

Antigens Highly Associated with Human Liposarcoma

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/2297/7799

ヒト脂肪肉腫に高度に関連する抗原

金沢大学医学部整形外科教室 (主任: 野村 進教授)

清水 俊 治

(昭和60年5月13日受付)

ヒト肉腫に組織型特異的抗原の存在することはこれまで知られていない。そこで著者は脂肪肉腫から不溶性分画を抽出し、デスオキシコール酸塩で可溶化した粗分画を免疫抗原としてモルモットに抗血清を作製した。抗血清を脂肪組織のアセトン粉末、正常血清及び肝、脾ホモジネートの沈渣などで吸収し、ゲル内拡散法と免疫蛍光法により、脂肪肉腫、とくにその細胞膜に特異性の高い抗原が存在することを示した。この抗原は正常成人組織、胎児(6カ月)組織、他型の肉腫、各種癌などでの存在は認められなかった。したがってヒト脂肪肉腫には腫瘍に共通な特異性のある抗原(または抗原群)が腫瘍の不溶性分画中に存在することが推定された。

Key words liposarcoma, tumor-associated antigen

ヒト腫瘍の免疫学における中心課題の一つは、腫瘍細胞に存在し同一個体の正常細胞に欠如するような抗原があるか否かという問題である。そのような抗原の存在は、近交系マウスにおけるメチルコラントレン誘導肉腫について、腫瘍特異移植抗原の存在を示した Prehn¹⁾, Klein²⁾の実験で決定的に示されている。しかし、ヒトの腫瘍については、腫瘍特異抗原の存在を肯定するデータが近年増加しつつあるとはいえ、まだその根拠は十分ではない。とくにヒト肉腫については、これまで肉腫の組織型に特異的な抗原が存在することはほとんど知られておらず、わずかに骨肉腫にかなり特異性の高い抗原の存在がポリクローナル又はモノクローナル抗体を使って証明されている程度である³⁾⁻⁵⁾。

著者はヒト脂肪肉腫(LS)の抽出液を抗原として異種抗血清を作製し、ゲル内二重拡散法と蛍光抗体法により抗原分析を行い、LSに高度に関連する抗原の存在することを明らかにしたので報告する。

材料および方法

1. 組織材料

ヒトLSの4例、LS₁(myxoid LS)、LS₂(myxoid LS)、LS₃(round-cell LS)、LS₄(round-cell LS)を材料とした。LS₁(45才男性の右大腿部に発生した

LS)、LS₂(40才女性の左上腕部に発生したLS)、LS₃(50才男性の背部に発生したLS)は手術時に、LS₄(40才男性の左大腿部に発生したLS)は剖検時に入手した。

小片を瞬間凍結して-80°Cに、あるいはTissue Tek, O. C. T. Compound (Division Miles Laboratories Inc. USA)に包埋して-40°Cに使用するまで保存し、蛍光抗体用の切片作製に供した。残りの組織は抗原抽出用に使用するまで-30°Cに保存した。胎児組織は6カ月胎児から得られた。対照の各種肉腫は手術時に、各種癌は一部手術時に、一部は剖検時に入手した。

腫瘍はいずれも小片を10%ホルマリン固定し、パラフィン切片、ヘマトキシリン・エオジン染色標本とし、LSは凍結切片、Sudan III染色標本も作製して組織診断を確認した。

LS₁とLS₂は星芒状ないし紡錘形の腫瘍細胞が疎に分布し、核はクロマチンが増量し、間質は粘液様物質と毛細血管から成っている(図1)。Sudan III染色によると腫瘍細胞の胞体に大小の脂肪滴が認められた。組織像はWHO分類のLiposarcoma, predominantly myxoid typeであった。

LS₃とLS₄は不整形形ないし紡錘形の腫瘍細胞が密に分布し、核は大小不同で核小体及びクロマチンの増量を見た。また腫瘍細胞の細胞質にはSudan III染色

Abbreviations: LS, liposarcoma PBS, phosphate-buffered saline, pH 7.2; CEA, carcinoembryonic antigen.

