

サイトカイン融合腫瘍特異的モノクローナル抗体を用いた新しい腫瘍ターゲティング療法の開発に関する基礎的研究

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	http://hdl.handle.net/2297/9167

サイトカイン融合腫瘍特異的モノクローナル抗体を用いた新しい腫瘍ターゲティング療法の開発に関する基礎的研究

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

織 本 健 司

腫瘍関連抗原としての多剤耐性遺伝子産物 P 糖蛋白に対するマウスモノクローナル抗体 MRK16 は、マウスを用いた動物実験で、単独投与により P 糖蛋白強発現ヒト卵巣癌細胞株 2780^{AD} の生体内での腫瘍増殖を抑制することが知られている。本研究ではターゲティングに用いた抗腫瘍モノクローナル抗体が腫瘍局所でエフェクター細胞を効率よく活性化でき、抗腫瘍免疫効果をさらに増強させることを目的として、ヒト免疫グロブリン IgG₁ の可変領域を MRK16 の可変領域で置換したマウス-ヒトキメラ抗体と、サイトカイン分子のインターロイキン-2 (interleukin-2, IL-2)、インターロイキン-4 (interleukin-4)、顆粒球-マクローファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) を遺伝子工学的手法で結合させ、3種類の新しいサイトカイン融合抗体を作成した。これらの融合蛋白はいずれも抗体としての特異的抗原結合能を維持し、かつ、サイトカイン分子としての活性も保持していた。IL-2, IL-4 融合抗体は組換え体 IL-2 と比較して比活性が減弱していたが、GM-CSF 融合抗体は組換え体 GM-CSF と同等の比活性を維持していた。比活性の減弱は抗体分子との結合に伴う、サイトカイン分子の高次構造の変化による可能性が示唆された。試験管内での抗腫瘍活性を調べた結果、3種類のサイトカイン融合キメラ抗体はいずれも抗体依存性細胞傷害性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 活性を保持しており、作動細胞/標的細胞比 (effector/target ratio, E/T 比) 依存性に細胞傷害活性の増強効果を示した。IL-2 および、GM-CSF 融合抗体は対照としたサイトカインを結合していないキメラ抗体と比較して傷害活性の増強効果を認めたが、IL-4 融合抗体の細胞傷害活性は対照キメラ抗体と比較して有意な差を認めなかった。生体内での腫瘍移植実験で、3種類のサイトカイン融合キメラ抗体はいずれも対照群と比較して腫瘍増殖抑制効果を示したが、その増殖抑制効果はサイトカインを結合していないキメラ抗体投与群と比較して有意な差は認められなかった。この試験管内と生体内での抗腫瘍活性の差異は全身投与にともなう末梢組織でのサイトカイン受容体への吸着、分子量増加にともなう組織移行性の低下などの影響が示唆された。投与経路などを工夫することにより、サイトカイン融合-抗腫瘍モノクローナル抗体は腫瘍免疫療法において抗腫瘍エフェクター細胞の有力なターゲティングの手段となることが期待される。

Key words cytokine, monoclonal antibody, fusion protein, multidrug resistance, immunotherapy

近年分子生物学的手法や免疫学的手法により多くの腫瘍特異的抗原が同定されており^{1)~7)}、エフェクター細胞の標的となりうるものがわかってきた。腫瘍抗原特異的モノクローナル抗体が得られれば、それを用いて抗体依存性細胞傷害性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 作用を介した抗腫瘍エフェクター細胞のターゲティングが可能である^{8)~12)}。

最近、腫瘍免疫の誘導および活性化に重要なサイトカイン分子の機能が解明されている。インターロイキン-2 (interleukin-2, IL-2)、インターロイキン-4 (interleukin-4, IL-4)、顆粒球-マクローファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) などのサイトカイン分子はナチュラルキラー細胞、マクローファージ、好酸球などの ADCC 活性を有するエフェクター細胞を活性化し抗腫瘍効果を増強することが報告されている^{13)~21)}。さらに、特異的抗腫瘍抗体と GM-CSF, IL-2 などのサイトカインを同時投与することにより抗体単独投与の場合より抗腫瘍効果が増強されることな

どから、抗腫瘍抗体とサイトカインは腫瘍局所で協調的に働き抗腫瘍効果を増強していることが示唆されている^{22)~24)}。以上の知見より、腫瘍特異的モノクローナル抗体とサイトカイン分子を結合させることにより、腫瘍局所で抗腫瘍エフェクター細胞を効果的に活性化し、腫瘍免疫効果を増強できる可能性が考えられた。

そこで、腫瘍特異的抗原をターゲットとした免疫療法の治療実験モデルの作成が必要であると考えた。現在、数多くの腫瘍特異的および腫瘍関連抗原が同定されているが、その機能および性状について解明されているものは以外に少なく、特異的腫瘍免疫療法のモデルとなりうる適切なターゲットは極めて少ない。

多剤耐性遺伝子産物 P 糖蛋白は分子量 170-180kDa の膜蛋白で、種々の細胞傷害性物質を細胞外へ能動的に排泄するトランスポーターとして機能している²⁵⁾²⁶⁾。種々の多剤耐性腫瘍ほか、化学療法後に新たに多剤耐性を獲得した腫瘍でも P-糖蛋

平成7年8月25日受付, 平成7年10月17日受理

Abbreviations: ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity; BSA, bovine serum albumin; DMEM, Dulbecco modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, HRP, horse radish peroxidase; IL-2, interleukin-2; IL-4,

白の発現が増強していることが知られている^{27)~29)}。また、多剤耐性遺伝子の発現が c-Ha-Ras や変異型 p53 遺伝子産物により増強することも報告されており³⁰⁾、P 糖蛋白は腫瘍の悪性化にも関与する腫瘍関連抗原と考えられる。多剤耐性遺伝子産物 P 糖蛋白に対するマウスモノクローナル抗体がいくつか作製されている。そのうちの一つである MRK16 は P 糖蛋白の細胞表面のエピトープを認識するモノクローナル抗体で、生体内でも P 糖蛋白発現細胞を認識できる唯一の抗体である²⁹⁾。すでに MRK16 は単独投与により P 糖蛋白強発現ヒト卵巣癌細胞株 2780^{AD} のヌードマウスでの腫瘍増殖を抑制することが報告されている³¹⁾。また、ヒトへの臨床応用を目的としてマウス-ヒトキメラ抗体が作製されている。以上より、多剤耐性遺伝子産物 P 糖蛋白は腫瘍関連抗原を標的とした特異的腫瘍免疫療法の適切な実験モデルになりうると考えられた。

本研究では、ヒト免疫グロブリン IgG₁ の可変領域を MRK16 の可変領域で置換したマウス-ヒトキメラ抗体と IL-2, IL-4, GM-CSF などのサイトカイン分子を遺伝子工学的手法を用いて結合させ、三種類のサイトカイン融合抗体を作成した。さらに、これらの作成した三種のサイトカイン融合抗体をターゲティングに用い、腫瘍局所でエフェクター細胞を効率よく活性化できるかどうか、抗腫瘍免疫効果を増強させうるかどうかを試験管内および生体内で検討したので報告する。

材料および方法

1. 使用細胞

1. マウス形質細胞由来 SP2/0-Ag14 (ATCC CRL 8287) 細胞は融合抗体産生のために用い、10%牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (ICN. FLOW, 大日本製薬, 東京) 添加 RPMI 1640 培地 (日本, 東京) で 5% CO₂, 37°C にて培養した。

2. ヒト卵巣癌細胞株 2780^{AD} 細胞は多剤耐性癌細胞で P 糖蛋白を強発現している。FACS 解析のコントロール細胞およびヌードマウスへの移植実験に使用した。10% FBS 添加 RPMI-1640 培地で 5% CO₂, 37°C にて培養した。(財) 癌研究会癌化学療法センター分子生物治療研究部濱田洋文博士より供与された。

3. ヒト多剤耐性遺伝子 (human multidrug-resistant gene, mdr-1) 導入マウス B16F10メラノーマ細胞株 B16F10mdr は ADCC アッセイの標的細胞に使用した。10% FBS 添加ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco modified Eagle's medium, DMEM) (日本) にて 5% CO₂, 37°C で培養した。(財) 癌研究会癌化学療法センター基礎研究部杉本芳一博士から供与された。

4. マウス T 細胞株 CTLL-2 (ATCC TIB 214) 細胞は IL-2 および IL-4 の生物学的活性測定用に使用した。10% FBS 添加 RPMI-1640 培地に組換え体インターロイキン-2 (recombinant-interleukin-2, rIL-2) (塩野義製薬, 東京) を 50U/ml の濃度になるように加え、5% CO₂, 37°C で培養した。

5. マウス血管内皮細胞株 Endo-1 は GM-CSF の生物学的活性測定用に使用した。10% FBS 添加 DMEM (日本) にて 5% CO₂, 37°C で培養した。(財) 癌研究会癌化学療法センター分子生物治療研究部濱田洋文博士より供与された。

II. プラスミドの構築

1. サイトカイン融合重鎖発現プラスミドの構築

GM-CSF 融合重鎖発現プラスミドの構築手順を (図 1) に示す。なお、制限酵素は全て New England Biolabs 社 (Beverly, MA, U.S.A.) のものを使用した。

1) ベクタープラスミド pUC13 [(財) 癌研究会癌化学療法センター分子生物治療研究部濱田洋文博士より供与された] は制限酵素 EcoRI および SalI で切断後、ベクター相互の再結合を防ぐためにウシ小腸アルカリフォスファターゼ (calf intestine alkaline phosphatase, CIAP) (ペーリンガー・マンハイム, 東京) を用いて緩衝液中にて 37°C 30分処理し断端を脱リン酸化後、0.8%アガロースゲルにて泳動し、約 3,200塩基対 (base pair, bp) 相当の DNA 断片をグラスビーズ法にて抽出した。

2) ヒト免疫グロブリン IgG₁ 定常領域ゲノム DNA 挿入プラスミド pSV2-HG₁gpt [(財) 癌研究会癌化学療法センター分子生物治療研究部濱田洋文博士より供与された] を制限酵素 EcoRI および NsiI で切断し、0.8%アガロースゲルにて泳動後、約 1770bp 相当の DNA 断片をグラスビーズ法にて抽出し、免疫グロブリン定常領域 DNA 断片 (CH₁-CH₃ 5'fragment) を得た。

3) 上述の pSV2-HG₁gpt を鋳型として 2組のオリゴヌクレオチドプライマー対 (oligo#621, 5'-ACG CCT CCC GTG CTG GAC T-3'; oligo#622, 5'-CGC CTA GGT GGC GGT GGA AAT GGG CCT CTG TCC CTC TC-3') を用いて PCR で DNA 断片を増幅し、制限酵素 NsiI および BamHI にて切断し、4%アガロースゲルにて泳動後、77bp相当の DNA 断片をグラスビーズ法にて抽出し、CH₃ 3'DNA 断片 (CH₃ 3'fragment) を得た。

4) プラスミド pGEMneo [(財) 癌研究会癌化学療法センター分子生物治療研究部濱田洋文博士より供与された] を制限酵素 BamHI と SalI で切断し、3%アガロースゲルで泳動後、DNA 断片をグラスビーズ法で抽出し、480bp 相当の長さのポリアデニル化シグナル (polyadenylation signal) DNA 断片 (poly A fragment) を得た。

