



Tissue distribution of a melanoma-associated antigen D-1 immunogenic in patients with melanoma

永井, 宏

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1739

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001739>

※ 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） ^{なが}永 ^い井 ^{ひろし}宏 （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1134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10年3月31日

学位論文題目 Tissue distribution of a melanoma-associated antigen D-1 immunogenic in patients with melanoma
（強免疫原性ヒト悪性黒色腫関連抗原 D-1 の組織分布）

審査委員 主査 教授 市 橋 正 光
教授 堀 田 博 教授 伊 東 宏

論文内容の要旨

【序 文】

悪性黒色腫はその経過中における部分消退現象や黒色腫関連脱色素斑の発症を通じ、宿主免疫能と密接な関連を有することが知られている。それゆえ、免疫療法の開発は多くの興味を集め、種々の試みがなされてきた。黒色腫患者において有用な能動免疫療法の免疫原開発のため、我々は培養ヒト黒色腫細胞由来 mRNA に相補的に作成した cDNA 発現ライブラリーを正常人血清でブロックした後、標識した黒色腫患者由来血清抗体を再び正常人血清と競合的にライブラリーに結合させ陽性クローンを選択した。獲得したクローン D-1 は 1029 base pairs より成り、これまでに報告されている哺乳類動物由来遺伝子群とは顕著な相同性を示さなかった。D-1 cDNA はノーザンブロット解析にて、培養ヒト黒色腫細胞、神経芽細胞腫、T 細胞および B 細胞リンパ腫由来 mRNA とハイブリダイズし、腎癌細胞、正常線維芽細胞、正常リンパ球由来のそれとは反応を認めないため、*in vitro* において腫瘍にかなり限局した存在が推測された。D-1 抗原は黒色腫細胞においては約 50 kD の形で表面発現されており、種々の黒色腫関連抗原とも分子量において異なっていた（Hayashibe et al., *J. Immunol.*, 147 : 1098-1104, 1991）。

本研究において我々は *in vivo* における D-1 抗原の発現およびその局在の解析を行った。

【方 法】

1, 組織の準備

手術的に獲得された組織は 4 % paraformaldehyde 処理、脱水、chloroform 処理の後、パラフィンにて包埋した。

2, RNA プローブの準備

plasmid Bluescript II にサブクローンされた D-1 cDNA はアンチセンスプローブ、センスプローブ作成のためそれぞれ BamH I, Hind III 処理を行い、linearized template DNA とした後、*in vitro* transcription を行い、digoxigenin でラベルした RNA プローブを作成した。

3, *In situ* hybridization

digoxigenin でラベルした一本鎖 RNA プローブを用いて、常法に従い、*in situ* hybridization を行った。ハイブリダイゼーションは 50°C にて 16 時間行い、カウンター染色はヘマトキシリンで行った。negative control としてはセンスプローブでのハイブリダイゼーションを用いた。

4, マウスポリクローナル抗 D-1 組み替え蛋白抗体の作成

D-1 cDNA を pMALc2 vector にサブクローニングし、イソプロピル β -D-チオガラクトシド (IPTG) を用いて D-1 とマルトース結合蛋白質 (MBP) との融合蛋白質として発現を誘導した。アミロースレジンによるカラムを用い、10mM マルトースを添加した溶液で融合蛋白質を溶出させ、濃縮後、FactorXa を用いて D-1 を MBP から切り離した。proteinA-Sepharose でコートした抗 MBP 抗体を用いて MBP を除去し、精製 D-1 蛋白を得た。精製 D-1 蛋白を免疫原として投与した Balb/c マウスの血清を採取し、ポリクローナル抗 D-1 組み替え蛋白抗体を得た。

5, 免疫組織学的検討

6 μ m に薄切した組織片に対して、マウスポリクローナル抗 D-1 組み替え蛋白抗体 (100 倍希釈) を用い、avidin-biotin-peroxidase 法にて免疫組織染色を行った。

6, Dot blot analysis

guanidine isothiocyanate-cesium chloride 法によりヒト組織より total RNA を抽出し、 32 P でラベルした D-1 cRNA プローブを用いて常法に従い Dot blot analysis を行った。

7, Western blot analysis

ヒト主要臓器組織および黒色腫組織を溶解後、7.5% SDS-PAGE gel にて分離し、ニトロセルロース膜へ転写した。マウスポリクローナル抗 D-1 抗体を 1 次抗体、horse radish peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulins を 2 次抗体とし、Hyperfilm-ECL system を用いて Western blot analysis を行った。

【結 果】

1, *In situ* hybridization による D-1 mRNA の発現分布

ヒト黒色腫組織 16 例 (原発巣 11 例, 転移巣 5 例) および非黒色腫組織 25 例 (扁平上皮癌 6 例, 基底細胞癌 6 例, 脂漏性角化症 5 例, 色素性母斑 8 例) に対して digoxigenin-labelled D-1 cRNA probes を用いて *in situ* hybridization を施行した。その結果、黒色腫組織の全例において D-1 mRNA の発現が認められた。隣接する角化細胞や色素細胞, 皮膚付属器, 線維芽細胞, 浸潤リンパ球には D-1 mRNA の発現は認められなかった。D-1 mRNA の発現の強さは、メラニン産生量や原発あるいは転移巣の差に関係なかった。また、非黒色腫組織の全例において D-1 mRNA の発現は認められなかった。

