

# DU-PAN-2抗原に対する抗イデオタイプ抗体の免疫応答の解析と癌診断治療への応用

著者	澤武 紀雄
著者別表示	Sawabu Norio
雑誌名	平成4(1992)年度 科学研究費補助金 一般研究(B) 研究成果報告書
巻	1991-1992
ページ	6p.
発行年	1993-03
URL	<a href="http://doi.org/10.24517/00049343">http://doi.org/10.24517/00049343</a>



DU-PAN-2 抗原に対する抗イディオタイプ  
抗体の免疫応答の解析と癌診断治療への応用

KAKEN

研究課題番号 03454226

1992

30

平成3～4年度科学研究費補助金  
(一般研究B) 研究成果報告書

平成5年3月

研究代表者 澤 武 紀 雄

(金沢大学がん研究所教授)



TAKEA  
1992  
30

## 研究組織

研究代表者：澤 武 紀 雄（金沢大学がん研究所 教授）  
研究分担者：坂 井 俊之助（ 同 上 助教授）  
" : 太 田 秀 樹（ 同 上 助手）

## 研究経費

平成3年度	3,500千円
平成4年度	1,200千円
計	4,700千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

- 1) 渡辺弘之, 河上浩康, 山川 治, 里村吉威, 太田英樹, 元雄良治, 岡井 高, 澤武紀雄: 膵癌と腫瘍マーカー. 臨床病理, 89 (特集) : 58-72, 1991.
- 2) Y. Satomura, N. Sawabu, Y. Takemori, H. Ohta, H. Watanabe, T. Okai, K. Watanabe, H. Matsuno, F. Konishi : Expression of various sialylated carbohydrate antigens in malignant and nonmalignant pancreatic tissues. 6 : 448-458, 1991.
- 3) Y. Motoo, H. Kawakami, H. Watanabe, Y. Satomura, H. Ohta, T. Okai, H. Makino, D. Toya, N. Sawabu : Serum sialyl-Tn antigen levels in patients with digestive cancers. Oncology 48 : 321-326, 1991.
- 4) N. Sawabu, H. Ohta, Y. Motoo, T. Okai : Immuno-biochemical diagnosis of liver cancer. Gann Monogr. Cancer Res., 38 : 59-73, 1991.
- 5) 里村吉威, 澤武紀雄: 腫瘍マーカーの組織分布, DU-PAN-2. 臨床検査, 35 : 1088-1089, 1991.
- 6) 太田英樹, 里村吉威, 岡井 高, 澤武紀雄: 肝胆膵領域癌における腫瘍マーカーの臨床的意義, DU-PAN-2, SPan-1. 肝胆膵, 23 : 889-897, 1991.
- 7) 太田英樹, 山川 治, 澤武紀雄, 坂井俊之助, 福井正憲, 瀬戸 昭: 腺癌関連糖鎖抗原 (DU-PAN-2) の抗イディオタイプ抗体による免疫応答の検討. 腫瘍マーカー研究会誌, 6 : 45-47, 1991.
- 8) S. Sakai, T. Murayama, T. Frukawa, S. Koshimura : Antibody production useful for cytotoxicity against mouse MM2 tumor cells by peritoneal macrophages. Microbiol. Immunol., 35 : 775-765, 1991.
- 9) H. Watanabe, I. Mouri, Y. Yamaguchi, O. Yamakawa, H. Kawakami, Y. Satomura, H. Ohta, Y. Motoo, T. Okai, M. Fukui, N. Sawabu : The Colon mucous test in comparison with the fecal occult blood test in the detection of gastrointestinal disease. Dig. Endosc. 2 : 139-146, 1992.
- 10) R.S. Metzgar, N. Sawabu, M.A. Hollingsworth : DU-PAN-2, A clinically useful mucin marker of differentiation of pancreatic and other ductal cells and their tumors. In "Serological Cancer Markers", ed. S. Sell, pp 355-374, 1992, Humana Press, Totowa,

NJ.

