

# Properties of a Wilms' Tumor (Nephroblastoma)-Specific Antigen

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/2297/7922">http://hdl.handle.net/2297/7922</a>

## ウィルムス腫瘍（腎芽腫）特異抗原の性状

金沢大学がん研究所病態生理部（主任：倉田自章教授）

山 本 博

（昭和62年1月10日受付）

ヒト・ウィルムス腫瘍（腎芽細胞腫）の不溶分画を抽出し、デオキシコール酸塩により可溶化した。可溶化分画中の凝集物を除いたものでモルモットを免疫し、ポリクローナル抗血清を作製した。1抗血清（ $\alpha$ W4）を選択し、血清及び腎、肝、脾、肺、大腸癌のホモジネートによる十分な吸収を加えたものを以後の実験に使用した。抗血清はELISAにより被検4例のウィルムス腫瘍全例、胎児腎、胃癌4例中1例、肺癌2例中1例と多少とも高い値を示したが、他の胎児・成人臓器、他の被検腫瘍とは反応しなかった。ウィルムス腫瘍の抗原はアガロースゲル電気泳動では $\beta_2$ - $\gamma$ の泳動度を示し、同領域を切出して抽出した成分についてウェスタンブロッティングを行うと、58Kdの単一なバンドが $\alpha$ W4によって染めだされた。ELISAでやや高い値を示したウィルムス腫瘍以外の材料には58Kdの抗原は認められなかった。エンドグリコシダーゼHで処理すると58Kdの抗原は54Kdに変化し、抗原が糖蛋白であることを示した。この58Kd抗原を $^{125}$ I-EGFと反応させた後、disuccinimidyl suberateで共有結合させ、SDS-PAGE後オートラジオグラフィーを行うと64Kdのバンドが生じた。反応液に大量の非標識EGFを共存させると同バンドは生じなかった。この成績はウィルムス腫瘍の腫瘍特異または腫瘍に高度に関連する58Kdの抗原（EGF受容体）があることを暗示する。

---

**Key words** Wilms' tumor, tumor antigen, epidermal growth factor

---

癌の免疫診断・治療にとって必須の条件は癌特異な抗原あるいは少なくとも癌に高度に関連する抗原が存在することである。

Hellströmら<sup>1)</sup>が幾種類かの腫瘍の患者リンパ球がそれぞれの腫瘍の培養細胞を概ね特異的に障害することを示して以来、ヒト腫瘍抗原の免疫学的研究は活発になり、ウィルムス腫瘍（腎芽腫）についての分析もいくつか行われた。リンパ球による細胞障害試験では、ウィルムス腫瘍と腎細胞癌のあいだに交差反応があるにせよ、一応ウィルムス腫瘍に対する特異性が患者リンパ球に認められた<sup>2)-4)</sup>。患者血清による蛍光抗体法でも少数例ながらウィルムス腫瘍細胞と特異的な反応を示す抗体の出現が見いだされた<sup>5)6)</sup>。つぎの研究段階として、腫瘍から抗原分画を抽出して異種抗血清を作り、それによって抗原分析を行う試みがなされている。

まずエチレンジアミン四酢酸塩液によってウィルムス腫瘍から糖蛋白性の異常成分がいくつか見つけられた。異常細胞外成分<sup>7)</sup>、W-抗原<sup>8)</sup>、fetuin抗原<sup>9)</sup>、あるいは前者に関連する抗原<sup>10)</sup>、などがそれである。しかしそれらの抗原にはウィルムス腫瘍例内の分布が狭いとか、他腫瘍にも出現するなどの問題点がある。その後教室のOkadaら<sup>11)</sup>はウィルムス腫瘍の不溶分画をデオキシコール酸塩溶液で可溶化した分画に腫瘍特異と思われる細胞膜性抗原の存在することを示した。しかし検査例数は少なく、測定系もゲル内拡散法を主としており、抗原の性状もあまり正確にわかっていない。そこで筆者は酵素免疫測定法（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）を用い、同分画についての分析を再度行い、新しい知見を得たので報告する。

---

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; CEA, carcinoembryonic antigen; DMSO, dimethylsulphoxide; DOC, desoxycholate; EGF, epidermal growth factor; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; PBS, phosphate-buffered saline; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis.

## 材料および方法

### I. 組織と細胞

ウィルス腫瘍 4 例 (W1, 大巢型; W2, 上皮型; W3, 小巢型; W4, 大巢型<sup>12)</sup>) および対照とした他の腫瘍はいずれも手術時に入手したものである。正常人臓器は数例の非癌患者の剖検時に入手した。胎児臓器は数例の中絶胎児 (5~6 カ月) から得られた。いずれも入手後直ちにポリスチレン袋内に密閉し、使用時まで $-30^{\circ}\text{C}$  に保存した。なお一部の組織は小片を瞬間凍結して小試験管に入れ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し、免疫蛍光法用の試料とした。

生細胞免疫蛍光法には以下のヒト培養細胞株: TuWi (ウィルス腫瘍), ACHN (腎細胞癌), Panc-1 (膵癌), Flow4000 (胎児腎, 正常 2 倍体), HEK (胎児腎), MKN-28 (胃腺癌), PC-3 (肺腺癌) を使用した。はじめの 4 株は Flow Laboratories Inc., U.S.A. より購入した。HEK は本学がん研ウィルス部 (波田野基一教授), MKN-28 は新潟大病理 (鈴木光助教授), PC-3 は東京医大外科 (早田義博教授) より御恵与を受けたものである。それぞれの指定培地に増殖させたものを使用した。

