

Thesis

胃癌関連モノクローナル抗体の肺癌への応用

埼玉医科大学第2内科学教室

(指導：西村 重敬教授)

下野 暢隆

Application of Human Gastric Cancer-reactive Monoclonal Antibodies to Human Lung Cancer

Nobutaka Shimono (Division of Pulmonology, Second Department of Internal Medicine, Saitama Medical School Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Background: Detection and identification of tumor-associated antigens are essential for immunotherapy as well as diagnosis of tumors. Recently mouse monoclonal antibodies (mAbs) against human gastric cancer were raised in our laboratory. **Purpose:** We asked if these mAbs detect antigens not only of gastric carcinoma cells but also of lung carcinoma cells, and if there are any difference in the localization of tumor-associated antigens among four major histologically different carcinomas of lung. **Method:** Mice were immunized with human carcinoma cells and normal cells of stomach. Five mAbs (1e2, 3e3, 5b10, 7c4, 7e4) recognizing cell-surface and intracellular molecules of gastric carcinoma cells but not of normal gastric mucosal cells were established by subtractive immunization. Human lung carcinoma cell lines (3 squamous cell carcinomas, 2 adeno carcinomas, 3 small cell carcinomas and 6 large cell carcinomas) and two normal human fetal lung fibroblast cell lines were employed. Cell surface and intracellular expression of antigens recognized by mAbs were examined by flow cytometry. In order to examine the intracellular expression, cell surface was treated with Cytofix/Cytoperm[®] kits to allow mAbs permeabilize into cells. **Results:** All lung carcinoma cell lines and or lung fibroblast cell lines were positively stained by all five mAbs. Monoclonal Abs were divided into three categories from staining patterns; 1) 3e3 and 7e4 stained both the surface and the inside of both all carcinoma cells and fibroblast cells, 2) 1e2 and 5b10 stained the inside of all carcinoma cells and the surface of carcinoma cells except large cell carcinomas, and 3) 7c4 stained the inside but not the surface of all carcinoma cells. These results revealed that three out of five mAbs raised against human gastric carcinoma cells can also react specifically with human lung carcinoma cells. The findings that two mAbs (1e2, 5b10) reacted with corresponding antigens on the surface and the inside of squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and small cell carcinoma, and reacted with an antigen only inside the cells of large cell carcinoma suggest that those mAbs would be diagnostically useful to discriminate large cell carcinoma from other carcinomas. The analysis of corresponding antigens recognized by these three mAbs is needed to testify its usefulness in both the basic and clinical research in the future.

Keywords: Lung cancer, Monoclonal antibody, Large cell carcinoma

緒言

癌特異抗原あるいは癌関連抗原は癌細胞にのみ発現しているか、あるいは正常細胞と比較して過剰に発現している蛋白である。それらは癌遺伝子産物で

医学博士 甲第845号 平成15年1月24日(埼玉医科大学)

あったり、変異した腫瘍抑制遺伝子や染色体再配列によって変異した遺伝子の産物、あるいは胎児性抗原の成人での再発現や正常遺伝子の持続的活性化による過剰発現などである。

癌特異抗原の同定は、癌化のメカニズムの解明に役立つのみならず、診断やそれを標的にした治療法の開

発に役立つと考えられる。肺癌は他臓器固型癌と比べると扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌、大細胞癌などを中心とした多彩な組織型から構成される点で特異である。特定の臓器癌から同定された癌抗原はその他の臓器癌でも発現していることがよくある。例えばメラノーマ特異抗原に属する MAGE は他の固型癌でも高率に発現している¹⁾。Kanki ら²⁾ は胃癌細胞をマウスに免疫することで胃癌細胞と特異的に反応する複数のモノクローナル抗体を作製した。本研究は胃癌細胞から得られたこれらのモノクローナル抗体が認識する抗原が肺癌細胞にも発現しているか否か、更には各腫瘍組織型間で抗体に対する反応性に差異があるかを検討することを主目的に行った。

方 法

細胞株

肺腫瘍細胞株として扁平上皮癌 (RERF-LC-AI, Sq-1, LK79), 腺癌 (1-87: 別名 LK-1, A549), 大細胞癌 (Lu99, Lu65, LA5, LALM, 86-2, T3M-10), 小細胞癌 (LU65, SBC-3, LU134a) をそれぞれ用いた。更に肺線維芽細胞 (lung fetus diploid fibroblast) 2 株 (MRC-5, MRC-9) をコントロールとして加え実験を行った。RERF-LC-AI, LU134a, T3M10 は理化学研究所 (Saitama, Japan) より、MRC-5, MRC-9 は発酵研究所 (Osaka, Japan) より購入した。その他の細胞株は東北大学加齢研究所より譲り受けた。細胞の形状は、T3M10 は浮遊細胞、それ以外は接着細胞であった。各細胞の培養液として、RERF-LC-AI, 86-2, MRC-5, MRC-9 には Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) + 10% ウシ胎児血清 (FCS) を、T3M10 には HamF12 + 10% FCS を、その他の細胞には RPMI1640 + 10% FCS を用いた。各細胞株をフラスコ (Corning, Acton, MA, USA) 中で 37℃, 5% CO₂ 加インキュベーター中で培養し、コンフルエントになった時点で 1% トリプシンを加えて細胞を剥離単離し、洗浄後 PBS で再浮遊した。

