

Characterization of Mouse Monoclonal Antibodies Specific for Human Renal Cell Carcinoma : Effect on Tumor Cell Growth in vitro

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/2297/8040

ヒト腎細胞癌に特異的なマウスモノクローナル抗体の特性

癌細胞増殖に対する *in vitro* の効果

金沢大学がん研究所病態生理部 (主任: 山本健一教授)

徳 山 由 紀 子

(昭和63年5月6日受付)

ヒト腎細胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) の培養細胞に対する三種類のマウスモノクローナル抗体 (monoclonal antibody, MAb) KRC-1, -2, -3 (IgG1) を作製した。MAb はすべて、一部の RCC とのみ反応し、他の癌細胞株や癌組織、腎臓をはじめとする正常組織とは反応しなかった。MAb が *in vitro* で癌細胞の増殖に及ぼす効果を軟寒天中と単層培養系で調べた。抗体はいずれも癌細胞の増殖の変調効果を示した。KRC-1 は促進効果を、一方 KRC-2 と -3 は抑制効果を示した。KRC-1 はイムノブロットィングにより 135 kd の糖蛋白質を、KRC-2 はゲルろ過により高分子量の抗原 (約 1,200 kd) を、KRC-3 は抗体アフィニティクロマトにより 170 kd を主成分とする糖蛋白質抗原をそれぞれ認識した。これらすべての抗原はコンカナバリン A (concanavalin-A, Con A) レクチンと親和性があった。抗原の分子性状から今までに報告された RCC 関連抗原とは異なっているようである。これら3つの MAb は変換細胞の増殖の調節機構を研究するのに有用と思われる。

Key words renal cell carcinoma, monoclonal antibody, tumor antigen, growth modulation

癌の診断や治療のために役立つ試薬としてのモノクローナル抗体 (monoclonal antibody, MAb) の作製が多く試みられているが、腎臓癌に関しては、まだ臨床的な応用に至っていない。

ヒト腎細胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) に対する多くの MAb が報告されている。それらは RCC に高い特異性をもつもの¹⁾⁻⁶⁾や、腎細胞の分化抗原⁷⁾⁻¹⁰⁾、あるいはウイルス由来の抗原¹¹⁾を認識するものである。しかし、それらの抗原の生物学的機能はほとんどわかっていない⁹⁾。

教室の岡田らは RCC 組織の膜成分をデオキシコール酸塩で可溶化した分画に対するモルモット抗血清を作製し分子量 68,000 の RCC 関連抗原が存在することを示した。蛍光抗体法によって RCC 細胞株、Ku-2 及び KN41 には反応するが胎児腎 (HEK14) には反応しないと報告した¹²⁾。筆者はこの知見を基にして、

Ku-2 と KN41 の細胞株をマウスに免疫して MAb を作製し、免疫抗原には反応するが胎児腎 HEK14 とは反応しないような抗体を選び出し、その特異性とこれらが認識する抗原の物理化学的性格を調べた。更にこの RCC 抗原が癌細胞の機能にいかなる役割を果しているかを探るため、*in vitro* の系で癌細胞の増殖に対する MAb の影響を調べた。

材料および方法

I. 培養細胞株

1. ヒト腎細胞癌株

Ku-2 は慶応大泌尿器科 (田崎教授)、KN41 は金沢大泌尿器科 (内藤博士)、Ko-RCC-1 は神戸大泌尿器科 (岡田博士)、NCC-75 は金沢大がん研 (沢口博士)、NRC-12 は新潟大泌尿器科 (小松原博士) より御恵与を受けたものであり、ACHN は American Type

Abbreviations: ABC, avidin-biotin-peroxidase complex; BSA, bovine serum albumin; Con-A, concanavalin A; DBA, dolichos biflorus agglutinin; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; EGF, epidermal growth factor; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; MAb, monoclonal antibody; PAP, peroxidase-anti-peroxidase; PBS, phosphate-

Culture Collection より購入した。

2. その他の細胞株

HEK-14 (胎児腎) は金沢大がん研ウイルス部 (小倉博士) より御恵与を受け、その他は大日本製薬株式会社 (ラボラトリープロダクツ部, 大阪) より購入した。細胞株はダルベッコ変法イーグル培地 (Gibco Lab., U.S.A.) (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) に10%ウシ胎児血清 (Gibco Lab., U.S.A.) とセフメタゾン (100 μ g/ml 三共株式会社, 東京) を添加して培養した。

II. ヒト腎細胞癌に対するモノクローナル抗体の作製

BALB/c マウスの腹腔内に RCC 細胞を次の二つの方法で注射した。実験 1: Ku-2 だけを 10^6 , 5×10^6 , 8×10^6 , 2.5×10^7 ずつを 1, 10, 34, 94 日目にそれぞれマウスに投与した。最終免疫の3日後に脾臓細胞をとり出し、マウスミエローマ細胞 P₃X63/Ag8 と細胞融合させた。実験 2: 2 つの RCC 細胞株 Ku-2 と KN41 を交互に免疫した。この時のマウスミエローマ細胞は Sp2/01Ag を使用した。細胞融合は, Kennett¹³⁾ の方法に従って行った。得られた抗体の活性は細胞酵素免疫測定法 (cell-enzyme linked immunosorbent assay, cell-ELISA) で調べた¹⁴⁾。Ku-2 と KN41 に陽性, HEK14 と他の 2, 3 のがん細胞に陰性となるハイブリドーマのコロニーを選び出し、これらを限界希釈法によって 2 回クローニングした。これらの抗体のサブクラスの決定は Zymed's MONO Ab-ID EIA キット (Zymed Laboratories, Inc., U.S.A.) で行った。腹水は pristan 処理した BALB/c マウスの腹腔内へクローン化したハイブリドーマ細胞を投与して、作製した。