- 11) 山川 治, 太田英樹, 毛利郁朗, 澤武紀雄, 坂井俊之助, 福井正憲, 瀬戸 昭: 抗イデオタイプ抗体を用いた癌患者血中抗 DU-PAN-2 自己抗体の測定に関する基礎的検討. 腫瘍マーカー研究会誌, 7 : 233-235, 1992.
- 12) T. Uehara, T. Miyawaki, S. Sakai, R. Nibu, M. Hasui, A. Yachie, S. Shimizu, N. Taniguchi : A novel T-cell activation antigen identified by monoclonal IMN 3.1 antibody and expressed preferentially on human T cells susceptible to apoptotic cell death. J. Immunol. (submitted)
- 13) O. Yamakawa, N. Sawabu, H. Ohta, S. Sakai, M. Fukui, A. Seto : Preparation of anti-idiotypic antibodies against anti-DU-PAN-2 monoclonal antibody and enzyme-linked immunosorbent assay for serum levels of anti-DU-PAN-2 antibody. Cancer Res. (submitted)
- 14) O. Yamakawa, N. Sawabu, S. Sakai, H. Ohta, M. Fukui, A. Seto : Usefulness of an anti-DU-PAN-2 antibody assay and identification of the autologous antibody against DU-PAN-2 antigen in cancer patients. Cancer Res. (in press)
- 15) H. Ohta, N. Sawabu, O. Yamakawa, I. Mouri, S. Sakai, M. Fukui, A. Seto : Antibodies against cancer-associated carbohydrate antigen (DU-PAN-2) induced by a monoclonal anti-idiotypic antibody. Int. J. Cancer (submitted)

## (2) 学会発表

- 1) 太田英樹, 山川 治, 河上浩康, 坂井俊之助, 福井正憲, 瀬戸 昭, 澤武紀雄: 膵腺癌関連糖鎖抗原 (DU-PAN-2) の抗イデオタイプ抗体による免疫応答の検討. 第22回日本膵臓学会, 1991年8月, 長野。
- 2) 山川 治, 太田英樹, 毛利郁朗, 坂井俊之助, 福井正憲, 瀬戸 昭, 澤武紀雄: 抗イデオタイプ抗体を用いた癌患者血中抗 DU-PAN-2 自己抗体の測定に関する基礎的検討. 第50回日本癌学会, 1991年9月, 東京。
- 3) 山川 治, 毛利郁朗, 太田英樹, 元雄良治, 岡井 高, 澤武紀雄: 抗イデオタイプ抗体を用いた各種消化器癌患者血清における抗 DU-PAN-2 抗体価の測定. 第89回日本内科学会, 1992年4月, 東京。
- 4) 山川 治, 太田英樹, 毛利郁朗, 坂井俊之助, 福井正憲, 瀬戸 昭, 澤武紀雄: 癌患者血中における抗 DU-PAN-2 抗体測定の診断的有用性. 第12回腫瘍マーカー研究会, 1992年9月, 大阪。
- 5) 山川 治, 太田英樹, 毛利郁朗, 坂井俊之助, 福井正憲, 瀬戸 昭, 澤武紀雄: 癌患者血中における抗 DU-PAN-2 抗体の同定とその測定の診断的有用性. 第51回日本癌学会, 1992年9月, 大阪。

## 研究成果の概要

### 序

生体内での抗体分子 (antibody, Ab 1) にはその超可変部位内に抗原性を有する構造が存在し、これを認識する抗イデオタイプ抗体 (Ab 2) と呼ばれる抗体が誘導され得る。これらには内部イメージと称される元の抗原エピトープに相同の構造を有するものがある。これを元の腫瘍抗原の代用として用い、各種の腫瘍免疫を誘導して癌治療に、あるいは腫瘍抗原に対する自己抗体の測定に応用できる可能性が期待されている。

