

氏 名（本籍）                    原        田        雄        功

学 位 の 種 類                    博        士    ( 医    学 )

学 位 記 番 号                    医        第    2 6 2 9    号

学 位 授 与 年 月 日                平 成   6 年   2 月   2 3 日

学 位 授 与 の 条 件                学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴                        昭 和 6 0 年   3 月   3 1 日  
   東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目                    Production and characterization of two novel  
   monoclonal antibodies AM-1 and AM-2 generated against breast cancer cell line, HMA-1.  
   ( 乳 癌 細 胞 株 HMA-1 に 対 する 単 ク ロ ー ン 抗 体 の  
   作 成 と そ の 認 識 抗 原 の 解 析 )

( 主 査 )

論 文 審 査 委 員                    教 授 森        昌 造        教 授 松 野 正 紀

   教 授 菅 村 和 夫

# 論文内容要旨

## 【研究目的】

ムチンの一種である MUC 1 と TAG-72 は、乳癌関連抗原として構造や機能が研究され、既に血清診断等に臨床応用されているが、癌化に伴い増加する抗原は、これら以外にも数多く存在すると考えられている。今回新たな癌関連抗原の発見を目的とし、当科で樹立したヒト乳癌細胞株 HMA-1 を免疫原として、単クローン抗体を作成した。その結果、乳癌組織に強く反応する 2 種類の IgM 抗体、AM-1 と AM-2 を選択した。本研究では、これらの抗体が認識する抗原（AM 抗原）の解析と、本抗体を用いた血清診断への応用について検討した。

## 【材料と方法】

### ハイブリドーマの作成

今回免疫原として用いた HMA-1 は MUC 1, TAG-72 等の乳癌関連抗原や *c-erbB-2* 蛋白を発現している新しい乳癌細胞株である。Balb/c マウスに対し、HMA-1 細胞と無血清培養上清の両者を用いて免疫し、ポリエチレングリコール法にてマウス脾細胞と P3X63Ag8.653 マウスミエローマ細胞との細胞融合を行った。HAT 培地によるセレクション後、乳癌組織切片を用いた免疫染色にて癌細胞に強く反応する 2 抗体を選択し、限界希釈法にてクローニングを行った。

### 免疫染色法による抗原解析

ABC 法にて、ヒト正常組織および乳腺腫瘍を材料として免疫染色を行った。また既知の抗原（MUC 1, TAG-72, CEA）を認識する抗体を用いた免疫二重染色を行った。

### 免疫沈降

抗原分子解析を目的とし、免疫沈降を行った。この際抗原を Neuraminidase, O-glycanase, N-glycanase 等で処理を行い、沈降する分子量の変化を検討した。

### Flow cytometry による抗原解析

まず抗原を Heat, Pronase, NaIO<sub>4</sub> 等で処理し、抗原性の変化を検討した。次いで MUC 1 や TAG-72 を認識する抗体（DF 3, HMFG-1, HMFG-2, SM-3, MUSE 11, B 72.3）や合成 MUC 1 ペプチドを用いた阻害実験を行った。

### Sandwich ELISA による抗原解析

MUC 1, TAG-72, CEA を認識する固相化抗体を用い、可溶化 HMA-1 を抗原とした Sandwich ELISA を行った。

### Sandwich RIA によるヒト血清中の抗原測定

対象は良性乳腺疾患 14 例、原発乳癌 31 例、進行・再発乳癌 51 例で、対照として正常女性 49 例、乳腺以外の悪性疾患 25 例、良性疾患 23 例の血清を測定した。更に乳癌患者においては同時

に CA15-3 を測定し、AM 抗原と CA15-3 抗原の相関について検討した。

## 【結 果 と 考 察】

### 免疫染色法による抗原解析

正常組織において AM-1 は腎尿細管、皮膚、脾臓等に、AM-2 は腎尿細管、肺、顎下腺等に反応が見られた。乳腺組織においてはいずれの抗体も正常、良性乳腺組織の apical surface に、乳癌組織の cytoplasm に反応が見られた。