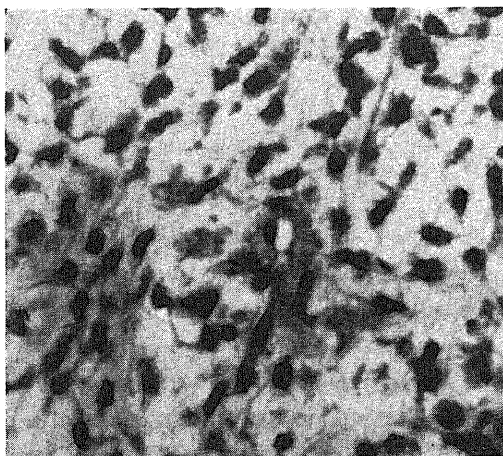


Fig. 1. Liposarcoma, predominantly myxoid type. Case 1. H & E stain, $\times 200$.

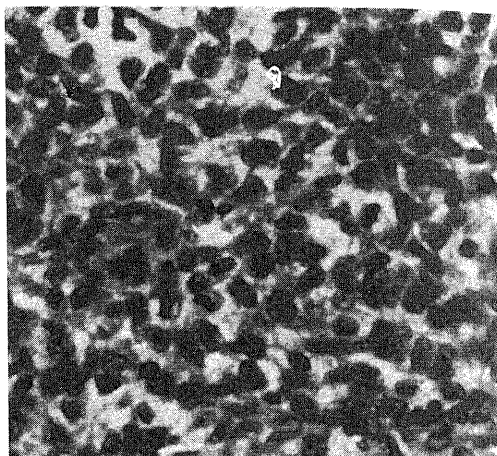


Fig. 2. Liposarcoma, round-cell type. Case 3. H & E stain, $\times 200$.

陽性の空胞を認めた。組織像はWHO分類のLiposarcoma, round-cell typeであった(図2)。

2. 粗抗原の抽出方法

LS₁(湿量 200 g)と、LS₃(湿量 85 g)から別々に不溶性分画をSmithら⁹⁾の方法の変法⁷⁾で抽出した。

融解した腫瘍組織を細切し、約3倍量の“Solution I”⁶⁾(0.16 M 塩化カリウム, 0.017 M クエン酸ナトリウム, 0.001 M ヨード酢酸)を加えて、Waring blenderにより0°Cに氷冷下でホモジネートを作り、順にガーゼ1枚、2枚、4枚、8枚で濾過し、10,000×g, 30分冷却遠心する。沈渣に“Solution I”を加えてテフロンホモジナイザーにより0°Cでホモジネートを作り、10,000×g, 30分冷却遠心する。沈渣に“Solution II”⁶⁾

(1 M 塩化カリウム, 0.034 M クエン酸ナトリウム, 0.01 M ヨード酢酸, pH 4.7に補正)を加えてホモジネートを作り、10,000×g, 30分冷却遠心する操作を以後8回繰り返す。最終沈渣に約3倍量の0.2%デオキシコール酸ナトリウム溶液を加えてホモジネートとした後、マグネチックスターラーを用いて冷室で48時間攪拌する。10,000×g, 20分冷却遠心して上清をとり、約10倍容量の冷アセトンを加えて-20°Cに一夜静置し、生じた沈澱を低速遠心で集めて、少量の0.01 M PBSに溶かして粗抗原液として使用時まで-20°Cに保存した。粗抗原の蛋白量はLowry法⁹⁾により測定した。LS₁ 100 g(湿量)から約10 mg蛋白の粗抗原が得られた。

ゲル内拡散用及び抗血清吸収用に各組織の25%(W/V)PBSホモジネートを作製した。また心及び胃粘膜筋層の平滑筋ホモジネートからは10,000×g, 30分冷却遠心の沈渣をとり吸収用に使用した。

正常脂肪組織については以下のようにアセトン粉末を作製した。細切した脂肪組織100 g(湿量)に300 mlの冷アセトンを加えて、Waring blenderによりホモジネートを作り、ホモジネートをマジックスターラーで室温30分攪拌後10分静置する。上清200 mlを吸引除去し、アセトン200 mlを追加して30分攪拌する。ガーゼ1枚で濾過し、10,000×g, 15分遠心する。沈渣を減圧乾燥後、使用するまで-20°Cに保存した。