我々は腺癌関連糖鎖抗原である DU-PAN-2 (D-2) を認識する抗 D-2 単クローン抗体を免疫原として抗イデオタイプ抗体 (Id) を作成し、その性状を分析すると同時にその抗体により誘導される免疫応答について検討しようとした。さらに、抗原構造の内部イメージを有する Id を用いて血中抗 D-2 抗体を検出する酵素抗体法 (EIA) を開発し、各種癌患者血中に存在する一種の自己抗体である抗 D-2 抗体価の測定を試み、その診断的意義を明らかにしようとした。

## 1. 抗イディオタイプ抗体の作成とその特異性

ポリクローナル Id (pId) は、抗 D-2 単クローン抗体をウィタター系ラットに免疫することにより作成し、得られた血清は等量の正常 BALB/c マウス血清にて非特異的抗体を吸収した後、protein A カラムにて Ig 分画に精製した。単クローン Id (mId) は、抗 D-2 単クローン抗体と LPS と結合させ BALB/c マウスに免疫し、その脾細胞とミエローマ細胞 (SP-2) と融合させたハイブリドーマより得た。その選択は D-2 抗原と D-2 抗体の結合反応阻害試験により行い、3 つの mId 産生クローンが得られ、その亜分画はいずれも IgG<sub>1</sub> であった。

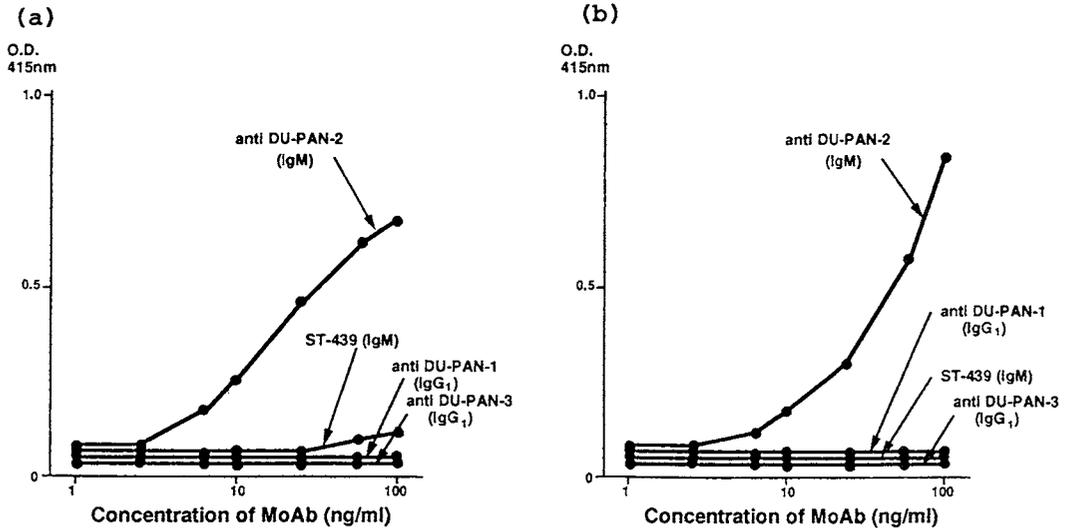


図 1 : Binding specificity of anti-idiotypic antibodies with anti-DU-PAN-2 MAb or other MAbs. (a) ; polyclonal anti-idiotypic Ab(pId), (b) ; monoclonal anti-idiotypic Ab(mId).