### II. 抗原分画の作製

凍結組織を解凍し, Okada ら<sup>13)</sup>の方法により, 不溶分画の抽出と可溶化を行った。不溶分画のデオキシコール酸塩による可溶化操作はつづけて 2 回行い, 上清をあわせてアセトン処理をおこなった。セファローズ 4B によるゲル濾過で低分子量ピーク (本論文では  $P_2$  と呼ぶ) をセロファンチューブに入れ, 冷室内で扇風機にあてて濃縮した。Lowry ら<sup>13)</sup>の方法で蛋白を定量後, 使用時まで $-20^{\circ}\text{C}$  に保存した。ELISA 用の被検試料とする場合には,  $P_2$ 分画を Blue-Sepharose CL-6B (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) のカラム ( $1.5 \times 4$  cm) を通してアルブミンと排除容量に溶出される凝集物を除去し, 遅れて溶出される主ピークをプールし,  $0.5 \sim 1$  mg 蛋白/ml に濃縮して $-20^{\circ}\text{C}$  に保存した。

### III. 抗血清の作製と吸収

体重約 400 g のモルモットに, 1 回 1 ml の抗原液 (ウィルス腫瘍  $P_2$  分画を 5 または 10 mg 蛋白) を同量の Freund 完全アジュバンドで乳化して肩甲骨下腔に分割注射した。4~8 週間に 3~5 回注射を行い, 最終注射の 1 週後に心採血した。6 種の抗血清  $\alpha$ W1-1,  $\alpha$ W1-2,  $\alpha$ W1-3,  $\alpha$ W2,  $\alpha$ W3,  $\alpha$ W4, を作製したが, 活性と特異性の上で  $\alpha$ W4 (1 回 5 mg 蛋白の  $P_2$  を 0, 7, 14, 42, 49 日目に注射し, 56 日目採血) が最も良い成績を示したので, 以後の実験はすべてこの抗血清

を使用して行った。抗血清は小試験管に分割して使用時まで $-20^{\circ}\text{C}$  に保存し, 使いすてにして凍結・融解の反復を避けた。ELISA および免疫プロットのためには抗血清に以下の吸収操作を加えた。抗血清 100  $\mu$ l あたり正常ヒト血清 20 ml, 正常腎ホモジネート 20 ml, 正常肝ホモジネート 20 ml, 正常脾ホモジネート 5 ml, 正常肺ホモジネート 5 ml, 大腸癌ホモジネート (carcinoembryonic antigen, CEA の粗標品として) 10 ml を加えて室温に 1 時間おき, ついで  $4 \sim 8^{\circ}\text{C}$  で 1 夜低速回転した。遠心上清に等量の 0.2 M 酢酸ナトリウム溶液を加えて  $0^{\circ}\text{C}$  に 30 分静置し, その遠心上清に氷冷下で攪拌しながら飽和硫酸アンモニウム液を滴下して 33% 飽和とし, 生じた沈澱をとって少量の稀釈液 (0.05% Tween<sup>®</sup> 20, 0.5% ウシ血清アルブミンを含む 0.01 M リン酸緩衝液, pH 7.4) に溶かし, 終濃度 0.1% に窒化ナトリウムを加え, 液量を 25 ml として  $4^{\circ}\text{C}$  に保存した。使用時にさらに稀釈液で 2 倍 (原血清の 500 倍稀釈) にうすめて使用した。なお, 吸収用のホモジネートはいずれも 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) - 生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) による 25% (W/V) ホモジネートである。また遠心はすべて冷却遠心器を使用して 10,000  $\times$  g, 30 分を行った。蛍光抗体法のための抗血清は以下のような吸収を行った。抗血清 100  $\mu$ l あたり正常ヒト血清 4 ml, 正常腎ホモジネート 0.6 ml, ヒト大腸癌ホモジネート 0.2 ml を加え, 1 時間静置後 1 夜  $4 \sim 8^{\circ}\text{C}$  で低速回転を行い, 遠心上清に終濃度 0.1% になるように窒化ナトリウムを加え, PBS で 1 ml (原抗血清の 10 倍稀釈) として  $4^{\circ}\text{C}$  に保存した。

### IV. 免疫学的検査法

#### 1. ELISA

96 穴ビニール測定プレート (Coster, U.S.A.) の各ウエルに 0.01 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で 50  $\mu$ g 蛋白/ml に稀釈した抗原試料 50  $\mu$ l ずつ入れ,  $37^{\circ}\text{C}$  1 時間静置後洗浄液 (0.05% Tween 20 を含む 0.01 MPBS) で 3 回洗浄した。

1% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) - PBS 100  $\mu$ l を加えて  $37^{\circ}\text{C}$  30 分おき, 3 回洗浄後に 1 次抗血清 (原血清の 500 倍稀釈) 50  $\mu$ l を加えて  $37^{\circ}\text{C}$  1 時間おいた。3 回洗浄後パーオキシダーゼ標識ウサギ抗モルモット免疫グロブリン (DAKO, Denmark) の 1000 倍稀釈液 50  $\mu$ l を加えて  $37^{\circ}\text{C}$  30 分おき, 6 回洗浄を行った。リン酸・クエン酸緩衝液 (pH 4.8) で 1 回洗浄後, 同緩衝液 10 ml, o-フェニレンジアミン 10 mg, 30% 過酸化水素 5  $\mu$ l の新製溶液を 100  $\mu$ l 加えて室温 15 分後に EIA reader EL307 (Biotek Instrument Inc., U.S.A.) により各ウエルの吸光

度を測定した。なお、1次抗血清に市販の家兎抗血清を使用した場合には2次抗血清としてパーオキシダーゼ標識抗IgG(羊)(Cappel Laboratories Inc., U.S.A.)の1000倍稀釈液を使用した。

## 2. 蛍光抗体法

生細胞膜免疫蛍光法にはトリプシン処理で遠離させた培養細胞を冷PBSで洗浄し、 $50\times g$ 、5分遠心して約 $4\times 10^6$ 個の細胞を含むPBS  $50\mu l$ を残した。蛍光抗体用吸収抗血清(原血清の10倍稀釈)の $50\mu l$ を加えて $0^\circ C$ に60分おいた。冷PBSで2回洗浄後FITC標識抗モルモットIgG(MBL社、名古屋)のPBSによる20倍稀釈液 $100\mu l$ を加えて $0^\circ C$ 30分おいた。冷PBSで2回洗浄後グリセリン-PBSで封入した。干渉フィルター2枚を設置したオリンパス蛍光顕微鏡BH・RFLで観察・撮影した。

組織切片についての蛍光抗体法には、クリオスタット切片(未固定、厚さ約 $10\mu m$ )を $37^\circ C$ 30分乾燥後、吸収抗血清の5倍稀釈(原血清の50倍積)を1次抗血清として室温1時間、FITC標識抗体(上述)の25倍稀釈を2次抗体として室温30分反応させた。

## V. 生化学的検査

### 1. アガロースゲル電気泳動

アガロース(SeaKem® HE, MFC corporation, Marine Colloids Div. U.S.A.)1%(W/V)によるゲルプレート(厚さ2mm)を作り、バルビタール緩衝液(pH 8.6,  $\mu=0.025$ )を溶媒としてアルブミンを除去した $P_2$ 分画を $2.5\text{mA/cm}$ で90分泳動した。泳動域を原点から陽極側を5mm間隔で10等分、陰極側を6等分し、それぞれリボン状のゲルを切出し、0.05M炭酸緩衝液(pH 9.6)により $4^\circ C$ 1夜抽出してELISAを行った。また後述のウエスタンブロッティングの試料には、約 $50\mu g$ 蛋白のアルブミンを除去した $P_2$ 分画をアガロースゲルで泳動し、陽極側5mm、陰極側15mm( $\beta_2$ - $\gamma$ 領域)のゲルを切り出して少量のPBSで2回抽出し、ELISAで活性を測定後抽出液をセロファンチューブに入れて冷室内でAquacide II-A®(Calbiochem. U.S.A.)内にうずめて約 $100\mu l$ に濃縮したものを使用した。

### 2. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmli<sup>14)</sup>の方法に従いSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)を行った。10%ポリアクリルアミドゲルプレート( $75\times 90\times 1\text{mm}$ )を作り、スラブディスク電気泳動装置(SJ-1060MSD, ATTO, 東京)を使用して $2.5\text{mA/cm}$ で90分間泳動した。分子量マーカーとしてSDS-PAGE用分子量マーカー(オリエンタル酵母, 大阪)を使用し、

マーカーの染色はSilver stain®キット(Bio-Rad Laboratories. U.S.A.)によった。

### 3. ウエスタンブロッティング

SDS-PAGEを行ったゲルからSDS存在下Durapor®(Millipore Corp., U.S.A.)への転写を行った<sup>15)</sup>。電圧勾配は $7\text{V/cm}$ として5時間転写を行い、転写後の膜は以下のように染色した。

0.05%(V/V)Tween20-0.01MPBSで振盪しながら15分3回洗浄後、3%BSA-0.01MPBS中に $4^\circ C$ 1夜おいた。上述同様15分3回の洗浄後、吸収 $\alpha W4$ (500倍稀釈)を室温1時間反応させた。15分3回洗浄後、Vectastain®ABCキット(モルモットIgGキット, Vector Laboratories, Inc., U.S.A.)によるavidin-biotin-peroxidase complex(ABC)法を行った。発色はStreitら<sup>16)</sup>の方法を用いた。

### 4. エンドグリコシダーゼによる糖分解

アルブミンを除去した $P_2$ 分画をアガロースゲル電気泳動にかけ、 $\beta_2$ - $\gamma$ 領域を切出して抽出した抗原分画を用い、エンドグリコシダーゼ $H^{17}$ (放線菌(生化学工業, 東京)による糖の分解をOwenら<sup>18)</sup>に従って行った。処理前後の抗原についてウエスタンブロッティングを行い、分子量の変化を測定した。

