Boston, USA) と 37°C、2 時間反応させて標識した。標識した細胞は 3 回洗浄後培地に浮遊させ、マイクロタイター V ボトルプレート (Dynatech Laboratories, Alexandria, USA) に採取した。その中に抗血清とエフェクター細胞を加え 2 時間反応させた。反応後プレートを 400 rpm で遠心し、上清の 100  $\mu\text{l}$  中の放射活性をガンマーカウンターで測定した。下記の算定式に基づき特異的 <sup>51</sup>Cr 放出値を算出して、これを細胞障害活性値とした。

細胞障害活性 (%) =  

$$\frac{(^{51}\text{Cr} \text{ 実測値} - ^{51}\text{Cr} \text{ 自然放出量})}{(^{51}\text{Cr} \text{ 最大放出量} - ^{51}\text{Cr} \text{ 自然放出量})} \times 100$$

最大放出量は標的細胞からの最大 <sup>51</sup>Cr 放出量で、標的細胞に 0.1 N HCl 100  $\mu\text{l}$  を加えた時の <sup>51</sup>Cr 放出量を示した。自然放出量は 3% FCS 加 RPMI 1640 培地 100  $\mu\text{l}$  を加えて培養した時の標的細胞の <sup>51</sup>Cr 自然放出量とした。

比較対照として、<sup>51</sup>Cr 標識 KATO III 細胞に、腹腔マクロファージのみ、抗 DU-PAN-2 抗体 (Ab1) と腹腔マクロファージ、マウス正常血清と腹腔マクロファージ、KATO III 細胞をマウスに免疫して得た抗血清と腹腔マクロファージを各々加えて、細胞障害活性を同様に測定した。

#### 2. CDC 活性

CDC 活性は補体として Hanks 液 (Hanks' balanced salt

solution, HBSS) (Gibco) で5倍希釈したラット新鮮血清50  $\mu$ lを用い、56°C、40分で非動化した抗血清 (Ab3) 50  $\mu$ lとともに、<sup>51</sup>Cr標識したKATO III細胞に加えて、ADCC活性測定と同様に細胞障害活性を測定した。比較対照として、<sup>51</sup>Cr標識 KATO III細胞に、補体のみ、Ab1と補体、またはマウス正常血清と補体を加えて、各々の細胞障害活性も測定した。

3. 抗イディオタイプ抗体免疫マウス脾細胞のキラー細胞活性および抗イディオタイプ抗体 (Ab2) との反応性

先に述べたように Ab2 免疫脾細胞より抽出したリンパ球を10% FCS 添加 RPMI-1640 液で $5 \times 10^6$ 細胞/mlに調製し、その100  $\mu$ lを96穴マイクロプレート (Coster) の各穴に分注し、エフェクター細胞とした。<sup>51</sup>Cr標識KATO III細胞を10% FCS 添加 RPMI-1640液に浮遊させたものを標的細胞とした。次いで、 $1 \times 10^6$ 細胞/mlに調製した<sup>51</sup>Cr標識KATO III細胞浮遊液100  $\mu$ lを先のエフェクター細胞液100  $\mu$ lに加えた (この条件でエフェクター細胞と標的細胞の比が50対1の数比になる)。37°C、5%CO<sub>2</sub>下で4時間培養した後、遠心し、上清を100  $\mu$ lづつ採取し、上清中の<sup>51</sup>Cr放出量をガンマカウンターにて測定し、キラー細胞活性とした。比較対照として、無処置マウス脾細胞およびKATO III細胞で免疫したマウスより抽出した脾細胞をエフェクター細胞として用いたもので活性を測定した。

さらに、Ab2免疫脾細胞浮遊液 ( $2 \times 10^7$ 細胞/ml) にanti Thy1.2 (Thy-1.2 F7D5 monoclonal IgM cytotoxic antibody) (Serotec, Oxford, UK) を室温、30分間反応させた後に、5倍希釈したラット血清を加えて、37°C、45分間反応させ、T細胞を除去した。その後、この浮遊液50  $\mu$ lを24穴反応トレイ (ダイナボット) に分注し、3%BSA添加0.1 M PBS (pH7.0) で30°C、2時間ブロッキングを行った。さらに、<sup>125</sup>I標識 Ab2 50  $\mu$ lを各ウェルに加え、30°C、3時間反応させた。0.1 M PBS (pH7.0) にてウェルを洗浄後、ウェルに残っている放射活性をガンマカウンター (アロカ) にて測定した。

同様の方法で、T細胞回収カラム (T cell recovery column) (Sci-Can Diagnostics, Edmonton, Canada) を2% FCS 添加 Hanks

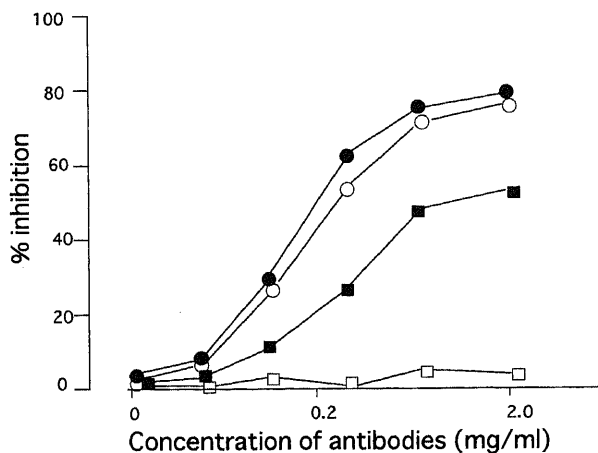


Fig.1. Inhibition of DU-PAN-2 antigen-antibody reaction by anti-idiotypic antibodies. Three clones were obtained that could inhibit the binding of DU-PAN-2 antigen-antibody reaction, but the inhibition rates differed. Clone1-2-4-4 showed the highest inhibition. ●, Mono-Id 1-2-4-4; ○, Mono-Id 1-2-4-6; ■, Mono-Id 1-2-4-7; □, normal mouse IgG.

