

抗胎盤性アルカリフォスファターゼ抗体を用いた転移性精巣腫瘍の診断および治療

著者	越田 潔
著者別表示	Koshida Kiyoshi
雑誌名	平成7(1995)年度 科学研究費補助金 一般研究(C) 研究成果報告書
巻	1993-1995
ページ	11p.
発行年	1996-03
URL	http://doi.org/10.24517/00049350

KAKEN

1995

22

抗胎盤性アルカリフォスファターゼ抗体を用いた
転移性精巣腫瘍の診断および治療

研究課題番号 05671307

平成5、6、7年度科学研究費補助金（一般研究C）
研究成果報告書

平成8年3月

研究代表者 越田 潔
(金沢大学医学部泌尿器科学教室)

研究課題

抗胎盤性アルカリフォスファターゼ抗体を用いた転移性精巣腫瘍の診断および治療

研究組織

研究代表者：越田 潔 (金沢大学医学部 講師)

研究分担者：山本 肇 (金沢大学医学部 助手)

平野 和行 (岐阜薬科大学 教授)

研究経費

平成5年度 1000千円

平成6年度 700千円

平成7年度 600千円

共同研究者：横山 邦彦 (金沢大学医学部核医学)

打林 忠雄、並木 幹夫 (金沢大学医学部泌尿器科学)



8000-45013-5

金沢大学附属図書館

論文発表

(主要論文)

- I. Significance of placental alkaline phosphatase (PLAP) in the monitoring of patients with seminoma. K. Koshida, T. Uchibayashi, H. Yamamoto, K. Hirano. *British Journal of Urology*, 77: 138-142, 1996.
- II. Immunohistochemistry of placental alkaline phosphatase in testicular germ cell tumors. H. Yamamoto, T. Uchibayashi, K. Koshida, K. Hirano, H. Hisazumi. *Urologia Internationalis*, 50: 33-35, 1993.
- III. A potential use of monoclonal antibody to placental alkaline phosphatase (PLAP) to detect lymph node metastases of seminoma. K. Koshida, T. Uchibayashi, H. Yamamoto, K. Yokoyama, K. Hirano. *Journal of Urology*, 155: 337-341, 1996.
- IV. Factors contributing to imaging of xenografts using anti-placental alkaline phosphatase monoclonal antibody. K. Koshida, K. Yokoyama, T. Uchibayashi, H. Yamamoto, K. Hirano, M. Namiki. submitted to *J Urol*
- V. Natural interferon enhances expression of placental alkaline phosphatase in human seminoma xenograft. K. Koshida, H. Yamamoto, T. Uchibayashi, K. Yokoyama, K. Hirano, M. Namiki. submitted to *Urol Int*
- VI. Immunolocalization of anti-placental alkaline phosphatase monoclonal antibody in mice with testicular tumors and lymph node metastasis. K. Koshida, K. Yokoyama, T. Uchibayashi, H. Konaka, K. Hirano, M. Namiki. submitted to *J Urol*

(関 連 論 文)

Altered form of alkaline phosphatase produced by Hep 2 substrain derived from HeLa cells. I. Koyama, R. Makiya, K. Hirano, T. Komoda, T. Stigbrand. *Seibutsu-butsurigaku*, 37: 75-82, 1993.

The alkaline phosphatase in human plexus chorioideus. Y. Nishihara, Y. Hayashi, T. Fujii, T. Adachi, T. Stigbrand, K. Hirano. *Biochem Biophys Acta*, 1209: 274-278, 1994.

Expression of heterodimeric (placental-intestinal) hybrid alkaline phosphatase in KB cells. H. Kodama, K. Asai, T. Adachi, Y. Mori, K. Hayashi, K. Hirano, T. Stigbrand. *Biochem Biophys Acta*, 1218: 163-172, 1994.