得られた pId と各種単クローン抗体との反応性を検討すると (図 1 a), pId は D-2 抗体とのみ濃度依存的に反応したが、他の抗体とは反応しなかった。D-2 抗原と D-2 抗体との反応に対する阻害活性の検討では図 2 に示すように濃度依存的に抗原抗体反応を阻害したが、対照として用いた正常マウス IgG には阻害活性はみられなかった。mId についても同様に検討すると、図 1 b に示すごとく D-2 抗体とのみ特異的に反応した。また、抗原抗体反応阻害試験においてもいずれのクローンも濃度依存的な阻害活性を示した (図 2)。以上より、得られた mId は抗 D-2 抗体の抗原結合部位を認識する、つまり内部イメージと呼ばれる D-2 抗原のエピトープと相同な構造を有する特異な抗体であると考えられる。また、得られた pId には上述したような mId と同様な性状を有する抗体の含まれることが確認された。

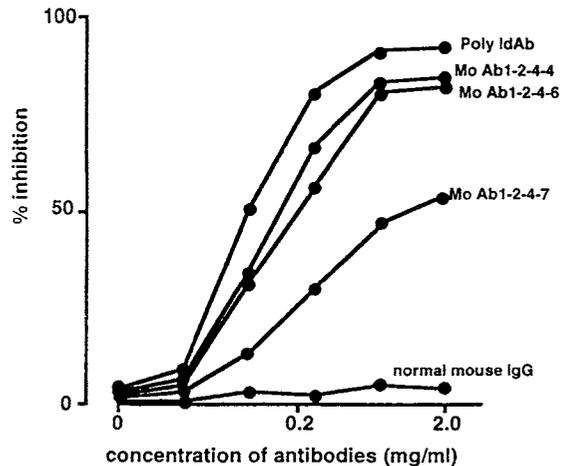


図 2 : Inhibition of binding of anti-DU-PAN-2 MAb and DU-PAN-2 Ag by pId or mIds.

## 2. Idにより誘導される免疫応答の検討.

前述の mId (Ab 2) 20 $\mu$ g と LPS と結合させ BALB/c マウスに毎週 4 回腹腔内に注射し、抗血清を得て、その抗・抗イデオタイプ抗体 (Ab 3) の誘導の有無を検討した。比較対照として抗 DU-PAN-1 単クローン抗体を同様に免疫して抗血清を得た。mId を免役して得られた抗血清は図 3 a に示すごとく濃度依存的に mId (Ab 2) と反応したが、比較対照抗血清にはその様な反応は認められなかった。また、Ab 2 免疫血清による D-2 抗体 (Ab 1) と D-2 抗原の結合反応の阻害を検討すると濃度依存的に結合反応が阻害された (図 3 b)。さらに、膀胱癌細胞 HPAF より精製した D-2 抗原を SDS 電気泳動にて分離し、Ab-2 免疫血清 (Ab 3) によるウエスタンブロッティングを行うと Ab-1 により染色された同じ部位に一致して活性帯が検出されたが、比較対照抗血清や予め D-2 抗原で吸収した Ab-2 免疫血清では活性帯は検出されなかった。以上のことより、Ab-2 免疫血清中にはいわゆる Ab 1 like Ab 3 の誘導されていることが示唆された。

Id により各種免疫反応を誘導し、治療に応用しようとする試みは報告されているが、実際に Id が生体内においてどのような免疫系に作用するか十分明らかにされていない。

D-2 抗原のエピトープは糖鎖抗原なので、免疫原性は弱いですが、本研究で示すように内部イメージといわれる D-2 抗原のエピトープと相同な構造を有する Id 抗体を用いることにより、元の D-2 抗原を認識する特異な抗体を誘導することが可能である。今後、誘導された Ab 3 がどのような機序で、どの程度に抗腫瘍活性を発揮できるかなどについて検討をすすめる必要がある。

## 3. Id を用いた血中抗 DU-PAN-2 自己抗体測定法の開発とその測定の臨床的意義

まず、血清サンプルを他の自己抗体を吸着する目的で Sepharose 4B に結合させた正常 IgG にて処理した。その遠心上清を mId または pId を固相化したプレートに添加反応させた後、2 次抗体に POD 標識抗ヒト IgG+A+M を使い、ABTS にて発色し、その吸光度より抗 D-2 抗体価を測定した。