### 5. 上皮細胞増殖因子(epidermal growth factor, EGF)の結合実験

転写を行ったDurapor膜を4等分し、3%BSA含有0.01MPBSでブロッキング後それぞれを(1)溶媒0.1%BSA-0.01MPBS, (2)(3)溶媒1mlあたり $10\mu g$ ヒト上皮細胞増殖因子(湧永製薬, 大阪), (4)同上溶媒1mlあたり $10\mu g$ インシュリン(ウシ由来, Sigma)に室温1時間インキュベートした。洗浄後(1)(2)(4)は $\alpha W4$ , (3)は抗ヒト上皮増殖因子(hEGF)モノクローナル抗体(湧永製薬, 大阪)を1次抗体としてABC染色を行った。

## 成 績

### I. 吸収抗血清によるELISAの成績

吸収抗ウィルムス腫瘍抗血清 $\alpha W4$ を使用し、正常の成人ならびに胎児組織と各腫瘍の抽出液( $P_2$ 分画)についてELISAを行った結果を表1に示す。492nmの吸光度0.02以下を-, 0.02~0.1を±, 0.1~0.2を+, 0.2以上を++とすると、ウィルムス腫瘍4例は吸光度0.34, 0.17, 0.13, 0.29ですべて+~++であった。成人臓器はすべて0.01以下の-を示し、胎児臓器は腎が0.03の±を示した以外はすべて0.01以下であった。他種腫瘍では胃癌4例中の1例(No.4)が+(0.17)。肝癌2例中の1例(No.1)が±(0.08)を示した以外はすべての被検腫瘍が陰性値を示した。なお、

ウィルムス腫瘍以外の多少とも高い吸光度を示した試料は後に免疫プロットングによる分析を行った。

II. 吸収抗血清による免疫蛍光

吸収抗血清  $\alpha$ W4 を用い生細胞膜免疫蛍光法を行った結果は TuWi (ウィルムス腫瘍) が細胞膜のリング状染色をしめし (図 1a), ACHN (腎細胞癌) (図 1b), Panc-1 (膵癌), PC-3 (肺腺癌), MKN-28 (胃腺癌) はいずれも陰性像を示した。Flow4000 (胎児腎) (図 1c) は陰性であったが, HEK (胎児腎由来) は陽性像を示した。HEK については後に免疫プロットングによる分析を行った。

ウィルムス腫瘍のクリオシュタット切片 (未固定) について間接蛍光抗体法を行ってみると, ウィルムス腫瘍細胞の細胞膜の陽性染色像が認められた (図 1d)。

III. ウィルムス腫瘍抗原の性状

ウィルムス腫瘍の P<sub>2</sub> 標品についてアルブミン除去

後, アガロースゲル電気泳動を行った結果を図 2 に示す。吸収  $\alpha$ W4 による ELISA で  $\beta_2$ - $\gamma$  泳動度の部分に抗原活性ピークが認められた。

ウィルムス腫瘍とウィルムス腫瘍細胞株, ELISA で多少とも高値を示した胎児腎, 胃癌 No. 4, 膀胱 No. 1, 免疫蛍光法で陽性像を示した細胞株 HEK の試料についてウェスタンプロットングを行い, 吸収  $\alpha$ W4 による ABC 法 (一部は silver stain 染色) を行った結果を図 3 に示す。ウィルムス腫瘍の P<sub>2</sub> 分画 (レーン a) は 58Kd のバンドと主にアルブミンによる幅広いバンドが目立ち, Blue Spharose CL-6B カラムを通した P<sub>2</sub> 分画 (レーン b) では後者のバンドはほとんど消失している。同試料をアガロース電気泳動にかけ,  $\beta_2$ - $\gamma$  泳動度域を切出して抽出したもの (レーン c) は 58Kd のバンドのみが示された。培養株 TuWi についてもかすかながら 58Kd のバンドの存在が認められた (レーン d)。一方, 同様に抽出した胎児腎の材料 (レーン e)

Table 1. Reactivity of an absorbed anti-Wilms' tumor antiserum  $\alpha$ W4 against antigenic fractions of various tissues, determined by an enzyme-linked immunosorbent assay

tissue	reactivity	tissue	reactivity
Normal adult organs		renal cell carcinoma	
brain	— <sup>a</sup>	1	—
heart	—	2	—
lung	—	3	—
liver	—	4	—
stomach	—	5	—
pancreas	—	lung cancers	
spleen	—	squamous	—
kidney	—	small cell	—
ovary	—	large cell	—
serum	—	stomach cancer	
Fetal organs		1	—
heart	—	2	—
lung	—	3	—
liver	—	4	+
stomach	—	breast cancer	
pancreas	—	1	—
spleen	—	2	—
kidney	—	pancreas cancer	
adrenal gland	± <sup>b</sup>	1	±
	—	2	—
Neoplastic tissues		colon cancer	—
Wilms' tumor		prostate cancer	—
1	++ <sup>d</sup>	leiomyosarcoma	—
2	+ <sup>c</sup>	leiomyoblastoma	—
3	+	rhabdomyosarcoma	—
4	++	fibrosarcoma	—
		giant cell sarcoma	—

a—, absorbance at 492 nm less than 0.02 in an enzyme-linked immunosorbent assay; b±, absorbance between 0.02 and 0.1; c+, absorbance between 0.1 and 0.2; d++, absorbance more than 0.2.