III. In vitro のがん細胞の増殖に及ぼす MAb の効果

1. 軟寒天培養系

この測定は Tong ら¹⁵⁾ の方法を改変して行った。がん細胞 (2×10^6 細胞/ml) を MAb の DMEM 培養液 (10 倍稀釈) 又は腹水 (200~500 倍稀釈) で、室温 1 時間処理した後、これを DMEM-10%ウシ胎児血清で溶かした 0.3%寒天に 20 倍稀釈した。一方、24 マルチプレート (Coster, U.S.A.) のウェルに 0.5 ml の 0.5%寒天の基底層を作っておき、この上に上記の 0.3%寒天細胞懸濁液 0.2 ml を重層し、7 日間培養し

28 mm² 当りの 30 個以上の細胞から成るコロニー数を顕微鏡下で読んだ。

2. 単層培養系

標的癌細胞を DMEM (3%ウシ胎児血清含有) に懸濁させ (4×10^4 - 1×10^6 細胞/ウェル) 24 マルチプレートにまき、ハイブリドーマ培養上清又は腹水存在下で 3 日間培養し、トリプシンで細胞を集めて、細胞数を読んだ。

IV. 免疫学的検査法

1. 免疫組織の染色

外科手術的に切除された組織は -80°C に冷却したイソペンタン中で瞬間凍結し、使用するまで -80°C で保存した。凍結組織は OCT コンパウンドで包埋し、厚さ約 5 μ m に切った。切片はメタノールで 4 分間固定した後、2%正常馬血清でブロックし、更に Avidin-biotin blocking キット (Vector Laboratories, Inc., U.S.A.) で処理した。ハイブリドーマ上清を室温で 45 分間反応させた後、Vectastain ABC キット (Vector Laboratories Inc., U.S.A.) による Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) 法を行った。3, 3'-ジアミノベンジジンで発色させた¹⁶⁾。ホルマリン固定、パラフィン切片組織は 5 年以内の保存のものを脱パラフィンの後、同様の方法で染色した。

2. イムノプロットティング

KN41 細胞を 1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 7.7) (2×10^7 細胞/ml) で 1 ml フェニルメチルスルフォニルフロライドとアプロチニン (100 U/ml) 存在下で 30 分、氷冷で抽出した後 10,000 xg, 30 分遠心し、上清を抗原抽出液とした。これを SDS-7.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) し¹⁷⁾、分離した蛋白を, Sartorius's Semi-Dry Electrobloetter (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) を使ってニトロセルロース紙 (0.45 μ m) に電氣的に転写した¹⁸⁾。これを Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) 法で染色した。即ちリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) で 10%に稀釈した正常馬血清で一夜、 4°C でブロックした後、ハイブリドーマ上清で 2 時間反応させた。0.05% Tween 20 を含む PBS (以下これで洗浄する) で 15 分間洗浄後、ウサギ抗マウスイムノグロブリン (メディカル アンド バイオケミカルラボラトリーズ、

buffered saline; PNA, peanut agglutinin; RCA I, ricinus communis agglutinin I; RCC, renal cell carcinoma; SBA, soybean agglutinin; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; UEA I, ulex europaeus agglutinin I; WGA, wheat germ agglutinin.

東京) (50倍稀釈)を30分間反応させ、洗浄後100倍稀釈したPAP(マウス)(DAKOPATTS a/s, Denmark)を30分間反応させた。発色には3,3'-ジアミノベンジジンを使った。分子量マーカとして α_2 -macroglobulin (340,000非還元, 170,000還元), phosphorylase b (97,400), glutamate dehydrogenase (55,400), lactate dehydrogenase (36,500)とtrypsin inhibitor (20,100)(Boehringer Mannheim GmbH, W. Germany)を使用した。

3. レクチン結合試験

腹水から33%飽和硫酸分画とDEAE-セファセルクロマトグラフィによって精製したMAB (10 μ g/ml)を96穴ビニールプレート(Coster, U.S.A.)に吸着させ(50 μ l/ウエル), 更に1%ウシ血清アルブミン(bovine serum albumine, BSA)(Armour Pharmaceutical Co., U.S.A.)でブロックした後, 50 μ lのKN41抗原抽出液を加え4°C1夜静置した。洗浄液でプレートを洗い50 μ lのビオチン化レクチン(Biotinylated Lectin Kit I)(Vector Lab.)を10 μ g/mlで加え, 37°C1時間反応させ, 次に50 μ lのstrept-avidin-horseradish peroxidase conjugate (Bethesda Res. Lab., U.S.A.) (1000倍稀釈)を加え, 37°C30分反応させた後, 0-フェニレンジアミンで発色させEIA reader EL307 (BIO-TEK Instrument Inc., U.S.A.)により各ウエルの吸光度を測定した。使用したレクチンはconcanavalin A (Con A), soybean agglutinin (SBA), wheat germ agglutinin (WGA), dolichos biflorus agglutinin (DBA), ulex europaeus agglutinin I (UEA I), peanut agglutinin (PNA)とricinus communis agglutinin I (RCA I)(Boehringer Mannheim GmbH, W. Germany)である。

4. 抽出抗原のゲルろ過

KN41を0.5mMエチレンジアミンテトラアセテートで処理して集め(3 \times 10⁷細胞), 0.7mlの1% Triton X-100, 20mM Tris-HCl, (pH 7.7)で1mMフェニルメチルスルホニルフロライドとアプロチニン(100 U/ml)存在下で30分氷冷抽出した後, 10,000 xg, 30分遠心し, その上清を1% Triton X-100, 0.15M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH 7.7), 0.1%ポリエチレングリコール6000で平衡化したSephacryl S-300のカラム(1 \times 40cm)にかけた。同緩衝液で溶出し0.45mlずつ採取し, 各分画の50 μ lをサンドイッチELISAの測定に使った。分子量マーカはBlue Dextran 2000 (分子量, 2,000,000)(Pharmacia Fine Chemical, Sweden), ferritin (450,000)とbovine serum albumin (67,000)(後者二つはBoehringer