モノクローナル抗体

Kanki ら²⁾ が subtractive immunization 法で作製したモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清を用いた。ハイブリドーマ作製法^{2,3)} は以下の通りである。即ち、胃癌切除標本の正常粘膜由来培養細胞を 4×10^6 個 Balb/c マウスに腹腔内注射した。第 2 日目と 3 日目にシクロホスファミド 4 mg を腹腔内注射し、第 18 日目及び 39 日目に同じ標本の癌部に由来する胃癌培養細胞 (MS-1) をそれぞれ 2×10^6 個、 3×10^6 個腹腔内注射した。第 42 日目に蛍光抗体法で胃癌細胞と反応する血清抗体価が最も高いマウスの脾細胞を P3-NS1-1 ミエローマ細胞と融合させた。作製したハイブリドーマ細胞の中で MS-1 細胞とのみ反応し、同じ切

除標本に由来する正常細胞とは反応しないハイブリドーマクローンを蛍光抗体法で選択した。今回実験に用いたモノクローナル抗体のクラスはすべて IgM であった。上清中のモノクローナル抗体量はサンドイッチ ELISA 法で測定し、濃度を調整して実験に用いた。尚、実験に用いた組織標本の使用にあたって患者には紙面による同意を得ている。

固定細胞及び摘出切片の免疫蛍光染色

1×10^6 /ml の細胞浮遊液 15 μ l を蛍光染色用 12 穴スライド (Cell-Line Scientific Co., USA) に滴下し、十分な風乾の後アセトン固定した。抗原の局在を調べる実験では、アセトン固定後 4% パラホルムアルデヒド処理を行って膜の透過性を低めたものと、パラホルムアルデヒド処理後更に 0.1% Triton-X-100 で処理して膜の透過性を高めたものとを比較した。生体材料について検討するために、肺癌の外科的切除後迅速に摘出された標本の一部を切除し、液体窒素で凍結した。凍結標本からクリオスタットで厚さ 8 μ m の切片を切り出し、スライドガラスに付着させ冷アセトンで固定した。また肺癌患者から蓄痰法で採取した検体をスライドガラス上に塗布し、アセトンで固定した。免疫蛍光染色は一次抗体として各ハイブリドーマ培養上清 100 μ l を滴下し 30 分室温で反応させた。PBS で 2 回洗浄後二次抗体として FITC 標識抗マウス IgG (H+L) (Sigma, St. Louis, MO) 10 μ l を加え 30 分室温で反応後洗浄し、倒立型レーザー顕微鏡 (Bio-Rad Radiance 2000) 下で発光強度を観察記録した。なお陽性コントロールには一次抗体として MHC クラス I に特異的に反応する W6/32 を、陰性コントロールには P3-NS-1-1 の培養上清を使った。核は 0.5% Propidium iodide/PBS で赤色に染色させた。尚、実験に用いたサンプルの使用にあたって患者には紙面による同意を得ている。

フローサイトメトリー

細胞膜表面及び細胞内部の抗原の表出分布を調べる目的でフローサイトメトリーを行った。各細胞株 1×10^6 を 100 μ l の 0.2% ウシ血清アルブミン (BSA), 0.1% NaN₃ 加 PBS に浮遊し、各モノクローナル抗体液 100 μ l を加え氷水中で 30 分間反応させた。同バッファーで洗浄後、FITC 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) 100 μ l を加え、暗所に置き氷水中で 30 分反応させた。バッファーで洗浄後 FACSscan (Becton Dickinson, San Jose, CA) にかけてヒストグラムを描出した。細胞内の抗原存在の有無をみるためには細胞膜透過性を高める処理を Cytofix/Cytoperm キット (Becton Dickinson, San Diego, CA) を用いて行ってから、各モノクローナル抗体液と反応させ上記と同手順で FACSscan にかけた。陰性コントロールとして抗 TNP マウス IgM (Becton

Dickinson, San Jose, USA) を用いた。

ウェスタンブロット法

腫瘍及び正常細胞をトリプシンで処理後 PBS で遠心洗浄し、細胞沈渣を SDS サンプルバッファー (100 mM Tris・HCL pH 7.8, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.2% bromophenol blue, 4% SDS) に溶解した。BCA 蛋白定量法 (Pierce, Rockford, Illinois) を用い蛋白量を測定し、各サンプルの蛋白量を 1 mg/ml に調整し、10% ポリアクリルアミドゲルの各レーンに 20 μ l ずつ加え、25 mA で 3 時間室温で電気泳動した。ゲルからニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell, GmbH, Dessen, Germany) に転写装置 (Bio-Rad, CA) を用いて 75 V で 1 時間かけて転写した。PBS で溶解した 5% スキムミルクで 1 時間ブロックした後、0.5% スキムミルク加トリスバッファー生食水 (pH 7.6) で希釈したマウスモノクローナル抗体と 4°C で一晩インキュベートした。PBS で各 10 分ずつ 3 回洗浄後、5% スキムミルク加 PBS で 1,000 倍希釈したアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) (KPL, Geithersburg, MD) を加えて室温で 1 時間インキュベートした。発色は BC1P/NBT ホスファターゼ基質システム (KPL) を用いて指示書に従って行った。

