



Production and Characterization of a Monoclonal Antibody against Medulloblastoma derived cell line

巽, 祥太郎

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1518

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001518>

※ 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)	たつみ 巽	しょうたろう 祥太郎	(和歌山県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)		
学位記番号	博い第1030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	Production and Characterization of a Monoclonal Antibody against Medulloblastoma -derived cell line (髓芽腫細胞株に対するモノクローナル抗体の作製とその認識抗原の解析)		
審査委員	主査教授 玉木紀彦 教授 伊東宏 教授 岡田安弘		

論文内容の要旨

(はじめに)

小児固体癌中最も発生頻度の高い腫瘍の一つである髓芽腫は、各種集学的治療によってもその5年生存率は65%にすぎず、新たな治療方法の開発が急がれるところである。モノクローナル抗体を用いた腫瘍免疫学的アプローチも期待されるところであるが、髓芽腫細胞株の樹立が困難なこと、髓芽腫の持つ特異抗原が乏しいことなどから、今までに髓芽腫に対するモノクローナル抗体は僅か2種類しか報告されていない。今回、新たな髓芽腫細胞に対するモノクローナル抗体を作製し、その認識抗原を解析した。

(材料及び方法)

1. 細胞株及び組織標本

髓芽腫細胞株は、8歳男児の小脳虫部に発生した髓芽腫組織より当教室で樹立した細胞株、MED-3をもちいた。MED-3は神経系及びグリア系双方の表現型を示すのが特徴であった。ヒト成人組織は当院での手術組織を用い、ヒト胎児組織は十分なインフォームドコンセントのもとに、人工中絶された胎児を用いた。

2. モノクローナル抗体の作製

MED-3細胞の腹腔内投与により免疫したBALB/cマウスの脾細胞と、マウスマイエローマ細胞P3X 63Ag8U.1細胞とを50%ポリエチレングリコールを用いて細胞融合した。ELISA法によりMED-3細胞と反応するハイブリドーマを選択し、限界希釈法によりクローニングを行い、MED-3細胞と最も強く反応するクローニングをM1Cと名付けた。M1Cの培養上清を硫酸アンモニウムを用いて精製し、以下の解析に用いた。

3. エピトープ解析

MED-3細胞内でのM1Cのエピトープの分布を間接蛍光抗体法にて、また各種細胞株や組織標本と

の反応性はフローサイトメトリー及び酵素抗体法(ABC法)を用いて検索した。MED-3細胞をトリプシン消化、ニューラミニダーゼ処理、酸塩基処理及び熱処理し、M1Cの反応性の変化を調べた。またMED-3細胞を可溶化し、還元及び非還元条件下でポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)を行った後、Western blotting法で分子量を推定した。

4. 細胞周期及び分化誘導と抗原発現の関係

MED-3の細胞周期と抗原発現量との関係、及びMED-3細胞をdibutyryl cyclic-AMPを用いて分化誘導した後の抗原発現量の変化を、フローサイトメトリーを用いて調べた。

(結果)

M1CのサブクラスはIgMで、精製抗体のグロブリン濃度は0.25mg/mlであった。

1. 抗原の局在と生化学的性状

エタノール固定後MED-3細胞では、抗原は主に細胞質内に存在し、特に核近傍に強く発現していた。MED-3未固定細胞の免疫蛍光抗体染色では抗原は一部細胞膜上にも発現がみられた。MED-3細胞をトリプシン処理することでM1Cの反応性は失われ、その認識抗原は分子量約25,000ダルトンの蛋白と推定された。

2. 各種細胞株及び組織標本との反応性

M1Cは、すべての悪性グリオーマ由来の細胞株と最も強く反応したが、他の悪性腫瘍由来の細胞株に対しても、軽度ながら広く反応性がみられた。神経芽細胞腫及び悪性黒色腫由来の細胞株との反応性は殆ど認められなかった。悪性グリオーマ株との反応は、MED-3細胞と同じく、細胞質内、特に核近傍で強く認められた。

組織切片では、M1Cは悪性グリオーマ組織に強く反応したが、星細胞腫には反応しなかった。神経芽細胞腫にも反応は見られず、髄芽腫では4例中2例に強い反応が見られた。悪性グリオーマ組織との反応は、細胞株と同じく核近傍に強いものであった。中枢神経系以外の腫瘍では反応は全く見られず、正常組織では、成人末梢血リンパ球とのみ反応した。

3. 細胞周期および分化誘導と抗原発現との関係

フローサイトメトリーを用いた解析により、MED-3細胞における抗原発現は、G0/G1期に比べG2/M期に多く認められ、dibutyryl cyclic-AMPによる分化誘導により抗原発現が減少することが示された。