液 (Gibco) で洗浄した後、その中を8滴/分の流速でAb2免疫脾細胞浮遊液を滴下させB細胞を除去した Ab2 免疫脾T細胞分画についても<sup>125</sup>I標識 Ab2 との反応性を検討した。

X. 測定値の有意差検定

細胞障害活性の測定値は、平均値±標準誤差 ( $\bar{x} \pm S.E.$ ) をもって示した。各群間の平均値の差の検定には、t検定 (Student's t-test) を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

成 績

I. 単クローン抗イディオタイプ抗体の確立とその反応特異性の検討

マウス・ハイブリドーマ法により作製したハイブリドーマより、Ab2 産生株を固相化抗 DU-PAN-2 抗体 (Ab1) に対する DU-PAN-2 抗原抗体反応阻止試験によりクローニングし、3種の陽性クローン (1-2-4-4, 1-2-4-6, 1-2-4-7) を選択した。そのうち図1に示すごとくクローン1-2-4-4が最も強い阻止反応を示したので、これを以下の実験に用いた。EIA法を用いた免疫グロブリン重分

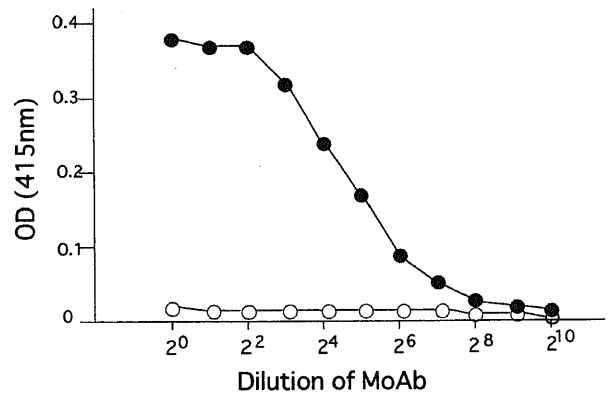


Fig.2. Binding activity of MoAb 1-2-4-4 (Ab2) to MoAb DU-PAN-2 (Ab1). MoAb 1-2-4-4 strongly bound to MoAb DU-PAN-2, but did not bind to a control MoAb (ST-439, IgM,  $\kappa$ ). ●, MoAb DU-PAN-2 (IgM); ○, MoAb ST-439 (IgM).

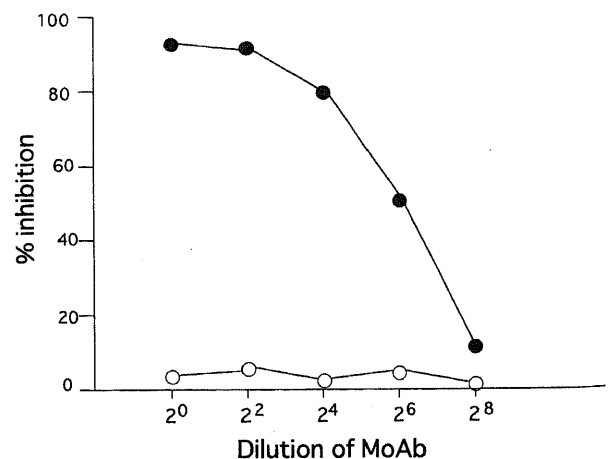


Fig.3. Inhibitory activity of MoAb 1-2-4-4 (Ab2) toward the binding of MoAb DU-PAN-2 (Ab1) with DU-PAN-2 Ag. Id MoAb 1-2-4-4 inhibited the the binding of MoAb DU-PAN-2 to DU-PAN-2 Ag, whereas control MoAb (MoAb DU-PAN-1) did not. ●, MoAb 1-2-4-4 (IgG1); ○, MoAb DU-PAN-1 (IgG1).

画の検討にて MoAb1-2-4-4 (Ab2) は, IgG1,  $\kappa$  サブクラス (subclass) に属していた。

得られた精製 Mono-Id の抗 DU-PAN-2 抗体との結合性を検討すると, 図2に示すごとく MoAb 1-2-4-4 は Ab1 と容量依存性に結合するが, Ab1と同じサブクラスの対照として用いた MoAb (ST-439, IgM,  $\kappa$ ) とは結合しなかった (図2)。DU-PAN-2 抗原抗体反応に対する阻止試験の検討では, 図3に示すごとく MoAb1-2-4-4 は DU-PAN-2 抗原と Ab1 の反応を容量依存的に阻害したが, 対照として用いた MoAb1-2-4-4 と同じサブクラスである MoAb (MoAb DU-PAN-1; IgG1,  $\kappa$ ) に対しては阻害活性は全く認められなかった。図には示さないが, MoAb1-2-4-4 は Ab1 の Fab 分画と容量依存性に結合したが, 対照 MoAb (MoAb DU-PAN-1) の Fab 部分とは結合しなかった。これらの成績より, MoAb1-2-4-4 (Ab2) は Ab1 と抗原との結合を干渉しうる抗原決定基近傍の標的イデオトープを認識し, モノクローナル抗 DU-PAN-2 抗体によって認識される DU-PAN-2 抗原に類似した

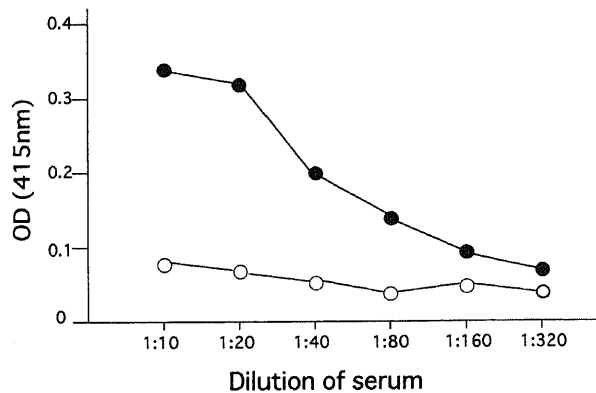


Fig.4. Representative binding activity of anti-MoAb 1-2-4-4 antiserum (Ab3) to MoAb 1-2-4-4 (Ab2) assessed by ELISA. Anti-MoAb 1-2-4-4 antiserum reacted with MoAb 1-2-4-4, whereas control antiserum (anti-MoAb DU-PAN-1 antiserum) failed to react. ●, anti-MoAb1-2-4-4 antiserum; ○, anti-DU-PAN-1 antiserum.