5) マウス GM-CSF cDNA 挿入プラスミド pU8-mGM-CSF [(財) 癌研究会癌化学療法センター分子生物治療研究部濱田洋文博士より供与された] を鋳型としてオリゴヌクレオチドプライマー対 (oligo#623, 5'-GC GGA TCC GGC GGT GGT GGA AGT GGT GGA GGA GGT TCG GTA CCC ACC CGC TCA CCC ATC AC-3'; oligo# 478, 5'-CC GGA TCC TCA TTT TTG GCT TGG TTT TTT GCA TTC AAA GGG G-3') にて PCR 法で DNA 断片を増幅し、制限酵素 BamHI で切断後、3%アガロースゲルで泳動し、417bp 相当の DNA 断片をグラスビーズ法で抽出し、リンカー-mGM-CSF DNA 断片 (linker-mGM-CSF fragment) を得た。前述のベクター DNA (pUC13) 断片に、これら 4種類の DNA 断片 (CH₁-CH₃5'fragment, CH₃3'fragment, linker-mGM-CSF fragment, poly A fragment) をライゲーションキット (宝酒造, 東京) を使用して 2段階で挿入した (プラスミド pUHG₁-mGM-CSF)。

6) ヒト P 糖蛋白に対するヒト-マウスキメラ抗体 MH16 の重鎖挿入プラスミド pBSV_{MH6} [(財) 癌研究会癌化学療法セン

interleukin-4; LAK, lymphokine activated killer; MOPS, 3-[N-molpholinom] propanesulfonic acid; PBS, phosphate-buffered saline; PGK, phosphoglycerate kinase; Poly A, Polyadenylation signal; RT-PCR, reversetranscription-polymerase chain reaction; TE, Tris EDTA

ター分子生物治療研究部濱田洋文博士より供与された]を制限酵素 EcoRI で切断し、0.8%アガロースゲルで泳動後、約2400塩基対の長さの重鎖 DNA 断片をグラスビーズ法で抽出し、pUCHG₁-mGM-CSF の EcoRI 部位へ挿入してマウス GM-CSF 融合重鎖発現プラスミドを構築した(プラスミド pUHG₁-mGM-CSF-V_{H16}).

マウス IL-2, および IL-4 融合抗体重鎖発現プラスミドを作成する為にマウス IL-2cDNA 挿入プラスミド pU8-mIL-2, マウス IL-4cDNA 挿入プラスミド pU8-mIL-4 [ともに(財)癌研究会癌化学療法センター分子生物治療研究部濱田洋文博士より供与された]を鋳型としてオリゴヌクレチオドプライマー対 (oligo #631, 5'-GGG GTA CCC ACT TCA AGC TCC ACT-3'; oligo#480, 5'-GGG GAT CCT TAT TGA GGG CTT GTT GAG ATG ATG CTT TGA CAG-3'), オリゴヌクレチオドプライマー対 (oligo#633, 5'-GGG GTA CCC GGA TGC GAC AAA AAT C-3'; oligo#490, 5'-CCG GAT CCT ACG AGT AAT CCA TTT GCA TGA TGC TCT TTA GGC-3') にて各々 PCR 法で DNA 断片を増幅後、制限酵素 KpnI と BamHI で切断し、3%アガロースゲルで泳動後、各々 422bp

および 441bp の長さの DNA 断片をグラスビーズ法で単離した。さらに、プラスミド pUHG₁-mGM-CSF を制限酵素 KpnI と SalI で切断し、mGM-CSFcDNA 断片および polyA 断片を除いた約8.2キロ bp の DNA 断片を単離した。この断片と、上述の 422bp または 441bp 断片、および前述の polyA 断片 (BamHI-SalI fragment) の3つの DNA 断片をリガーゼで連結し、pUHG₁-mIL-2, pUHG₁-mIL-4 を再構築した。同様にして pUHG₁-mIL-2-V_{H16}, pUHG₁-mIL-4-V_{H16} も構築した。

2. 軽鎖発現ベクタープラスミドの構築

ヒト P 糖蛋白に対するマウス-ヒトキメラ抗体軽鎖発現プラスミド pSV2H_{κneo}18 は(財)癌研究会癌化学療法センター分子生物治療研究部濱田洋文博士より供与された。選択マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子 (neomycin-resistant gene, neo) が組込まれている (図 2-A).

III. プラスミドの大量調整

上記のようにして得られたサイトカイン融合重鎖発現プラスミドおよび軽鎖発現プラスミドで形質転換した大腸菌 MC1061 株を LB 培地 [トリプトン (Difco laboratory, Detroit, U.S.A.) 10g/l, 酵母エキス (Difco laboratory) 5g/l, NaCl 5g/l]

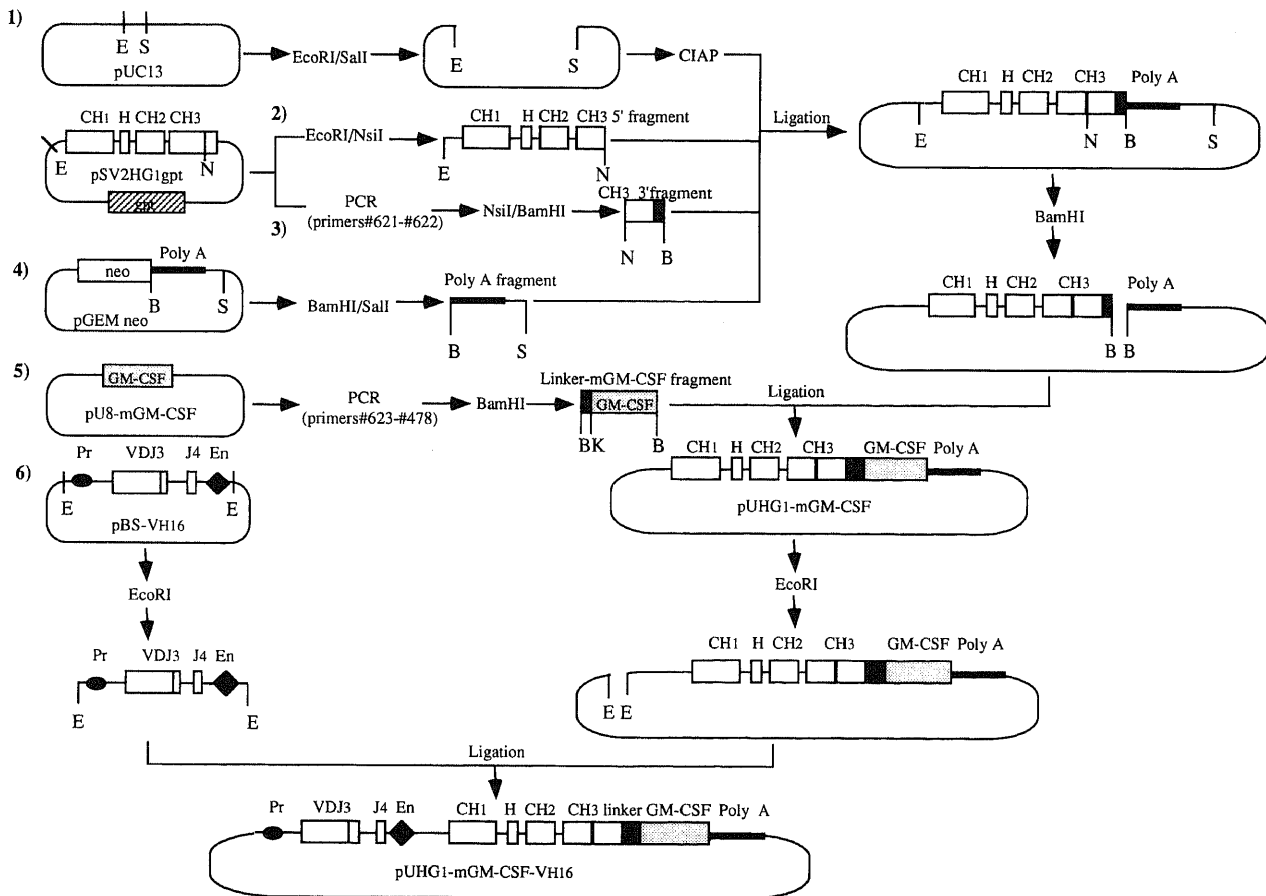


Fig. 1. Schematic representation of the strategy for construction of the cytokine-fused heavy chain expression plasmids. Exons are shown by boxes, and transcriptional regulatory elements by filled ovals. Pr, En and Poly A are the murine heavy chain promoter, the enhancer and polyadenylation signal of human phosphoglycerate kinase gene, respectively. Unless otherwise indicated, all genes and regulatory sequences are of murine origin except for the CH and H regions. CH and H regions. CH and H represent the human IgG1 constant region and the hinge region, respectively. The numbers 1)-6) correspond to those described in the text (Materials and Methods). Cleavage sites of restriction enzymes are indicated; B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; K, Kpn I; N, Nsi I; S, Sal I. CIAP represents the treatment to remove 5'-terminal phosphate residues by digestion with calf intestine alkaline phosphatase. Vectors and DNA fragments are not drawn to scale.

11にて37℃に12時間振盪培養した。培養終了後8,000rpm, 10分遠心により集菌した。菌体を20mlの溶液I [50mM グルコース, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0)] に緩やかに懸濁後5分室温に静置し, 40mlの溶液II [0.2N NaOH, 1%SDS] を加え緩やかに攪拌し10分間水中に静置した後, 30mlの溶液III (3M 酢酸カリウム, 5M 氷酢酸) を加え攪拌し, 再度10分間水中に静置した。10,000rpm, 20分遠心し, 上清を濾過したのち, 0.6倍量のイソプロパノールを加え15分間室温にて静置した。12,000rpm, 30分遠心し, 沈殿を80%エタノールにて洗浄, 乾燥後8mlのTrisEDTA (TE) (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0) に溶解し, 8.8gの塩化セシウム (GIBCO BRL, Gaithersburg, U.S.A.), 8mlの臭化エチジウム溶液 (10mg/ml) を加え, 3,000rpm, 10分遠心後, 上清をクイックシールチューブ (quickseal tube) (ベックマンジャパン, 東京) に密封注入した。ベックマンVTi65 垂直ローター (ベックマンジャパン) にて20℃, 60,000rpm, 14時間超遠心し, プラスミドのバンドを注射器で回収し, ブタノール抽出後, TE に対して一晚透析し 1mg/ml の濃度に調整した。

IV. サイトカイン融合モノクローナル抗体産生ミエローマの作成

1. 遺伝子導入

遺伝子導入はエレクトロポレーション法によった。SP2-0/Ag14 細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) で2回洗浄し, エレクトロポレーションバッファー [10mM MOPS (和光, 東京), 血清無添加 RPMI-1640 培