### 免疫沈降

両抗体とも、分子量が 160～210kDa、および 370kDa 以上の分画に沈降を認めた。抗原の酵素処理の結果、AM 抗原には、シアル酸に富むムチン型糖鎖とアスパラギン型糖鎖の両者が存在すると考えられた。

### Flow cytometry, Sandwich ELISA による抗原解析

酵素および化学処理による抗原解析の結果、いずれの抗原でも熱処理または Pronase 処理にて抗原性が大きく減少し、NaIO<sub>4</sub> 処理にて抗原性は減少した。従って AM-1、AM-2 抗原のエピトープはいずれも Glycoprotein と考えられた。

既知の抗体を用いた阻害実験の結果、AM-1 は AM-2、DF 3 で阻害され、AM-2 は AM-1、HMFG-1、MUSE 11 で阻害された。しかしいずれの抗体も MUC 1 合成ペプチドでの阻害は見られなかった。

Sandwich ELISA 実験の結果、Solid AM-1-AM-1 または Solid AM-2-AM-1 の組み合わせで可溶性抗原量の測定が可能だったが、Solid B72.3-AM-2 でも Sandwich 可能であった。

以上の結果より、AM-1、AM-2 は同一の抗原（AM 抗原）を認識し、MUC 1 や TAG-72 とは異なること、AM 抗原が MUC 1、TAG-72 抗原と 3 量体を形成している可能性があることが示された。

### Sandwich RIA によるヒト血清中の抗原測定

AM 抗原は、乳癌患者、特に進行・再発例で血清中に増加したが、良性乳腺疾患や乳腺以外の良性、悪性疾患では増加しなかった。

乳癌患者血清においては AM 抗原値と CA15-3 との相関係数は 0.171 であり、両者間に相関は見られなかった。

## 【ま と め】

ヒト乳癌細胞株 HMA-1 を免疫原として新しい単クローン抗体 AM-1 および AM-2 を作成した。これらの抗体が認識する抗原（AM 抗原）は MUC 1 や TAG-72 等の既知の抗原とは異なる新しい乳癌関連抗原であり、乳癌患者の血清診断への応用が可能であった。

## 審査結果の要旨

- ・ムチン抗原である MUC1 と TAG-72 は乳癌関連抗原としてその構造や機能が研究されているが、癌化に伴い増加する抗原はこれ以外にも数多く存在するものと考えられる。今回、乳癌に関する新しい癌関連抗原の検出を目的として、乳癌細胞株 AM-1 に対する単クローン抗体 AM-1, AM-2 を作製し、その認識抗原 (AM 抗原) を解析した。
- ・AM-1, AM-2 はマウス IgM 抗体で、両者が認識する抗原 (AM 抗原) は分子量 160-210 および 370 kDa 以上の、ムチン型糖鎖とアスパラギン型糖鎖を含む高分子糖蛋白である。
- ・AM 抗原は、ヒト乳癌細胞株 HMA-1, YMB-1-E, MDA-MB-231, ZR-75-1, MCF-7, MCF-7-R27, T-47D に強く発現されるが、他臓器由来の悪性細胞株では卵巣癌の OVCAR-4 を除き、殆ど発現を認めなかった。また、AM 抗原は免疫組織化学的に乳癌細胞膜において強い発現がみられるが、正常および良性乳腺組織には極めて軽微な発現しか認められなかった。
- ・既知の乳癌関連抗原を認識する抗体や、合成ペプチドを用いた阻害実験のおお結果、AM 抗原は MUC1 や TAG-72 抗原とは異なるが、MUC1 と結合している可能性のあることが示唆された。
- ・AM 抗原は乳癌患者血清中に増加し、Sandwich RIA 法により抗原量の定量が可能であった。AM 抗原と CA15-3 抗原とは相関がなく、AM 抗原は新しい乳癌関連抗原であることが示唆された。今後、乳癌の免疫組織学的診断、血清診断ならびに AM 抗原をターゲットとした乳癌の免疫療法への応用が期待される。
- ・以上の結果から、AM 抗原は新しい乳癌関連抗原であることが示唆され、本研究は学位論文として値するものと考えられる。