結 果

1. フローサイトメトリー

Kanki らが樹立した 5 種の胃癌細胞特異的モノクローナル抗体²⁾, 1e2, 3e3, 5b10, 7c4, 7e4 を用いてフローサイトメトリーを行った。扁平上皮癌 3 株、腺癌 2 株と小細胞癌 3 株は、ほぼ同様な染色パターンを示した。即ち細胞浮遊液の細胞表面の染色をみると A549 細胞が 1e2 で、Lu65 細胞が 5b10 でそれぞれ陰性であったのを除けば、7c4 を除く 1e2, 3e3, 5b10, 7e4 の 4 つで陽性に染まった (Table 1)。一方透過性を亢進させた細胞浮遊液で染色してみると、上記 4 種のモノクローナル抗体以外に 7c4 でも陽性となった。このことは 7c4 が認識する抗原が細胞内にのみ存在することを示している。以上の結果は Kanki らが各種胃癌細胞について検討した結果²⁾と一致していた。

大細胞癌 6 株について染色パターンをみると、他の肺癌細胞と同様、3e3 と 7e4 は無処理細胞浮遊液と膜処理細胞浮遊液共に陽性に染まり、7c4 は膜処理細胞浮遊液のみで陽性に染まった。しかし 1e2 と 5b10 は、86-2 細胞が 5b10 で膜表面も染色されたのを除き、膜処理細胞浮遊液のみで陽性に染まった。典型例として扁平上皮癌株 RERF-LC-AI (Fig. 1) と大細胞癌 LU99 (Fig. 2) の 1e2, 5b10, 7e4, 7c4 に対するヒストグラムを示す。

肺線維芽細胞株 MRC-5 と MRC-9 は 3e3 と 7e4 で無処理細胞浮遊液と膜処理細胞浮遊液共に陽性に染まり、1e2, 5b10, 7c4 では全く染まらなかった。

Table 1. Summary of staining patterns analyzed by FACScan

Cell line	Cell surface treatment	Monoclonal Ab					Cell line	Cell surface treatment	Monoclonal Ab				
		1e2	3e3	5b10	7c4	7e4			1e2	3e3	5b10	7c4	7e4
Squamous cell carcinoma							Large cell carcinoma						
RERF-LC-AI	-	+	+	+	-	+	Lu99	-	-	+	-	-	+
	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
Sq-1	-	+	+	+	-	+	Lu65	-	-	+	-	-	+
	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
LK-79	-	+	+	+	-	+	T3M10	-	-	+	-	-	+
	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
Adeno carcinoma							Fibroblast						
1-87(LK-1)	-	+	+	+	-	+	LA-5	-	-	+	-	-	+
	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
A549	-	-	+	+	-	+	LALM	-	-	+	-	-	+
	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
Small cell carcinoma							86-2	-	-	+	+	-	+
Lu134a	-	+	+	+	-	+		+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	MRC-3	-	-	+	-	-	+
LU65	-	+	+	-	-	+		+	-	+	-	-	+
	+	+	+	+	+	+	MRC-9	-	-	+	-	-	+
SBC-3	-	+	+	+	-	+		+	-	+	-	-	+
	+	+	+	+	+	+							

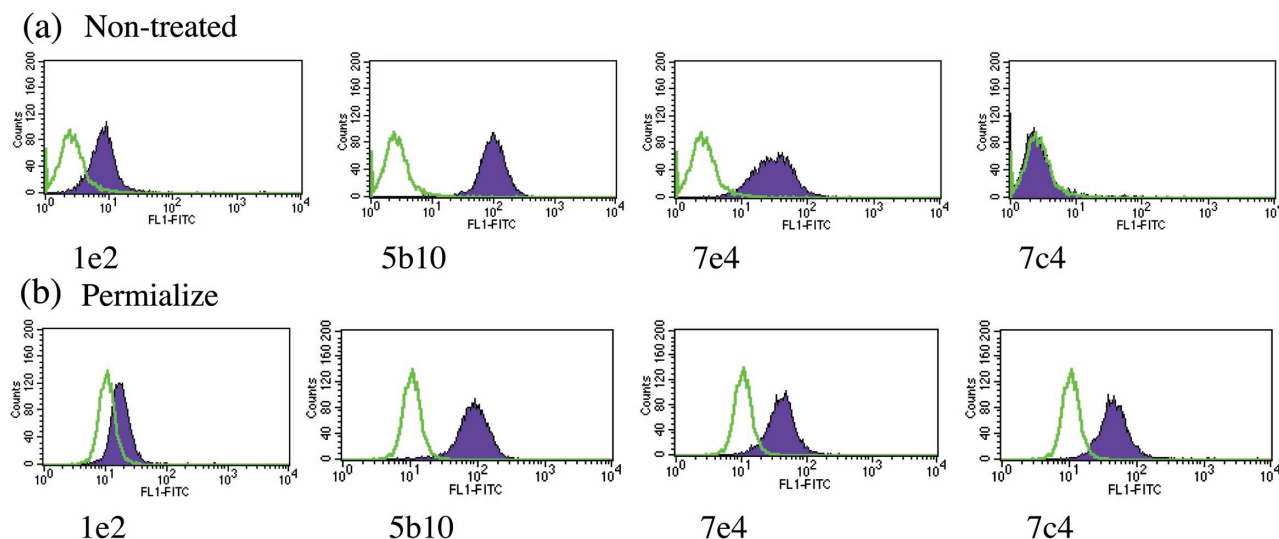


Fig. 1. Histograms of flow cytometry of squamous cell carcinoma cell line RERF-LC-AI. (a) Non-treated cells, (b) cells treated with Cytofix/Cytoperm®.