地] に浮遊させ 1×10^7 個/ml の濃度に調整し細胞浮遊液を作製した。制限酵素 SalI で切断し直線化した 20 μ g のサイトカイン融合重鎖発現プラスミドと, 制限酵素 BamHI で切断し直線化した 1 μ g の軽鎖発現プラスミドを 500 μ l (5×10^6 個) の細胞浮遊液とともに 0.4cm 幅キュベット (Bio-Rad, 東京) に注入し, 5分間水上に静置したのち, Gene Pulser (Bio-Rad) を用いて 250V/960 μ F の設定条件にて1回パルスを加えることによりトランスフェクションを行った。パルスを加えた直後キュベットを10分間水上に静置した後, 細胞液を 10ml の 10%FBS 添加 RPMI1640 培地に加え, 懸濁後, 96穴マルチプルウェルプレート (Falcon, Oxnard, U.S.A.) 上へ 100 μ l ずつ播種し, 5%CO₂, 37℃にて培養した。エレクトロポレーション後48時間非選択培地で培養したのち, 各穴毎に 1600 μ g/ml のジェネティシン (Gibco BRL, Gaithersburg, U.S.A.) を含む血清含有培地を 100 μ l 加え (最終濃度 800 μ g/ml), さらに10-14日間, 5%CO₂, 37℃にて培養した。

2. ELISA 法によるスクリーニングおよび抗体産生細胞の樹立

20 μ g/ml のプロテイン A (Sigma, St. Louis, Mo. U.S.A.) を 96穴マイクロプレート (Falcon) の各ウェルに 50 μ l ずつ分注し, 14時間4℃で静置後内容を回収し, PBS で2回洗浄後, 200 μ l のブロッキング溶液 [1%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Boehringer Mannheim, Kuhl Lagen, Germany), 0.02%アジ化ナトリウム (sodium azide, NaN₃) 含有 PBS] を各穴毎に分注し室温に30分間静置したのち内容を捨

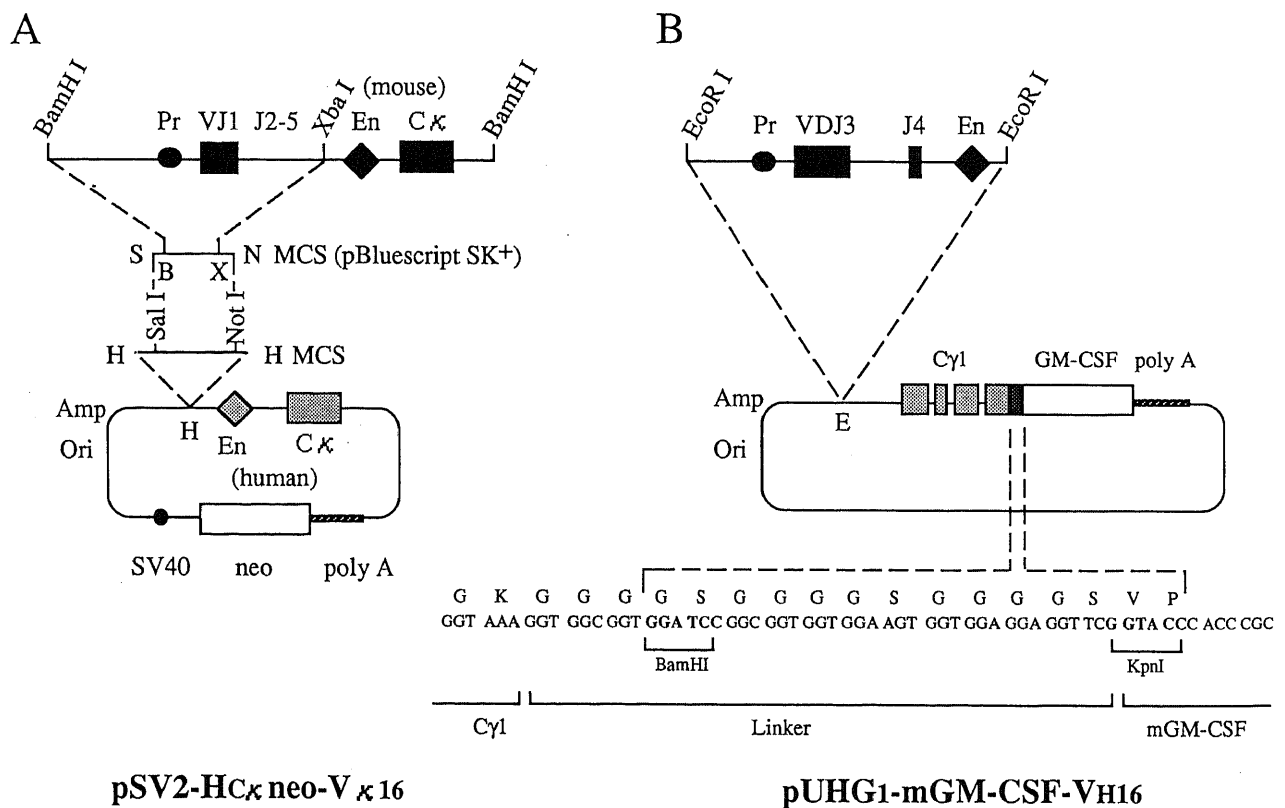


Fig. 2. Construction of plasmids pSV2-HC κ neo-V κ 16 and pUCHG1-mGM-CSF VH16. Ori, pBR322 replication origin; Amp, β -lactamase gene; SV40, SV40 promoter; MCS, multiple cloning site; hu PGK, human phosphoglycerate kinase; G4S, Glycine-Glycine-Glycine-Glycine-Serine. Restriction enzymes; N, Not I; X, Xba I. For other signs, see the legend of Fig. 1.

て、ELISA アッセイプレートを作成した。ミエローマ細胞培養プレートの各ウエルから培養上清を 100 μ l ずつ採取し、ELISA アッセイ用プレートへ分注した。プレートを 37 $^{\circ}$ C にて 30 分静置後内容を捨て、200 μ l の PBS にて 3 回洗浄し、50 μ l の西洋ワサビペルオキシダーゼ (horse radish peroxidase, HRP) 標識抗マウス免疫グロブリン抗体 (Cappel, Durham, NC, U.S.A.) を分注し、プレートを 37 $^{\circ}$ C にて 30 分静置後内容を捨て、200 μ l の PBS にて 3 回洗浄し乾燥させた。50 μ l のペルオキシダーゼ-基質溶液 [0.1M クエン酸, 0.2M リン酸 2 ナトリウム, 0.04% オルソ-フェニレンジアミン (o-phenylenediamine, OPD) (Sigma, Oxnard, California, U.S.A.), 0.0032% H₂O₂] を加えて発色させ、Microplate Titer (Bio-Rad) を用いて 490nm の波長の吸光度を測定し抗体産生細胞を選別した。選別された細胞群を限界希釈法を繰り返して行い細胞をクローン化し、安定したサイトカイン融合抗体産生クローンを樹立した。

V. サイトカイン融合抗体の精製

抗体産生ミエローマは無血清培地 [5 μ g/ml ヒトインスリン (Sigma), 5 μ g/ml ヒトトランスフェリン (Sigma), 2 $\times 10^{-5}$ M エタノールアミン, 2 $\times 10^{-5}$ M メルカプトエタノール, 1mg/ml BSA 含有血清無添加 RPMI-1640] で 7-10 日間培養し、培養上清を 6,000rpm, 10 分遠心し上清を集め、培養上清 II につき 313g の硫酸アンモニウム (ナカライ, 東京) (50%飽和度) を加え緩やかに室温で 30 分間攪拌し、懸濁液を 8,000rpm, 30 分遠心したのち、沈殿を 10ml の PBS に溶解し、PBS に対して 4 $^{\circ}$ C で一晚透析した。透析チューブより 15ml の遠心管 (Falcon) に溶液を移し、3,000rpm, 10 分間遠心し、上清を 5ml のアフィゲルプロテイン A カラム (Bio-Rad) に吸着、平衡後、溶出バッファー [0.1M NaCl, 0.1M グリシン (Gibco BRL) 含有 PBS, pH3.0] で溶出した。溶出液を直ちに中和バッファー (1M Tris 含有 PBS, pH8.8) にて中和し、ウシ血清ガンマグロブリン (Standard I, Bio-Rad) をコントロールとして Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用いて標準曲線を作製し、融合抗体の蛋白濃度を測定した。ピーク分画を含む溶出液約 3ml を PBS に対して 4 $^{\circ}$ C で一晚透析後、サイトカイン融合抗体濃度を 1mg/ml に調整した。

VI. サイトカイン融合抗体の SDS-PAGE 解析

サイトカイン融合抗体 (MH16-mGM-CSF, MH16-mIL-2, MH16-mIL-4) およびコントロール抗体 (MH16) 各 2 μ l (2 μ g) に 3 μ l の PBS と 5 μ l の 2 \times SDS 泳動バッファー (50mM Tris-Cl pH6.8, 100mM ジチオテリオール, 1% SDS, 0.1% ブロモフェノールブルー, 10% グリセロール, 2% 2-メルカプトエタノール) を加え 5 分間煮沸後急冷し、10% SDS ポリアクリルアミドゲル (polyacrylamide gel) 電気泳動を行った (定電流 60mA)。泳動後ゲルを染色液 [0.1% クマジーブリリアントブルー (Gibco BRL), 50% メタノール, 10% 氷酢酸] に浸し緩やかに振とうしながら 1 時間染色した後、脱色液 (30% メタノール, 10% 氷酢酸) に浸し一晚緩やかに脱色した。

VII. フローサイトメトリーによるサイトカイン融合抗体の抗原結合能の解析

P 糖蛋白強発現ヒト卵巣癌細胞株 2780^{AD} を PBS にて 2 回洗浄後、細胞を 4 $^{\circ}$ C に冷却した染色緩衝液 (2% FBS 添加 PBS) に浮遊させ、2 $\times 10^7$ 個/ml に調整した。1.5ml エッペンドルフチューブに 50 μ l の細胞浮遊液と 20 μ l のサイトカイン融合抗体希釈液 (50 μ g/ml), 抗 P 糖蛋白マウス-ヒトキメラ抗体

(MH16) 希釈液 (50 μ g/ml) およびコントロール抗体 [抗 IL-2 受容体抗体 (癌研究会癌化学療法センター分子生物治療研究部濱田洋文博士より供与された)] (50 μ g/ml) を加え、水中で 60 分静置したのち、3,000rpm, 2 分遠心し、沈殿を染色緩衝液にて 2 回洗浄後細胞を 50 μ l の染色緩衝液に浮遊させ、フルオレスセイン・イソチオシアン酸 (fluorescein sothiocyanate, FITC) 標識抗マウス免疫グロブリン抗体 (Cappel) を 20 μ l 加え水中で 20 分静置後 1ml の染色緩衝液にて 2 回洗浄し、細胞を 1ml の染色緩衝液に浮遊させ、FACScan (Becton Dickinson) の Lysis II プロトコールを用いて解析した。