ELISA for human tissue-unspecific(liver/bone/kidney) alkaline phosphatase. Y. Hayashi, Y. Nishihara, A. Murata, T. Yasuda, M. Minagawa, T. Mitani, T. Adachi, K. Hirano. *Jpn J Clin Chem*, 23: 203-208, 1994.

Immunohistochemical demonstration of intestinal-type alkaline phosphatase in stomach tumors induced by N-methyl-N-nitrosoguanidine in rats. H. Yuasa, K. Hirano, H. Kodama, H. Nakanishi, T. Imai, H. Tsuda, K. imaida, M. Tatematsu. *Jpn J Cancer Res*, 85: 897-903, 1994.

Levels of alkaline phosphatase isozymes in testicular tumors and the adjacent normal looking tissues in the testis. H. Yamamoto, T. Uchibayashi, K. Koshida, K. Hirano. submitted to *Urol Res*

学会発表

第43回日本泌尿器科学会中部総会 1993

精巣腫瘍の腫瘍マーカー：胎盤性アルカリフォスファターゼ (PLAP) と既存マーカーとの比較検討

越田 潔、山本 肇、打林忠雄

11th Asia-Panpacific Cancer Congress, 1993

Immunopathology of alkaline phosphatase isozymes in seminoma.

H. Yamamoto, T. Uchibayashi, K. Koshida, K. Hirano

第53回日本癌学会総会 1994

抗アルカリフォスファターゼ抗体を用いた転移性セミノーマのイメージングに関する基礎的検討

越田 潔、山本 肇、打林忠雄、横山邦彦、平野和行

第32回日本癌治療学会総会 1994

進行性精巣腫瘍の臨床的検討：腫瘍マーカーの推移と治療効果との関連について

越田 潔、山本 肇、打林忠雄

第44回日本泌尿器科学会中部総会 1994

ヒト精巣セミノーマ移植腫瘍の産生する胎盤性アルカリフォスファターゼ (PLAP) について

山本 肇、越田 潔、打林忠雄、平野和行

第82回日本泌尿器科学会総会 1994

抗アルカリフォスファターゼモノクローナル抗体の腫瘍集積性について：HeLa細胞およびヒト精巣セミノーマ由来細胞を用いた検討

越田 潔、山本 肇、打林忠雄、平野和行

23rd International Congress of Urology, 1994

A potential use of a monoclonal antibody to placental alkaline phosphatase (PLAP) to detect lymph node metastasis of seminoma.

K. Koshida, H. Yamamoto, K. Yokoyama, T. Uchibayashi, K. Hirano

23rd International Congress of Urology, 1994

Levels of alkaline phosphatase isozymes in testicular tumors and the adjacent normal tissues (CIS) of the tumors.

H. Yamamoto, K. Koshida, T. Uchibayashi, K. Hirano

第83回日本泌尿器科学会総会 1995

精巣腫瘍における胎盤性アルカリフォスファターゼの研究 (特別講演)

越田 潔

第54回日本癌学会総会 1995

SCIDマウスにおける胎盤性アルカリフォスファターゼ (PLAP) 産生精巣腫瘍およびリンパ節転移モデルの作製と同モデルにおける抗PLAP抗体の腫瘍集積性について
越田 潔、横山邦彦、山本 肇、打林忠雄、平野和行

第33回日本癌治療学会総会 1995

抗胎盤性アルカリフォスファターゼ抗体の腫瘍集積性：腫瘍抗原発現量と血流量が腫瘍イメージングに及ぼす影響について
越田 潔、横山邦彦、山本 肇、打林忠雄、平野和行

第33回日本癌治療学会総会 1995

精巣腫瘍および腫瘍周囲組織 (CIS) における胎盤性アルカリフォスファターゼ (PLAP) 濃度について
山本 肇、越田 潔、打林忠雄、平野和行

第45回日本泌尿器科学会中部総会 1995

インターフェロンのヒトセミノーマ移植腫瘍内アルカリフォスファターゼ活性における増強効果ならびに抗アルカリフォスファターゼ抗体の腫瘍集積に及ぼす影響
越田 潔、山本 肇、打林忠雄、平野和行