Mannheim GmbH, W. Germany)を使用した。

5. サンドイッチELISA

96穴ビニール測定プレート(Coster)の各ウエルに精製した抗体(10 μ g/ml)を吸着させ, 次に試料を加えた。更にGuesdonら¹⁹⁾の方法でビオチン化したMABを加えた後, ストレプトアビジンパーオキシターゼ(1000倍稀釈)を結合させ, 0-フェニレンジアミンで発色させた。

6. 抗原活性のプロテアーゼ感受性

Ku-2を0.2%トリプシン(type XIII, Sigma Chemical Co., U.S.A.)又は0.2%プロナーゼE(科研化学, 東京)で37°C30分処理した後, 1%BSA-PBSでブロックした。Millititer SVLPプレート(Millipore Corp., U.S.A.)上に処理したものと未処理の細胞をのせ(2 \times 10⁶細胞/ウエル)MABでELISA測定を4°Cで行った。

7. 抗体アフィニティカラムによる抗原の精製

KRC-3の腹水より33%飽和硫酸塩析とDEAE-Sephacel (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)によってIgG1-MABを精製し, Staehelinら²⁰⁾の方法によってAFFI-GEL®10 (Bio-Rad Lab., U.S.A.)に結合させた。(抗体結合量2mg/ml gel, 以下KRC-3-gelとする)正常マウスIgGもブールした正常BALB/c血清から同様な精製と処理をした(以下MIg-gelとする)。0.4mlの抗原抽出液を, ゲルに非特異的に吸着する成分をあらかじめ除くため, MIg-gel (0.15ml)に加え, 4°C2時間反応させ。その上清0.3mlを抜きとり二等分してそれぞれをKRC-3 gel及びMIg-gel (0.15ml)にまぜ4°C一夜反応させた。上清を捨て0.5% Triton X-100, 0.15M NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7.7で沈渣を5回洗浄した。ペレットに3% SDS-30%グリセロール液0.125mlを加え60°C4分抽出した後, この上清に1/10容量の10%の2-メルカプトエタノール溶液を加え, 更に65°C3分加熱した。この抽出溶液をSDS-7% PAGEにかけSilver stain®キット(Bio-Rad Lab.)によりバンドを染め出した。

成 績

I. マウスモノクローナル抗体の特異性

MABのKRC-1 (IgG1)はKu-2だけを, KRC-2, -3は(共にIgG1)Ku-2とKN41とをそれぞれマウスに免疫して作製したものである。種々の培養細胞に対する反応性は各々の腹水を1000倍稀釈してcell-ELISAによって調べた。その結果を表1に示す。3つの抗体の培養細胞に対する特異性は互によく似ていた。即ちRCC細胞株6例中2例とのみ反応し, 他の被検がん細胞(37種), 末梢血白血球, AB型赤血球,

胎児腎, 正常甲状腺細胞とは反応しなかった. 又組織の凍結及びパラフィン切片の酵素抗体法による染色では, 腎癌では KRC-1 は 8 例中 3 例, KRC-3 では 2 例が

陽性であり, KRC-2 はすべて陰性であった. 又胃癌 (4 例), 結腸癌 (5 例), 甲状腺癌 (3 例), 乳癌 (2 例), 肺癌 (5 例), 食道癌 (1 例), や腎臓 (3 例),

Table 1. Reactivity of mouse monoclonal antibodies (KRC-1, -2, -3) against cell lines

Cell line		Reactivity		
		KRC-1	KRC-2	KRC-3
Ku-2	(renal cell cancer)	+ ¹⁾	+	+
KN41	"	+	+	+
Ko-RCC-1	"	-	-	-
NCC-75	"	-	-	-
ACHN	"	-	-	-
NRC-12	"	-	-	-
G401	(Wilms' tumor)	-	-	n.d.
KK47	(cancer of bladder)	-	-	-
T-24	"	-	-	-
NBT-2	"	-	-	-
Panc-1	(cancer of pancreas)	-	-	-
HGC-25	"	-	-	-
MIA-PaCa-2	"	-	-	-
Kato-III	(cancer of stomach)	-	-	-
MKN-1	"	-	-	-
MKN-28	"	-	-	-
MKN-45	"	-	-	-
TPC-1	(cancer of thyroid)	-	-	-
TPC-2	"	-	n.d.	n.d.
TPC-3	"	-	n.d.	n.d.
TUC-1	"	-	n.d.	n.d.
THC-4-JCK	"	-	-	-
C-1	(cancer of colon)	-	-	-
Colo-201	"	-	-	-
MC-63	(osteogenic sarcoma)	-	n.d.	n.d.
OST-1	"	-	n.d.	n.d.
IMR-32	(neuroblastoma)	-	n.d.	n.d.
ZR-75-1	(cancer of breast)	-	-	-
A204	(rhabdomyosarcoma)	-	-	-
HeLa	(cancer of uterus)	-	-	-
CHC-4	(hepatoma)	-	-	-
HOC-21	(cancer of ovary)	-	-	-
Hep-2	(cancer of larynx)	-	n.d.	n.d.
HMV-1	(melanoma)	-	-	-
PC-3	(cancer of lung)	-	-	-
BALL	(B-cell type ALL)	-	-	-
TALL	(T-cell type ALL)	-	n.d.	n.d.
CCRF-CEM	"	-	-	-
Daudi	(Burkitt's lymphoma)	-	-	-
RPMI826	(myeloma)	-	-	-
H1 60	(myelocytic leukemia)	-	-	-
THP-1	(monocytic leukemia)	-	-	-
K-562	(chronic myeloid leukemia)	-	-	-
HEK-14	(embryonal kidney cell)	-	-	-
Flow 4000	"	-	-	-
NTC-1	(normal thyroid cell)	-	n.d.	n.d.
normal peripheral blood leucocyte erythrocytes of AB type		-	-	-

Reactivity was determined by cell ELISA using 1:1000 dilution of ascites fluid.