VIII. サイトカイン融合抗体の生理活性の測定

1. IL-2 および IL-4 バイオアッセイ

IL-2 および IL-4 融合抗体の生物活性はマウス CTLL-2 細胞を使った T 細胞増殖アッセイを用いて解析した。CTLL-2 細胞は 48 時間 IL-2 を枯渇した状態で培養したのち、1 $\times 10^4$ 個の細胞を 200 μ l の培地に浮遊させ、96 穴丸底マルチウエルプレート (Falcon) に播種し、種々の濃度のサイトカイン融合抗体および組換え体 IL-2 を加え培養した。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ で 20 時間培養したのち各穴毎に 1 μ Ci の [メチル-³H] チミジン (Amersham, Greenwich, CT, U.S.A.) を加え 4 時間培養したのちセルハーベスター (SKATRON INSTRUMENTS, Sterling, VA, U.S.A.) を用いて細胞をグラスファイバーペーパー (SKATRON INSTRUMENTS) に吸着させ、放射活性を液体シンチレーションカウンター (ベックマンジャパン) を用いて測定した。

2. GM-CSF バイオアッセイ

GM-CSF 融合抗体の生物活性はマウス血管内皮細胞株 Endo-1 増殖アッセイを用いて解析した。1 $\times 10^4$ 個の Endo-1 細胞を 200 μ l の無血清 DMEM 培地に浮遊させ 96 穴丸底マルチウエルプレート (Falcon) に播種し、種々の濃度のサイトカイン融合抗体および組換え体 GM-CSF (キリンビール, 東京) を加えて培養した。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ で 20 時間培養後、各穴毎に 1 μ Ci の [メチル-³H] チミジン (Amersham) を加え、4 時間培養したのち上述と同じ方法で放射活性を測定した。

K. 細胞傷害活性の測定

C57BL/6 マウスの脾細胞を 10% FBS 添加 RPMI-1640 培地で 8 $\times 10^6$ 個/ml, 4 $\times 10^6$ 個/ml, 2 $\times 10^6$ 個/ml, 1 $\times 10^6$ 個/ml に調整し、その 100 μ l ずつを 96 穴丸底型マイクロプレート (Falcon) の各穴毎に分注し、作動細胞 (effect cell) とした。一方、標的細胞 (target cell) として B16F10mdr (多剤耐性遺伝子 mdr-1 導入マウスメラノーマ細胞株) を用いた。2.5 $\times 10^6$ 個/ml の濃度の標的細胞浮遊液 200 μ l に、50 μ Ci の Na₂⁵¹CrO₄ (Amersham) (50 μ l) を加え、37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下で 45 分間インキュベーションしたのち、RPMI-1640 培地で 3 回洗浄し、10% FBS 添加 RPMI-1640 培地に浮遊させ 2 $\times 10^5$ 個/ml の濃度に調整し、⁵¹Cr 標識標的細胞浮遊液とした。次いで ⁵¹Cr 標識標的細胞浮遊液 100 μ l を先の作動細胞液 100 μ l に加えた (この条件で作動細胞と標的細胞の比はそれぞれ 40:1, 20:1, 10:1, 5:1 となる)。さらに各ウエルにそれぞれサイトカイン融合抗体およびコントロール抗体 (MH16) を 10 μ g/ml となるように加え、37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 下で 4 時間インキュベーションしたのち、上清を各ウエルから 100 μ l ずつ採取し、上清中の ⁵¹Cr 放出量をオートウエルガンマカウンター (ベックマンジャパン) を用いて測定した。下記の計算式に基づき特異的 ⁵¹Cr 放出量を算出して、これを細胞傷害活性とした。

$$\text{細胞傷害活性 (\%)} = 100 \times \frac{({}^{51}\text{Cr 実測値} - {}^{51}\text{Cr 自然放出量})}{({}^{51}\text{Cr 最大放出量} - {}^{51}\text{Cr 自然放出量})}$$

最大放出量は標的細胞に 0.1N 塩酸 100 μ l を加えたときの ${}^{51}\text{Cr}$ 放出量を示し、自然放出量は 10% FBS 添加 RPMI-1640 培地 100 μ l を加えて 4 時間インキュベーションしたのちの標的細胞 ${}^{51}\text{Cr}$ 放出量である。

X. サイトカイン融合抗体の生体内での抗腫瘍活性

1.5 $\times 10^7$ 個の 2780^{AD} 細胞をヌードマウス (BALB/c; nu/nu) (日本チャールズリバー, 厚木) の側腹部皮下に接種し、その 2 日、および 5 日後に 1 μ g のサイトカイン融合抗体および抗ヒト P 糖蛋白マウス-ヒトキメラ抗体 (MH16) を尾静脈より投与した。PBS を投与したマウスをコントロールとした。各群 5 匹について施行し、腫瘍接種 14 日後から腫瘍サイズを経時的に測定した。

成 績

I. サイトカイン融合キメラ抗体発現ベクター

濱田、鶴尾らによりクローニングされた多剤耐性遺伝子産物ヒト P 糖蛋白に対するマウスモノクローナル抗体 MRK16 の軽鎖可変領域および重鎖可変領域遺伝子を、サイトカイン融合キメラ抗体の軽鎖および重鎖を作成するのに使用した。融合抗

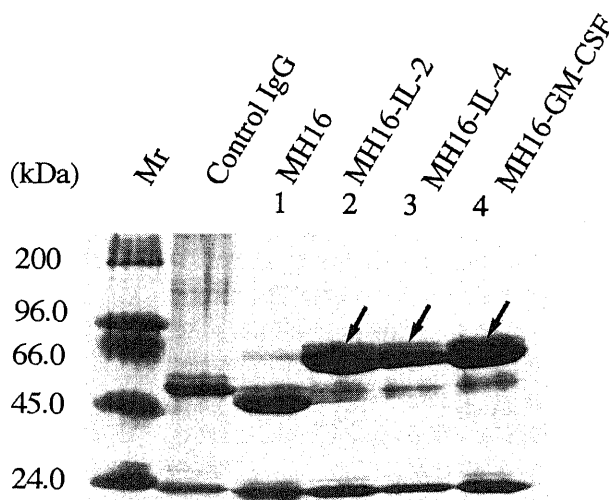


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of cytokine-fused antibodies. 2 μ g of each monoclonal antibody MH16 (lane 1), MH16-IL-2 (lane 2), MH16-IL-4 (lane 3), MH16-GM-CSF (lane 4) were subjected to SDS-PAGE analysis after 2-mercaptoethanol treatment. Arrows indicate the bands of cytokine-antibody fusion proteins.

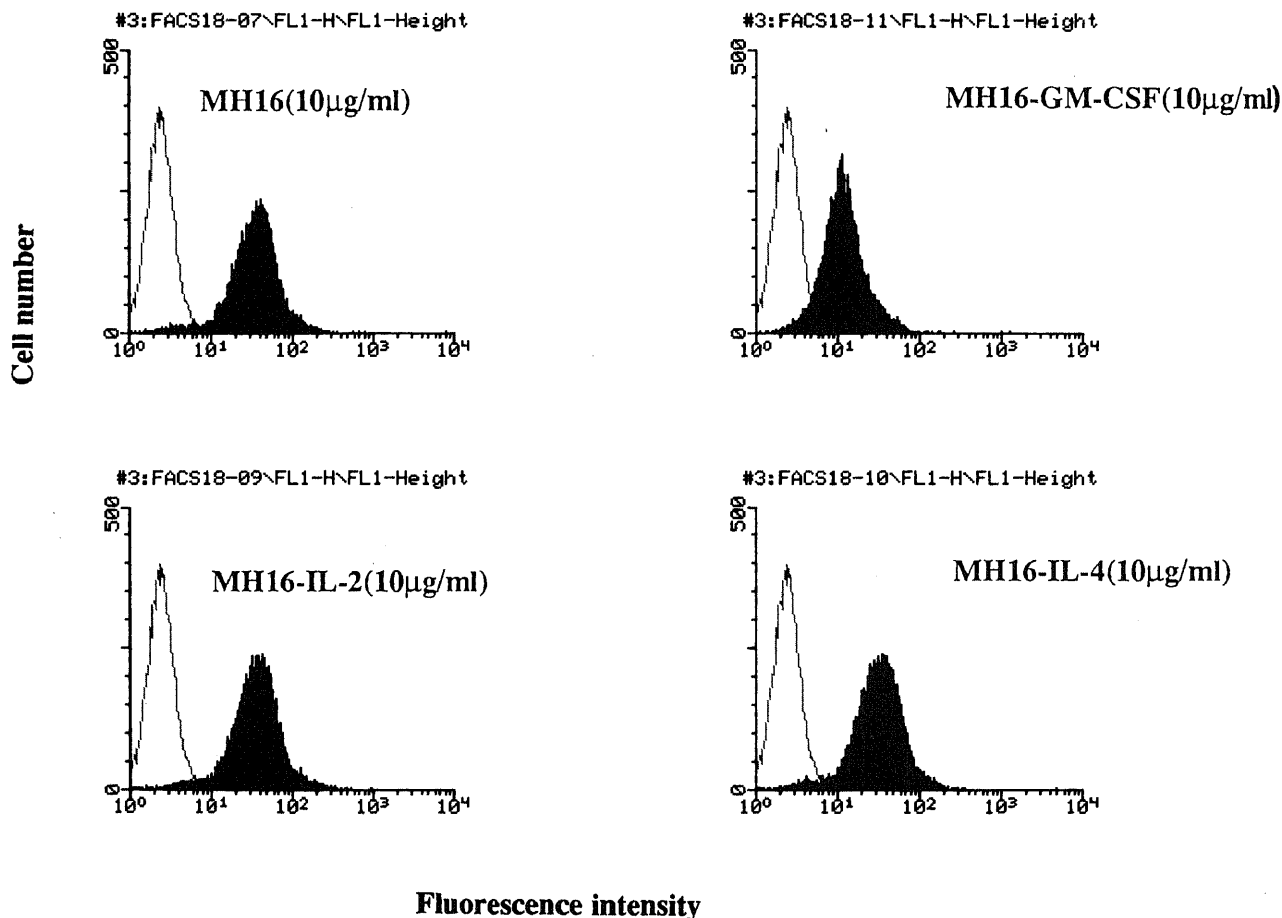


Fig. 4. Specific binding of cytokine-fused chimeric antibodies to the tumor cells. 2780^{AD} tumor cells were incubated with the indicated amounts of parental antibody (MH16) or cytokine-fused antibodies (MH16-GM-CSF, MH16-IL-2 and MH16-IL-4). Bound antibodies were detected by FITC conjugated goat anti-mouse Igs specific antibodies. Anti-IL-2 receptor antibody was used as control antibody (the open peak).