3. 異種抗血清の作製

LS₁とLS₃の粗抗原で異種抗血清を作製した。モルモット(体重約250 g)に粗抗原0.5 ml(LS₁は3~4 ml蛋白, LS₃は1.6 mg蛋白含有)を、Freund's complete adjuvant 0.5 mlで乳化して肩胛下腔に注射した。その後1週間隔で2および3回目の注射を行い、以後2週間隔で4および5回目の注射を行った。最終注射の1週間後に心採血して血清を分離し、少量ずつ分割して使用時まで-20°Cに保存した。抗血清はそれぞれAnti-LS₁, Anti-LS₃と名付けた。なお上記と同じスケジュールでモルモットにadjuvantのみ注射してadjuvant control血清を作製した。

4. 抗血清の吸収

ゲル内拡散法には、Anti-LS₁ 1 mlにつき脂肪組織アセトン粉末100 mg, 正常ヒト血清0.5 ml, 肝の25%ホモジネート1.25 ml及び脾の25%ホモジネート1.25 mlを加えて室温1時間静置後、4~8°Cで一夜吸収操作を行った。その後、10,000×g, 30分冷却遠心して上清をとり、再度脂肪組織アセトン粉末100 mg, 正常ヒト血清0.5 ml, 肝と脾の25%ホモジネート各1.25 mlを加えて吸収を繰り返し、その上清をMinicon B-15 (Amicon Corporation, USA)で0.25

mlに濃縮して使用した。

また上記の吸収に更にヒト平滑筋、心あるいは胎児皮膚の25%ホモジネート0.125 mlを追加して吸収を行い、0.125 mlに濃縮した抗血清も作製した。adjuvant control血清にも上記と同様の吸収処置を振った。

蛍光抗体法用にはAnti-LS₁あるいはAnti-LS₃1mlにつき脂肪組織アセトン粉末100 mg、正常ヒト血清0.25 ml、肝の25%ホモジネート0.25 ml、脾の25%ホモジネート0.25 mlによる室温1時間、4°C一夜低速回転の吸収を2回繰り返した。なお得られた抗血清に1 mlの心の25%ホモジネートの遠心沈渣による吸収を数回加えた抗血清を作製した。吸収抗血清はいずれもPBSで原抗血清の16倍又は32倍に希釈して使用した。

5. 免疫学的検査法

ゲル内二重拡散法を行った。厚さ2 mmの寒天板に直径4 mm、間隔4 mmの抗原・抗体孔を作り、粗抗原は5 mg 蛋白/mlとしたもの、ホモジネートの場合は25%PBSホモジネートを加えた。抗血清は前記の如く吸収後濃縮したものを使用した。湿潤状態で4~8°Cにおき、約1週間連日観察した。

蛍光抗体法は間接法によった。凍結保存材料から未固定のcryostat切片(厚さ5 μ)を作製し、37°C、30分乾燥後、吸収抗血清(最終希釈1/16)に室温1時間反応させた。洗滌後FITC標識抗モルモットIgG(家兔)(MBL Co. Ltd.名古屋)のPBSによる1/25希釈液を室温30分反応させた。洗滌後グリセリン・バッファーで封入し、落射型蛍光顕微鏡Olympus BH-RFL-Bで観察、撮影を行った。

成 績

adjuvant control血清はゲル内二重拡散法でLS抗原と沈降線を作らないが、吸収Anti-LSの粗抗原液あるいは、25%ホモジネートに対しかなり幅は広いが1本の沈降線を生じた。ヒト血清あるいは心、肺、肝、脾、腎、胃、大腸、皮膚の各ホモジネートに対しては沈降線を作らなかった(図3 a)。胎児臓器では肺、肝、脾、腎、腸の各ホモジネートはいずれも沈降線を生じなかった(図3 b)。

LS₂は5 mg 蛋白/mlでは吸収Anti-LS₁に対し明瞭な沈降線は作らなかったが、LS₁の沈降線がLS₂域で彎曲を示し(図3 c)、抗原の存在が暗示された。こころみにLS₂の抗原濃度を高めてみるとやや幅の広い、弱い沈降線が現われ、それはLS₁の沈降線と融合した。