1) +, optical density at 490 nm > 0.4; -, < 0.05; n.d., not done.

脾臓 (1例), 肺 (1例), 胃 (2例), 大腸 (3例), 小腸 (1例), 膵臓 (1例), 甲状腺 (1例), 肝臓 (1例) の正常組織に対しては三抗体共全てに陰性であった。

II. 抗原の性状

1. 抗原の分子量

KN41 を 1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 7.7) で可溶化した抗原抽出液を使い, ゲルろ過, イムブロットティング, アフィニティカラムを行って抗原の分子量をしらべた。まず Sephacryl S-300 で抗原を分離し, 一抗体サンドイッチ ELISA の測定を行った。図 1 に示すように高分子量 (約 1,200 kd) の KRC-2 抗原のみが検出され, KRC-1 と -3 抗原はこの方法では検出されなかった。そこで SDS-7.5% PAGE で抗原を分離した後, イムブロットティングし, PAP 法で染色した (図 2)。KRC-1 抗原のみが還元下で分子量 135 kd のバンドとして染め出された。この方法では, 他の 2 つの抗原は SDS による変性を受けたかもしれないので, SDS の影響を除くため, 抗原を AFFI-GEL 10 に KRC-3 を結合させたアフィニティカラムで精製した後 SDS-PAGE を行ったところ, 3 つのバンドが特異的に現われ, 対照物としての胃癌細胞株

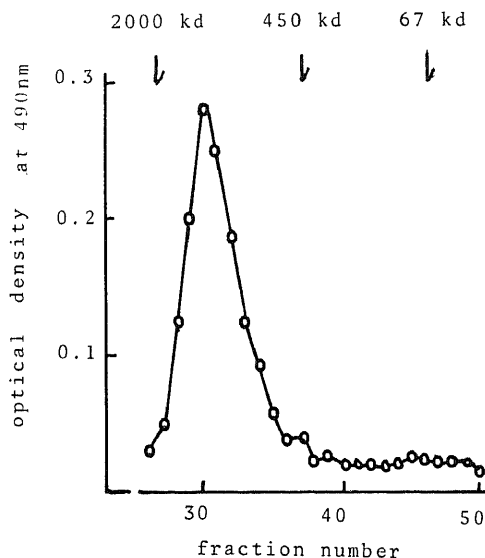


Fig. 1. Gel filtration of KRC-2 antigen solubilized from KN41 with 1% Triton X-100 on a Sephacryl S-300 column. KRC-2 antigen was assayed by a homologous sandwich ELISA. The fraction of the peak activity had an apparent MW of 1,200,000.

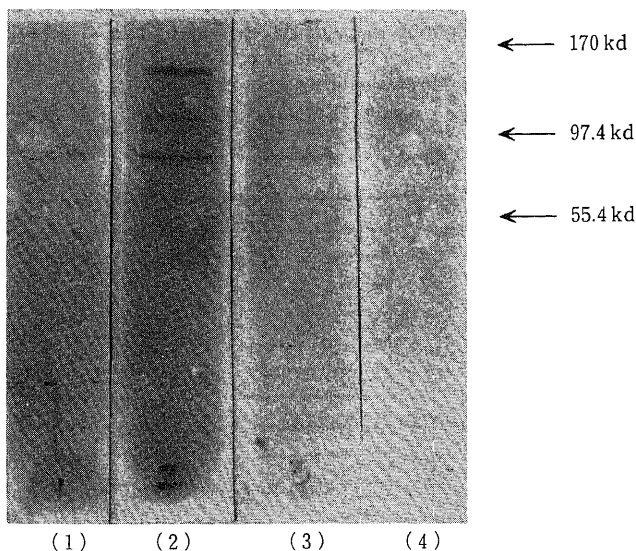


Fig. 2. Immunoblotting of KRC-1 antigen solubilized with 1% Triton X-100 from KN41 cells. Triton X-100 extract of KN41 cells was separated on a SDS-7.5% polyacrylamide gel and electrophoretically blotted to a nitrocellulose membrane. The blot was incubated with hybridoma supernatant and visualized by the PAP method. Monoclonal antibodies used: (1), P₃X63/Ag8; (2), KRC-1; (3), KRC-3; (4), KRC-2. Arrows indicate MW markers. A component with MW of 135,000 under reducing condition was visualized with KRC-1.

(Kato-III)の抗原を使った時には、バンドは現われなかった(図3)。

2. 化学的性質

まず抗原のレクチンへの親和性を調べた。抗原を、固相に吸着させた各々の抗体に結合させた後、レクチンを結合させて測定した。図4に示すように、3つの抗原は Con A と強く結合し、DBA と UEA I とは中

程度に WGA PNA, RCA I と SBA とは結合が弱かった。対照抗原として Kato-III について同様の実験を行ったがいずれのレクチンにも反応しなかった。次に Ku-2 細胞抗原のトリプシンとプロナーゼ E 処理による感受性を cell-ELISA によってしらべた。KRC-1 抗原では未処理の細胞に対してそれぞれ 28% と 22% に減少し KRC-2 抗原は二つのプロテアーゼで変化を

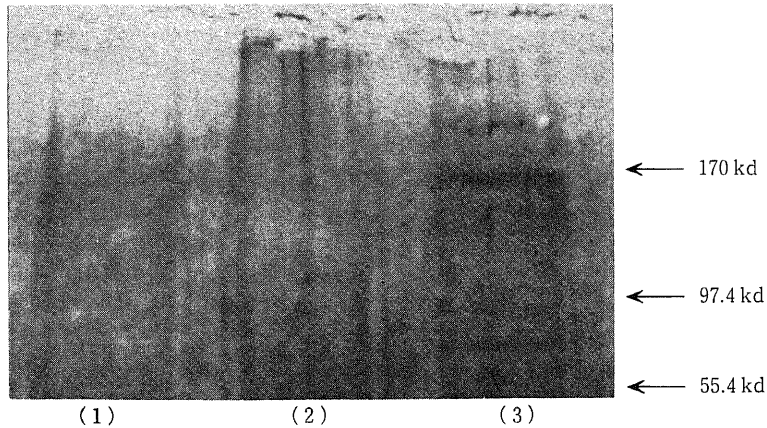


Fig. 3. Silver staining of KRC-3 antigen purified by affinity column chromatography. KRC-3 antigen was purified by and eluted from KRC-3 coupled Affi-Gel 10 column and subjected to SDS-7% PAGE. The gel was stained by a silver staining method. (1), extract of KRC-3 gel; (2), 1% Triton X-100 extract of Kato III (stomach cancer cell); (3), 1% Triton X-100 extract of KN41; Arrows indicate MW markers.