体重鎖発現ベクターは、MRK16 のシグナルシーケンスを含む重鎖可変領域マウスゲノム DNA 断片に続き、ヒト免疫グロブリン IgG₁ 定常領域ゲノム DNA 断片と、その 3' 末端に(グリシン-グリシン-グリシン-グリシン-セリン)₆ の 15 アミノ

酸残基からなる合成リンカーをはさんでサイトカインの成熟 cDNA 断片が組み込まれ、その後ろにヒトフォスホグリセレートキナーゼ (phosphoglycerate kinase, PGK) 遺伝子のポリ A が組み込まれた構造となっている (図 2-B)。本ベクターの転写ユニットはマウス免疫グロブリン重鎖遺伝子固有のプロモーター-エンハンサーによりその発現調節が起こる。軽鎖発現ベクターには、MRK16 のシグナルシーケンスを含む軽鎖可変部領域ゲノム DNA 断片に続き、ヒト k 軽鎖定常領域ゲノム DNA 断片および SV40 ポリ A 配列が組み込まれており、マウス免疫グロブリン軽鎖遺伝子固有のプロモーターならびにヒト k 軽鎖遺伝子エンハンサーの組み合わせによりその転写ユニットの発現が調節される。さらに軽鎖発現ベクターには SV40 プロモーターにより転写活性を調節される選択マーカー遺伝子である neo 遺伝子が含まれている (図 2-A)。

II. サイトカイン融合キメラ抗体産生ミエロマ

エレクトロポレーション法により 1 μ g の軽鎖発現ベクターと 20 μ g のサイトカイン融合重鎖発現ベクターを 5 \times 10⁶ 個のマウスミエロマ SP2-0/Ag14 細胞にトランスフェクションしたのち、G418 選択によりサイトカイン融合抗体産生ミエロマ

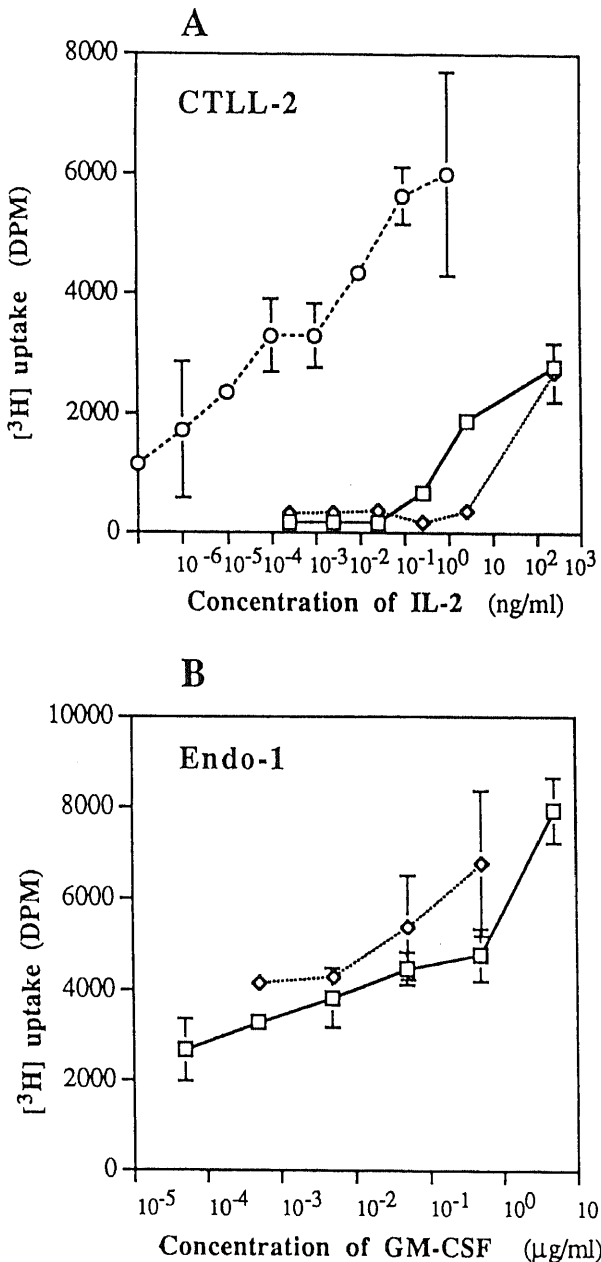


Fig. 5. The cytokine-fused chimeric antibodies do not lose the native biological activity of the cytokines. (A) IL-2 activity of purified MH16-IL-2 and MH16-IL-4 as measured by [³H] thymidine incorporation of mouse T cell line, CTLL-2. Recombinant human IL-2 was used as control. Symbols for chimeric proteins and native cytokine are as follows: (□), MH16-IL-2; (◇), MH16-IL-4; (○), rhIL-2. (B) GM-CSF as measured by [³H] thymidine incorporation of mouse vascular endothelial cell line, Endo-1. Recombinant mouse GM-CSF was used as control. Symbols for chimeric proteins and native cytokine are as follows: (□), MH16-GM-CSF; (◇), rmGM-CSF. Results were normalized to cytokine content of the fusion protein.

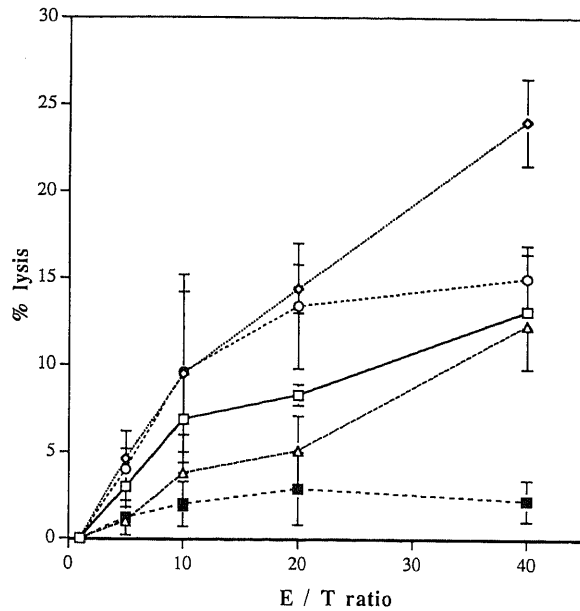


Fig. 6. The cytokine-fused chimeric antibodies kill P-glycoprotein-expressing B16F10 cells (B16F10mdr) as effectively as the parental antibody. Spleen cells from C57BL/6 mouse were used as the effector cell source. B16F10mdr were obtained by transducing the MDR gene into B16F10 cells using a retroviral vector. Target cells were labelled with ⁵¹Cr. Cell suspension (100 μ l) containing 10⁴ labelled target B16F10mdr cells was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 30 min with 50 μ g/ml of above indicated monoclonal antibodies in a 96-well microculture plate. Then, 100 μ l of cell suspension containing effector cells were added each well. The plate was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 6 hrs in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After centrifugation, the radioactivity in 100 μ l of supernatant was counted by a gamma counter. Symbols for the chimeric proteins and parental antibody are as follows; (□), MH16; (◇), MH16-GM-CSF; (○), MH16-IL-2; (△), MH16-IL-4; (■), No addition. Symbols mean triplicate determinations; Error bars represent the standard deviation (SD) of the means.

を樹立した。G418 選択に基づくトランスフェクションの効率は 10^{-5} – 10^{-4} であった。無血清培地上でマイクロマを 7–10 日培養し、80% の細胞が死んだ時点で培養上清を採取し融合抗体を精製した。11 の培養上清から約 1mg の抗体が精製された。

Ⅲ. サイトカイン融合キメラ抗体の物理学的性状

融合抗体を 2-メルカプトエタノールで還元し抗体分子内の S-S 結合を切断した状態で SDS-PAGE 解析を行った結果、約 25kDa 付近の免疫グロブリン軽鎖に相当するバンドに加え、20kDa 前後のサイトカイン分子が結合した免疫グロブリン重鎖に相当する、約 75kDa のバンドが認められた (図 3)。

Ⅳ. サイトカイン融合キメラ抗体の生体内での生物学的性状

1. 抗原結合力

サイトカイン融合キメラ抗体の抗原結合力は多剤耐性遺伝子産物 P 糖蛋白強発現ヒト卵巣癌細胞株 2780^{AD} を抗原としてフローサイトメトリーを用いて解析した。三種類のサイトカイン融合キメラ抗体はいずれも 2780^{AD} 細胞に対する結合力を保持していた (図 4)。

2. サイトカイン生理活性

サイトカイン融合抗体 MH16-mIL-2, MH16-mIL-4 のサイトカイン生理活性はマウス T 細胞株 CTLL-2 細胞に対する増殖刺激活性を指標にして測定した。両抗体ともに濃度依存性に増殖刺激活性を示したが、組換え体ヒト IL-2 と比較すると約 10,000 分の 1 に比活性が減弱していた (図 5-A)。MH16-mGM-CSF の生理活性はマウス血管内皮細胞株 Endo-1 に対する増殖刺激活性を指標にして測定した。この抗体では濃度依存性に増殖刺激活性が認められ、組換え体マウス GM-CSF と同等の比活性を保持していた (図 5-B)。

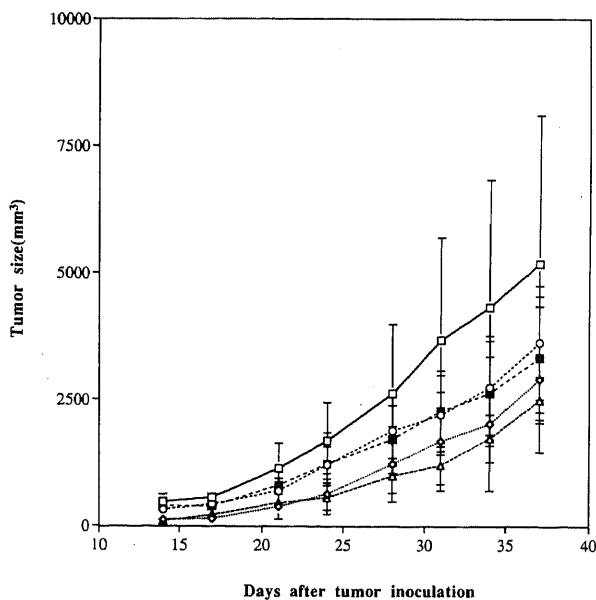


Fig. 7. Inhibition of tumor growth in 2780^{AD}-bearing nude mice. Mice bearing S. C. tumors were treated with 1 μ g of MH16, MH16-IL-2, MH16-IL-4, MH16-GM-CSF or PBS on days 2 and 5 after tumor inoculation. Tumor-size was determined from the formula: $V=1/2ab^2$, where a is the longest diameter and b is the shortest diameter of the tumor and is expressed as $\bar{x} \pm SD$ (error bars) in each group. Symbols for the chimeric proteins and parental antibody are as follows: (\square), Control; (\diamond), MH16; (\circ), MH16-IL-2; (\triangle), MH16-IL-4; (\blacksquare), MH16-GM-CSF.