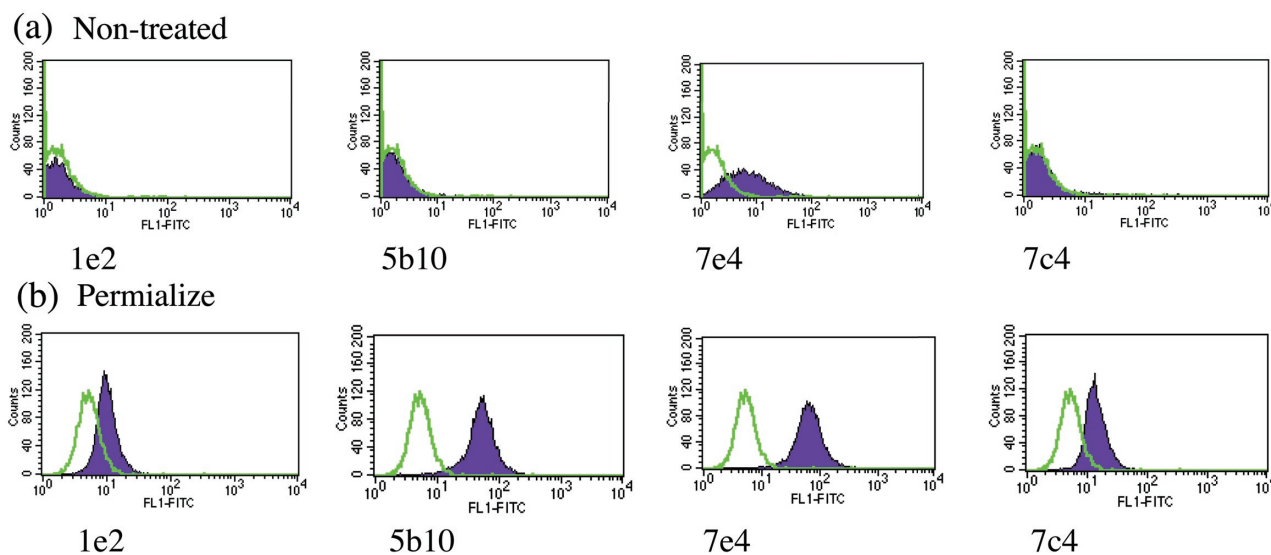


Fig. 2. Histograms of flow cytometry of large cell carcinoma cell line Lu99. (a) Non-treated cells, (b) cells treated with Cytofix/Cytoperm®.

2. 細胞の蛍光染色

スライドガラス上に固定した単離細胞の蛍光染色によりフローサイトメトリーの結果の確認を行った。アセトン固定した細胞の蛍光染色では、5種の抗体のうち肺癌細胞に陽性かつ線維芽細胞に陰性であるのは1e2, 5b10, 7c4の3種であり、3e3と7e4は肺癌細胞だけでなく、線維芽細胞でも陽性であった (Fig. 3に7c4の結果を示す)。抗原の局在を調べるために、アセトン固定の後パラホルムアルデヒド処理を行ない抗体の細胞膜通過を阻止して染色を行った。一方膜透過性を高めて細胞質内の抗原との反応を調べるために、上記の処置の後 TritonX-100 処理

を行い比較した。7c4 はいずれの肺癌細胞でも細胞内部のみが染色されていたのに対し、1e2, 3e3, 5b10, 7e4の4つの抗体は扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌で細胞表面と細胞内部の両方が染色された (data not shown)。ところが大細胞癌株でみると4つの抗体のうち3e3と7e4では細胞膜と細胞内部ともに染色されるのに対し1e2, 5b10では細胞内だけが染色された (Fig. 4)。これらの結果はフローサイトメトリーと全く同じであった。

3. 肺癌標本染色

樹立された細胞株だけでなく、扁平上皮癌患者の外

科切除標本についても検討した。HE 染色標本でみられる癌細胞部分に一致して 7c4 モノクローナル抗体で陽性に染色されている (Fig. 5a, b)。一方癌周囲の肺組織は全く染色されなかった (Fig. 5c, d)。また肺癌患者から得た喀痰を 7c4 で染色すると癌細胞と思われる細胞が明瞭に陽性に染まった (Fig. 6)。他の 4 つの抗体ではいずれも陽性結果は得られなかった。

4. ウェスタンブロット

5 つのモノクローナル抗体のうち唯一 linear epitope を認識し、ウェスタンブロットの検出に使用できる 7c4 で各種の細胞株について検討した結果、肺癌細胞

で 4 本のバンドが検出された (Fig. 7)。それらのうち 59kD のバンドはすべての肺癌細胞のみならず肺線維芽細胞株 (MRC-5, MRC-9) でも認められた。一方 49kD, 45kD, 42kD の各バンドは肺癌細胞にのみ認められ、かつ細胞株によって染色強度及びバンド数に差を認めた。これらのバンドのサイズは胃癌細胞のもの²⁾と一致していた。7c4 によるウエスタンブロットでは大細胞癌と他の肺癌細胞型とのあいだに明らかな違いは認められなかった。