にはより高分子のバンドは存在したが、58Kdのバンドはなく、胃癌 No. 4 (レーン f) や肺癌 NO. 1 (レーン g) についても 58Kd のバンドは認められなかった。培養株 HEK (レーン h) でも低分子のバンドは存在したが、58Kd のバンドは存在しなかった。ウィルムス腫瘍標品についてエンドグリコシターゼ H による糖分解を行ったのち同様にプロットィングを行うと約 54Kd のバンドが生じた (図 3, レーン i)。

Durapor 膜に転写したウィルムス腫瘍抗原に EGF を反応させたのち吸収  $\alpha$ W4 により ABC 染色を行うと明らかに 58Kd バンドの染色性の低下が見られた (図 4, レーン a, b)。対照としてインスリンを反応させた場合には 58Kd バンドの染色性低下は起こらなかった (図 4, レーン c)。ウィルムス腫瘍の 58Kd バンドは EGF を反応させた後、抗ヒト EGF モノクローナル抗体で染色しても染め出された (図 4, レーン d)。このことは  $\alpha$ W4 が抗 EGF 受容体抗体活性をも

ち、58Kd の抗原分子には EGF 受容体活性のあることを暗示する。

そこで  $^{125}\text{I}$ -EGF による結合実験を以下のように行った。

W4 の  $\beta_2\sim\gamma$  分画 5  $\mu\text{g}$  に  $^{125}\text{I}$ -EGF (100  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ , Amersham, International Plc. England) 5 ng を加え、25°C, 30 分静置した後、0.1 M の disuccinimidyl suberate-DMSO を 5  $\mu\text{l}$  加え、37°C, 30 分反応させ<sup>19)</sup>、SDS-PAGE, オートラジオグラフィーを行い 64Kd の単一バンドを認めた (図 4 レーン e)。なお、 $^{125}\text{I}$ EGF と同時に 1  $\mu\text{g}$  のヒト EGF を加えて同様操作を行ったところ、このバンドは出現しなかった。

#### 考 察

吸収抗血清  $\alpha$ W4 を用いた ELISA の成績はウィルムス腫瘍に高度に関連する抗原の存在することを暗示した。対照材料のごく一部にやや高値を示すものが

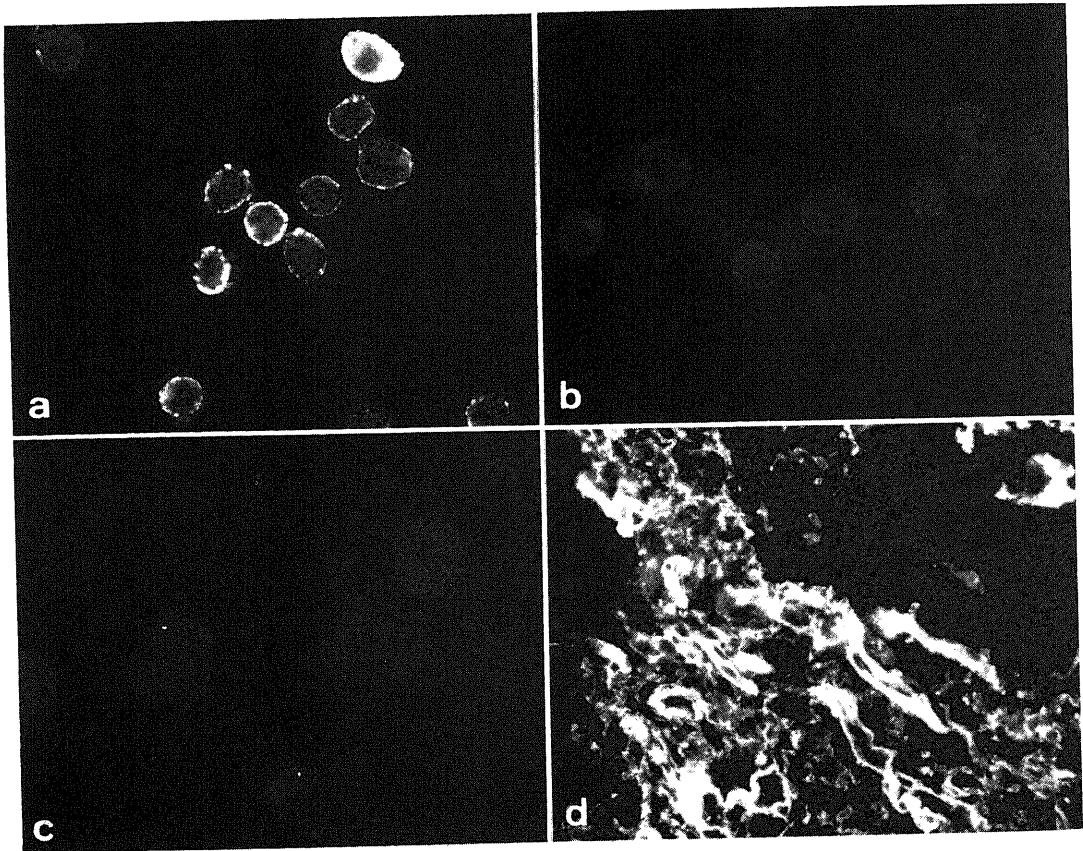


Fig. 1. Detection of antigen on living cells and in frozen section with polyclonal antibody  $\alpha$ W4 by immunofluorescence.  
a, TuWi (Wilms'tumor); b, ACHN (renal cell carcinoma); c, Flow 4000 (fetal kidney); d, section of Wilms'tumor tissue (W4).