3. 細胞傷害活性

多剤耐性遺伝子導入マウス B16F10mdr 細胞株 (B16F10mdr) を標的細胞、同種 C57BL/6 マウスの脾細胞を作動細胞としてサイトカイン融合抗体 ADCC 活性の増強効果を調べた。3種類のサイトカイン融合キメラ抗体はいずれも ADCC 活性を保持しており、作動細胞/標的細胞比および抗体濃度依存性に細胞傷害活性の増強効果を示した。MH16-mIL-2, MH16-mGM-CSF では対照とした MH16 と比較して傷害活性の増強効果を認めた。しかし、MH16-mIL-4 の細胞傷害活性には MH16 と比較して有意な差を認めなかった (図 6)。

V. サイトカイン融合キメラ抗体の生体内での抗腫瘍活性

1.5×10^7 個の 2780^{AD} 細胞をヌードマウス (BALB/c; nu/nu) の側腹部皮下に接種したのち、サイトカイン融合抗体を経静脈的に投与して、その抗腫瘍活性を調べた。3種類のサイトカイン融合キメラ抗体はいずれも対照群と比較して腫瘍増殖抑制効果を示した。しかしながらその増殖抑制効果には MH16 投与群と比較して有意な差は認められなかった (図 7)。

考 察

遺伝子組換え技術の発達により、腫瘍細胞を特異的に認識する抗腫瘍モノクローナル抗体と、抗腫瘍免疫作用を有するエフェクター細胞を賦活する多彩な活性を有するサイトカイン分子とを結合させた融合蛋白を作成することが可能となった^{32,33}。サイトカイン融合モノクローナル抗体に関しては直接の抗腫瘍効果を期待して悪性黒色腫³²や種々の癌腫^{33,34}などの固形腫瘍の治療に応用しようとする試みが行われているほか、最近マウス B 細胞リンパ腫の表面免疫グロブリンイデオタイプと IL-2, IL-4, GM-CSF との融合抗体が単独および同時投与により腫瘍免疫を誘導しうる有効な腫瘍ワクチンとなりうる事が報告され癌に対する新しい治療法として注目されている^{35,36}。最近、scid マウスを用いた実験系で、IL-2 融合抗ガンクリオンド抗体と IL-2 刺激により活性化されたリンフォキーン賦活キラー (lymphokine activated killer, LAK) 細胞を同時に投与することで、脾臓内に移植したヒト神経芽細胞腫の肝転移が抑制されることが報告されており³⁷、サイトカイン融合抗体は癌性胸膜炎、癌性腹膜炎、消化管腫瘍の肝転移、肺転移、脳腫瘍などの限局性腫瘍病巣の治療などへの応用が期待される。

最近、レトロウイルスベクターはじめとするウイルスベクターの開発により、高効率に目的遺伝子を細胞に導入、発現することが可能となり^{38,39}、種々のサイトカイン遺伝子をウイルスベクターを用いて腫瘍細胞に導入し、放射線照射により不活化したのち、生体に接種して有効な腫瘍免疫を誘導しようとする腫瘍ワクチンによる免疫遺伝子治療に関する基礎研究が相次いで報告されている^{40–42}。すでに欧米諸国では腎癌、悪性黒色腫などの悪性腫瘍を対象として臨床試験が開始されている⁴³。しかしながら生体に投与した際のウイルスベクターの安全性については今後長期の観察が必要であり、明確な保証はされていない。一方、リンパ球や造血幹細胞などの血球系細胞では遺伝子導入の効率が低く、腫瘍ワクチンの作成が困難である場合もある。もし抗腫瘍抗体の作成が可能であれば、サイトカイン融合抗体を作成し腫瘍細胞と混合することで簡便かつ安全にサイトカイン産生腫瘍ワクチンと同様の効果が期待できる。

抗腫瘍活性を有するサイトカインは数多く報告されている。IL-2 は試験管内および生体内での全身投与などにより胆癌患

者の細胞傷害性 T 細胞¹³⁾, LAK¹⁴⁾, ナチュラルキラー細胞^{15,16)}などの増殖刺激作用や抗腫瘍活性の増強効果を持つことが報告されているほか, B 細胞¹⁷⁾やマクロファージ¹⁸⁾の活性化作用など多彩な活性を有するサイトカインである。最近, 低免疫原性腫瘍にレトロウイルスベクターなどを用いて IL-2 遺伝子を導入した腫瘍ワクチンの抗腫瘍免疫誘導効果^{40,47)~52)}, IL-2 遺伝子導入細胞傷害性 T 細胞の生体内投与での抗腫瘍活性の増強効果^{53,54)}などが相次いで報告されており, IL-2 の免疫応答局所での濃度の増加が, 腫瘍免疫における抗原認識や抗腫瘍活性の発現に重要であることが注目されている。GM-CSF も腫瘍免疫において重要な役割を担うサイトカインのうちの一つである。GM-CSF は単球およびマクロファージの ADCC 活性を高め, 抗腫瘍作用を増強することが知られている。また GM-CSF 遺伝子導入腫瘍ワクチンは強力な抗腫瘍効果を発揮することが報告されており⁴¹⁾, GM-CSF による樹状細胞 (dendritic cell, DC) などの抗原提示細胞の活性化が腫瘍免疫に重要であることが示唆されている^{55,56)}。さらに IL-4 も T 細胞, B 細胞, ナチュラルキラー細胞などを活性化し抗腫瘍効果を増強することが知られている。一方で, サイトカインを全身投与してその抗腫瘍効果を期待するには大量の投与量が必要となり, 重篤な副作用がしばしば問題となっている⁵⁷⁾。本来サイトカインは免疫担当細胞間局所において極微量でその活性を発揮するものであり, サイトカイン融合抗体はサイトカイン単独投与に比べ極少量で効率よくエフェクター細胞を活性化できる可能性がある。

今回作成した融合抗体は上述したサイトカインのもつ種々の固有の生理活性や同調効果を期待して IL-2, IL-4, GM-CSF の三種のサイトカインを選択した。これらのサイトカイン融合抗体はいずれも抗体本来の抗原結合性を保持していた。IL-2 および IL-4 融合抗体はともにマウス T 細胞株 CTLI-2 に対する増殖刺激活性を有していたが, 組換え体 IL-2 と比べると大幅に比活性の減弱が認められた。このような比活性の減弱は, 抗ヒト大腸癌抗体と IL-2, 抗ガングリオンド抗体と GM-CSF⁵⁸⁾, B リンパ腫イディオタイプと IL-4⁵⁹⁾との融合蛋白で報告されている。本研究においては, 融合抗体産生ミエロマの培養上清を用いて IL-2 および IL-4 融合抗体の生理活性を測定した場合も比活性の減弱が同程度に認められており, 融合抗体精製過程で比活性が減弱する影響は少ないものと考えられる。比活性の減弱する原因としていくつかの報告がある。マウス IL-4 には分子内に 3 組のジスルフィド結合が存在しており, その高次構造および活性維持に重要である^{59,60)}。IL-4 と免疫グロブリンとの結合により IL-4 分子内のジスルフィド結合が断裂して比活性の減弱を引き起こしている可能性がある。抗ガングリオンド抗体と IL-2 との融合抗体では, 免疫グロブリンと IL-2 との間にペプチドリンカーを使用せずに直接サイトカインと抗体分子を結合させても, 組換え体 IL-2 と全く同等の比活性を維持していることが報告されている⁶¹⁾。したがって, 本来 2 つの異なる分子の相互の活性を妨げないことを目的として設計されたペプチドリンカーが, 逆にその立体構造に影響を及ぼしサイトカイン分子としての活性を低下させている可能性も考えられる。また, B リンパ腫イディオタイプと GM-CSF との融合抗体⁵⁹⁾では逆に比活性が増強しており, 今回作成した GM-CSF 融合抗体でも比活性は維持されていた。サイトカイン融合抗体の生理活性は, 抗体分子とサイトカイン分子との結合の結果新たに生じる高次構造に依存する要素が強く, 活性が維持されるか否か予

想することは困難である。

一方で, 今回作成した IL-2 および IL-4 融合抗体では, 比活性の低下が認められたが, そのことにより重篤な副作用の発現することなく大量の抗体を投与できる可能性も考えられる。

ADCC を指標にサイトカイン融合抗体の試験管内での細胞傷害活性を測定した結果からは, 3 種の融合抗体はいずれも ADCC 活性を維持していた。IL-2 および GM-CSF 融合は, サイトカインが結合していない MH16 と比較して細胞傷害活性の増強が認められた。IL-2 融合抗体では比活性が著明に低下していたにもかかわらず, ADCC 活性の増強作用が認められており, 腫瘍細胞局所では極微量のサイトカインで十分にエフェクター細胞の活性化を誘導できる可能性が示唆された。IL-4 融合抗体では逆に ADCC 活性は減弱していた。IL-4 は Fc レセプターの発現を低下させることが報告されており⁶²⁾, そのことによりエフェクター細胞の ADCC 活性を減弱させている可能性がある。

生体内での胆癌マウスの治療実験モデルでは予想に反し, MH16 と比較して, サイトカインを融合させたことで期待された抗腫瘍活性の増強効果は認められなかった。サイトカイン融合抗体では抗体分子との結合により本来のサイトカイン分子よりも分子量が大きくなり, 血中からのクリアランスが低下して, 有効血中濃度の持続時間が延長することが報告されている。しかし, 分子量が増加することにより組織移行性が低下して腫瘍局所への集積が阻害される可能性も考えられる。また, サイトカイン受容体は免疫担当細胞以外の組織でも広く発現していることが多く, サイトカイン融合抗体を末梢静脈から全身投与した場合, 末梢組織に存在するサイトカイン受容体に結合して消費されてしまう可能性もある。今回作成したサイトカイン融合抗体の場合も, 試験管内での細胞傷害活性と生体内で期待された抗腫瘍効果との不一致の原因の一端は, 以上述べたようなドラッグデリバリーシステム (drug delivery system) に存在しているのかもしれない。

Kohler らのハイブリドーマ法によるモノクローナル抗体作成技術の確立⁶³⁾により, 理論的にはすべての抗原に対する均一で大量の抗体が得られるようになり, 免疫学のみならず, 医学, 生物学の分野で大きな進歩がみられた。一方, 利根川らにはじまる免疫グロブリン遺伝子の証明^{64,65)}により, その構造遺伝子や抗原に対する多様性獲得のメカニズムが遺伝子レベルで明らかになった。その結果, 抗体をコードする遺伝子の組み換えによって, 新しい抗体蛋白質の作用が可能となった。Morrison により, 抗原と結合する抗体可変領域はマウス由来, 定常領域はヒト由来であるマウス-ヒトキメラ抗体の作製が可能となり⁶⁶⁾, モノクローナル抗体は悪性腫瘍の診断や治療など臨床応用が可能となった。最近ではヒト免疫グロブリン遺伝子トランスジェニックマウスが開発され, 容易にヒト型モノクローナル抗体が作製できる可能性が示唆されている^{67,68)}。ファージディスプレイライブラリーシステムの開発⁶⁹⁾により腫瘍浸潤 B リンパ球⁷⁰⁾など, わずかな mRNA ソースから逆転写反応および特異的 DNA 増幅反応 (reversetranscription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 法により抗体ライブラリーを作製し, 効率よく容易に腫瘍特異的抗体を作製できる可能性も示唆されている⁷¹⁾。重鎖抗体遺伝子と軽鎖抗体遺伝子を組み換え DNA 法を用いてペプチドリンカーで直接接続した単鎖抗体 (single chain-antibody, scAb) を T 細胞受容体と鎖に結合させ

た融合遺伝子を T 細胞に導入し、人工的に抗原特異的細胞傷害性 T 細胞およびヘルパー T 細胞を作製する試みも報告されている⁷²⁾⁷³⁾。遺伝子組み換え技術の進歩により、モノクローナル抗体の応用範囲は急速に拡大しつつある。