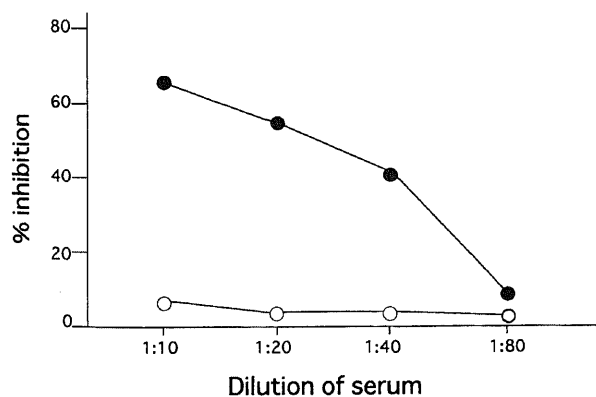


Fig.5. Representative inhibitory activity of anti-MoAb 1-2-4-4 antiserum (Ab3) toward the binding of MoAb DU-PAN-2 (Ab1) with DU-PAN-2 Ag. Anti-MoAb 1-2-4-4 antiserum inhibited the binding of MoAb DU-PAN-2 (Ab1) with DU-PAN-2 Ag, whereas control antiserum (anti-MoAb DU-PAN-1 antiserum) failed to inhibit it. ●, anti-MoAb 1-2-4-4 antiserum; ○, anti-DU-PAN-1 antiserum.

構造をもつことが推測された。

## II. 抗・抗イデオタイプ抗体 (Ab3) のDU-PAN-2抗原との反応性

同系マウス (BALB/C) を用いて Ab3 の誘導を試みた。5 匹のマウスを MoAb1-2-4-4 (Ab2) で免疫し, 抗 MoAb1-2-4-4 抗血清 (Ab3) を得た。免疫マウスから得られた抗 MoAb1-2-4-4 抗血清は段階的に希釈した MoAb1-2-4-4 との間に容量依存的に抗原抗体反応が認められたのに対して, 対照抗血清 (抗 MoAb DU-PAN-1 抗血清) との間には反応が認められなかった (図4)。次に, MoAb 1-2-4-4 で免疫して得られた抗血清 (Ab3) が Ab1 による DU-PAN-2 抗原抗体反応を阻止するかどうかを検討した。抗 MoAb1-2-4-4 抗血清 (Ab3) は DU-PAN-2 抗原に対する Ab1 の反応を容量依存的に阻害したが, 対照抗血清には阻害活性は認められなかった (図5)。さらに, DU-PAN-2 抗原に対する抗 MoAb 1-2-4-4 抗血清 (Ab3) の反応性をウエスタンブロット法で検討した (図6)。抗 MoAb 1-2-4-4 抗血清 (Ab3) は DU-PAN-2 抗原と反応し, SDS-PAGE により泳動される DU-PAN-2 抗原の Ab1 により染色される部位に一致して特異的活性帯が検出された。比較対照に用いた抗 MoAb DU-PAN-1 抗血清ではいづれの活性帯も検出されなかった。また, DU-PAN-2 抗原とあらかじめ反応させた抗 MoAb 1-2-4-4 抗血清も精製 DU-PAN-2 抗原との反応性は消失し, 活性帯が認められなかった。以上のことより, 抗 MoAb1-2-4-4 抗血清 (Ab3) が DU-PAN-2 抗原に対する抗体活性を所有している, 抗・抗イデオタイプ抗体, いわゆる Ab1-like Ab3 であることが示された。

## III. 抗イデオタイプ抗体 (Ab2) 投与により誘導される免疫反応

Ab2 免疫血清を用いて  $^{51}\text{Cr}$  標識した KATO III 細胞に対する ADCC 活性および CDC 活性を検討した。ADCC 活性に関して

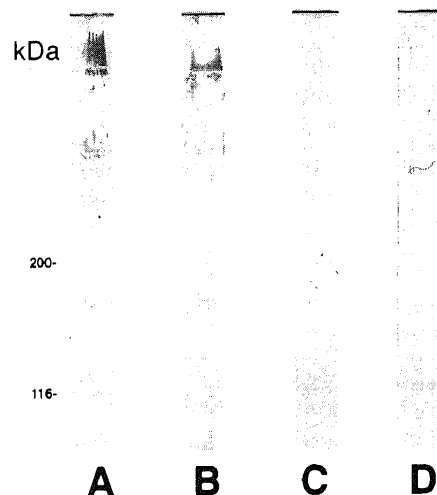


Fig.6. Western blot analysis of the binding activity of anti-MoAb 1-2-4-4 antiserum (Ab3) and control antiserum (anti-MoAb DU-PAN-1 antiserum) to purified DU-PAN-2 Ag. Anti-DU-PAN-2 MoAb reacted with DU-PAN-2 antigen (Lane A). Anti-MoAb 1-2-4-4 antiserum reacted with DU-PAN-2 Ag (Lane B), whereas control antiserum (anti-MoAb DU-PAN-1 antiserum) failed to react (Lane C). The reaction of anti-MoAb 1-2-4-4 antiserum with DU-PAN-2 Ag was inhibited by the addition of DU-PAN-2 Ag to the immune serum (Lane D).

Table 1. Reactivity of Ab2 immunized spleen cells against  $^{125}$ I labeled Ab2

Treatment	Reactivity (cpm)	
	Normal spleen cell	Ab2 immunized spleen cell
None	112 ± 35	2011 ± 175
Anti-Thy-1.2+complement	114 ± 39	1240 ± 241
T cell recovery column	89 ± 19	132 ± 25

Data are shown as  $\bar{x} \pm SE$ .

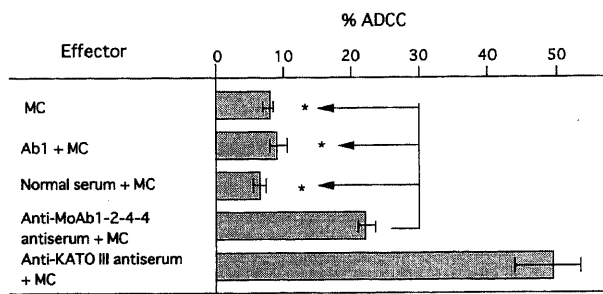


Fig.7. ADCC of anti-MoAb 1-2-4-4 antiserum and control antibodies against  $^{51}$ Cr-labeled KATO III cells in the presence of macrophage. Although, anti-KATO III antiserum gave higher cytotoxicity than anti-MoAb 1-2-4-4 antiserum, anti-MoAb 1-2-4-4 antiserum had gave significant higher cytotoxicity than normal serum, Ab1 and macrophage alone ( $p < 0.05$ ). Data are shown as  $\bar{x} \pm SE$ . \*,  $p < 0.05$  VS control by Student's t-test. MC: macrophage.