The Third Beijing International Symposium on Recent Advances in Urology, 1995

Placental alkaline phosphatase (PLAP) in testicular tumors (Invited lecture)

K. Koshida

はじめに

我々は特異的腫瘍マーカーがないとされてきたヒト精巣セミノーマにおいて胎盤性アルカリフォスファターゼ (PLAP) がその腫瘍マーカーとして有用であることを臨床的に確認してきた (論文 I)。患者血清 PLAP レベルは腫瘍組織内濃度ならびに腫瘍進展度にある程度相関していることが示された (論文 I)。セミノーマ組織内 PLAP レベルは正常精巣および非セミノーマ精巣腫瘍に比べそれぞれ約 80 倍、10 倍高く、PLAP はおもに腫瘍細胞膜に局在していることが確認された (論文 II)。従って PLAP を標的とする抗 PLAP 抗体は腫瘍の immunodetection and immunotherapy において有用であることが期待される。そこで PLAP 産生細胞株：HeLa Hep 2 cell とヒトセミノーマのリンパ節転移巣より SCID マウスに継代移植腫瘍として樹立したヒトセミノーマ腫瘍を用いて以下の項目について検討を行った。

実験 1：HeLa Hep 2 cell は PLAP の約 1/10 量の肝性アルカリフォスファターゼ (LAP) を産生する。そこでヌードマウス背部皮下に HeLa 細胞を移植し Anti-PLAP MAb および Anti-LAP MAb の集積性を観察し抗原量の相違が抗体集積性に及ぼす影響を検討した。

実験 2：ヒトセミノーマと HeLa あるいはヒト膀胱癌由来細胞株：KK-47 を同時に移植した SCID マウスを用いて Anti-PLAP MAb の集積性について観察し、腫瘍イメージングに影響を及ぼす因子について検討した。

実験 3：ヒトセミノーマにおける PLAP 濃度は HeLa より高いにもかかわらず Anti-PLAP MAb の集積性は低く腫瘍イメージングは不可能であった。そこでインターフェロン投与による腫瘍抗原量の増強効果ならびに抗体集積増強効果を検討した。

実験 4：SCID マウス精巣に HeLa 細胞を injection することにより精巣腫瘍およびそのリンパ節転移モデルを作製し、Anti-PLAP MAb の血行性およびリンパ行性投与における腫瘍集積性について検討した。

実験 5：上記の精巣腫瘍転移モデルでは肝、肺にヒトベータグロビンの PCR 産物として検出される micrometastasis の存在が示された。そこで I-131 labeled Anti-PLAP MAb による Macro- and micrometastasis に対する抗腫瘍効果を検討した。

研究成果

実験 1 (論文 III)

ヌードマウス背部に移植されたHeLa細胞が産生するPLAPレベルはヒトセミノーマ精巣腫瘍ならびにリンパ節転移巣のPLAPレベルに相当していた。いっぽうHeLa細胞が産生するLAPレベルはアルカリフォスファターゼ活性として非セミノーマ精巣腫瘍のPLAPレベルに相当していた。免疫組織化学染色においてはPLAP, LAPともセミノーマ細胞の細胞膜におもに局在していることが示された。そこで一種類の移植腫瘍に2種類の抗体: Anti-PLAP MAb, Anti-LAP MAbを用いることにより、抗原量の違いが抗体の腫瘍集積性およびイメージングにどのように影響するかを観察したところ、Anti-PLAP MAbの投与によってのみ腫瘍イメージを捕えることが可能であった。従って臨床においてはAnti-PLAP MAbを用いたリンパ節転移巣を含めたセミノーマ病巣の描出の可能性が示唆されると同時に、抗原量の相違から同抗体を用いた非セミノーマ病巣の検出は困難であることが予想された。