考 察

本研究で肺癌主要組織型に共通して発現している抗原エピトープを認識し、かつ大細胞癌だけに於いては細胞内部だけが陽性に染まるという特徴をもったモノクローナル抗体を探し出すことができた。

癌治療戦略の一環として癌特異抗原あるいは癌関連抗原の検索が行われてきた。これらの研究成果は一方では診断としての CEA などの腫瘍マーカーの開発へ、他方では免疫療法の開発へと進んでいる。後者の免疫療法は細胞障害性 T 細胞の認識するメラノーマ抗原が報告⁴⁾されて以来、メラノーマに限っても cDNA クローニングを中心とした方法により多数の抗原エピトープが同定されている⁵⁾。その他にも扁平上皮癌から同定された SART 遺伝子蛋白⁶⁾や HER2/C-erbB-2/neu 遺伝子蛋白⁷⁾などがある。これら癌特異的あるいは関連抗原を同定することにより、一方では診断や

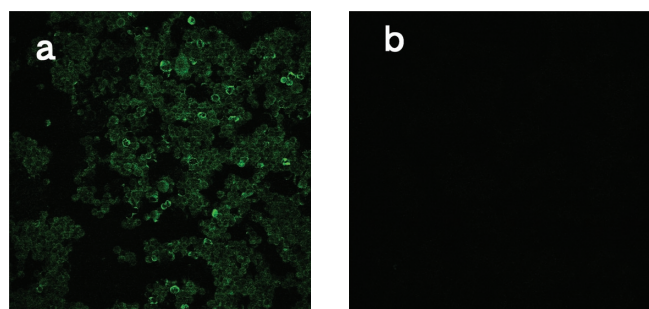
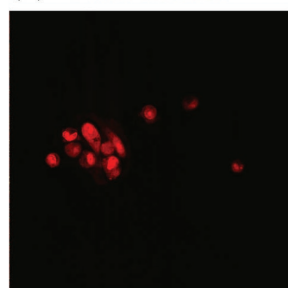
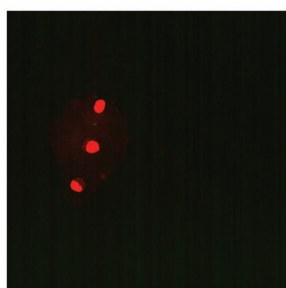


Fig. 3. Immunofluorescence staining of acetone-fixed cells with 7c4 mAb. (a) Squamous cell carcinoma cell line Sq-1, (b) human fetal lung fibroblast cell line MRC-5. Magnification; $\times 200$.

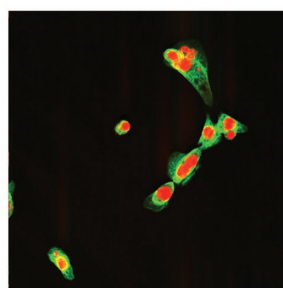
(a) Non-treated



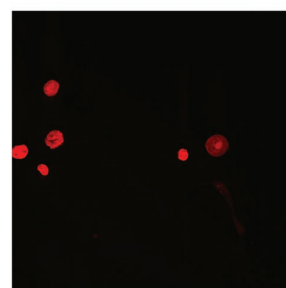
1e2



5b10

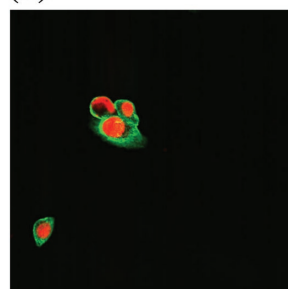


7e4

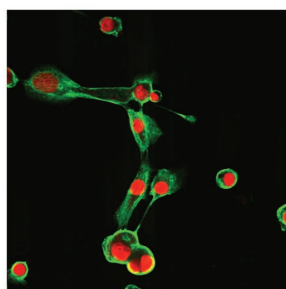


7c4

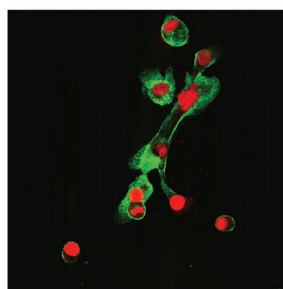
(b) Permialized



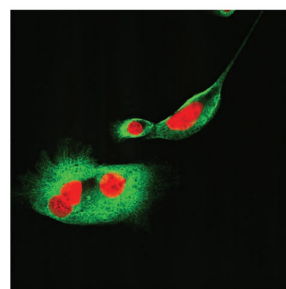
1e2



5b10



7e4



7c4

Fig. 4. Immunofluorescence staining of paraformaldehyde-fixed large cell carcinoma cell line T3M10. (a) Non-treated cells, (b) cell treated with 0.1% Triton-X-100. Magnification; $\times 400$.