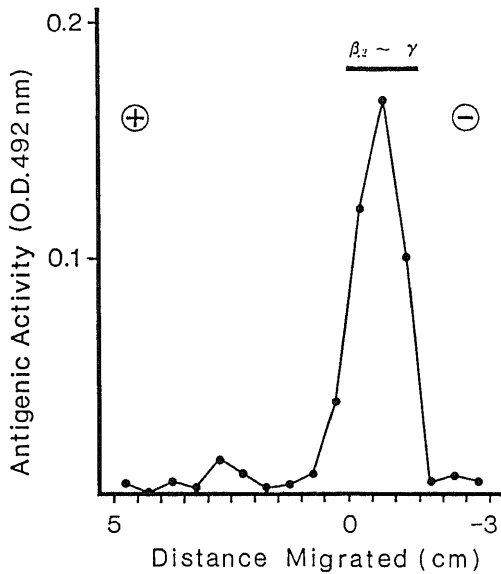


Fig. 2. Analysis by zone electrophoresis of desoxycholate-solubilized fraction from Wilms' tumor tissue using  $\alpha$ W4. The gel was cut off at intervals of 5 mm. The antigenic activity of the extract from each slice was assayed by ELISA with absorbed antiserum  $\alpha$ W4.

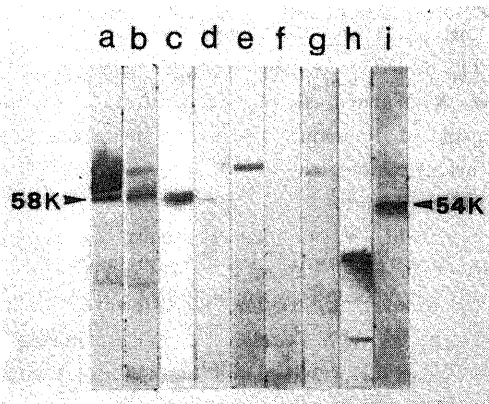


Fig. 3. Electrophoretic analysis of partially purified antigen from Wilms' tumor and of the components of  $\beta_2$ - $\gamma$ -mobilities from various tissues. The Western blot, stained with  $\alpha$ W4, of the desoxycholate-solubilized fraction (designated P<sub>2</sub>) of W4 (lane a), the P<sub>2</sub> of W4 after chromatography on Blue Sepharose CL-6B (lane b), its components of  $\beta_2$ - $\gamma$ -mobilities (lane c), the Western blot, stained with  $\alpha$ W4, of the components of  $\beta_2$ - $\gamma$ -mobilities from TuWi (lane d), a fetal kidney (lane e), gastric cancer No. 4 (lane f), pancreatic cancer No. 1 (lane g) and a cell line HEK (lane h). The components of  $\beta_2$ - $\gamma$ -mobilities from W4 treated with endoglycosidase H (lane i).

あったが、大部分の正常臓器や他種腫瘍は陰性値を示した。多少とも血清蛋白、その他が混在する抗原分画で高度免疫して作製した異種抗血清を用いる以上、たとえ血清などで充分な吸収を行ったとしてもなお未知非特異抗原に対する抗体が残るから、ELISAで対照材料に全く偽陽性をなくすることは難しい。この点でモノクローナル抗体の作製が望まれるが、それらが得られるまでは免疫プロットングなどによる一層の抗原分析が必要となる。ウイルス抗原分画についてウエスタンブロットングを行い、吸収抗血清  $\alpha$ W4によりABC法染色を行うと58Kdのバンドが認められたが、多少とも高いELISA測定値を示した胎児腎、胃癌No. 4、膵癌No. 1や免疫蛍光陽性のHEKについては同バンドの存在が認められなかった。従って58Kdの抗原はウイルス腫瘍に特異な抗原と考えられる。この抗原は $\beta_2$ - $\gamma$ の泳動度を持ち、ウイルス腫瘍細胞の細胞膜に局在することが示された。エンドグリコシダーゼHによる糖分解後の抗原はSDS-PAGEで約54Kdのバンドを示したから、抗原は約7%またはそれ以上の糖を持つ糖蛋白と考えられる。

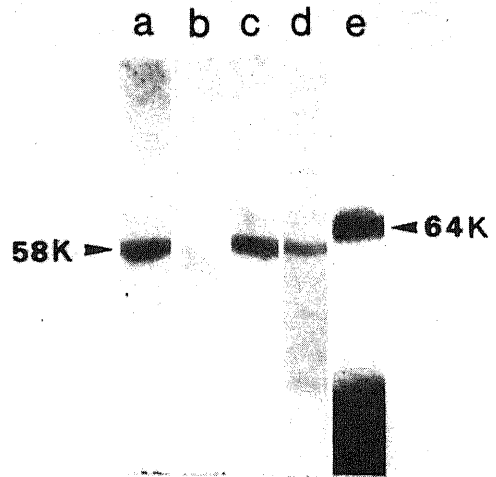


Fig. 4. Reactivity of the 58Kd-blot of Wilms' tumor in Western blotting with peptide hormones. Lane a, the 58Kd-blot stained with  $\alpha$ W4; lane b, the 58Kd-blot incubated with epidermal growth factor (EGF) followed by staining with  $\alpha$ W4; lane c, the 58Kd-blot with incubated with insulin followed by staining with  $\alpha$ W4; lane d, 58Kd-blot incubated with EGF followed by staining with anti-EGF monoclonal antibody; lane e, formation of the complex with Mol. Wt. 64,000 by incubation of the antigens with <sup>125</sup>I-EGF (autoradiography).