図 4 は pId を用いた EIA 法により測定した血清抗 D-2 抗体価の成績である。健常対照の平均 +

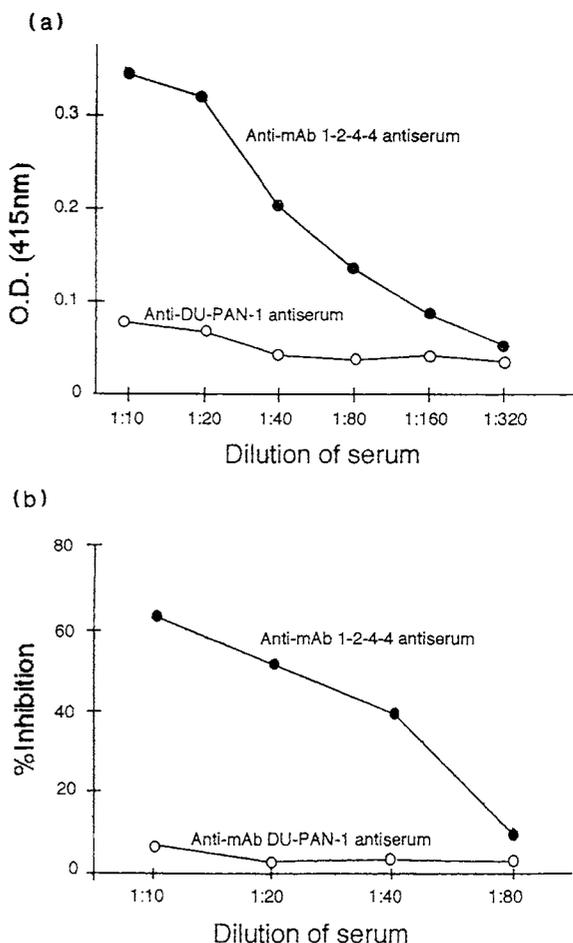


図 3 : (a) ; Binding specificity of anti-mId antiserum (Ab 3) with mId. (b) ; Inhibition of binding of anti-DU-PAN-2 MAbs (Ab 1) and DU-PAN-2 Ag by anti-mId antiserum (Ab 3).