他の非上皮性腫瘍では骨肉腫1例、軟骨肉腫2例、線維肉腫1例、横紋筋肉腫1例、Ewing肉腫1例、巨

細胞腫1例の25%ホモジネートは沈降線は生じず(図3 c)、平滑筋肉腫1例はLSの沈降線に融合しない1本の弱い沈降線を生じたが、抗血清の吸収に平滑筋を加えるとそれは消失した。

上皮性腫瘍では肺未分化癌2例、胃腺癌1例、腎細胞癌1例、子宮頸癌1例は沈降線は作らず(図3 d)、胃腺癌には微弱な沈降線を生ずる例が他にあったが、それも抗血清に平滑筋による吸収を加えると消失した。LSの粗抗原液を市販の抗CEA抗血清(DAKO immunoglobulin Ltd., Denmark)、抗 α_1 -fetoprotein抗血清(DAKO)、抗ferritin抗血清(Behringwerke AG, Germany)、抗 β_2 -microglobulin抗血清(生化学工業、東京)に対してゲル内二重拡散法を行ったが沈降線は生じなかった。

間接蛍光抗体法では吸収Anti-LS₁及び吸収Anti-LS₃はLS₁~LS₄の腫瘍細胞とくにその細胞膜を染めた(図4 a, b)。正常成人組織の肝、脾、腎、膵、腎、大腸、副腎、甲状腺、胸腺は陰性であった。心筋、横紋筋、脂肪細胞膜も陰性であったが、筋内膜や脂肪組織の細網線維が染まり、とくに吸収Anti-LS₃にそれが強かった。しかし抗血清の心あるいは平滑筋ホモジネート沈渣による吸収を十分に行うとそれは消失し(図4 c)、LSの陽性染色が残された。胎児組織では皮膚を検索したが、皮下脂肪細胞は陰性であった(図4 d)。

LS以外の腫瘍については表-1に示す成績が得られた。骨肉腫(図4 e)や軟骨肉腫(図4 f)に陽性所見はなく、それ以外の非上皮性悪性細胞の細胞膜も陰性であった。調べ得た肺腺癌、胃腺癌、膵癌、大腸癌、甲状腺癌、卵巣癌にも陽性の細胞膜染色を示したものはなかった。

市販の抗CEA抗血清、抗 α_1 -fetoprotein抗血清、抗 β_2 -microglobulin抗血清、抗ferritin抗血清を用いて間接蛍光抗体法を行ったが、LS₁~LS₄の腫瘍細胞にも陽性の細胞膜染色を示したものはなかった。尚LS細胞膜の陽性染色はadjuvant control血清では起こらず、抗血清をLSの粗抗原で吸収すると消失した。

考 察

ゲル内二重拡散法あるいは間接蛍光抗体法の成績からヒトLSには、myxoid型でも、round cell型でも共通する腫瘍抗原があって、それは正常成人組織や胎児臓器あるいは他種の非上皮性、上皮性悪性腫瘍には存在しないことが認められた。ゲル内二重拡散法による沈降線は常にやや幅の広いが、これらは抗原分子のmicroheterogeneityによると考えられる。この抗原あるいは抗原群の存在部位はLS細胞の細胞膜であり、

脂肪空胞や細胞核は陰性であった。吸収抗LS抗血清は蛍光抗体法で心、骨格筋、脂肪組織などの筋内膜結合線維や細網線維も共染したが、それも抗血清に心、平滑筋ホモジネート沈渣を加えると消失し、LS細胞膜の染色性のみが残った。即ち、ポリクローナルではあっても機能的に単一特異性の抗体が得られたことに

なる。

このような吸収抗血清で認識される抗原は、従来知られている肉腫関連抗原^{3)-5),9)-13)}とは明らかに異っている。それらがいずれも組織型特異性をもたないか、あるいはその程度の低い抗原であるのに対して、著者の抗原は実験の範囲内ではLSに限定されている。ま