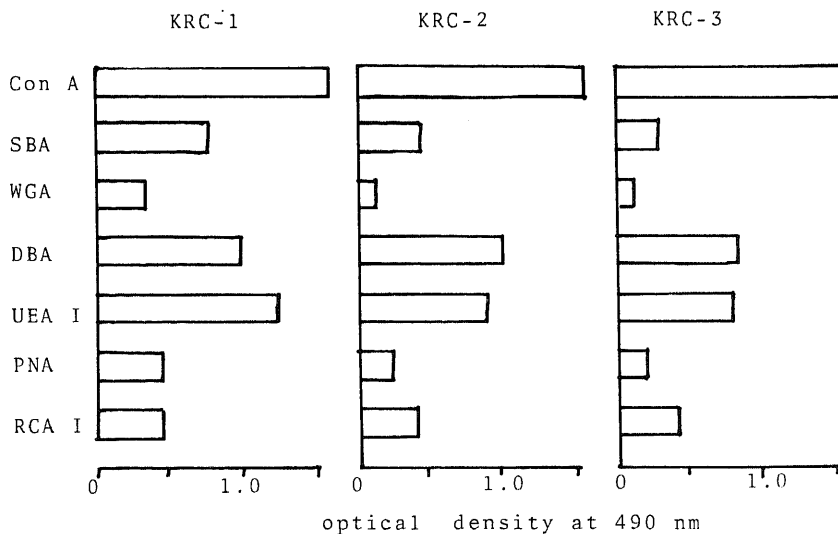


Fig. 4. Lectin affinity of KRC-1, KRC-2 and KRC-3 antigens.

The antigens were solubilized with 1% Triton X-100 from KN41 cells and added to KRC-1, -2, and -3 antibodies coated polyvinyl plates. The bound antigens were assayed for lectin affinity, using biotinylated lectins and streptavidin-peroxidase.

うけず、又 KRC-3 抗原では、トリプシンではほとんど影響をうけないが (84%)、プロナーゼ E では 14% に減少した。

III. がん細胞の成長に及ぼす影響

KRC-1, -2, -3 抗体が標的癌細胞の増殖に及ぼす影響を軟寒天培地と単層培地で調べた。この効果を示す最適条件を 24 マルチプレートを使って、細胞数、培地血清濃度及び抗体濃度について調べた。その結果、単層培養では 4×10^4 細胞/ウェル、ウシ胎児血清濃度 3% (寒天中では 10%)、培養上清では 10 倍、腹水では 200~500 倍希釈が最適条件であった。表 2 に示すよ

うに KRC-1 は単層培養ではがん細胞の増殖を促進させた。即ちこのアッセイ法では、対照実験との比は 1.43~1.52 (n=4) の値を示した。又軟寒天中でも 2.2~1.48 (n=4) の値であった。一方 KRC-3 は細胞の増殖を抑制する効果が見られた。培養上清では、対照実験との比は 0.33~0.71 (n=5)、腹水では、0.6~0.7 (n=4) の値を示した。次にこの効果の細胞特異性を調べた。表 3 と 4 に示すように、これらの抗体は cell-ELISA で陽性である Ku-2 と KN41 にのみ影響を与え、他の RCC 細胞株 (Ko-RCC-1) や膀胱癌 (Panc-1) には効果がなかった。KRC-2 も又軟寒天中で

Table 2. Effect of mouse monoclonal antibodies (MAb) KRC-1 and KRC-3 on Ku-2 cell growth in culture plate

Experimental number	MAb	cell number/well ($\times 10^2$)		
		with MAb ¹⁾	without MAb	ratio ²⁾
1	KRC-1	1920 \pm 256 ³⁾	1280 \pm 224	1.50
2	KRC-1	3870 \pm 400	2544 \pm 200	1.52
3	KRC-3	960 \pm 100	2096 \pm 336	0.46
4	KRC-3	2112 \pm 288	3056 \pm 344	0.69

1) In Exp. 1 and Exp. 3, hybridoma supernatant was added at 1:10 dilution. In Exp. 2 and 4, ascites fluid was added at 1:200.

2) Ratio of cell number in experiment culture with MAb to that of control culture without MAb.

3) Expressed as mean of duplicate determinations \pm S.D. (n=2).

Table 3. Cell line specificity of stimulation effect of mouse monoclonal antibody KRC-1 on tumor cell growth in soft agar

Tumor cell line	Colony number		
	with MAb ¹⁾	without MAb	ratio
Ku-2	2744 \pm 14	1673 \pm 175	1.64
KN41	768 \pm 144	494 \pm 13	1.55
Ko-RCC-1	469 \pm 20	427 \pm 49	1.09
Panc-1	624 \pm 51	553 \pm 35	1.13

1) Tumor cells were treated with ascites fluid at 1:500 dilution.

Table 4. Cell line specificity of suppression effect of mouse monoclonal antibody KRC-3 on tumor cell growth in tissue culture plate

Tumor cell line	Cell number/well ($\times 10^{-2}$)		
	with MAb ¹⁾	without MAb	ratio
Ku-2	1232 \pm 112	1760 \pm 152	0.70
Ko-RCC-1	906 \pm 260	789 \pm 72	1.15
Panc-1	1872 \pm 125	1680 \pm 74	1.11

1) Tumor cells were cultured in the present of ascites fluid at 1:300 dilution.