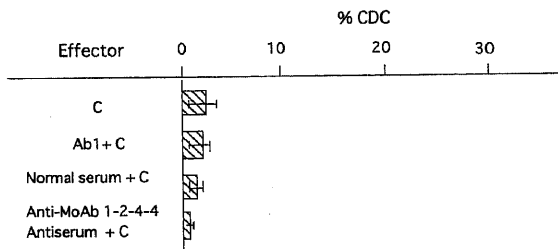


Fig.8. CDC of anti-MoAb 1-2-4-4 antiserum, normal serum and anti-DU-PAN-2 antibody against  $^{51}$ Cr-labeled KATO III cells in the presence of complement. Anti-MoAb 1-2-4-4 antiserum had gave only 1-2% cytotoxicity. Similarly, normal serum, Ab1 and complement alone had gave 2-3% cytotoxicity. Data are shown as  $\bar{x} \pm SE$ . \*,  $p < 0.05$  VS control by Student's t-test. C: complement.

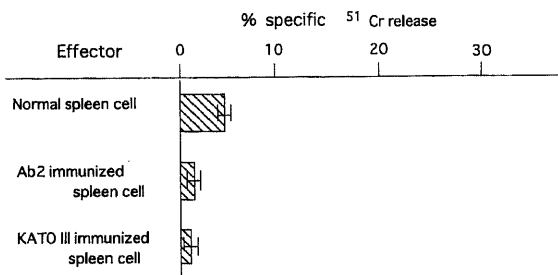


Fig.9. Killer cell activities of the mouse spleen cell immunized by the anti-DU-PAN-2 mono-Id (Ab2) and the mouse spleen cell immunized by KATO III cells as determined by  $^{51}$ Cr-release assay. Normal spleen cell had gave only 4% cytotoxicity, and Ab2 immunized spleen cell and KATO III immunized mouse spleen cell had no measurable effect. Data are shown as  $\bar{x} \pm SE$ . \*,  $p < 0.05$  VS control by Student's t-test.

は、抗MoAb 1-2-4-4抗血清 (Ab3) は KATO III細胞の細胞溶解質 (cell lysate) を免疫して得られた抗血清に比較して活性は低い、比較対照とした正常血清やAb1よりも有意に高い ADCC 活性を示した ( $p < 0.05$ ) (図7)。これに対して、抗 MoAb 1-2-4-4抗血清 (Ab3) 添加による CDC 活性は、対照として用いた Ab1 や正常血清を添加した場合と差異はなく、CDC 活性を有する抗体は誘導されないか極めて低反応性であることが示唆された (図8)。

さらに、Ab2 を免疫したマウス脾細胞より抽出したリンパ球の KATO III細胞に対する細胞障害活性 (キラー活性) を測定したが、正常脾細胞やKATO III細胞で免疫した脾細胞と比較して、有意なキラー細胞活性は認められなかった (図9)。

さらに、Ab2 を免疫したマウスの脾細胞より抽出したリンパ球のAb2との反応性を検討したところ、表1に示すように、Ab2免疫脾細胞は正常脾細胞に比して高い反応性が認められた。また、脾リンパ球を anti Thy1.2 と補体と反応させ、T細胞を除去しても Ab2 との反応性は認められた。しかし、T細胞回収カラムよりB細胞を除去するとほとんど反応しなくなることより、Ab2 と反応するB細胞の存在することが推測された。

## 考 察

抗イデオタイプ抗体 (Ab2) には、抗体 (Ab1) 分子に存在するオリジナル (original) 抗原の抗原決定基を認識するものがある。このような抗原とAb2は、それぞれある種の蛋白と免疫グロブリンというように機能や全体的な構造は異なっても部分的には同じ立体構造を有していると考えられる。つまり、Ab2はオリジナル抗原と相同性を有する内部イメージと称される構造を有し、機能的にオリジナル抗原に対する抗体産生 (Ab3) を誘導することが示唆されている。このような概念を Jerne はイデオタイプネットワークとして紹介した<sup>1)</sup>。この概念を腫瘍免疫に応用した場合、抗イデオタイプ抗体を癌抗原の代わりに特異的な免疫療法に用いることが可能である。しかも、以下の点で癌抗原そのものを用いるよりも優れている。1) 腫瘍細胞から癌抗原を単一かつ大量に精製することは困難であるが、抗イデオタイプ抗体では単クローン抗体の技法を用いて大量に得ることが可能である。2) 癌抗原をそのまま患者に投与することは発癌ウイルスを含有するなどの危険を伴うのに対し、抗イデオタイプ抗体では、その可能性が低い。3) 担癌患者においては、癌そのものにより、または、化学療法などにより免疫能は低下し癌抗原自体を投与しても免疫原性は弱いと考えられる。ところが、抗イデオタイプ抗体は異種蛋白である為に免疫原性は極めて高く、抗原としての投与量は少量でよく、また、癌抗原に耐性が生じている場合でも潜在性クローン (silent clone) を刺激して免疫反応を惹起しうる<sup>17)</sup>。

従来、抗イデオタイプ抗体の開発は、細菌やウイルスの成分抗原や腫瘍関連抗原に対して行われてきている<sup>23-25, 189-241</sup>。これらの報告でのオリジナル抗原は、LPS, B型肝炎ウイルス表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg), 高分子量メラノーマ関連抗原 (high-molecular-weight melanoma-associated antigen, HMW-MAA) や癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) など多くはポリペプチド成分である<sup>23(22) 241</sup>。近年ハイブリドマ法の確立により、細胞の分化や癌化に伴い構造が変化する糖鎖抗原に対しても単クローン抗体の作製が可能になり、種々の癌特異性の高い糖鎖抗原が腫瘍マーカーとして診断に用いられるようになった<sup>251</sup>。しかし、このような癌関連糖鎖抗原は癌特異性が高いにもかかわらず、免疫原性が弱いためか、癌免疫療法へはほとんど応用されていない。しかし、抗イデオタイプ抗体を応用すれば、免疫グロブリンを介する免疫応答による強力な抗腫瘍免疫を誘導しうる可能性も期待されうる。しかし、そのような検討はほとんどなされていない。今回作製した抗イデオタイプ抗体のオリジナル抗原は DU-PAN-2 抗原であり、その特異なエピトープはシアル化糖鎖であるといわれているが、その詳細な構造は確立されていない<sup>249(9)</sup>。これは胎児腸管に強く発現しているが、生後低下する。しかし、癌化により再び強く発現し、膵胆道癌を中心に腺癌で高率にみられることより、有力な腫瘍マーカーとして普及している<sup>25 11</sup>。このような抗原を抗イデオタイプ抗体を用いた癌の特異的免疫療法に応用するには、抗イデオタイプ抗体 (Ab2) が DU-PAN-2 抗原の内部イメージを有することが必須となる。今回、DU-PAN-2 抗体に対する抗イデオタイプ抗体を作製し、DU-PAN-2 抗原抗体反応阻止試験により3種のクローン (1-2-4-4, 1-2-4-6, 1-2-4-7) を選別した。この中より、図1に示したように、最も強い阻害活性を示した MoAb 1-2-4-4 を選択した。さらに、MoAb 1-2-4-4 は、図2で示したように DU-PAN-2 抗原と Ab1 との結合を容量依存的に阻害した。このことは、1-2-4-4 が Ab1 のパラトープ関連イデオトープと反応することを示しており、そのような抗イデオタイプ抗体 (Ab2) は元の抗原に対して相同性を示す内部イメージを有するものと考えられる。