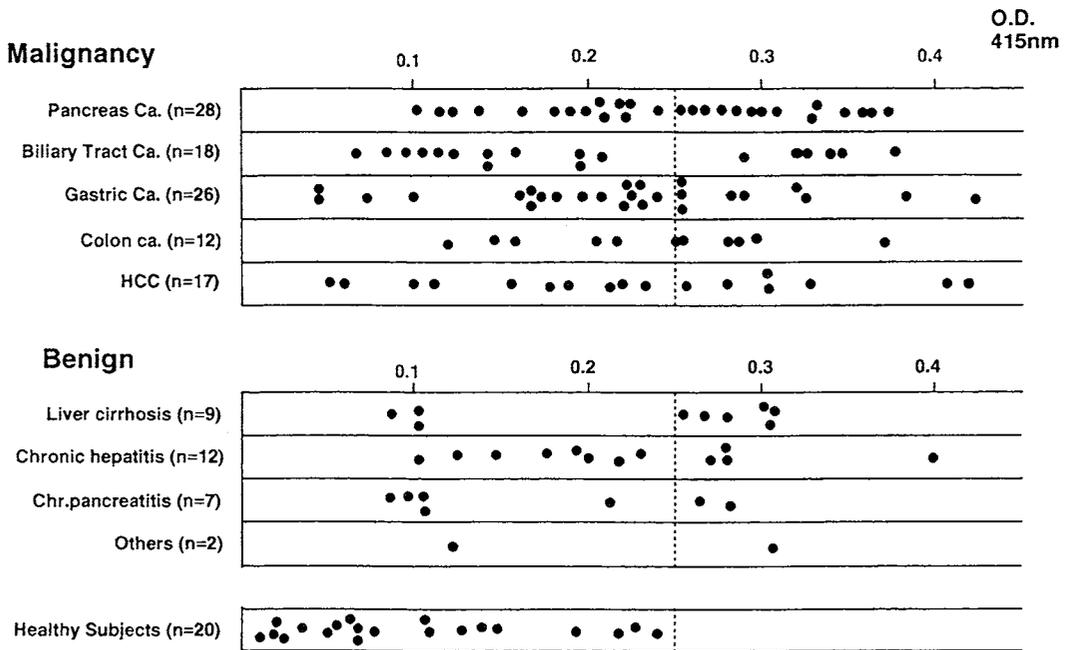


図4 : Levels of anti-DU-PAN-2 antibody detected by pId in sera of patients with various digestive diseases.

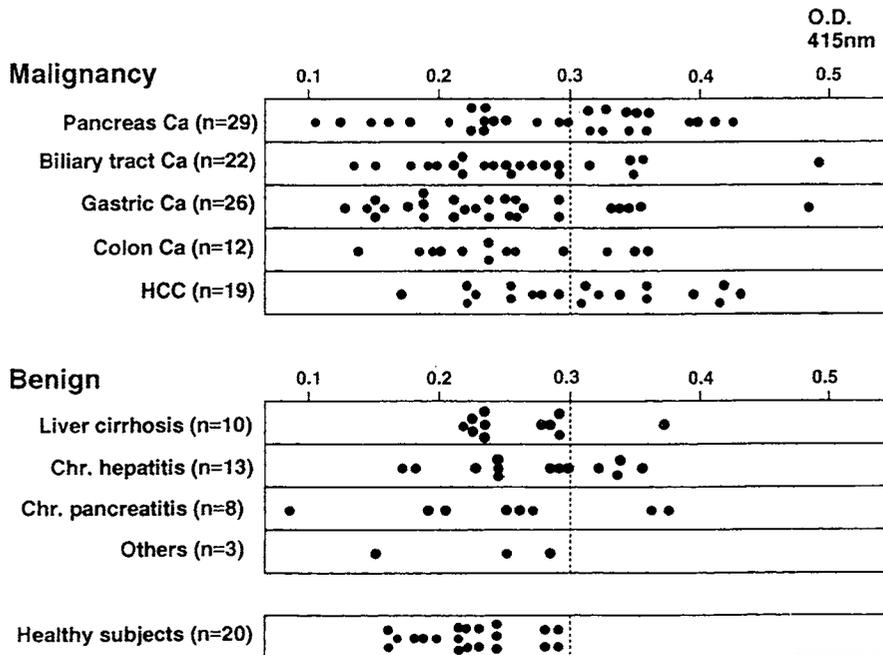


図5 : levels of anti-DU-PAN-2 antibody detected by mId in sera of patients with various digestive diseases.

2SD をカットオフ値にとると、膵癌50%、胆道癌33%、胃癌35%、大腸癌50%、肝細胞癌41%がカットオフ値を越え、癌疾患全体では42%が陽性であった。一方、良性疾患では慢性膵炎29%、慢性肝炎33%、肝硬変67%と偽陽性はかなり高率であった。mId を用いて測定した成績では図5

に示すように膵癌45%、胆道癌23%、胃癌19%、大腸癌25%、肝細胞癌53%に、癌患者全体では33%に陽性であった。一方、良性疾患全体の偽陽性は21%であり、慢性肝炎31%、肝硬変9%、慢性膵炎25%に陽性であり、pIdを用いた方法で測定した場合に比して、偽陽性率は低かった。抗体価と同時にEIA法にて測定したD-2抗原値との関連を検討すると、両者間には相関性はみられず、抗原陰性群中pId法で44% (21/48)、mId法で30% (18/60) に抗体価が陽性であった。