実験 2 (論文 IV)

より臨床に近い実験条件を設定することを目的にヒトセミノーマ腫瘍のリンパ節転移巣をSCIDマウスに移植し、これを継代移植腫瘍として樹立した。同腫瘍の増殖速度はHeLaのそれに比べて遅いが、腫瘍内PLAP濃度はHeLa細胞より高い濃度を維持していた。低レベルのPLAPを発現しているヒト膀胱癌由来細胞株: KK-47を加えて3種類の移植腫瘍に対するAnti-PLAP MAbの腫瘍局在について観察した。HeLaの腫瘍イメージングは抗体投与48時間以降、またKK-47の腫瘍イメージングは抗体投与後216時間で捕えることが可能であったが、最も高いPLAP濃度を有するヒトセミノーマ移植腫瘍は全く描出されなかった。タリウム (TI-201) を用いた腫瘍血流の測定結果からヒトセミノーマのそれは最も少ないことが示され、腫瘍血流は抗原量よりも重要な因子であることが示唆された。さらに抗体の低分子化を計ることにより、血管から腫瘍組織への透過性を増し、かつ抗体の全身循環からの排泄を促すことで腫瘍/血流の比を増加させ、ヒトセミノーマにおける腫瘍イメージングの改善が可能であることが示された。

実験 3 (論文 V)

インターフェロン (IFN) は種々の生物学的活性を示す物質として知られ、細胞膜に存在する糖蛋白抗原の発現にも影響を及ぼすことが示されている。そこでこれまでにCEAなどにおいて報告されているIFN投与による細胞膜抗原の発現増強効果がヒトセミノーマ移植腫瘍のPLAPにおいて誘導されうるか否かを検討した。IFN投与により腫瘍組織内PLAP濃度は約50%増加した。抗体の腫瘍集積性は増強し抗体投与11日後において腫瘍イメージの改善をみた。しかしこの際の腫瘍/血流比は1.0以下で抗体投与

後早期から腫瘍イメージを捕えることは困難であり、IFN投与量や投与方法に検討の余地を残した。

実験 4 (論文 VI)

これまでの検討ではマウス背部皮下移植腫瘍においてはある一定の抗原量と血流が確保されればAnti-PLAP MAbのPLAP産生腫瘍に対する特異的集積が認められ腫瘍イメージングが可能であることが示された。より臨床に即した条件を設定することを目的にHeLa細胞をマウス精巣に注入することにより、精巣腫瘍ならびにそのリンパ節転移モデルを作製した。そこでAnti-PLAP MAbを血行性(経静脈)およびリンパ行性(足底)に同時に投与した際の抗体の分布状態を観察した。抗体の腫瘍集積性は精巣腫瘍よりもリンパ節転移巣に高く、これは病巣の大きさおよび抗原量の相違によるものと考えられた。また抗体の腫瘍集積の絶対量は血行性投与の方が勝っていた。リンパ行性投与によるリンパ節に対する優位な抗体の集積は認められずこの転移モデルにおいては腫瘍局在診断および標的治療に際し、抗体の血行性投与の有用性が示唆された。

実験 5

上記のマウス転移モデルを用いてRI標識抗体を用いた標的治療の可能性について検討した。精巣腫瘍およびリンパ節転移巣に対しては腫瘍重量においてそれぞれ57%、95%の抑制率を認めたが(Figure 1-A, B)、組織学的に残存腫瘍が確認された(Figure 2)。またこのモデルにおいては腫瘍細胞注入後1週目より肝、肺にPCRによって検出可能であるmicrometastasisが認められたことより、これらの病巣に対する抑制率を検討したところ、それぞれ97%、81%であった(Figure 3)。以上の結果よりRI標識抗体を用いたRadioimmunotherapyの抗腫瘍効果が確認されたが、PCRでのみ検出されるmicrometastasisに対しても同療法の治療限界が示唆された。