次に、この Ab2 を同系マウスに免疫することにより、Ab3 を誘導しようと試み、同時にそれに伴う各種免疫応答を検討した。得られた MoAb1-2-4-4 でマウスを2週間隔で計4回免疫して得られた抗血清は Ab2 と容量依存的に反応するのみならず (図4)、DU-PAN-2 抗原と Ab1 との結合を容量依存的に阻害する活性を有していた (図5)。さらに、イムノプロット法にて、得られた抗血清 (Ab3) は Ab1 と同様に DU-PAN-2 抗原に対して反応性があることも示された。このように、血清中の Ab3 はオリジナル抗体 (Ab1) とイデオトープを共有し、類似の結合性を有しているものと考えられた。従って、この Ab3 は Koprowski<sup>250</sup> が言うところの Ab1-like Ab3 であると言えよう。また、逆に Ab2 はオリジナルな抗原に対して、内部イメージを有することを別の観点から証明したことになる。最近、抗 CEA MoAb MA208 を同系マウスに免疫して得られた抗イデオタイプ単クローン抗体 M7-625 において可変部領域をクローニングし1次構造を決定し、M7-625 の H 鎖可変領域の相補性決定領域 (complementarity determining region, CDR) 2 に CEA ドメイン III とのアミノ酸配列の相同性 (homology) を認めたとする Hinoda<sup>260</sup> の報告もみられる。この事は、抗イデオタイプ抗体の中には、オリジナルな抗原の内部イメージを持つものがあることを、より直接的に

示しており、今後このようなイデオトープ・マッピングでの証明も可能であろう。

Ab2 により誘導された Ab3 の免疫応答に関して、今回の検討では、ADCC 活性、CDC 活性とキラー細胞活性を測定した。図6に示すように Ab2 免疫抗血清 (Ab3) は、DU-PAN-2 抗原を発現している KATO III 細胞に対し、CDC 活性は認めなかったものの、正常血清に対して有意に高い ADCC 活性を示した。これは、誘導された Ab3 のサブクラスに依存すると思われ、今後検討されなければならないが、理論的には IgG1 までしか誘導されなかったものと推測される。また、キラー細胞活性の誘導はみられず、さらに表1に示すように Ab3 を誘導した際の脾より抽出した B 細胞は Ab2 と反応するが、T 細胞とは反応しなかった。このような結果は、抗イデオタイプ抗体 1-2-4-4 (Ab2) が B 細胞を刺激して腫瘍抗原に対する抗体産生を誘導しうるが、キラー細胞などの T 細胞系への刺激は十分ではなく、細胞性免疫の誘導ができなかったことを示唆している。

ところで、抗イデオタイプ抗体を用いた腫瘍の免疫療法は、受動免疫療法としてのターゲティング療法 (targeting therapy) と宿主の免疫調節を惹起する能動免疫療法とがある。前者は、腫瘍の細胞表面に発現している抗原に対する単クローン抗体を細胞表面に結合させた後に、補体や T 細胞、単球、マクロファージなどと共に、CDC や ADCC などの細胞障害メカニズムによる効果を期待するものである。このメカニズムを用いたものとしては、腫瘍細胞表面に特異なイデオトープを有する免疫グロブリンを発現している B 細胞リンパ腫患者に対する抗イデオタイプ抗体投与の報告がみられる<sup>260(2)</sup>。後者は、抗イデオタイプ抗体を投与することにより、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 細胞の誘導 (細胞性免疫) を惹起するなど、イデオタイプを介した免疫応答を利用しようとするものである。このメカニズムを用いたものには、消化器癌、悪性リンパ腫やメラノーマなどにおいて比較的多くの報告がみられる<sup>251(26) 330</sup>。液性免疫誘導では、Koprowski<sup>250</sup> は、大腸がん関連抗原 GA733 に対する単クローン抗体 17-1A (Ab1) を患者に投与した際、抗イデオタイプ抗体 (Ab2) が多く誘導される症例が予後良好であることを見だし、腫瘍免疫においてイデオタイプ・ネットワークの重要性を認識させる契機となった。彼らは Ab2 を投与した患者リンパ球を、試験管内 (in vitro) で Ab2 により刺激した後に培養すると、投与後3週間で培養上清中に Ab3 が増加し、さらにオリジナル抗原と反応する Ab3 (Ab1-like Ab3) が出現してくることを確認し、腫瘍細胞に特異的液性免疫を誘導しえたことと述べている。さらに彼らは、MoAb17-1A と同様に GA733 を認識する単クローン抗体 MAb GA733 に対して、Ab2 を開発し、それを用いて誘導した Ab3 に抗体依存性マクロファージ媒介性細胞障害 (antigen-dependent macrophage-mediated cytotoxicity, ADMC) 活性がみられることを報告している<sup>250</sup>。Pohl<sup>251</sup> は、Hodgkin リンパ腫にみられる腫瘍関連抗原 CD30 を認識する単クローン抗体 HRS-4 を用いて Ab2 を作製し、それを用いて Ab3 を誘導している。そして、単クローン性の Ab3 が CDC 活性を、多クローン性の Ab3 が ADCC 活性を有することを示している。また、メラノーマ患者にメラノーマ抗原 HMW-MAA に対する抗イデオタイプ抗体 MK2-23 を投与し、その大部分で Ab3 の産生を認め、完全寛解した患者もいたことを Ferrone<sup>241</sup> は報告している。細胞性免疫誘導に関しては、Robins<sup>189(30) 320</sup> は大腸がん関連抗原 gp72 を認識するマウ