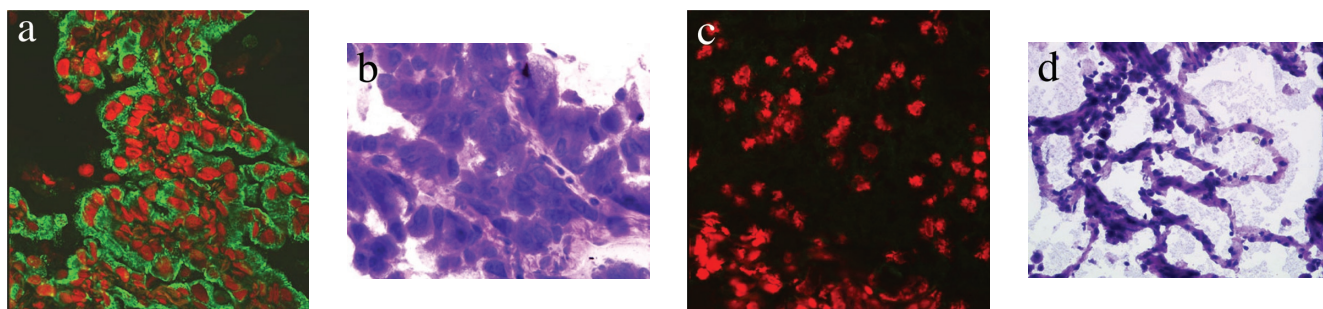


Fig. 5. Immunofluorescence staining of frozen sections with 7c4 mAb. A specimen was obtained from surgically resected lung of a patient with squamous cell carcinoma. (a) A portion of carcinoma stained with 7c4 (b) the same portion as (a) stained with Hematoxylin- Eosin, (c) a portion of normal lung tissue stained with 7c4, (d) the same portion as (c) stained with Hematoxylin- Eosin. Magnification; $\times 400$.

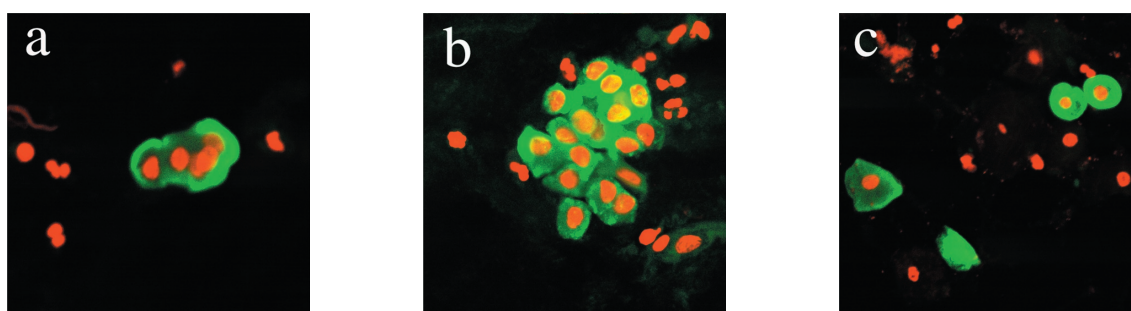


Fig. 6. Immunofluorescence staining of sputa obtained from different patients with lung cancer. Small cell carcinoma (a and b), adenocarcinoma (c). Magnification; $\times 400$. Monoclonal Ab was 7c4.

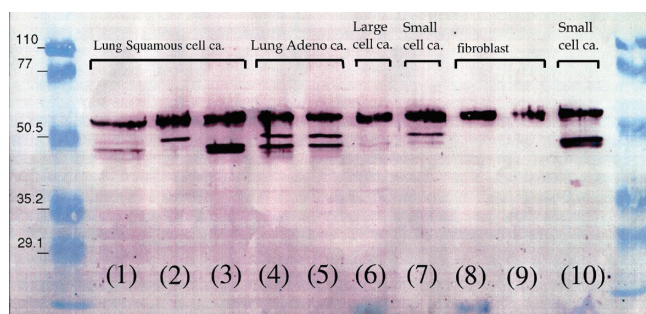


Fig. 7. Western blot of lysates of carcinoma and fibroblast cell lines. Monoclonal Ab 7c4 was used as probe. lane 1, RERF-LC-AI; lane 2, LK79; lane 3, Sq1; lane 4, LK1; lane 5, A549; lane 6, 86-2; lane 7, LU65; lane 8, MRC-5; lane 9, MRC-9; lane 10, Lu134a.

予後を判別する因子として研究され、他方では細胞障害性T細胞を誘導し腫瘍を拒絶するワクチン療法あるいはモノクローナル抗体を用いて抗体依存性細胞障害 (antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC) により腫瘍細胞融解をおこす免疫療法が可能となる道が開ける^{8,9)}。肺癌においてはK-ras変異, p53変異, erbB-2発現など¹⁰⁾ 以外にRACS1¹¹⁾, 43-9F¹²⁾ などの癌

関連抗原が予後因子として評価研究されている。モノクローナル抗体に関しては、Her-2に対する抗体 (ハーセプチン[®])¹³⁾ で臨床応用に至ったように、増殖因子受容体をブロックして増殖阻止に働いたり、細胞内シグナル伝達を引き起こすことで腫瘍細胞のアポトーシスを誘導したりして抗腫瘍活性を発揮する。その他にもリシン毒素結合モノクローナル抗体を用いた臨床試験¹⁴⁾ や、¹³¹I標識ハプテンとハプテン/CEAを認識するモノクローナル抗体を用いた第I/II相臨床試験¹⁵⁾ などが報告されている。

Kankiら²⁾ は、胃癌細胞を用いて、subtractive immunization法を駆使して数種のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立した。本研究はそれらのモノクローナル抗体が胃癌以外に肺癌細胞も認識するか否かを目的として行った。肺癌は組織型が稀なものも含めて複数あることが特徴のひとつであるため、今回は扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌そして大細胞癌それぞれ複数株を使用して検討した。浮遊細胞の染色結果を総合すると、5種のモノクローナル抗体は扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌、大細胞癌のほとんどすべてで陽性であった。このうち3e3と7e4の2つは肺線維芽細胞株でも陽性に染色された。Kankiらの胃正常細胞での検討では陰性であったので、この2つは細胞の不