進行度の明らかな胃癌23例と大腸癌9例について、進行度別に血中抗D-2抗体価を検討した(図6)。I期に比してⅢ期以上での陽性率が高率であったが、早期癌であるI期においてもpId法で33% (4/12)、mId法で8% (1/12) に陽性例が認められた。さらに、この32例において進行度別にD-2抗原値と抗体価との関係を検討すると(図7)、抗原陽性例は32例中4例にみられたが、いずれもⅣ期であった。一方、抗体のみ陽性例はpIdによる測定法で34% (11/32) に認められ、その中にI期症例が4例に含まれていた。また、mId法では19% (6/32) に抗体のみの陽性例がみられ、うち1例にI期例が含まれていた。

担癌生体では癌の早期から免疫応答の起こることが想定されることより、癌患者の血清中に腫瘍抗原に感作されたリンパ球の産生する特異な自己抗体を検出しようとする試みはかなり以前より行われてきた。しかし、いずれも定性的であり、定量化がなされておらず、腫瘍マーカーとして臨床的有用性を論ずるまでに至っていない。その理由として、測定に用いる腫瘍抗原が微量にしか存在せず、精製が難しいために鋭敏で安定した測定系の確立が困難なことが挙げられ、特に免疫原性の弱い糖鎖抗原では困難であった。これに対して、本研究では内部イメージといわれるD-2抗原のエピトープと相同な構造を有するIdを抗原の代用として用い、血中抗D-2自己抗体を定量するEIA法を考案した。それを用いて癌患者血中におけるD-2抗体価を測定したところ、癌患者における陽性率はpId法で42%、mId法で33%であった。さらに、血中D-2抗原陰性群では

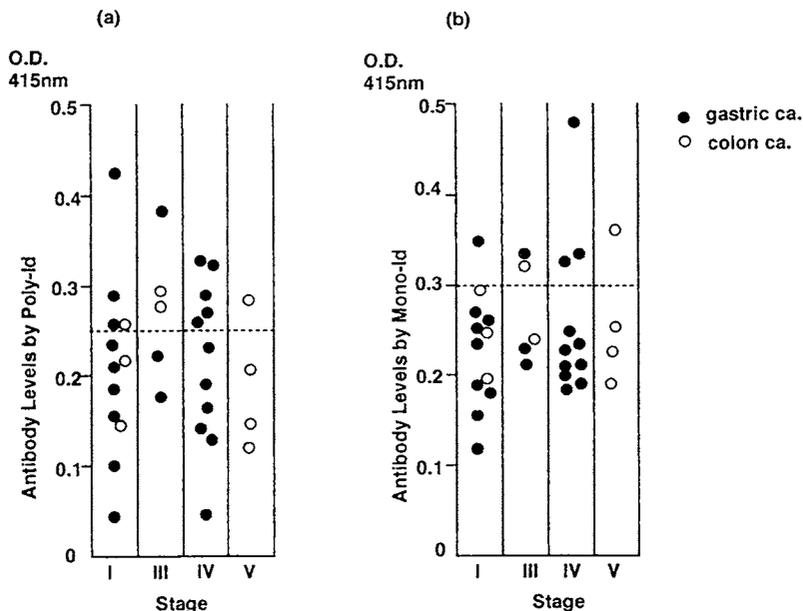


図6 : Serum anti-DU-PAN-2 antibody levels in relation to the histological stage of gastric and colorectal cancers.