KN41の増殖を抑制する効果を示した。腹水500倍稀釈では、未処理群に比べ、細胞数は40%に低下した。対照抗体として、ELISAでRCC細胞と反応せず胃癌細胞に反応するIgG1タイプの胃癌MAbがKu-2とKn41に及ぼす効果と同じ条件下で調べたが、どんな効果も示さなかった。

考 察

腎細胞癌細胞株(Ku-2とKN41)をマウスに免疫してMAbを作製し、ヒト腎癌に特異性の高い3種類の抗体(KRC-1,-2,-3)を選び出した。3つの抗体は、調べた範囲では、一部のRCC細胞株やRCC組織とのみ反応し、他のがん細胞、正常組織とは反応しなかった。又岡田らが示した68kdのRCC関連抗原とも反応しなかった。今までに報告されている特異性の高いMAbでは、より高い比率でRCC細胞株や⁹RCC組織⁹を染めたり、又わずかではあるが他の癌にも反応するようなもの⁶であった。彼らは免疫原として手術で得たRCC細胞を直接か又はそれらを初代培養したものを使用している。このような抗原は、不均一で多様ながん細胞集団で、細胞表面に多様な癌抗原が発現しているが、KN41のような樹立化された細胞では癌細胞が均一であり、抗原が局限しているのであろう。癌組織を構成する癌細胞の内、培養に適応した細胞のみが樹立されるので、それが主な癌細胞の性格を反映するものかどうかは常に問題になる。本研究では実験2のように2種のRCC培養株Ku-2とKN-41を交互に免疫してRCCに共通性の高い癌関連抗原に対する免疫効果を高める試みを行った。診断、治療のためのMAb作製には、免疫原としてはさらに多くのRCC細胞株を使用する必要がある。目下数種類のRCC細胞株の交互免疫によるMAbの作製を検討中である。

KRC-1,-2,-3抗原は、今までに報告されたRCC抗原¹¹⁻¹²)とは異なる新しいRCC抗原である。即ち抗原のレクチンに対する親和性、プロテアーゼ処理、ゲルろ過、SDS-PAGEからのウエスタンブロッティング及び抗体アフィニティカラムによる抗原の精製などによってKRC-1抗原は135kdの糖蛋白質、KRC-2抗原は高分子量の糖質分子、KRC-3抗原は170kdを主成分とする糖蛋白質であった。

このような腎癌関連抗原ががん細胞内でどのような機能をもっているのだろうか。作製した抗体を使って癌細胞の増殖に及ぼす影響について軟寒天中と単層培養でしらべた。その結果KRC-1はcell-ELISAで陽性であったRCC細胞株(Ku-2とKN41)にだけ対照実験に対し増殖促進効果(平均150%,最大220%)を示し、又この効果はcell-ELISAの細胞株特異性と同一

結果を示した。がん細胞は本来増殖機能が高まっているにも拘らず、KRC-1が促進効果に寄与するという事は、がん患者の自己抗体が、癌細胞の増殖を促進する可能性を暗示しているのであろうか²¹。同系腫瘍に対する抗体産生系に於て、ここで得られたKRC-1の様な抗体が検出されるかどうかは興味深い問題である。In vitroの系で癌細胞の増殖を促進させる効果をもつポリクロナール抗体が報告されている²²⁾⁻²⁴⁾。最近Rosenblattらは抗アクチンモノクロナール抗体がマウスのL-cellに増殖促進効果をもつことを示した²⁵⁾。KRC-1は抗原の分子量や特異性からこれに相当しない。

一方KRC-2,-3はRCC細胞に対して抑制効果を示した。平均50%(最大67%)抑制の値はKRC-1の値が逆に150%促進していることが同じ測定法で同時に測定されたことにより有意の数値と考えられる。これらの抗体で標的がん細胞を1時間処理しても細胞の損傷は見られなかった。従ってこの効果は細胞傷害によるものではなくcytostatic effectによるものであろう。今までに抗癌MAbがin vitroでcytostatic mechanismによる増殖抑制効果を示すことが多く報告されている¹⁵⁾²⁶⁾⁻³¹⁾。しかしKRC-2,-3抗原は分子的性格からこれらと異ったものである。

これらのMAbによる癌細胞の増殖の調節機構はまだわからないが次のことが考えられる。正常細胞は培養して飽和状態になるとコンタクトインヒビションをおこして増殖は止まるが、癌細胞では増殖抑制因子に対する受容体の欠損又は変形によって増殖の抑制がからなくなってしまう。正常の増殖抑制因子はこのような受容体には結合できないがKRC-3のような増殖抑制に関係する抗体がこの変形受容体に結合して増殖抑制シグナルを出すのかもしれない。癌細胞は増殖因子(トランスフォーミンググロースファクター α ; epidermal growth factor, EGF; 未知のものなど)に対する受容体をもっており、がん化に伴ってその受容体が少し変化しているのかもしれない。最近ヒト癌細胞のEGF受容体のがん特異抗原があるという報告がなされた³²⁾。もしKRC-1ががん関連増殖因子受容体に結合して増殖促進シグナルを出すとその結果細胞の増殖が起こる。又KRC-3のような抗体が増殖因子受容体に結合し、増殖因子の結合を阻止し、その結果細胞増殖が抑制されるかもしれない。同じような機構が抗EGF受容体抗体の系で報告された。一つのタイプは抗EGF受容体抗体がEGFの結合を阻止し、更にEGF結合による初期と後期の生化学的応答を誘導する³³⁾。他のタイプはEGFの結合を阻止するがEGFによる効果を示さない。そしてEGFによるDNA合成の誘

導³⁴⁾ *in vivo* のがん細胞の増殖を抑制する³⁵⁾。

結論として新しい RCC 関連抗原が見つかり、それらはがん細胞の増殖の促進及び抑制に密接に関係していた。このようながん細胞の増殖を調節するような MAb は増殖を調節する細胞膜分子を検出したり、増殖調節因子によっておこる細胞内の信号伝達反応を分析するのに役立つ試薬として有用となるであろう。