死化に関連した蛋白とかセルサイクルに関連した蛋白を認識しているのかもしれない。おそらく癌特異抗原あるいは腫瘍マーカーとは異なると思われる。残る 1e2, 5b10, 7c4 の 3 種は異なる組織型から構成される主要な肺癌全体を認識しうるモノクローナル抗体といえる。

これら 3 種のモノクローナル抗体が認識する抗原の局在を調べると、大細胞癌を除いた他の各細胞株では、1e2 と 5b10 が認識する抗原が細胞膜表面と細胞内両方に分布していることがわかった。一方大細胞癌では他の癌細胞株と異なり、1e2, 5b10 はいずれも細胞表面には存在せず細胞内にのみ局在していた。1e2 と 5b10 がなぜ大細胞癌株では細胞表面で染まらないのか理由は不明である。この点を解明するにはこれらの抗体が認識する蛋白が何であるかを突き止める必要がある。

7c4 は肺癌細胞でも胃癌と同様、細胞内の抗原局在が確認された。肺線維芽細胞株とは反応しないので多くの癌細胞に特異的な抗体と思われる。しかも肺癌切除標本や喀痰の塗抹標本でも癌細胞を特異的に染め出すことができ、診断に有用であると考えられた。他の抗体が肺癌標本に対して陰性であったのは、7c4 も含めていずれも IgM クローンで、抗体のアフィニティーが低いことが原因していたためかもしれない。これらのうち 7c4 は細胞を抗原とした ELISA でも最も高い O. D. 値を示すので (data not shown), アフィニティーが最も高く肺癌標本でも癌細胞を染め出すことができたのであろう。いずれの抗体も同じ特異性を持つ IgG 抗体が得られれば、診断に役立つかもしれない。

5 つのモノクローナル抗体のうち 7c4 が認識する蛋白の機能として、細胞内にのみ分布していることから何らかの信号伝達経路に関与する蛋白や細胞骨格に関与する蛋白などであることが推測される。ウェスタンブロット法で調べると 42, 45, 49kD の 3 つの異なる分子量の蛋白と反応することがわかった。Kanki ら²⁾ は詳細な分析の結果、7c4 が認識する蛋白がサイトケラチン 8 あるいは 18 のヘテロダイマーであるとしている。一方、他の抗体の対応抗原に関してはその詳細の解析にはいまだ至っていない。またこれらのモノクローナル抗体が認識する抗原がこれまでに数多く報告されている既知の蛋白の中のものと同じのものであるか、それとも新規のものであるのかの検討も未だ充分ではないので、抗原ペプチドのアミノ酸分析を行わなければならないだろう。いずれにせよ、これら 3 種のモノクローナル抗体は肺癌細胞を分別して染色するのに有用であるだけでなく、1e2 と 5b10 の 2 つの抗体は大細胞癌を他の組織型の肺癌と鑑別することにおいてきわめて有用である可能性が示された。

大細胞癌は病理組織学的には大型の腫瘍細胞が特定の分化傾向を示さず重層扁平上皮様構造や管腔

形成がない腫瘍をまとめたものである。細胞内に粘液がある場合は粘液形成型、ない場合は粘液非形成型と呼ぶ。しばしば巨細胞が混在しており、その占める割合が 30 % を超える場合は巨細胞癌型と呼ばれる。尚 WHO 分類に記されている淡明細胞癌はわが国の学会分類には含まれていない^{16, 17)}。しかしながら実際には大細胞癌の病理診断の場合においては扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌など他の特定な組織型の特徴を示さない未分化癌として除外診断で診断されることが多く waste-basket 的意味合いが強い。例えば癌胞巢内で層状の分化傾向を示し扁平上皮癌への分化を示唆することがあるし、また細胞内に少量の粘液が証明され腺癌への分化傾向を示すこともある^{18, 19)}。実際わが国では大細胞癌に分類されている粘液形成型は WHO 分類では低分化腺癌に分類されている¹⁷⁾。このように国際的に病理診断基準が一致していない上に、更には大細胞癌はすべての肺癌組織型の中で、組織診と細胞診で一致率が最も低い癌でもある²⁰⁾。

このような状況下に於いて、いかに大細胞癌という病理学的分類に整合性を持たせるかは重要である。その試みのひとつとして細胞表面のウロキナーゼ型組織プラスミンアクチベータ分布及び結合能をみることで大細胞癌を扁平上皮癌・腺癌そして小細胞癌から分別できるという報告がある²¹⁾。大細胞癌と他の肺癌細胞の間のエピトープの違いを認識する様な抗体はまだ報告が無い。Hanai らは Kanki らのようにシクロホスファミドを持いる方法ではなく、新生マウスに肺正常組織を過剰に免疫してトレランスを誘導した後、肺の腺癌あるいは扁平上皮癌を免疫するという subtractive immunization 法でそれぞれに反応する抗体を得ているが、大細胞癌を選別できるような抗体は取れていない²²⁾。本研究では肺癌主要組織型に共通して発現している抗原エピトープを認識し、かつ大細胞癌だけに於いては細胞内部だけが陽性に染まるという特徴をもったモノクローナル抗体を探し出すことができた。このモノクローナル抗体を用いることにより免疫組織・細胞染色が臨床病理の現場において応用され、特に大細胞癌という分類に分子学的裏づけを与える可能性を開いたと考える。今後の研究の方向としてひとつにはこのモノクローナル抗体が認識する蛋白の同定、ひとつには免疫療法への応用の可能性を探る研究そして臨床病理への応用の適否を標本、検体を用いて検討することであると考えている。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました西村重敬教授、赤塚隆俊教授、坂本芳雄助教授に深甚なる謝意を捧げますと共に、直接御指導いただきました神吉泰三郎講師、本学中央研究施設形態部門大島晋先生に感謝いたします。そして実験に際し、染色に