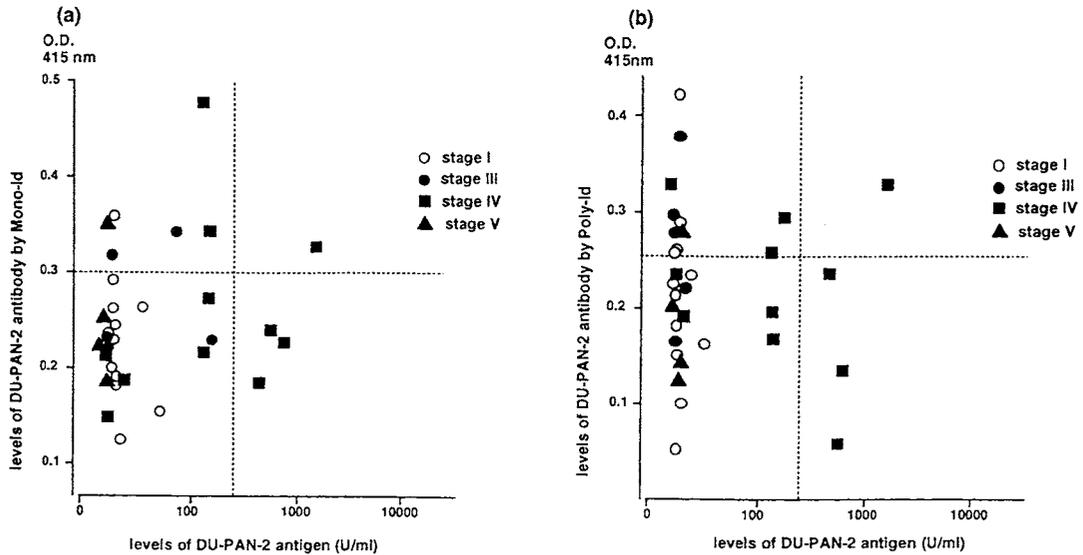


図7：Correlation between levels of DU-PAN-2 antigen and anti-DU-PAN-2 antibody determined by pId (a) or mId (b) in sera of patients with gastric or colorectal cancer of various histopathological stages.

pId法で44%，mId法で30%に血中抗D-2抗体価が陽性であり，これらの症例では血中抗原はカットオフ値以下であるため，抗原を測定しても陰性と判定されるが，抗体価の測定により，間接的に抗原の存在を推定することが可能である。

このような抗体価測定の利点が最も期待されるのは，腫瘍が小さくても免疫応答が誘発される可能性のある早期癌の診断の場合である。胃・大腸癌で進行度と抗D-2抗体価の関係を検討したところI期に比してⅢ期以上で陽性率が高率であったが，pId法では早期癌のI期で33%（4/12）に抗体価が陽性であった。胃や大腸癌の組織レベルでのD-2抗原の発現率は高々50～60%であることを考慮すればI期での抗体の33%という陽性率はかなり注目される。さらに，進行度別にD-2抗原値と抗体価の関係をみると，抗原陽性例は9%（3/32）で，いずれもⅣ期であった。一方，抗体値のみの陽性例はpId法で34%（11/32），mId法で19%（6/32）と抗原の場合に比べて明らかに多く，しかも，I期の12例では抗原陽性例はみられなかったのに対し，抗体陽性例はpId法で4例，mId法で1例に認められたことから早期診断での抗体価測定の有用性の高いことが窺えよう。

#### 4. 血中における抗DUN-PAN-2抗体の同定

pIdをSephrose 4Bに結合させたカラムにて行った高D-2抗体価を示した癌患者血清のアフィニティクロマトグラフィを行うと，溶出分画はpIdとmIdの双方に対して反応したが，D-2抗原は素通り分画のみに検出された。このことより，素通り分画にはD-2抗原抗体複合物の存在する可能性は考慮されるが，Idに対してはD-2抗原抗体複合物は反応しないものと考えられた。

ところで，我々の開発した血中抗D-2抗体測定法の問題点として，Idを用いて測定された血中抗D-2抗体が真にD-2抗原に対する自己抗体であるかということが挙げられる。そこで，上述のアフィニティクロマトグラフィで得られた吸着分画をSDS電気泳動後，ウエスタンブロッテ

ングを行うと、この分画は<sup>125</sup>I 標識 D-2 抗原ならびに <sup>125</sup>I 標識 mId のいずれとも反応し、同じ泳動位置に活性帯が検出された。このことより、EIA 法にて検出される抗 D-2 抗体は、D-2 抗原にも反応することが示され、また、患者血中にその様な抗体の存在することが証明された。