このような抗原は抗原抽出方法、抗原の分布、分子量、電気泳動度から見て Okada ら<sup>11)</sup>の抗原と同一のものらしい。異常細胞外成分<sup>9)</sup>、W-抗原<sup>9)</sup>、fetuin 抗原<sup>9)</sup>、W-抗原関連抗原<sup>10)</sup>とは電気泳動度に明らかな差がある。異常細胞外成分はプレアルブミン泳動度、他の3抗原はいずれも  $\alpha$  泳動度をもつものに対し、筆者らの抗原は  $\beta_2$ - $\gamma$  泳動度をもっている。

ウィルムス腫瘍特異と思われるこのような抗原分子はいかなる細胞内機能をもつのであろうか。腫瘍特異抗原に関する教室の系統的な研究においてもこの点は容易に明らかにされなかったが、最近、岡田らは各種の腫瘍特異抗原分子に EGF 受容体機能と蛋白キナーゼ活性のあることを見出だしている(未発表)。そこで筆者もウィルムス腫瘍抗原について予備的実験を行い、抽出抗原標品に EGF 結合活性のあることを認めた。EGF 受容体はこれまで A-431 細胞株(扁平上皮癌)に分子量 170 Kd のものが見出だされ、同様の受容体が正常細胞や腫瘍細胞に広範に分布していることが示されている<sup>20)21)</sup>。しかし、それ以外の EGF 受容体は上記 170 Kd の分解産物以外に見出だされていないし、まして腫瘍特異性をもつ受容体分子の存在はこれまで全く知られていない。定量的な EGF 結合実験や反応機構の解析が必要ではあるが、もしこのような腫瘍特異性をもつ EGF 受容体がそれぞれの腫瘍に存在するならば、腫瘍発生機構におけるその意義は極めて大きいと考えられる。

## 結 論

ヒトのウィルムス腫瘍から不溶性分画を抽出し、DOC 処理によって可溶化した分画 ( $P_2$ ) を免疫原としてモルモットを高度免疫し、ポリクローナルな抗血清を作製した。高単位抗血清 ( $\alpha W4$ ) を選択し、充分な吸収を加えて ELISA、免疫蛍光、免疫プロットングに使用し、以下の結果を得た。

1. ELISA では 4 例のウィルムス腫瘍の  $P_2$  分画(アルブミン除去)が全て陽性を示した。正常成人及び胎児臓器材料は胎児腎を除くすべてが陰性であった。他種腫瘍では胃癌 4 例中 1 例 (No. 4)、膀胱癌 2 例中 1 例 (No. 1) 以外の  $P_2$  分画はすべて陰性であった。

2. ウィルムス腫瘍株 (TuWi) の生細胞免疫蛍光法及びウィルムス腫瘍(手術材料)のクリオシユタット切片(未固定)の蛍光抗体法ではいずれも腫瘍細胞の細胞膜における抗原の局在が認められた。なお、ヒト胎児腎由来細胞株 (HEK) も膜染色陽性であった。

3. ウィルムス腫瘍抗原はアガロースゲル電気泳動で  $\beta_2$ - $\gamma$  泳動度を示し、同抗原についてウェスタンブロットングを行うと 58Kd のバンドが示された。抗

原をエンドグリコシダーゼ H で処理すると 54Kd のバンドが生じ抗原が糖蛋白であることが示された。上記の胎児腎、胃癌 No. 4、膀胱癌 No. 1 および培養株 HEK の分画については 58Kd のバンドは認められなかった。

4. ウィルムス腫瘍抗原 (58Kd のウェスタンブロット) に EGF を反応させると抗ウィルムス腫瘍抗血清 ( $\alpha W4$ ) によるプロットの染色性が低下し、EGF のプロットへの結合が抗 EGF モノクローナル抗体による染色で示された。腫瘍抗原分画を <sup>125</sup>I-EGF (6Kd) と反応後、SDS-PAGE 及びオートラジオグラフィーを行い、64Kd のバンドの出現を認めた。