結 論

ヒト腎細胞癌細胞株をマウスに免疫して、モノクローナル抗体を作製した。特異性の高い抗体を選び出し、これによって認識される抗原の物理化学的性質と、がん細胞の増殖に及ぼす影響を検討し以下の結果を得た。

1. 3種類の抗体 KRC-1, -2, -3 は一部の RCC 細胞とのみ反応し、他のがん細胞、正常組織とは反応しなかった。

2. 抗原は分子量と特異性から、今までに報告されていない新しい RCC 関連抗原であった。KRC-1 抗原は 135 kd の糖蛋白、KRC-2 抗原は高分子量の糖分子、KRC-3 抗原は 170 kd を主成分とする糖蛋白であった。

3. これらの抗体の *in vitro* でのがん細胞の増殖に及ぼす影響は KRC-1 では増殖促進 (対照の 220% - 150%) を KRC-2, -3 では増殖抑制 (対照の 50%) を示すことがわかった。

以上のことから、RCC に特異性が高い抗原が RCC 細胞株に存在し、これらはがん細胞の増殖の調節作用に密接に関連していることが示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました山本健一教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の機会と御指導、御援助を頂きました倉田自章前教授に厚く感謝致します。直接御指導、御助言、御協力を頂いた金沢大がん研究所分子免疫部、徳山先生に心から感謝し、また御協力、御支援を頂いた岡田先生、佐藤先生、並びに病態生理部の皆様に謝意を表します。

本論文の要旨の一部は、第 44 回日本癌学会 (昭和 60 年 10 月 東京)、第 45 回同学会 (昭和 61 年 10 月 札幌)、Hybridoma, 7, 155-165 (1988). において発表した。

文 献

1) Ueda, R., Ogata, S., Morrissey, D. M., Finstad, C. L., Szkudlarek, J., Whitmore, W. F., Oettgen, H. F., Lloyd, K. O. & Old, L. J.: Cell surface antigens of human renal cancer defined by mouse monoclonal antibodies: Identification of tissue-specific kidney glycoproteins. Proc. Natl.

Acad. Sci. U.S.A., 78, 5122-5126 (1981).

2) Finstad, C. L., Cordon-Cardo, C., Bander, N. H., Whitmore, W. F., Melamed, M. R. & Old L. J.: Specificity analysis of mouse monoclonal antibodies defining cell surface antigens of human renal cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 2955-2959 (1985).

3) Moon, T. D., Vessella, R. L., Palme, D. F., Nowak, J. A. & Lange, P. H.: A highly restricted antigen for renal cell carcinoma defined by a monoclonal antibody. Hybridoma, 4, 163-171 (1985).

4) Schärfe, T., Becht, E., Kaltwasser, R., Thüroff, J. W., Jacobi, G. H. & Hohenfellner, R.: Tumor-specific monoclonal antibodies for renal cell carcinoma. Eur. Urol., 11, 117-120 (1985).

5) Luner, S. J., Ghose, T., Chatterjee, S., Cruz, H. N. & Belitsky, P.: Monoclonal antibodies to kidney and tumor-associated surface antigens of human renal cell carcinoma. Cancer Res., 46, 5816-5820 (1986).

6) Oosterwijk, E., Ruiter, D. J., Hoedemaeker, P. J., Pauwels, E. K. J., Jonas, U., Zwartendijk, J. & Warnaar, S. O.: Monoclonal antibody G250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney. Int. J. Cancer, 38, 489-494 (1986).

7) Cordon-Cardo, C., Bander, N. H., Fradet, Y., Finstad, C. L., Whitmore W. F., Lloyd, K. O., Oettgen, H. F., Melamed, M. R. & Old, L. J.: Immunoanatomic dissection of the human urinary tract by monoclonal antibodies. J. Histochem. Cytochem., 32, 1035-1040 (1984).

8) Tagliabue, E., Canevari, S., Menard, S., Fossati, G., Balsari, A., Torre, G. D. & Colnaghi, M. I.: Human renal antigen defined by a murine monoclonal antibody. J. Natl. Cancer Inst., 73, 363-369 (1984).

9) Andy, R. J., Finstad, C. L., Old, L. J., Lloyd, K. O. & Kornfeld, R.: The antigen identified by a mouse monoclonal antibody raised against human renal cancer cells is the adenosine deaminase binding protein. J. Biol. Chem., 259, 12844-12849 (1984).

10) Oosterwijk, E., Ruiter, D. J., Wakka, J. C., Huiskens, J. W., Meij, V. D., Jonas, U., Fleuren, G. J., Zwartendijk, J., Hoedemaeker, P. & Warnaar, S. O.: Immunohistochemical analysis of

