



Tissue distribution of a melanoma-associated antigen immunogenic in patients with melanoma as analyzed by polyclonal antibodies to recombinant peptide antigen

加古, 覚

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1500

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001500>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	加古 覚 ^{か こ さとる} （兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博い第1026号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成8年3月31日
学位論文題目	Tissue distribution of a melanoma-associated antigen immunogenic in patients with melanoma as analyzed by polyclonal antibodies to recombinant peptide antigen. （強免疫原性悪性黒色腫関連抗原の組織分布：組み換え蛋白抗原に対する多クローン性抗体を用いた解析）
審査委員	主査 教授 市橋 正光 教授 伊東 宏 教授 河野 通雄

論文内容の要旨

〔緒言〕

悪性黒色腫の特異的能動免疫療法において能動免疫原として用いられる抗原分子の免疫原性は必須のものである。マウス単クローン性抗体により認識・同定されたヒト黒色腫関連抗原はヒト生体において免疫原性を有するものは少なく又、黒色腫患者のBリンパ球から樹立されたヒト型モノクローナル抗体ではそれらがIgMクラスに属することと、親和性の低さから抗原分子の免疫生化学的同定は困難であった。これらの問題を克服するため我々は、培養黒色腫細胞から抽出したmRNAに相補的に構築したcDNA発現ライブラリーを正常人血清でブロックした後、黒色腫患者血清により陽性クローンのスクリーニングを行った。これにより、担癌患者が有する本来の抗黒色腫免疫応答をスクリーニングに反映させることが可能であり、かつ同定されたクローンは、その性状がDNAレベルで明確であり、又大量に均一な免疫抗原の産生が可能となる。陽性反応を示した数個のクローンのうち、D-1クローンは1029bpsで核酸及びアミノ酸配列解析では既報告の哺乳動物由来遺伝子とは明らかな相同性を示さなかった。一方、ノーザンブロットにおいて、黒色腫、神経芽細胞腫、T及びBリンパ腫とハイブリダイズし、腎癌細胞、正常リンパ球、正常線維芽細胞とは反応性を示さなかった。

故にD-1抗原の組織内分布が適切であれば、黒色腫に対する特異的能動免疫療法の能動免疫原として有用と考えられる。D-1cDNAを発現ベクター内に組み込み産生させた蛋白を免疫して得られたマウス抗D-1組み換え蛋白多クローン性抗体を用いてD-1抗原のヒト正常組織内および皮膚腫瘍における発現を解析した。

〔実験材料及び方法〕

〔1〕マウス多クローン性抗D-1組み換え蛋白抗体の作成

1) D-1組み換え蛋白の発現と精製

黒色腫関連抗原D-1をコードするcDNAをplasmid BluescriptIIからpMALc2 vectorにサブクローニングする。これをE.coli.TB1にトランスフェクションしIPTGを用いて発現させる。pMALc2 vector

ではD-1cDNAはmaltose binding protein (MBP) をコードするmalE遺伝子の下流域に挿入されるが、この間には、プロテアーゼFactor Xaの認識配列が含まれており、MBPとのfusion proteinとして発現されたD-1蛋白抗原はFactor Xaにより単離される。D-1がコードする蛋白抗原は約34kDであり、SDS-PAGEにより確認したのち、免疫原として用いた。

2) マウスの免疫

Balb/cマウスを用いて、1週間ごとに5回、D-1組み換え蛋白100 μ gをcomplete Freund adjuvantと混合して皮下に投与する。第6週目に血清を採取し、以降の免疫染色実験に供した。

〔2〕組織検体

皮膚腫瘍（悪性黒色腫15例、有棘細胞癌5例、基底細胞上皮腫5例、脂漏性角化症5例、母斑細胞性母斑5例）を手術的に切除し、ホルマリン固定した後パラフィン包埋する。6 μ m切片を作成し、キシレンによる脱パラフィン、エタノール洗浄、0.3% H_2O_2 処理後、100倍希釈した多クローン性抗D-1蛋白抗体で40分間incubationする。2次抗体はビオチン化ウマ抗マウスIgG抗体を用い、発色は3-amino-9-ethylcarbazolを用いた。