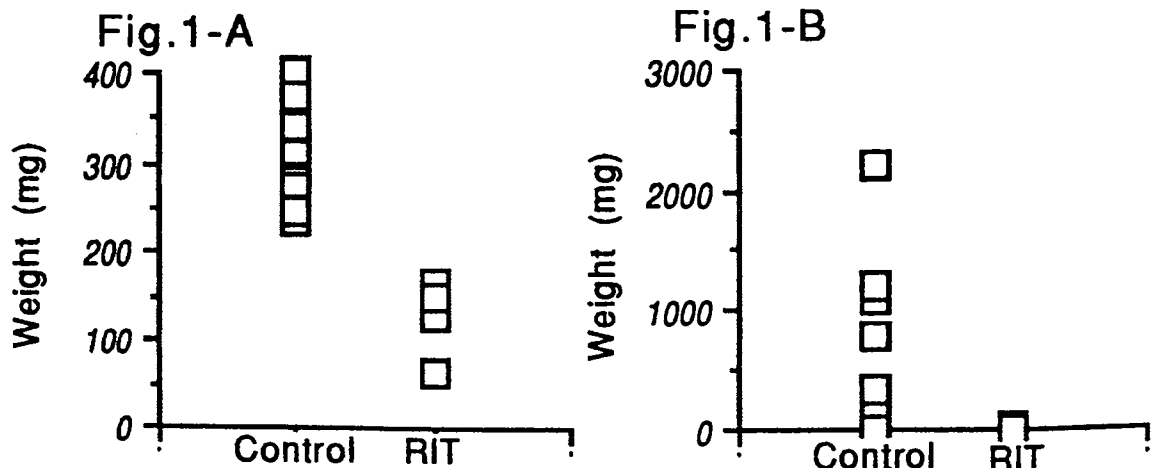


Figure 2

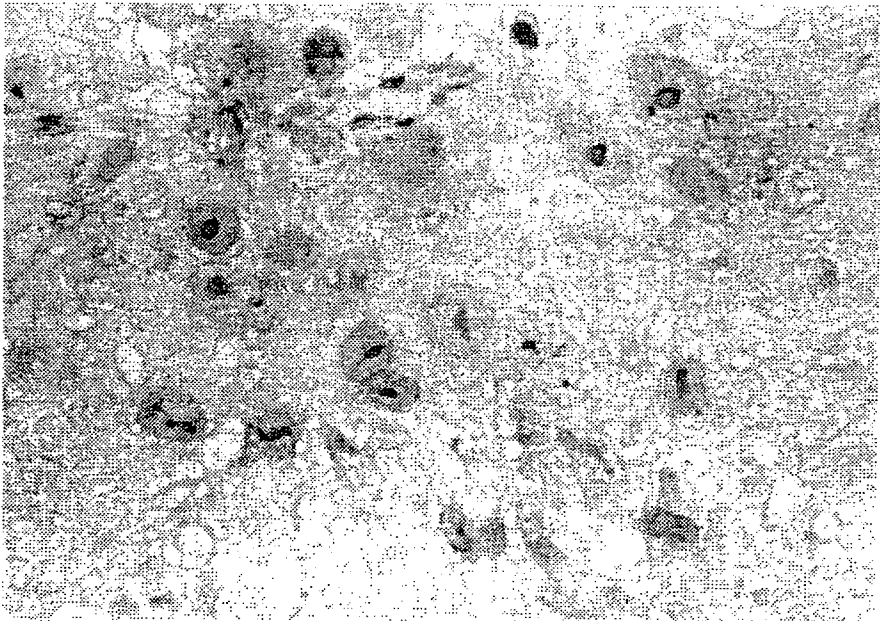
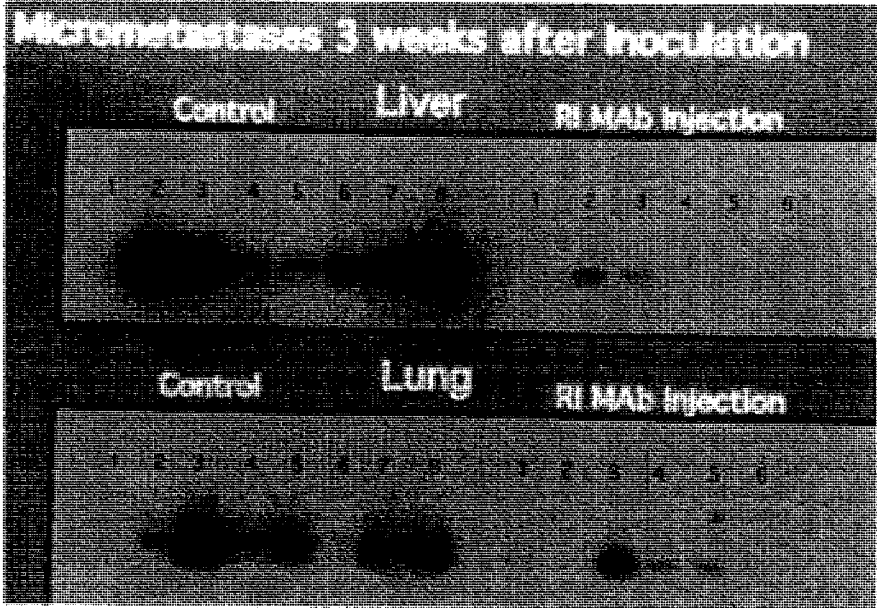