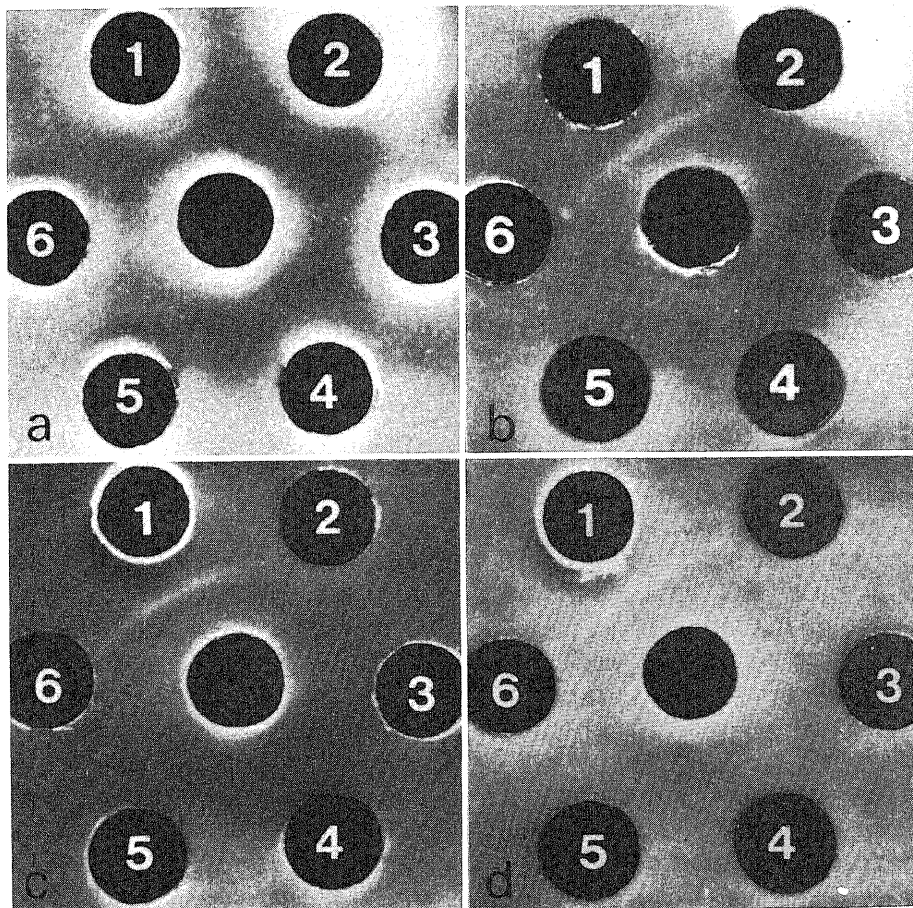


Fig. 3. Double immunodiffusion: An antiserum against human liposarcoma was previously absorbed with acetone powder of fatty tissue, normal serum, homogenates of liver, spleen and heart. The absorbed anti-liposarcoma antiserum is in center wells and surrounding wells contains liposarcoma extracts, normal adult and fetal organ homogenates, and various organ homogenates. (a): (1) liposarcoma extract; (2) liver homogenate; (3) spleen homogenate; (4) lung homogenate; (5) stomach homogenate; (6) colon homogenate. (b): (1) liposarcoma extract; (2) fetal liver homogenate; (3) fetal spleen homogenate; (4) fetal lung homogenate; (5) fetal kidney homogenate; (6) fetal gut homogenate. (c): (1) liposarcoma (LS₁) extract; (2) liposarcoma (LS₂) extract; (3) osteosarcoma homogenate; (4) chondrosarcoma homogenate; (5) giant cell tumor homogenate; (6) rhabdomyosarcoma homogenate. (d): (1) liposarcoma extract; (2) homogenate of undifferentiated carcinoma of the lung; (3) homogenate of adenocarcinoma of the stomach; (4) homogenate of adenocarcinoma of the cervix; (5) homogenate of renal cell carcinoma; (6) homogenate of colon cancer.