〔結果〕

1) Expression vector pMALc2を用いた組み換え蛋白合成システムにおけるD-1組み換え蛋白の精製

D-1cDNAがコードする蛋白抗原は約34kDでありMBPとのfusion proteinでは約43.2kDとなる。プロテアーゼFactor Xaによって目的とする蛋白をMBPと分離し、SDS-PAGEを用いて精製度を確認した。わずかに混入するE.coli断片等に対して惹起されてくるマウス抗体の反応性をモニターするため、D-1インサートを含まないpMALc2を発現させて得た蛋白をマウスに免疫し、得られた抗体をコントロールとした。

2) 黒色腫関連抗原D-1の正常皮膚及び皮膚腫瘍における発現

悪性黒色腫15例中13例までD-1蛋白を発現していた。黒色腫の各組織型、原発巣、転移巣、メラニン生成能の有無にかかわらず著明な発現を認めた。一方、有棘細胞癌、基底細胞上皮腫、脂漏性角化症、母斑細胞性母斑では反応性を示さなかった。更に、正常メラノサイト、培養メラノサイト、正常表皮、毛包、脂腺においてもその発現は認めなかった。

又、陽性反応を示した黒色腫症例を強拡大で観察すると、D-1蛋白発現は約70%で主に細胞表面に見られ、そうでない場合は主に細胞質で認められた。

〔考察〕

cDNAライブラリーの黒色腫血清を用いたスクリーニングにより得られたD-1cDNAのin vitroでの特性は①黒色腫患者血清群（100検体）は正常血清群（100検体）に比し、約5倍のD-1蛋白に対する結合能力を示す、②ノーザンブロットで培養黒色腫細胞に強く、培養正常細胞では、殆どその発現が検出されない、③D-1cDNAシーケンス解析では、既報告、黒色腫抗原とは全く異なったものであり、また既知の哺乳動物由来蛋白とも相同性を示さない、という点である。臨床応用に不可欠なin vivoでの発現様態を解析すべく本研究を行った。

現時点ではD-1遺伝子のコードする蛋白分子のなかのどのエピトープが抗黒色腫免疫応答において最重要であるか不詳のため、多クローン性抗D-1組み換え蛋白抗体を用いて皮膚腫瘍及び正常皮膚組織における抗D-1抗原の分布を検討した。D-1抗原は黒色腫細胞にほぼ特異的に発現されており、そ

の反応性は黒色腫の病理組織分類による組織型、メラニン生成能、転移能の有無に関わりなかった。この結果より、D-1組み換え蛋白が様々な病型の黒色腫患者に対しての治療の為の免疫原として適応できると考えられた。

我々は更にD-1抗原が、黒色腫細胞表面にわずかしき発現されていない黒色腫細胞においては細胞質において相当に発現されていることを認めた。このことからD-1蛋白が細胞膜表面に発現されるためにはある種の輸送蛋白が必要なのではないかと考えられた。実際、黒色腫患者群の中にも抗D-1抗体に対して高抗体価を有する群とそうでない群が存在する。こうした事実の一つの説明として、D-1抗原が細胞膜表面に発現する際にある特定のHLA分子とリンクしているのではないかと推定している。これに関しては個々の黒色腫患者の抗D-1抗体価とHLAフェノタイプの相関性を統計的に処理すると同時に抗HLAクラスI及びクラスII抗体と多クローン性抗D-1抗体による二重免疫染色によって解析する必要がある。

Boonらは細胞障害性Tリンパ球が認識する黒色腫細胞上のエピトープをコードする遺伝子MAGE-1を同定し、その蛋白はHLA-A1分子とリンクしてのみ細胞膜表面に発現されることを示した。より効果的な免疫応答を誘導すると考えられるHLA分子とのリンクがD-1蛋白抗原発現において事実であれば、D-1抗原を用いた能動免疫療法において更に強い有用度を示唆することになる。