2, 免疫組織染色による D-1 抗原の発現分布

マウスポリクローナル抗 D-1 抗体を用いた免疫組織染色において、黒色腫細胞に D-1 抗原の発現を認めたが、扁平上皮癌, 基底細胞癌, 脂漏性角化症, 色素性母斑を含む非黒色腫組織には D-1 抗原の発現を認めず、*in situ* hybridization に合致する結果となった。D-1 抗原は黒色腫細胞の細胞質, 細胞膜表面の両方に認められた。

3, Dot blot analysis による D-1 mRNA の発現

ヒト主要臓器組織および黒色腫組織における D-1 mRNA の発現を確認するため、Dot blot analysis を行った。黒色腫組織において D-1 mRNA の強い発現を認めたが、ヒト正常臓器（大脳、小脳、腎臓、脾臓、肺、肝臓、骨格筋）には認められなかった。

4, Western blot analysis による D-1 抗原の発現

さらに我々は、黒色腫組織では約 50 kD の D-1 抗原の発現を認めるが、ヒト正常臓器（大脳、心筋、肺、甲状腺、肝臓、脾臓、胃、結腸、腎臓）では発現をみとめないことを Western blot analysis で確認した。

【考 案】

黒色腫患者に対する能動免疫療法の有用な免疫原となりうる組み替え D-1 蛋白抗原の臨床応用に先だって、明確にすべき幾つかの点が残っている。1) 黒色腫組織、正常臓器における D-1 遺伝子および抗原の *in vivo* における発現の評価、2) D-1 抗原が特定の主要組織適合抗原と結合しているかの解析、3) D-1 ペプチドを黒色腫患者にワクチンとして使用する際の有用なアジュバンドの開発、である。これらに対する解答は、それぞれ D-1 ペプチドを黒色腫患者にワクチンとして使用することの合理性、黒色腫拒絶に好都合な CTL (cytotoxic T cell) の誘導、能動免疫の増強に対応すると考えられる。本研究においては、最初の点を解析するために *in situ* hybridization, 免疫組織染色などを行った。*in situ* hybridization, 免疫組織染色, Dot blot analysis, Western blot analysis により D-1 は遺伝子および蛋白レベルにおいてヒト正常主要臓器では発現を認めず、黒色腫組織に非常に限局した局在を示すことが明らかになった。このことは D-1 ペプチドをワクチンとして使用する際、自己免疫的な副作用が少ないことを示唆する所見あり、同ワクチンの臨床応用に先だって重要な基礎的データと考えられる。黒色腫細胞における D-1 抗原の細胞膜への表出形式に関しては、以前に報告しているように黒色腫患者血清中の抗 D-1 抗体価に大きな幅があることより、ある特定の主要組織適合抗原と結合して細胞膜表面に表出している可能性があると考えられる。その解析については今後の課題の1つである。

【結 論】

黒色腫関連抗原 D-1 はヒト正常主要臓器に発現を認めず黒色腫組織に非常に限局した局在を示すことより、組み替え D-1 蛋白抗原は黒色腫患者の能動免疫療法の有用な免疫原となりうることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

悪性黒色腫はその経過中における部分消退現象や黒色腫関連脱色素斑の発症を通じ、宿主免疫能と密接な関連を有することが知られている。それゆえ、免疫療法の開発は多くの興味を集め、種々の試みがなされてきた。黒色腫患者において有用な能動免疫療法の免疫原開発のため、我々は培養ヒト黒色腫細胞由来 mRNA に相補的に作成した cDNA 発現ライブラリーを正常人血清でブロックした後、標識した黒色腫患者由来血清抗体を再び正常人血清と競合的にライブラリーに結合させ陽性クローンを選択した。獲得したクローン D-1 は 1029 base pairs より成り、これまでに報告されている哺乳類動物由来遺伝子群とは顕著な相同性を示さなかった。D-1 cDNA はノーザンブロット解析にて、

培養ヒト黒色腫細胞，神経芽細胞腫，T細胞およびB細胞リンパ腫由来 mRNA とハイブリダイズし，腎癌細胞，正常線維芽細胞，正常リンパ球由来のそれとは反応を認めないため，*in vitro* において腫瘍にかなり限局した存在が推測された。D-1 抗原は黒色腫細胞においては約 50 kD の形で表面発現されており，種々の黒色腫関連抗原とも分子量において異なっていた。

本研究において我々は *in vivo* における D-1 抗原の発現およびその局在の解析を行った。手術的に獲得された組織標本に対して，digoxigenin-labelled D-1 cRNA probes を用いて *in situ* hybridization を施行したところ，黒色腫組織の全例において D-1 mRNA の発現が認められた。隣接する正常組織や非黒色腫組織（偏平上皮癌，基底細胞癌，脂漏性角化症，色素性母斑）には D-1 mRNA の発現は認められなかった。マウスポリクローナル抗 D-1 抗体を用いた免疫組織染色において，黒色腫細胞に D-1 抗原の発現を認めたが，非黒色腫組織には D-1 抗原の発現を認めず，*in situ* hybridization に合致する結果となった。さらにヒト主要臓器組織には D-1 の発現がみとめられないことを Dot blot analysis, Western blot analysis にて確認した。

本研究はヒト黒色腫関連抗原 D-1 の組織分布につき研究したものであるが，D-1 は遺伝子および蛋白レベルにおいてヒト正常主要臓器では発現が認められず，黒色腫組織に非常に限局した局在を示すことを種々の解析法を用いて明らかにし，組み替え D-1 蛋白抗原を用いた黒色腫患者に対する能動免疫療法の応用に先だち重要な知見を得たものとして価値あ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あると認める。