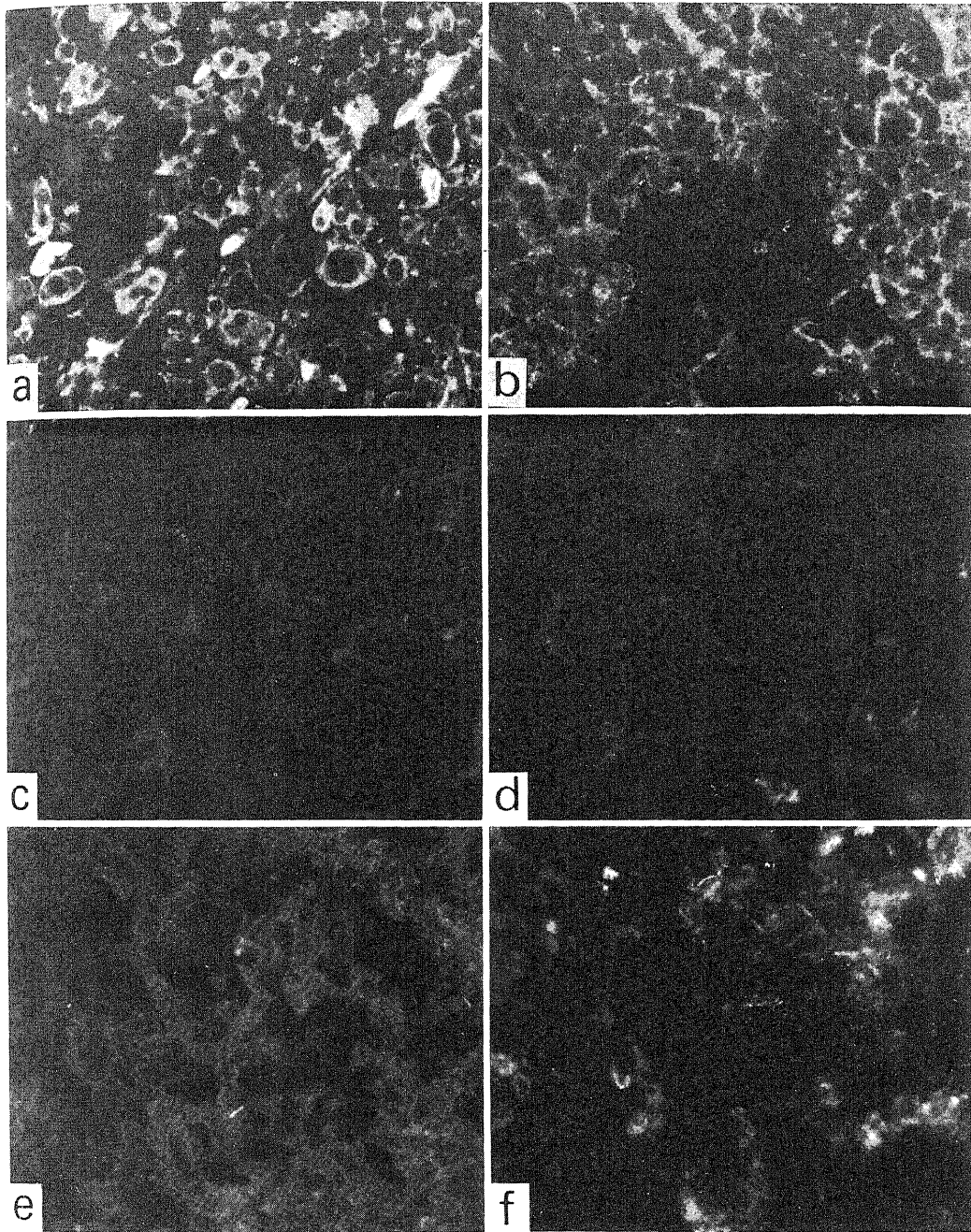


Fig. 4. Indirect immunofluorescent staining with anti-liposarcoma antiserum of myxoid liposarcoma. The antiserum was previously absorbed as in Fig.3 and the sections were stained with the absorbed anti-liposarcoma antiserum at a dilution of 1:16. (a), myxoid liposarcoma, $\times 300$; (b), round-cell liposarcoma, $\times 300$; (c), adult fatty tissue, $\times 300$; (d), fatal subcutaneous fatty tissue, $\times 300$; (e), osteosarcoma, $\times 300$; (f), chondrosarcoma, $\times 300$.