ついでご協力して頂いた本学病理学教室の鎌田孝一、後藤義也実験助手に、また研究に協力して頂いた坂本敦子氏に感謝いたします。

参考文献

- 1) Inoue H, Mori M, Li J, Mimori K, Honda M, Nakashima H, et al. Human esophageal carcinomas frequently express the tumor-rejection antigens of MAGE genes. *Int J Cancer* 1995; 63: 523-6.
- 2) Kanki T, Yoshimura K, Miyazawa H, Aoyama M, Akatsuka T. Truncated cytokeratin 8 network in gastric tumor cell line defined by subtractive immunization (submitted for publication).
- 3) Brooks PC, Lin J-M, French DL, Quigley JP. Subtractive immunization yields monoclonal antibodies that specifically inhibit metastasis. *J Cell Biol* 1993; 122: 1351-9.
- 4) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254: 1643-7.
- 5) Kawakami Y, Rosenberg A. Human tumor antigens recognized by T-cells. *Immunol Res* 1997; 16: 313-39.
- 6) Shichijo S, Nakao M, Imai Y, Takasu H, Kawamoto M, Niiya F, et al. A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 187: 277-88.
- 7) Fisk B, Blevins TL, Wharton JT, Ioannides CG. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J Exp Med* 1995; 181: 2109-17.
- 8) Dillman RO. Antibodies as cytotoxic therapy. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1487-515.
- 9) Matthews DC, Smith FO, Bernstein ID. Monoclonal antibodies in the study and therapy of hematopoietic cancers. *Curr Opin Immunol* 1992; 4: 641-6.
- 10) Micke P, Hengstler JG, Ros R, Bittinger F, Metz T, Gebhard S, et al. *C-erbB-2* expression in small-cell lung cancer is associated with poor prognosis. *Int J Cancer* 2001; 92: 474-9.
- 11) Iwasaki T, Nakashima M, Watanabe T, Yamamoto S, Inoue Y, Yamanaka H, et al. Expression and prognostic significance in lung cancer of human tumor-associated antigen RACS1. *Int J Cancer* 2000; 89: 488-93.
- 12) Battifora H, Sorensen HR, Mehta P, Ahu C, Niland J, Hage E, et al. Tumor-associated antigen 43-9F is of prognostic value in squamous cell carcinoma of the lung. A retrospective immunohistochemical study. *Cancer* 1992; 70: 1867-72.
- 13) Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2639-48.
- 14) Lynch TJ Jr, Lambert JM, Coral F, Shefner J, Wen P, Blattler WA, et al. Immunotoxin therapy of small-cell lung cancer: A phase I study of N901-blocked ricin. *J Clin Oncol* 1997; 15: 723-34.
- 15) Vuillez J-P, Kraeber-Bodéré F, Moro D, Bardies M, Douillard J-Y, Gautherot E, et al. Radioimmunotherapy of small cell lung carcinoma with the two-step method using a bispecific anti-carcinoembryonic antigen/anti-diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) antibody and Iodine-131 Di-DTPA hapten: Results of a phase I/II trial. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3259s-67s.
- 16) 日本肺癌学会編. 肺癌取り扱い規約, 改訂 5 版. 東京: 金原出版; 1999. p. 92-106.
- 17) WHO. Histological Typing of Lung Tumours, 2nd ed., Geneva: World Health Organization; 1981.
- 18) Ishida T, Kaneko S, Tateishi M, Oka T, Mitsudomi T, Sugimachi K, et al. Large cell carcinoma of the lung. Prognostic implications of histopathologic and immunohistochemical subtyping. *Am J Clin Pathol* 1990; 93: 176-82.
- 19) Churg A. The fine structure of large cell undifferentiated carcinoma of the lung: Evidence for its relation to squamous cell carcinomas and adenocarcinomas. *Human Pathol* 1978; 9: 143-56.
- 20) 亀谷徹, 上井良夫. 大細胞癌. 大里幸雄編. 腫瘍鑑別診断アトラス 肺. 東京: 文光堂; 1996. p. 104-11.
- 21) Schwartz-Albiez R, Heidtmann H-H, Wolf D, Schirmacher V, Moldenhauer G. Three types of human lung tumour cell lines can be distinguished according to surface expression of endogenous urokinase and their capacity to bind exogenous urokinase. *Br J Cancer* 1992; 65: 51-7.
- 22) Hanai, N., et al. Generation of monoclonal antibodies against human lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma using mice rendered tolerant to normal human lung. *Cancer Res.* 1986; 46: 4439-43.