一方、数多くのサイトカイン分子がクローニングされ、腫瘍免疫に関わる機能が解明されつつある。しかしながら、サイトカインを全身投与した場合重篤な副作用を引き起こす場合が多く、サイトカインの生体内での作用を的確に把握することが困難であった。本研究で作製されたサイトカイン融合腫瘍特異的モノクローナル抗体は、少量投与により、重篤な副作用の発現を伴うことなく腫瘍局所で免疫担当細胞を効率よく活性化し、本来のサイトカイン分子としての腫瘍免疫における役割を解析する有用な手段となりうる。さらに、作製した融合抗体は定常領域をヒト免疫グロブリンで置換した、いわゆるヒト化抗体である。サイトカイン分子をヒト由来のものに換えることにより、ヒトへの投与も容易に可能であり、今後悪性腫瘍に対する特異的免疫療法への臨床応用が期待される。

結 論

1. 腫瘍関連抗原の一つであるヒト多剤耐性遺伝子産物 P 糖蛋白に対するマウス-ヒトキメラ抗体と 3 種類のサイトカイン IL-2, IL-4, GM-CSF との融合蛋白を作製した。

2. 融合はいずれも抗体としての抗原結合能を維持していた。

3. 作製されたすべての融合蛋白はサイトカイン分子としての活性を保持していた。IL-2, IL-4 融合抗体は組換え体 IL-2 と比較して比活性が減弱していたが、GM-CSF 融合抗体は組換え体 GM-CSF と同等の比活性を維持していた。

4. 試験管内で抗腫瘍活性を調べた結果、3 種類のサイトカイン融合キメラ抗体はいずれも ADCC 活性を保持しており、作動細胞/標的細胞比依存性に細胞傷害活性の増強効果を示した。MH16-mIL-2, MH16-mGM-CSF は対照とした MH16 と比較して傷害活性の増強効果を認めたが、MH16-mIL-4 の細胞傷害活性は MH16 と比較して有意な差を認めなかった。

5. 生体内での腫瘍移植実験で 3 種類のサイトカイン融合キメラ抗体はいずれも対照群と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。しかしながらその増殖抑制効果はサイトカインを結合していないキメラ抗体 MH16 投与群と比較して有意な差は認められなかった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御稿閲を賜りました恩師松田保教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接の御指導を賜りました(財)癌研究会化学療法センター分子生物治療研究部濱田洋文部長に深謝します。さらに、研究計画に際し、貴重な御助言をいただいた(財)癌研究会化学療法センター基礎研究部鶴尾隆部長に深謝致します。また、動物実験に際し多大なる御協力をいただいた(財)癌研究会化学療法センター基礎研究部研究助手佐藤重男氏に深く感謝します。さらに、多大なる御協力を賜りました金沢大学医学部第三内科骨髄移植グループならびに(財)癌研究会化学療法センター分子生物治療研究部の皆様に感謝致します。なお、本研究の要旨は第17回日本分子生物学会年會において発表した。

文 献

1) Anichini, A., Maccalli, C., Mortarini, R., Salvi, S., Mazzocchi, A., Squarcina, P., Herlyn, M. & Parmiani,

G.: Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized byHLA-2 restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients. *J. Exp. Med.*, 177, 989-998 (1993).

2) van der Buggen, P., Traversari, P., Chomez, P., Lurquin, C., Deplane, E., van den Eynde, B., Knuth & Boon, T.: A Gene encoding an antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254, 1643-1647 (1991).

3) Jerme, K. R., Domenech, N. & Finn, O. J.: Tumor-specific cytotoxic T lymphocyte clones from patients with breast and pancreatic adenocarcinoma recognize EBV-immortalized B cells transfected with polymorphic epithelial mucin cDNA. *J. Immunol.*, 151, 1654-1662 (1994).

4) Kawakami, Y., Eriyahu, S., Delgado, C. H., Robbins, P. F., Sakauchi, K., Appella, E., Yannelli, J. R., Adema, G. J., Miki, T. & Rosenberg, S. A.: Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 6458-6462 (1994).

5) Kotera, Y., Fonttenot, J. D., Pecher, G., Meztar, R. S. & Finn, O. J.: Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. *Cancer Res.*, 54, 2856-2860 (1994).

6) Mandelboim, O., Berke, G., Fridkin, M., Feldman, M., Eisenstein, M. & Eisenbach, L.: CTL induction by a tumor-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma. *Nature*, 369, 67-71 (1994).

7) Peoples, G. E., Geodegebuure, P. S., Smith, R., Linehan, D. C., Yoshino, I. & Eberlein, T. J.: Breast and ovarian cancer-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the HER2/neu-derived peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 432-436 (1995).

8) Mount, P. F., Sutton, V. R., Li, W., Buress, J., McKenzie, F. C., Pietersz, G. A. & Trapani, J. A.: Chimeric (Mouse/human) anti-colon cancer antibody c30.6 inhibits the growth of human colorectal cancer xenografts in scid/scid mice. *Cancer Res.*, 54, 6160-6166 (1994).

9) Romeijn, P., Lenthall, R., Strvrou, D., Melcher, D., Ladyman, H. & Ritter, M. A.: Identification of glioma-associated antigen MUC2-63 as CD44. *Br. J. Cancer*, 70, 799-803 (1994).

10) Chen, Y. T., Stockert, E., Chen, Y., Rettig, W. J., van der Bruggen, P., Boon, T. & Old, L. J.: Identification of the MAGE-1 gene product by monoclonal and polyclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1004-1008 (1994).

11) Lui, A. Y., Robins, R. R., Hellstrom, K. E., Murray, E. D., Chang, J. C. P. & Hellstrom, I.: Chimeric mouse-human IgG1 antibody that can mediate lysis of cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 3439-3443 (1987).

12) Renner, C., Jung, W., Sahin, U., Denfeld, R., Pohl, C., Trumper, L., Hartmann, F., Diehl, V., Lier, R. V. & Pfreundschuh, M.: Cure of xenografted human tumors by bispecific monoclonal antibodies and human T cells.

- Science, 264, 833-835 (1994).
- 13) Lotze, M. T., Matory, Y. L., Ettinghusen, S. E., Ryneer, A. A., Sharrow, S. O., Seipp, C. A. Y., Custer, M. C. & Rosenberg, S. A.: In vivo administration of purified human interleukin-2: II. half life, immunologic effects, and expression of peripheral lymphoid cells in vivo with recombinant IL-2. *J. Immunol.*, 135, 2865-2875 (1985).
 - 14) Hawkins, M. J., Atkins, M. B., Dutcher, J. P., Fischer, R. I., Weiss, G. R., Margorin, K. M., Rayner, A. A., Szol, M., Parkinson, D. R., Paietta, E., Gaynor, E. R., Boldt, D. H., Doroshow, J. H. & Arosen, F. R.: A phase II trial of interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells in advanced colorectal carcinoma. *J. Immunother.*, 15, 74-78 (1994).
 - 15) Yasumura, S., Lin, W.-C., Hirabayashi, H., Vujanvic, N. L., Herbermn, R. B. & Whiteside, T. L.: Immunotherapy of liver metastasis of human gastric carcinoma with interleukin 2-activated natural killer cells. *Cancer Res.*, 54, 3808-3816 (1994).
 - 16) Nakajima, F., Khanna, A., Xu, G., Lagmaan, M., Haschemeyer, R., Mouradian, J., Wang, J. C., Stenzel, K. H., Rubin, A. L. & Suthanthiran, M.: Immunotherapy with anti-CD3 monoclonal antibodies and recombinant interleukin 2: stimulation of molecular programs of cytotoxic killer cells and induction of tumor regression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 7889-7893 (1994).
 - 17) Grabstein, K. H., Urdal, D. L., Tusinski, R. J., Mochizuki, D. Y., Price, V. L., Cantrell, M. A., Gillis, S. & Coonlon, P. J.: Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Science*, 232, 506-508 (1986).
 - 18) Paul, W. E.: Interleukin-4: prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood*, 77, 1859-1870 (1991).
 - 19) Tepper, R. I.: The tumor-cytokine transplantation assay and the antitumor activity of interleukin-4. *Bone Marrow Transpl.*, 9, 177-181 (1992).
 - 20) Tepper, R. I., Pattengle, P. K. & Leder, P.: Murine interleukin-4 display potent antitumor activity in vivo. *Cell*, 57, 503-512 (1992).
 - 21) Tepper, R. I., Coffman, R. L. & Leder, P.: An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of IL-4. *Science*, 257, 548-551 (1992).
 - 22) Charak, B. S., Agah, R. & Mazumder, A.: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced antibody-dependent cellular cytotoxicity in bone marrow transplantation. *Blood*, 81, 3474-3479 (1993).
 - 23) Hank, J. A., Albertini, M. R., Schiller, J. & Sondel, P. M.: Activation of multiple effector mechanisms to enhance tumor immunotherapy. *J. Immunother.*, 14, 329-335 (1993).
 - 24) Hank, J. A., Robins, R. R. & Surfus, J.: Augmentation of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity following in vivo therapy with recombinant interleukin-2. *Cancer Res.*, 50, 5234-5239 (1990).
 - 25) Hamada, H. & Tsuruo, T.: Functional role for the 170-to-180kDa glycoprotein specific to drug-resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 7785-7789 (1986).
 - 26) Gottesman, M. M. & Pastan, I.: The multidrug transporter, double-edged sword. *J. Biol. Chem.*, 263, 12163-12166 (1988).
 - 27) Bell, D. r., Gerlach, J. H., Kartner, N., Buich, R. N. & Ling, I.: Detection of P-glycoprotein in ovarian cancer: a molecular marker associated with multidrug resistance. *J. Clin. Oncol.*, 3, 311-315 (1985).
 - 28) Fojo, A. T., Ueda, K., Simon, D. J., Poplck, D. G., Gottesman, M. M. & Pastan, I.: Expression of a multidrug resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 265-269 (1987).
 - 29) Sato, H., Gottesman, M. M. & Goldstein, R. J.: Expression of the multidrug resistance gene in myeloid leukemia. *Leukemia Res.*, 14, 11-22 (1990).
 - 30) Chin, K. -V., Ueda, K., Pastan, I. & Gottesman, M. M.: Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science*, 255, 459-462 (1992).
 - 31) Hamada, H., Miura, K., Ariyoshi, K., Heike, Y., S., S., Kameyama, K., Kuroswa, Y. & Tsuruo, T.: Mouse-human chimeric antibody against multidrug transporter P-glycoprotein. *Cancer Res.*, 50, 3167-3171 (1990).
 - 32) Gilles, S. D., Reilly, E. B., Lo, K. -M. & Reisfield, R. A.: Antibody-targeted interleukin 2 stimulates T-cell killing of autologous tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1428-1432 (1992).
 - 33) Fell, H. P., Gayle, M. A., Grosmaire, L. & Lebedetter, J. A.: Genetic construction and characterization of a fusion protein consisting of chimeric F(ab)' with specificity for carcinomas and human IL-2. *J. Immunol.*, 146, 2446-2452 (1991).
 - 34) Gillies, S. D., Wesolowski, J. S. & Lo, K. -M.: Targeting human cytotoxic T lymphocytes to kill heterologous epidermal growth factor receptor-bearing tumor cells. *J. Immunol.*, 146, 1067-1071 (1991).
 - 35) Tao, M. -H. & Lavy, R.: Idiotype/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B cell lymphoma. *Nature*, 362, 755-758 (1993).
 - 36) Chen, T. T., Tao, M. -H. & Levy, R.: Idiotype-cytokine fusion proteins as cancer vaccines: Relative efficacy of IL-2, IL-4, and Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.*, 153, 4775-4787 (1994).
 - 37) Sabzevari, H., Gillies, D., Mueller, B., Pncook, D. & Reisfield, A.: A recombinant antibody-interleukin 2 fusion protein suppress growth of hepatic human neuroblastoma metastases in severe combined immunodeficiency mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 9626-9630 (1994).
 - 38) Danos, O. & Mulligan, R. C.: Safe and efficient generation of recombinant retrovirus with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 6460-6464 (1988).