ス単クローン抗体791T/36 (Ab1) をヒトに投与して誘導した抗イデオタイプ抗体105AD7 (Ab2) を大腸癌患者に免疫することにより遅延型過敏反応, T細胞の胚子発生 (blastogenesis) やインターロイキン2を誘導して, 生存を延長しえたことを示している。さらに, Fagerbergら<sup>39)</sup>は大腸癌患者において, 先述した単クローン抗体 17-1A を用いて別のAb2を開発し, それを用いてAb3と同時にAb2に特異的なT細胞を誘導し, インターフェロン $\gamma$ およびインターロイキン2分泌と遅延型過敏反応を惹起しえることを報告している。また, Foonら<sup>30)</sup>もT細胞リンパ腫において, T細胞リンパ腫に発現する糖蛋白 gp37 に対し Ab2 を作製し, Ab2 で免疫した患者血清中に, オリジナル抗原と特異的に反応する抗体と末梢血単核球増殖により液性および細胞性免疫の誘導を証明している。これらのオリジナル抗原のエピトープはいずれもペプチドであるので, 本研究で用いた糖鎖抗原であるDU-PAN-2 に比して強い免疫誘導を惹起させ, 種々の液性および細胞性免疫応答を誘導することが可能なであろう。

一方, 腫瘍関連の糖鎖抗原に対する抗イデオタイプ抗体の報告は非常に少なく, 先ず Diakunら<sup>37)</sup>が 3-O- $\alpha$ -L-フコピラノシル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド {3-O- $\alpha$ -L-fucopyranosyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, Fuc  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3)Gal} 抗原に対する抗体 (Ab1) に対して抗イデオタイプ抗体 (Ab2) を作製し, Ab2により誘導されたAb3がAb1と同様の反応性を有するという報告した。それに次いで, 腺癌関連糖鎖抗原 YH206<sup>38)</sup>, Lewis Y<sup>39)</sup>や sialyl Le<sup>x</sup><sup>40)</sup>などの血液型関連抗原に対する抗イデオタイプ抗体に関する報告がみられるのみである。これらの報告では Ab1-like Ab3 を誘導しえることを示しているが, その機序については検討されておらず, また, 明らかな免疫応答は誘導されていない。一般に, 糖鎖抗原はT細胞非依存性抗原であり, T細胞, その中でも腫瘍免疫に大きな役割を果たすヘルパーT細胞はこれらの抗原に対する免疫応答には関与しないと言われている。一方, B細胞のみによって産生される抗体も多くは IgM にとどまり, IgG が産生される場合もせいぜい IgG3 にとどまると考えられている<sup>29)</sup>。DU-PAN-2 抗原を認識する抗 DU-PAN-2 抗体 (Ab1) のサブクラスが IgM であり, 本研究に用いた抗イデオタイプ抗体 MoAb1-2-4-4 (Ab2) のサブクラスは IgG1 であった。これらのことより, 抗原に対する抗体 (Ab1) の段階では, B細胞が主に関与したが, 抗イデオタイプ抗体 (Ab2) 誘導の段階でT細胞が関係する細胞性免疫の関与があった可能性が考えられる。しかし, T細胞は誘導されたものの, 期待されたT細胞から産生されるサイトカインによる数多くのエフェクター細胞の活性化とそれに引き続いて起こる有効な抗腫瘍免疫応答は誘導できなかったのかもしれない。あるいは, 本研究では, 胸腺で分化した末梢, 脾臓に存在する細胞群についてしか検討しなかったが, 最近, 老化や癌化などを含む自己免疫反応に主に働くT細胞は肝臓で特異的に分化した自己反応性T細胞 (autoreactive T cell) であるという報告<sup>41,42)</sup>もあり, この様なT細胞の誘導されている可能性も考慮されよう。

## 結 論

抗 DU-PAN-2 単クローン抗体 (Ab1) を免疫原として, ハイブリドーマ法により単クローン性の抗イデオタイプ抗体 (Ab2) を作製した。さらに, 得られた Ab2 を同系マウスに免疫して抗・抗イデオタイプ抗体 (Ab3) を誘導し, それに伴う免疫応答の検討を行い, 以下のような結論を得た。

1. 得られた抗イデオタイプ抗体は, 免疫原であるDU-PAN-2 抗体の抗原結合部位と特異的に結合し, DU-PAN-2 抗原エピトープの一部と相同の構造を持つ抗体であると推定された。また, そのサブクラスはいずれもIgG1であった。

2. 1. で得られた単クローン性抗イデオタイプ抗体 (Ab2) を免疫原として誘導した抗・抗イデオタイプ抗体 (Ab3) は, DU-PAN-2 抗原と抗 DU-PAN-2 抗体 (Ab1) の結合を阻害する活性を有していた。また, イムノブロット法により, Ab3 は DU-PAN-2 抗原と特異的に反応した。これらのことより, 得られた Ab3 は, Ab1-like Ab3 であることが示唆された。

3. Ab2免疫抗血清 (Ab3) は, DU-PAN-2 抗原を発現しているKATO III細胞に対し, CDC活性とキラー細胞活性を示さなかったが, ADCC 活性を誘導した。

4. DU-PAN-2 抗原に対して抗イデオタイプ抗体を用いることにより ADCC 活性を有する Ab1-like Ab3 を誘導しえたことから, 抗イデオタイプ抗体を応用することにより, 免疫原性の弱い腫瘍関連糖鎖抗原に対してもイデオタイプ・ネットワークを介して, 宿主に抗原特異的な免疫応答が誘導され, 抗腫瘍効果をもたらす可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み, 御指導, 御校閲を賜りました恩師澤武紀雄教授に深甚なる謝意を捧げます。そして, 直接, 御指導下さった本研究所内科太田英樹博士に深く感謝致します。また, 御助言いただいた本研究所免疫生物部坂井俊之助教授および御協力いただいた本研究所内科山川治博士に感謝致します。さらに, 御協力頂いた教室員各位に厚く御礼を申し上げます。