た胎児皮膚に存在しないことから考えて腫瘍胎児性の抗原ではなく、mesenchym-associated antigen¹⁴⁾でもない。粗抗原液が抗 CEA 抗血清や、抗 α_1 -fetoprotein 抗血清とも反応しないからそれらとの関連も否定できるし、抗 β_2 -microglobulin 抗血清と反応しないことや抗原分布から見て、組織適合関連抗原とも考え難い。従ってこの抗原はヒト脂肪肉腫に特異な抗原あるいはその候補として挙げ得るものである。

LS からの抗原抽出は、LS の細胞密度が必ずしも高くなく、治療による腫瘍細胞破壊が加わるために、腫瘍の大きさの割には収量が良くない。そこで抗原の精製やモノクローナル抗体の作製には材料の得られる次の機会に待たなければならない。この点では培養 LS 細胞を材料とする研究が有利になるが、現在本邦では LS 細胞株は維持されていない。

LS に特異と思われる抗原が存在するとすれば、他の肉腫についても組織型に特異な腫瘍特異抗原の出現が期待される。骨肉腫についてはかなり特異性のある抗原がモノクローナル抗体を使って見出されつつあるが²¹⁾⁻²³⁾、他の肉腫についてはまだそのような抗体は見つかっていない。それらが同定・精製されるようになれば肉腫の診断・治療により有効な免疫学的アプローチが可能となるであろう。

結 論

ヒト脂肪肉腫から不溶性分画を抽出したのち、デオキシコール酸塩で可溶化した、粗抗原分画を用いてモルモットを免疫し、異種抗血清を作製した。抗血清をヒト正常血清、脂肪組織アセトン粉末、肝ホモジネート、脾ホモジネート、心ホモジネート沈渣などにより吸収したのち濃縮してゲル内二重拡散法を行い、吸収した抗血清を希釈して蛍光抗体法（間接法）を行い、以下のような成績を得た。

1) ゲル内二重拡散法では脂肪肉腫粗抗原またはそのホモジネートは吸収抗血清とやや幅の広い沈降線を生じたが、正常臓器及び胎児臓器ホモジネートとは沈降線を生じなかった。非上皮性悪性腫瘍では骨肉腫、軟骨肉腫、線維肉腫、横紋筋肉腫、Ewing 肉腫、巨細胞腫は沈降線を生じず、平滑筋肉腫は微弱な沈降線を示したが、平滑筋による吸収で消失したため LS と区別できた。上皮性腫瘍も LS に一致する抗原の存在を示したものはなかった。

2) 蛍光抗体法では 4 例の LS 細胞が陽性の細胞膜染色を示した。対照の各種非上皮性及び上皮性腫瘍では、腫瘍細胞膜はいずれも陰性であった。

以上の結果から、ヒト脂肪肉腫に共通で特異性の高

Table 1. Reactivity of various tumors with absorbed guinea pig antiserum to liposarcoma

Tumor histologic type	Reactivity *
Liposarcoma, myxoid (LS ₁)	+
Liposarcoma, myxoid (LS ₂)	+
Liposarcoma, round-cell (LS ₃)	+
Liposarcoma, round-cell (LS ₄)	+
Osteosarcoma	-
Chondrosarcoma	-
Rhabdomyosarcoma	-
Fibrosarcoma	-
Malignant schwannoma	-
Ewing's sarcoma	-
Malignant lymphoma, B-cell	-
Adenocarcinoma of lung	-
Adenocarcinoma of stomach	-
Adenocarcinoma of pancreas	-
Adenocarcinoma of colon	-
Papillary adenocarcinoma of thyroid	-
Serous cystadenocarcinoma of ovary	-

* + means the positive staining of plasma membranes by an indirect immunofluorescent assay and - means no staining of plasma membranes.