Figure 3



ま と め

ヒト精巣セミノーマにおける胎盤性アルカリフォスファターゼ (PLAP) の腫瘍マーカーとしての有用性を示し、腫瘍局在診断、標的治療におけるPLAPのターゲットとしての可能性についてマウスの移植腫瘍モデルを用いて検討した。本研究で得られた知見をまとめると以下の如くである。

1 セミノーマ患者における血清PLAP陽性率は約50%であった。血中半減期は2.3日と比較的短く同マーカーの推移を追うことは病勢、予後を知るうえで有用であった。

2 ヒトセミノーマと同レベルのPLAPを産生する細胞株 (HeLa Hep 2 cell) のマウス背部皮下移植腫瘍においてはRI標識抗胎盤性アルカリフォスファターゼ抗体の特異的集積が認められ鮮明な腫瘍イメージングが得られた。同抗体の臨床応用の可能性が示唆された。

3 しかしSCIDマウスに樹立したヒトセミノーマ移植腫瘍では高いPLAP濃度にもかかわらず同抗体の腫瘍集積は認められなかった。同腫瘍における少ない血流量がこの一因と考えられた。この結果は臨床における化学療法、放射線療法後の残存腫瘍に対するアプローチの困難さを伺わせた。また抗体の低分子化により腫瘍イメージングの改善の可能性が示唆された。

4 SCIDマウスに確立した精巣腫瘍およびそのリンパ節転移モデルにおいてはより小さい病巣 (リンパ節転移巣) により有効な抗体の集積性を認め、微小転移巣に対する標的治療の有用性が示唆された。

5 RI標識抗体による治療実験においては明らかな腫瘍増殖抑制効果が確認されたが、精巣内腫瘍細胞の消失には至らず、またリンパ節転移を完全に抑制できなかった。さらにPCRで検出された肝、肺におけるmicrometastasisに対してもそれらを消失させるには至らず同療法の治療限界が示唆された。

以上より抗胎盤性アルカリフォスファターゼ抗体がPLAP産生腫瘍に特異的に集積することが確認され、同抗体が転移性ヒトセミノーマの局在診断、標的治療に有用であることが示唆された。しかしRadioimmunotherapyの根治性に関してはここに提示したマウスの精巣腫瘍転移モデルにおいて治療限界が示唆され臨床応用に際してさらなる基礎的検討が必要であると考えられた。