- 39) Miller, A. D. & Rosman, G. J.: Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Bio Techniques*, 7, 980-990 (1989).
- 40) Bennerji, R. & Arroyo, C. D.: The role of IL-2 secreted from genetically modified tumor cells in the establishment of antitumor immunity. *J. Immunol.*, 152, 2324-2331 (1994).
- 41) Dranoff, G., Jeffee, E., Lzenby, A., Golumberg, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D. & Mulligan, R. C.: Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 3539-3543 (1993).
- 42) Porgador, A., Tzehoval, E., Katz, A., Vadai, E., Revel, M., Feldman, M. & Eisenbach, L.: Interleukin 6 gene transfection into Lewis lung carcinoma tumor cells suppresses the malignant phenotype and confers immunotherapeutic competence against parental metastatic cells. *Cancer Res.*, 52, 3679-3686 (1992).
- 43) Tepper, R. I. & Mule, J. J.: Experimental and clinical studies of cytokine gene-modified tumor cells. *Human gene therapy*, 5, 153-164 (1994).
- 44) Vujanovic, N. L., Yasumur, S., Hirabayashi, H., Lin, W.-C., Watokins, S., Herberman, R. B. & Whiteside, T. L.: Antitumor activity of subsets of human IL-2-activated natural killer cell in solid tissues. *J. Immunol.*, 154, 281-289 (1995).
- 45) Waldman, T. A., Gold, C. K., Robb, R. J., Depper, J. M., Leonard, W. J., Sharrow, S. O., Bonjibanni, K. F., Korsmeyer, S. J. & Greene, W. J.: Expression of interleukin-2 receptor on activated human B cells. *J. Exp. Med.*, 160, 1450-1466 (1984).
- 46) Baccarini, M., Schwinzer, B. & Lohmann-Matthes, M.-L.: Effect of human recombinant IL-2 on murine macrophage precursors. Involvement of receptor distinct from the p55 (Tac) protein. *J. Immunol.*, 142, 118-125 (1989).
- 47) Fearon, E. R., Pardoll, D. M., Itaya, T., Golumberg, P., Levitsky, H. I., Simons, J. W., Karasuyama, H., Vogelstein, B. & Frost, P.: Interleukin-2 production by tumor cells bypass T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell*, 60, 397-403 (1990).
- 48) Rosenthal, F. M., Cronin, K., Banerji, R., Golde, D. W. & Gansbacher, B.: Augmentation of antitumor immunity by tumor cells transduced with a retroviral vector carrying the interleukin-2 and interferon- γ cDNA. *Blood*, 83, 1289-1298 (1994).
- 49) Uchiyama, A., Hoon, D. S. B., Morisaki, T., Kaneda, Y., Yuzuki, D. H. & Morton, D. L.: Transfection of interleukin 2 gene into human melanoma cells augments cellular immune response. *Cancer Res.*, 53, 949-952 (1993).
- 50) Corner, J., Bnerji, R., Saito, S., Heston, W., Fair, W. & Gilboa, E.: Regression of bladder tumors in mice treated with interleukin 2 gene-modified tumor cells. *J. Exp. Med.*, 177, 1127-1134 (1993).
- 51) Kim, T. S. & Cohen, E. P.: Interleukin-2-secreting mouse fibroblasts transfected with genomic DNA from murine melanoma cells prolong the survival of mice with melanoma. *Cancer Res.*, 54, 2531-2535 (1994).
- 52) Kim, T. S. & Cohen, P.: Immunization of mice with allogeneic fibroblasts genetically modified for interleukin-2 secretion and expression of melanoma-associated antigens stimulate predetermined classes of anti-melanoma effector cells. *J. Immunother.*, 16, 24-35 (1994).
- 53) Nakamura, Y., Wakimoto, H., Abe, J., Kanegae, Y., Saito, I., Aoyagi, M., Hirakaw, K. & Hamada, H.: Adoptive immunotherapy with murine tumor-specific T lymphocytes engineered to secrete interleukin-2. *Cancer Res.*, 54, 5757-5760 (1994).
- 54) Treisman, J. T., Hwu, P., Minamoto, S., Shafer, G. E., Cowherd, R., Morgan, R. A. & Rosenberg, S. A.: Interleukin-2-transduced lymphocytes grow in an autocrine fashion and remain responsive to antigen. *Blood*, 85, 139-145 (1995).
- 55) Huang, A. Y. C., Golumberg, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D. & Levitsky, H.: Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigen. *Science*, 264, 961-965 (1994).
- 56) Dranoff, G., Crawford, A. D., Sddelin, M., Ream, B., Roderick, A. R., Bronson, T., Dickersin, G. R., Bachurski, C. J., Mark, E. L., Whitest, J. A. & Mulligan, R. C.: Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science*, 264, 713-716 (1994).
- 57) Rosenberg, S. A., Lotze, M. T. & Mule, J. J.: New approaches to the immunotherapy of cancer using interleukin-2. *Ann. Inter. Med.*, 108, 853-864 (1988).
- 58) Gillies, S. D., Young, K. M., Lo, K. M. & Roberts, S.: Biological activity and in vivo clearance of fusion proteins. *Bioconj. Chem.*, 4, 230-236 (1993).
- 59) Carr, C., Aykent, S., Kimack, N. M. & Levine, A. D.: Dissulfied assignments in recombinant mouse and human interleukin-4. *Biochemistry*, 30, 1515-1532 (1991).
- 60) Kreitman, R. J., Puri, R. K. & Pastan, I.: A circularly permuted recombinant interleukin 4 toxin with increased activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 6889-6893 (1994).
- 61) Gillies, S. D., Reilly, E. B., Lo, K.-M. & Reisfield, R. A.: Antibody-targeted interleukin 2 stimulates T-cell killing of autologous tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1428-1432 (1992).
- 62) Te Velde, A.: IL-4 decrease Fc γ R membrane expression and Fc γ R-mediated cytotoxic activity of human monocytes. *J. Immunol.*, 144, 3046-3051 (1990).
- 63) Kohler, G. & Milstein, C.: Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497 (1975).
- 64) Maki, R., Traunecker, A., Sakano, H., Roeder, W.

- & Tonegawa, S.: Exon shuffling generates immunoglobulin heavy chain gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2138-2142 (1980).
- 65) Tonegawa, S.: Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, **302**, 575-581 (1983).
- 66) Morison, S. L.: Transfectomas provide novel chimeric antibodies. *Science*, **229**, 1202-1207 (1985).
- 67) Zou, Y.-R., Gu, H. & Rajewsky, K.: Generation of mouse strain that produces immunoglobulin κ chains with human constant regions. *Science*, **19**, 1271-1274 (1993).
- 68) Taki, S., Meiering, M. & Rajewsky, K.: Targeted insertion of a variable region gene into the immunoglobulin heavy chain locus. *Science*, **262**, 1268-1271 (1993).
- 69) Winter, G. & Milstein, C.: Man-made antibodies. *Nature*, **349**, 293-299 (1991).
- 70) Punt, C. J. A., Barbuto, J. M. A., Zhang, H., Grimes, W. J., Hatch, K. D. & Hersh, E. M.: Anti-tumor antibody produced by human tumor-infiltrating and peripheral blood B lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.*, **38**, 225-232 (1994).
- 71) Ketteborough, C. A., Ansell, K. H., Allen, R. W., Rosell-Vives, E., Gussow, D. H. & Bendig, M. M.: Isolation of tumor cell-specific single-chain Fv from immunization mice using phage-antibody libraries and the re-construction of whole antibodies from these antibody fragments. *Eur. J. Immunol.*, **24**, 952-958 (1994).
- 72) Romeo, C. & Seed, B.: Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides. *Cell*, **64**, 1037-1046 (1991).
- 73) Robert, M. R., Q., D. L., Smih, D. H., Tran, A.-C., Dull, T. J., Groopmn, J. E., Capon, D. J., Byrn, R. A. & Finer, M. H.: Targeting of human immunodeficiency virus-infected cells by CD8⁺ T lymphocytes armed with universal T-cell receptors. *Blood*, **84**, 2878-2889 (1994).

The Development of a Novel Strategy for the Targeting Therapy of Cancer Using Cytokine-fused Tumor-specific Monoclonal Antibodies Kenji Orimoto, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **104**, 655—667 (1995)

Key words cytokine, monoclonal antibody, fusion protein, multidrug resistance, immunotherapy

Abstract

A mouse monoclonal antibody MRK16, targeted against human multidrug-resistant gene product P-glycoprotein, has been shown to have anti-tumor effects in vitro and in vivo on the growth of the human ovarian carcinoma cell line 2780^{AD} cells highly expressing P-glycoprotein. In the studies described here, recombinant mouse-human chimeric antibodies against P-glycoprotein, consisting of variable regions of MRK16 and the constant region of human IgG1, genetically fused with GM-CSF, IL-2 and IL-4 were generated. These fusion products were expected to direct and localize the effects to the vicinity of the tumors specifically and stimulate immune effector cells sufficiently to achieve efficient tumor cell lysis. All three fusion proteins were proved to maintain antigen-binding ability and their own cytokine-activities. Although the activity of both IL-2 and IL-4 fusion proteins were less than that of recombinant IL-2, GM-CSF fusion product maintained the same level of specific activity as recombinant GM-CSF. The reduction of the specific activities of the two fusion products appeared to be due to potential alterations in the conformation of these cytokine molecules caused by the fusion of these to the Ig heavy chain. All three cytokine-fused antibodies were found to maintain tumoricidal activity in the presence of mouse effector cells and were shown to enhance the tumor lytic activity in a dose dependent manner. The ability of cytokine-fused antibodies and the parent chimeric antibody to kill tumor cells was compared. Although IL-2 and GM-CSF fusion proteins were more efficient in killing tumor cells than the parent chimeric antibody, the tumoricidal activity obtained by adding IL-4-fused antibody to the target cells did not exceed that obtained by adding the parent chimeric antibody. In in vivo experiments, all three fusion proteins suppressed the growth of drug-resistant tumor xenografts, but the effects of fusion proteins were not superior to that of unmodified chimeric antibody (MH16). This discrepancy between the tumoricidal activity of fusion proteins in vitro and their ability to suppress the growth of 2780AD cells in vivo might be explained by the hypothesis that fusion proteins were easily captured by the cytokine receptors expressed on peripheral tissue, or that fusion proteins increased in size and resisted permeation in the vicinity of the tumor. By determining the appropriate route for the administration of fusion proteins, these agents may prove useful for targeting anti-tumor effector cells in immunotherapy for human cancers.