(考察)

腫瘍関連抗原の解析は悪性腫瘍の診断ならびに治療に広く応用されるようになったが、髄芽腫抗原に対して作製された抗体の報告は今まで僅か2種類にすぎない。今回報告したM1Cは、分子量25,000ダルトンの蛋白抗原を認識する抗体で、以前の報告とはまったく異なる抗原を認識するものであった。

M1Cは、悪性グリオーマ組織と強く反応したにも拘わらず星細胞腫組織との反応はみられなかった。またフローサイトメトリーを用いた解析で、MED-3の分化誘導により抗原の発現量が減少したこと、及び、G2/M期で抗原発現が増加したことから、M1Cの認識抗原は、細胞分化及び増殖関連抗原であることが示唆される。悪性グリオーマにおいては、腫瘍の悪性度に関連する抗原や、分化増殖関連抗原の解析が進められているが、髄芽腫における抗原について、分化及び増殖に関して解析されたのは本報告が初めてである。

M1Cの反応性に関する免疫組織学的検討では、M1Cは悪性グリオーマ全組織に反応し、星細胞腫及び神経芽細胞腫とは全く反応しなかったが、成人末梢血リンパ球とは反応した。過去の報告でも、悪性グリオーマが造血系細胞と共に通抗原を持つことは多く報告されているが、M1Cの反応性が、腫瘍組織では悪性グリオーマと髓芽腫に特異的であったことは注目される。

髓芽腫の細胞起源と分化に関しては今なお議論の多いところである。髓芽腫組織の免疫学的研究から、髓芽腫は神経系への分化傾向にあると報告が多くみられる一方、髓芽腫がグリア系への分化傾向を示すという報告も散見される。M1Cの認識抗原が、検索されたすべての悪性グリオーマ組織、及び半数の髓芽腫組織に存在したことから、髓芽腫細胞の一部は、悪性グリオーマと共に通抗原を持つことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

小児脳腫瘍の中で最も発生頻度が高く、最も悪性度が高い腫瘍の一つである髓芽腫は、各種集学的治療によってもその5年生存率は悪く新たな治療方法の開発が望まれている。悪性腫瘍の診断治療においてモノクローナル抗体は広く応用されるようになったが、髓芽腫細胞株の樹立が困難なこと、髓芽腫の持つ特異抗原が乏しいことなどから現在までに髓芽腫に対するモノクローナル抗体は僅か2種類しか報告されていない。本研究は、新たに髓芽腫細胞に対するモノクローナル抗体を作製し、その認識抗原を解析したものである。

髓芽腫の手術摘出組織より当教室で樹立した細胞株、MED-3細胞を腹腔内投与することにより免疫したBALB/Cマウスの脾細胞と、マウスミエローマ細胞とを50%ポリエチレングリコールを用いて細胞融合した。ELISA法によりMED-3細胞と反応するハイブリドーマを選択し、限界希釈法によりクローニングを行い、MED-3細胞と最も強く反応するクローンの培養上清からの精製抗体をM1Cと名付けた。

M1CのサブクラスはIgMで、精製抗体のグロブリン濃度は0.25mg/mlであった。

抗原はMED-3細胞の主に細胞質内に存在し、一部細胞膜上にも発現がみられた。MED-3細胞をトリプシン処理することでM1Cの反応性は失われ、Western blotting法によりその認識抗原は分子量約25,000ダルトンの蛋白と推定された。

M1Cは、悪性グリオーマ組織と強く反応したにも拘わらず星細胞腫組織との反応はみられなかったこと、またMED-3の分化誘導により抗原の発現量が減少したこと、及びG2/M期で抗原発現が増加したことから、M1Cの認識抗原は、細胞分化及び増殖関連抗原であることが示唆された。M1Cはヒト末梢血リンパ球と交差反応を示した。M1Cの反応性は、腫瘍組織では悪性グリオーマと髓芽腫に特異的であった。すなわちM1Cの認識抗原が、検索されたすべての悪性グリオーマ組織及び半数の髓芽腫組織に存在したことから、髓芽腫細胞の一部は悪性グリオーマと共に通抗原を持つことが示唆された。

本研究は髓芽腫細胞に対するモノクローナル抗体を新たに作製し、その認識抗原を解析した研究であるが、従来ほとんど行われなかった髓芽腫関連抗原を認識する抗体が得られたこと、また分化増殖との関連が解明されたことより、髓芽腫の生物学的特性について重要な知見を得たものとして、価値有る集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格が有ると認める。