## 謝 辞

終わりに御指導、御校閲をいただいた倉田自章教授、御協力をいただいた岡田収司助教授ならびに教室員各位に深く感謝いたします。

また本研究の機会をお与え下さいました金沢医科大学呼吸器内科、大谷信夫助教授に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Hellström, I., Hellström, K. E., Pierce, G. E. & Yang, J. P. S.: Cellular and humoral immunity to different type of human neoplasms. *Nature*, **220**, 1352-1354 (1968).
- 2) Hellström, I., Hellström, K. E., Sjögren, H. O. & Warner, G. A.: Demonstration of cell-mediated immunity to human neoplasms of various histological types. *Int. J. Cancer*, **7**, 1-16 (1971).
- 3) Diehl, V.: Cellular immunity to nephroblastoma. *Int. J. Cancer*, **2**, 277-284 (1971).
- 4) Kumar, S., Taylor, G., Steward, J. K., Waghe, M. A. & Pearson, D.: Cellular immunity in Wilms' tumor and neuroblastoma. *Int. J. Cancer*, **10**, 36-43 (1972).
- 5) Kumar, S. & Taylor, G.: Non-organ specific and tumor-specific antibodies in children with Wilms' tumor. *Int. J. Cancer*, **16**, 448-455 (1975).
- 6) Kumar, S., Waghe, M. & Taylor, G.: Tumor-specific antibodies reactive with cell-surface antigens in children with Wilms' tumor. *Int. J. Cancer*, **19**, 351-355 (1977).
- 7) Allerton, S. E., Beierle, J. W., Powars, D. R. & Bavetta, L. A.: Abnormal extracellular components in Wilms' tumor. *Cancer Res.*, **30**, 679-683 (1970).
- 8) Burtin, P. & Gendron, M. C.: A tumor-



- associated antigen in human nephroblastomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 2051-2054 (1973).
- 9) Wise, K. S., Allerton, S. E., Trump, G., Powars, D. & Beirle, J. W.: A fetuin-like antigen from human nephroblastoma. Int. J. Cancer, **16**, 199-210 (1975).
- 10) Waghe, M. & Kumar, S.: Demonstration of a Wilms' tumor associated antigen using xenogenic antiserum. Eur. J. Cancer, **13**, 993-998 (1977).
- 11) Okada, S., Itaya, K. & Kurata, Y.: Identification of a tumor-specific antigen in the insoluble fraction of human nephroblastoma. Eur. J. Cancer, **15**, 1085-1093 (1979).
- 12) 日本病理学会小児悪性腫瘍分類委員会: 腎芽腫(腎芽細胞腫)-Nephroblastoma, Wilms' Tumorの組織分類. 日小外誌, **8**, 333-338 (1972).
- 13) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265-275 (1951).
- 14) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature, **227**, 680-685 (1970).
- 15) Bernette, W. N.: "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radionated protein A. Anal. Biochem., **112**, 195-203 (1981).
- 16) Streit, P. & Reubi, J. C.: A new and sensitive method for axonally transported horseradish peroxidase (HRP) in the pigeon visual system. Brain Res., **126**, 530-537 (1977).
- 17) Tarentino, A. L. & Maley, F.: Purification and properties of an endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces griseus*. J. Biol. Chem., **249**, 811-817 (1974).
- 18) Owen, M. J. & Kissonerghis, A.: Biosynthesis of HLA-A and HLA-B antigens in vivo. J. Biol. Chem., **255**, 9678-9684 (1980).
- 19) Pilch, P. F. & Czech, M. P.: The subunit structure of the high affinity insulin receptor. Evidence for a disulfide-linked receptor complex in fat cell and liver plasma membranes. J. Biol. Chem., **255**, 1722-1731 (1980).
- 20) Carpenter, G. & Cohen, S.: Epidermal growth factor. Ann. Rev. Biochem., **48**, 193-216 (1979).
- 21) Adamson, E. D. & Ress, A. R.: Epidermal growth factor receptors. Mol. Cell. Biochem., **34**, 129-152 (1981).

**Properties of a Wilms' Tumor (Nephroblastoma)-Specific Antigen** Hiroshi Yamamoto, Department of Pathophysiology, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., **96**, 104—112 (1987)

**Key words:** Wilms' tumor, nephroblastoma, tumor antigen, epidermal growth factor

#### Abstract

The insoluble fraction of human Wilms' tumor (nephroblastoma) tissue was solubilized by the aid of desoxycholate. The solubilized fraction, after partial purification was used to raise antisera in guinea pigs. A selected antiserum ( $\alpha$ W4), absorbed extensively with sera and homogenates of kidney, liver, spleen, lung, and colon carcinoma, was used throughout the following experiments. The antiserum was reactive on ELISA with all 4 Wilms' tumors tested, a fetal kidney, 1 of 4 gastric cancers, and 1 of 2 pancreatic cancers, but not with other neoplasms tested as well as normal adult and fetal organs except fetal kidney. Immunofluorescence studies showed that the antigen (s) was membrane-associated. The antigens showed  $\beta_2 \sim \gamma$ -mobilities on zone electrophoresis in agarose gel combined with ELISA. When components of  $\beta_2 \sim \gamma$ -mobilities were extracted and submitted to "Western" blotting, a single component of molecular weight 58,000 daltons could be immunostained with absorbed  $\alpha$ W4 by ABC method. This

component was absent in preparations of a fetal kidney, a gastric cancer, and a pancreatic cancer, which had showed more or less positive reaction with  $\alpha$ W4 on ELISA or immunofluorescence. When the 58Kd antigen was incubated with  $^{125}$ I-EGF, treated with disuccinimidyl suberate and submitted to SDS-PAGE, a single component of apparent molecular weight 64Kd was detected by autoradiography. This labelling was virtually abolished, when an excess amount of unlabelled EGF was present in the binding medium. These results suggest that a tumor-specific or highly associated EGF receptor of 58Kd exists in Wilms' tumor.