なお本論文の要旨は, 第22回日本脾臓学会にて発表した。

## 文 献

- 1) Jerne NK. Towards a network theory of immune system. *Ann Immunol* 125 : 373-389, 1974
- 2) Kennedy RC, Eichberg JW, Lanford RE, Dreesman GR. Anti-idiotypic antibody vaccine for type B viral hepatitis in chimpanzees. *Science* 232 : 220-223, 1986
- 3) Schreiber JR, Patawaran M, Tosi M, Lennon J, Pier GB. Anti-idiotypic-induced, lipopolysaccharide-specific antibody response to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol* 144 : 1023-1029, 1990
- 4) Zaghouni H, Goldstein D, Shah H, Anderson S, Lacroix M, Dionne G, Kennedy R, Bona C. Induction of antibodies to the envelope protein of the human immunodeficiency virus by immunization with monoclonal anti-idiotypes. *Proc Acad Sci USA* 88 : 5645-5649, 1991
- 5) Metzgar RS, Gaillard MT, Levine SJ, Tuck FL, Bossen EH, Borowitz MJ. Antigens of human pancreatic adenocarcinoma cells defined by murine monoclonal antibodies. *Cancer Res* 42 : 601-608, 1982
- 6) Lan MS, Khorrami B, Metzgar RS. Molecular characterization of a mucin-type antigen associated with human pancreatic cancer. *J Biol Chem* 262 : 12863-12870, 1987
- 7) Borowitz MJ, Tuck FC, Sindelar WF, Fernsten PD, Metzgar RS. Monoclonal antibodies against human pancreatic adenocarcinoma : Distribution of DU-PAN-2 antigen on glandular epithelia and adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 72 : 999-1005,

1984

- 8) Satomura Y, Sawabu N, Takemori Y, Ohta H, Watanabe H, Okai T, Watanabe K, Matsuno H, Konishi H. Expression of various sialylated carbohydrate antigen in malignant and nonmalignant pancreatic tissues. *Pancreas* 6 : 448-458, 1991
- 9) Sawabu N, Toya D, Takemori Y, Hattori N, Fukui M. Measurement of a pancreatic cancer associated antigen (DU-PAN-2) detected by a monoclonal antibody in sera of patients with digestive cancers. *Int J Cancer* 37 : 693-696, 1986
- 10) 竹森康弘, 澤武紀雄, 里村吉威, 太田英樹, 渡辺弘之, 岡井高, 磨伊正義, 服部 信, 秋山高義, 橋本琢磨. 各種消化器癌における血清DU-PAN-2値の測定—酵素免疫測定法 (EIA) による検討—. *癌と化学療法* 14 : 119-126, 1987
- 11) 里村吉威, 太田英樹, 竹森康弘, 澤武紀雄, 南 修二, 北村徳治, 磨伊正義, 服部 信, 秋山高義, 渡辺駿七郎. 各種消化器癌における血清DU-PAN-2の免疫組織学的検討. *医学のあゆみ* 137 : 143-144, 1986
- 12) 山川治. 抗DU-PAN-2抗体に対する抗イデオタイプ抗体の開発とその血清学的癌診断法への応用. *十全医会誌* 101 : 454-468, 1992
- 13) Hirohashi S, Watanabe M, Shimosato Y, Sekine T. Monoclonal antibody reactive with sialyl-sugar residue of a high molecular weight glycoprotein in sera of cancer patients. *Gann* 75 : 485-488, 1984
- 14) Primi D, Cazenave PA. Monoclonal antibodies coupled to LPS specifically induce synthesis of immunoglobulins with complementary variable region determinants. *J Immunol* 129 : 1124-1129, 1982
- 15) Onoue K, Kishimoto T, Yamamura Y. Structure of human immunoglobulin M. II. Isolation of a high molecular weight Fc fragment of IgM composed of several Fc subunits. *J Immunol* 100 : 238-244, 1968
- 16) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 : 4350-4354, 1979
- 17) Bona CA, Heber-Katz E, Paul WE. Idiotype-anti-idiotype regulation. I. Immunization with a levan-binding myeloma protein leads to the appearance of auto-anti-(anti-idiotype) antibodies and to the activation of silent clones. *J Exp Med* 153 : 951-967, 1981
- 18) Adler KM, Carlson RW, Murray JL, Bendon L, Brewer H, Palomares D, Merritt J. Anti-idiotypic immunization in poor prognosis melanoma : sequential phase I trials. *Proc Amer Ass Cancer Res* 34 : 491, 1993
- 19) Denton GWL, Durrant LG, Hardcastle JD, Sewell HF, Robins RA. Clinical outcome of colorectal cancer patients treated with human monoclonal anti-idiotypic antibody. *Int J Cancer* 57 : 10-14, 1994
- 20) Brown SL, Miller RA, Horning SJ, Czerwinski D, Hart SM, McElderry R, Basham T, Warnke RA, Merigan TC, Levy R. Treatment of B cell lymphomas with anti-idiotype antibodies alone and in combination of alpha interferon. *Blood* 73 : 651-661, 1989
- 21) Herlyn D, Ross AH, Koprowski H. Anti-idiotypic antibodies bear the internal image of a human tumor antigen. *Science* 232 : 100-102, 1986
- 22) 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
- 23) Bhattacharya-Chatterjee M, Mukerjee S, Biddle W, Foon KA, Kohler H. Murine monoclonal anti-idiotype antibody as a potential network antigen for human carcinoembryonic antigen. *J Immunol* 145 : 2758-2765, 1990
- 24) Mittelman A, Chen ZJ, Kageshita T, Yang H, Yamada M, Baskind P, Goldberg N, Puccio C, Ahmed T, Arlin A, Ferrone S. Active specific immunotherapy in patients with melanoma; a clinical trial with mouse murine anti-idiotypic monoclonal antibodies elicited with syngeneic anti-high-molecular-weight-melanoma-associated antigen monoclonal antibodies. *J Clin Invest* 86 : 2136-2144, 1990
- 25) Kannagi R, Hakomori S. Monoclonal antibodies directed to carbohydrate antigens. In DM Weir, L Herzenberg (eds), *Handbook of Experimental Immunology Vol.4, Application of Immunological Methods in Biomedical Sciences*, p117.1-117.20, Blackwell, Boston, 1986
- 26) Hinoda Y, Tsujisaki M, Imai K, Yachi A. Internal image-bearing anti-idiotypic monoclonal antibodies. *Tumour-Biol* 16 : 48-55, 1995
- 27) Meeker TC, Lowder J, Maloney DG, Miller R, Thielemans K, Warnke R, Levy R. A clinical trial of anti-idiotype therapy for B cell malignancy. *Blood* 65 : 1349-1363, 1985
- 28) Koprowski H, Herlyn D, Lubeck M, DeFreitas E, Sears HF. Human anti-idiotype antibodies in cancer patients: Is the immune response beneficial for the patient? *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 216-219, 1984
- 29) Herlyn D, Wettendorff M, Schmoll E, Iliopoulos D, Schedel I, Dreikhausen U, Raab R, Ross AH, Jaksche H, Scriba M, Koprowski H. Anti-idiotype immunization of cancer patients : Modulation of the immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 8055-8059, 1987
- 30) Austin EB, Robins RA, Baldwin RW, Durrant LG. Induction of delayed hypersensitivity to human tumor cells with a human monoclonal anti-idiotype antibody. *J Natl Cancer Inst* 83 : 1245-1248, 1991
- 31) Robins RA, Denton GWL, Hardcastle JD, Austin EB, Baldwin RW, Durrant LG. Antitumor immune response and interleukin 2 production induced in colorectal cancer patients by immunization with human monoclonal anti-idiotypic antibody. *Cancer Res* 51 : 5425-5429, 1991
- 32) Durrant LG, Buckley TJD, Denton GWL, Hardcastle JD, Sewell HF, Robins RA. Enhanced cell-mediated tumor killing in patients immunized with human monoclonal anti-idiotypic antibody 105AD7. *Cancer Res* 54 : 4837-4840, 1994
- 33) Nepom GT, Nelson KA, Holbeck SL, Hellstrom I, Hellstrom KE. Introduction of immunity to a human tumor