い抗原あるいは抗原群が存在すると推定される。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師野村進教授、金沢大学がん研究所病態生理部、倉田自章教授、研究に御指導、御援助いただいた石川県立中央病院整形外科部長、島 巖先生、金沢大学がん研究所病態生理部、岡田収司助教授及び教室の諸先生方に謹んで感謝の意を表します。また貴重な材料を御分与下さった金沢大学医学部第1外科学教室、第一病理学教室、金沢医科大学、武川昭男教授に深謝申し上げます。

本論文の要旨は第55回日本整形外科学会で発表した。

文 献

- 1) Prehn, R. T. & Main, J. M.: Immunity to methylchoranthrene-induced sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, **18**, 769-778 (1957).
- 2) Klein, G., Sjögren, H. O., Klein, E. & Hellström, K. E.: Demonstration of resistance against methylchoranthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res.*, **20**, 1561-1572 (1960).
- 3) Singh, I., Tsang, K. T. & Blakemore, W. S.: Serologic analysis of tumor-associated surface antigens on human osteosarcoma cells, p161-176. *In* S. A. Rosenberg (ed.), *Serologic analysis of human cancer antigens*, Academic Press, New York, 1980.
- 4) Hosoi, S., Nakamura, T., Higashi, S., Yamamura, T., Toyama, S., Shinomiya, K. & Mikawa, H.: Detection of human osteosarcoma-associated antigen (s) by monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, **42**, 654-659 (1982).
- 5) Brown, J. M.: Detection of a human sarcoma-associated antigen with monoclonal antibodies. *Cancer Research*, **43**, 2113-2120 (1983).
- 6) Smith, J. T., Funckes, A. J., Barak, A. J. & Thomas, L. E.: Cellular lipoproteins. I. The

insoluble lipoprotein of whole liver cells. *Exp. Cell Res.*, **13**, 96-102 (1957).

7) Okada, S., Kurata, Y., Kitagawa, K. & Ookawa, M.: Demonstration and preliminary characterization of an antigen in the insoluble extracts of human transitional cell carcinoma. *Eur. J. Cancer*, **16**, 1451-1458 (1980).

8) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).

9) Eilber, F. R. & Morton, D. L.: Sarcoma specific antigens: Detection by complement fixation with serum from sarcoma patients. *J. Natl. Cancer Inst.*, **44**, 651-656 (1970).

10) Girald, G., Beth, E., Hirschaut, Y., Aoki, T., Old, L. J., Boyse, E. A. & Chopra, H. C.: Human sarcoma in culture. *J. Exp. Med.*, **133**, 454-478 (1971).

11) Mukherji, B. & Hirschaut, Y.: Evidence for fetal antigen in human sarcoma. *Science*, **181**, 440-442 (1973).

12) Sethi, J. & Hirschaut, Y.: Complement-fixing antigen of human sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, **57**, 489-493 (1976).

13) Lichtiger, B., Trujillo, J. M., Burk, K. H. & Drewinko, B.: Identification and subcellular localization of human sarcoma associated antigen. *Cancer*, **37**, 1788-1799 (1976).

14) Delpech, B., Delpech, A., Girard, N., Chawzy, C., Halavent, C. & Laumonier, R.: Mesenchyme associated antigen. p577-580, *In* F. G. Lehman (ed.), *Carcino-embryonic proteins: Chemistry, Biology, Clinical applications*. New York, Elsevier North Holland and Biomedical Press, Vol II. 1979.

Antigens Highly Associated with Human Liposarcoma Toshiharu Shimizu, Department of Orthopedics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J.Juzen Med. Soc., 94, 561 – 568 (1985)

Key words: human liposarcoma, tumor-associated antigen

Abstract

So far, little is known about tissue type-specific tumor antigens in human sarcomas. The insoluble extract of a human liposarcoma has been solubilized by the aid of desoxycholate and the soluble extract was used to raise an antiserum in guinea pigs. The antiserum, which had been absorbed with acetone powder of fatty tissue, normal serum, and homogenates of liver, spleen and heart, proved to characterize antigens common to liposarcomas by immunodiffusion and immunofluorescence. The antigens were undetectable in normal adult organs, fetal organs or other neoplasms including a variety of sarcomas except liposarcomas. It was therefore suggested that the tumor-specific antigens were present in the insoluble fraction of human liposarcomas.