- monoclonal antibodies to renal antigens. Application in the diagnosis of renal cell carcinoma. *Am. J. Pathol.*, **123**, 301-309 (1986).
- 11) **Wahlström, T., Suni, J., Nieminen, P., Närvänen, A., Lehtonen, T. & Vaheri, A.**: Renal cell adenocarcinoma and retrovirus p30-related antigen excreted to urine. *Lab. Invest.*, **53**, 464-469 (1985).
- 12) 岡田収司, 佐藤信生, 倉田自章: ヒト腎細胞癌抗原 第42回日本癌学会総会抄録, 156 (1983).
- 13) **Kennett, R. H.**: Fusion protocol. Fusion by centrifugation of cells suspended in polyethylene glycol. In Kennett, R. H., McKearn, T. J. & Bechtol, K. B. (eds), *Monoclonal Antibodies. Hybridoma: A New Dimension in Biological Analysis*, p365-367, Plenum Press, New York & London, 1980.
- 14) **Kennett, R. H.**: Enzyme-linked antibody assay with cells attached to polyvinylchloride plates. *ibid.*, 376-377 (1980).
- 15) **Tong, A. W., Lee, J. & Stone, M. J.**: Characterization of two human small cell lung carcinoma-reactive monoclonal antibodies generated by a novel immunization approach. *Cancer Res.*, **44**, 4987-4992 (1984).
- 16) **Straus, W.**: Imidazole increases the sensitivity of the cytochemical reaction for peroxidase with diaminobenzidine at a neutral pH. *J. Histochem. Cytochem.*, **30**, 491-493 (1982).
- 17) **Laemmli, U. K.**: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, **227**, 680-685 (1970).
- 18) **Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J.**: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4350-4354 (1979).
- 19) **Guesdon, J. L., Ternynck, T. & Avrameas, S.**: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, **27**, 1131-1139 (1979).
- 20) **Staehelin, T., Hobbs, D. S., Kung, H. -f., Lai, C. -Y. & Pestka, S.**: Purification and characterization of recombinant human leukocyte interferon (IFLrA) with monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.*, **256**, 9750-9754 (1981).
- 21) **Prehn, R. T.**: The immune reaction as a stimulator of tumor growth. *Science*, **176**, 170-171 (1972).
- 22) **Shearer, W. T., Philpott, G. W. & Parker, C. W.**: Stimulation of cells by antibody. *Science*, **182**, 1357-1359 (1973).
- 23) **Shearer, W. T., Philpott, G. W. & Parker, C. W.**: Humoral immunostimulation. II. Increased nucleoside incorporation, DNA synthesis and cell growth in L cells treated with anti-L cell antibody. *Cell. Immunol.*, **17**, 447-462 (1975).
- 24) **Ryan, W. L. & Durick, M. A.**: Antibody stimulation of tumor cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **155**, 420-423 (1977).
- 25) **Rosenblatt, H. M., Parikh, N., McClure, J. E., Meza, I., Hwo, S., Bryan, J. & Shearer, W. T.**: Mitogen-like monoclonal anti-actin antibodies. *J. Immunol.*, **135**, 995-1000 (1985).
- 26) **Byrd, R. L., Jonak, Z. L. & Kennett, R. H.**: Monoclonal antibodies against human neuroblastomas and leukemias: Detection of metastasis and of molecules involved in growth regulation. In: Mitchell M. S. and Oettgen H. F. (eds) *Hybridomas in Cancer Diagnosis and Treatment*. p219-229, Raven Press, New York, 1982.
- 27) **Harper, J. R. & Reisfeld, R. A.**: Inhibition of anchorage-independent growth of human melanoma cells by a monoclonal antibody to a chondroitin sulfate proteoglycan. *J. Natl. Cancer Inst.*, **71**, 259-263 (1983).
- 28) **Dippold, W. G., Knuth, A. & zum Büschenfelde, K. -H. M.**: Inhibition of human melanoma cell growth in vitro by monoclonal anti-G_{D3}-ganglioside antibody. *Cancer Res.*, **44**, 806-810 (1984).
- 29) **Vollmers, H. P., Imhof, B. A., Wieland, I., Hiesel, A. & Birchmeier, W.**: Monoclonal antibodies NORM-1 and NORM-2 induce more normal behavior of tumor cells in vitro and reduce tumor growth in vivo. *Cell*, **40**, 547-557 (1985).
- 30) **Drebin, J. A., Link, V. C., Stern, D. F., Weinberg, R. A. & Greene, M. I.**: Down-modulation of an oncogene protein product and reversion of the transformed phenotype by monoclonal antibodies. *Cell*, **41**, 695-706 (1985).
- 31) **Wieland, I., Müller, G., Braun, S. & Birchmeier, W.**: Reversion of the transformed phenotype of B16 mouse melanoma: Involvement

of an 83 kd cell surface glycoprotein in specific growth inhibition. *Cell*, **47**, 675-685 (1986).

32) Basu, A., Murthy, U., Rodeck, U., Herlyn, M., Mattes, L. & Das M.: Presence of tumor-associated antigens in epidermal growth factor receptors from different human carcinomas. *Cancer Res.*, **47**, 2531-2536 (1987).

33) Schreiber, A. B., Lax, I., Yarden, Y., Eshhar, Z. & Schlessinger J.: Monoclonal antibodies against receptor for epidermal growth factor induce early and delayed effects of

epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.*, **78**, 7535-7539 (1981).

34) Haigler, H. T. & Carpenter, G.: Production and characterization of antibody blocking epidermal growth factor: Receptor interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, **598**, 314-325 (1980).

35) Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G. & Mendelsohn, J.: Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, **44**, 1002-1007 (1984).

Characterization of Mouse Monoclonal Antibodies Specific for Human Renal Cell Carcinoma: Effect on Tumor Cell Growth in vitro Yukiko Tokuyama, Department of Pathophysiology, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **97**, 569—579 (1988)

Key words: renal cell carcinoma, monoclonal antibody, tumor antigen, growth modulation

Abstract

Three mouse monoclonal antibodies (MAbs), KRC-1, -2 and -3 (IgG1) were produced against human renal cell carcinoma (RCC) cell lines. All of them had restricted specificity for subset of RCC, but did not react with other tumor cell lines, tumor and normal tissues including kidney. The effect of these MAbs on the tumor cell growth in vitro was examined both in soft agar and in plate culture systems. All of them modulated the tumor cell growth: KRC-1 showed stimulation, while others (KRC-2 and -3) showed suppression. KRC-1 detected a 135 kd glycoprotein in immunoblotting. KRC-2 detected a high molecular weight antigen (ca. 1200 kd) in gel filtration. KRC-3 detected 170 kd (major), 88 kd and 210 kd glycoproteins by antibody affinity purification. All of the antigens showed affinity for Con-A lectin. Molecular properties of these antigens appeared to be different from previously reported RCC-associated antigens. These three MAbs seem to be useful for studying the mechanism of cell growth regulation in transformed cells.