marker by in vivo administration of anti-idiotypic antibodies in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 2864-2867, 1984

34) Pohl C, Renner C, Schwonzen M, Schobert I, Liebenberg V, Jung W, Wolf J, Pfreundschuh M, Diehl V. CD30-specific AB1-AB2-AB3 internal image antibody network; potential use as anti-idiotypic vaccine against Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 54 : 418-425, 1993

35) Fagerberg J, Steinitz M, Wigzell H, Askelof P, Mellstedt H. Human anti-idiotypic antibodies induced a humoral and cellular immune response against a colorectal carcinoma-associated antigen in patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 4773-4777, 1995

36) Foon KA, Oseroff AR, Vaickus L, Greenberg SJ, Russell D, Bernstein Z, Pincus S, Kohler H, Seon BK, Tahaoglu E, Beers T, Chakraborty M, Bhattacharya-Chatterjee M. Immune responses in patients with T-cell lymphoma treated with an anti-idiotypic antibody mimicking a high restricted T-cell antigen. *Clin Cancer Res* 1 : 1285-1294, 1995

37) Diakun KR, Matta KL. Synthetic antigens as immunogens: Part III. Specificity of an anti-anti-idiotypic antibody to a carbohydrate tumor-associated antigen. *J Immunol* 142 : 2037-2040, 1989

38) Sugiyama T, Imai K, Ono A, Takayama Y, Tujisaki M, Taki T, Hinoda Y, Yachi A. Conformational structure of a monoclonal anti-adenocarcinoma-associated carbohydrate antibody YH206. *J Immunol* 146 : 3097-3101, 1991

39) Hirashima K, Zenita K, Takada A, Kitahara A, Ishihara G, Harada R, Ohmori K, Hirohashi S, Kyoizumi S, Akiyama M, Kannagi R. High idiotypic connectivity of the VH7183-encoded antibodies directed to a murine embryonic carbohydrate antigen, Lewis Y, as ascertained by syngenic anti-idiotypic monoclonal antibodies. *J Immunol* 145 : 224-232, 1990

40) Furuya A, Yoshida H, Hanai N. Development of anti-idiotypic monoclonal antibodies for sialyl Le<sup>a</sup> antigen. *Anticancer Res* 12 : 27-32, 1992

41) Okuyama R, Abo T, Seki S, Ohteki T, Sugiura K, Kusumi A, Kumagai K. Estrogen administration activates extrathymic T cell differentiation in the liver. *J Exp Med* 175 : 661-669, 1992

42) Ohteki T, Okuyama R, Seki S, Abo T, Sugiura K, Kusumi A, Ohmori T, Watanabe H, Kumagai K. Age-dependent increase of extrathymic T cells in the liver and their appearance in the periphery of older mice. *J Immunol* 149 : 1562-1570, 1992

**Antibody Production against Cancer-associated Carbohydrate Antigen (DU-PAN-2) Induced by Monoclonal Anti-idiotypic Antibody and Immune Response of the Induced Antibody** Hiroyasu Kawakami, Department of Internal Medicine, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, 106, 53—62 (1997)

**Key words** DU-PAN-2, monoclonal antibody, anti-idiotypic antibody, tumor immunity, carbohydrate antigen

#### Abstract

The DU-PAN-2 antigen (Ag) is a cancer-associated carbohydrate Ag defined by the mouse monoclonal antibody DU-PAN-2(Ab1), and is found on various adenocarcinomas. In this study, we prepared and characterized a syngeneic murine monoclonal anti-idiotypic (Id) antibody MoAb 1-2-4-4 (Ab2) belonging to the IgG1 class to evaluate the immune response against DU-PAN-2 Ag induced by Ab2. Ab2 bound to DU-PAN-2 (Ab1) in a dose-dependent fashion, and specifically inhibited the binding of Ab1 to DU-PAN-2 Ag. Ab2 was thought to recognize a paratope-related idiotope carried by Ab1. Next, anti-anti Id antibodies (Ab3) were generated by the immunization of syngenic mice with Ab2. The antiserum from mice (Ab3) had an inhibitory activity against the binding of Ab1 to DU-PAN-2 Ag and immunoprecipitated the purified DU-PAN-2 Ag as well as Ab1 by Western blotting analysis. These results indicate that Ab3 shares idiotopes with Ab1. Furthermore, the antiserum (Ab3) showed antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) against <sup>51</sup>Cr-labeled KATO III cells as determined by <sup>51</sup>Cr-release assay, though it had no complement dependent cytotoxicity or killer cell activity. These findings indicate that MoAb 1-2-4-4 (Ab2) carries the internal image of the original Ag (DU-PAN-2 Ag), and can induce Ab1-like Ab3 bearing ADCC activity. The results of this study suggest that antitumor immunity, even against a cancer-associated carbohydrate antigen considered to be a weak immunogen, can be induced with use of anti-Id antibody through an idiotypic network system.