本研究において、生体内でのD-1抗原の分布が蛋白レベルで明白となったことは、上述したこれら次の課題に研究を展開してゆく上での堅固とした基礎となったばかりでなく、臨床応用を始める上での正当性を与えたと考えられる。

論文審査の結果の要旨

悪性黒色腫の特異的な能動免疫療法において能動免疫原として用いられる抗原分子の免疫原性は必須のものである。マウス単クローン性抗体により認識・同定されたヒト黒色腫関連抗原はヒト生体において免疫原性を有するものは少なく又、黒色腫患者のBリンパ球から樹立されたヒト型モノクローナル抗体ではそれらがIgMクラスに属することと、親和性の低さから抗原分子の免疫生化学的同定は困難であった。これらの問題を克服するため我々は、培養黒色腫細胞から抽出したmRNAに相補的に構築したcDNA発現ライブラリーを正常人血清でブロックした後、黒色腫患者血清により陽性クローンのスクリーニングを行った。これにより、担癌患者が有する本来の抗黒色腫免疫応答をスクリーニングに反映させることが可能であり、かつ同定されたクローンは、その性状がDNAレベルで明確であり、又大量に均一な免疫抗原の産生が可能となる。陽性反応を示した数個のクローンのうち、D-1クローンは1029bpsで核酸及びアミノ酸配列解析では既報告の哺乳動物由来遺伝子とは明らかな相同性を示さなかった。一方、ノーザンブロットにおいて、黒色腫、神経芽細胞腫、T及びBリンパ腫とハイブリダイズし、腎癌細胞、正常リンパ球、正常線維芽細胞とは反応性を示さなかった。故にD-1抗原の組織内分布が適切であれば、黒色腫に対する特異的な能動免疫療法の能動免疫抗原として有用と考えられる。

本研究ではD-1cDNAを発現ベクター内に組み込み産生させた蛋白を免疫して得られたマウス抗D-1組み換え蛋白多クローン性抗体を用いてD-1抗原のヒト正常組織内および皮膚腫瘍における発現を解析した。悪性黒色腫15例中13例までD-1蛋白を発現していた。黒色腫の各組織型、原発巣、転移巣、メラニン生成能の有無にかかわらず著明な発現を認めた。このことは、D-1組み換え蛋白が様々な病型の黒色腫患者に対して治療の為の免疫原として適応できると考えられた。一方、有棘細胞癌、基底

細胞上皮腫，脂漏性角化症，母斑細胞性母斑では反応性を示さなかった。更に，正常メラノサイト，培養メラノサイト，正常表皮，毛包，脂腺においてもその発現は認めなかった。又，陽性反応を示した黒色腫症例でのD-1蛋白発現は約70%で主に細胞表面に見られた。

我々は更にD-1抗原が，黒色腫細胞表面にわずかししか発現されていない黒色腫細胞においては細胞質において相当に発現されていることを認めた。このことからD-1蛋白が細胞膜表面に発現されるためにはある種の輸送蛋白が必要なのではないかと考えられた。実際，黒色腫患者群の中にも抗D-1抗体に対して高抗体価を有する群とそうでない群が存在する。こうした事実の一つの説明として，D-1抗原が細胞膜表面に発現する際にある特定のHLA分子とリンクしているのではないかと推定している。この点に関しては個々の黒色腫患者の抗D-1抗体価とHLAフェノタイプの相関性を統計的に処理すると同時に抗HLAクラスⅠ及びクラスⅡ抗体と多クローン性抗D-1抗体による二重免疫染色によって解析する必要がある。

本研究において，生体内でのD-1抗原の分布および，腫瘍細胞膜上での強い発現を蛋白レベルで明らかにしたことは，上述した如く今後の課題に研究を展開してゆく上での堅固とした基礎となったばかりでなく，臨床応用を始める上での正当性を与えたと考えられる。よって本研究者は，博士（医学）の学位を得る資格があると認める。