
シンポジウム

腫瘍抗原の臨床診断への応用

Clinical Application of Tumor Antigen

第 452 回新潟医学会

日 時 平成元年10月21日（土）午後 2 時

会 場 新潟大学医学部研究棟 第Ⅱ講義室

司 会 屋形 稔教授（検査診断学）

演 者 福田剛明（第二病理）、内山一晃（検査診断学）、鈴木康史（第三内科）、吉谷徳夫（産婦人科）、
富田 善彦（医動物学）、西山 勉（泌尿器科）

発言者 追手 颯（腎研免疫）、永井孝一（第一内科）、大西昌之（第一内科）、杉田 収（検査部）、
藤原道夫（医動物学）、山田俊幸（検査診断学）

司会 それでは本日の司会をさせていただきます。腫瘍抗原の臨床診断への応用という題ですが、最初に簡単にお話してから始めていただきます。数えてみますと五年前なんですけども、「腫瘍マーカーの現状と問題点」という題で、本会のシンポジウムに採上げていただき、各領域から腫瘍マーカーについて話していただき、問題点の克服を論じたことがあります。その後五年間にこの分野では基礎医学的なアプローチが非常に進歩を遂げております。特にこの数年間に注目されている所は糖性の癌抗原ですが、この理由の第一はモノクローナル抗体の作製手段が確立されたということで、癌抗原に対する抗体作製に盛んに応用されるようになったということでございます。その次にこれらのモノクローナル抗体の一部を用いまして担癌患者血清中にそれに当る癌抗原の存在が証明されまして、そのうちいくつかが実地診療において鑑別診断に応用が可能であることが判ってきました。しかしながらこういう糖鎖についてみましても基礎的に生化学的研究のテクニックが発達してきて、長い糖

鎖構造の解析が十分にいくようになったのですが、それに比べると臨床的研究というのは遅々として進まないような感じがございます。これからは基礎医学的研究に十分に臨床応用ということが伴ってきることが必要で、今日のシンポジウムもそういった目的で行われるものであります。演者の方々の顔ぶれを見ましても両方の分野から出ていらっしゃいますけど、行き着く所は、目的は同じということであります。私達の検査診断学領域でも一応一枚加えていただいて血液型物質が糖質と深い関わり合いがあるというのが判ったのが随分昔でありますけども、最近では CA19-9 とか SSEA1 というような腫瘍マーカーがいろいろ出まして検討され、分析と応用と両面からかなり研究が行われております。本日はこういって各方面から pick up した演題について、腫瘍抗原の臨床診断への応用というような問題に迫っていただければ有難いと考えております。それでは最初に、薬剤耐性白血病細胞株に対する特異抗体および膜抗原の変異、第二病理の福田先生お願いします。

1) AraC 耐性白血病細胞株の耐性機序と特異抗体の作製

新潟大学医学部第二病理 福田 剛明・柿原 敏夫
新潟大学医学部検査診断 山田 俊幸

Mechanism of Resistance for Cytosine Arabinoside of AraC Resistance
Leukemic Cell Line and a Specific Monoclonal Reacting with it

Takeaki FUKUDA, Toshio KAKIHARA

Second department of pathology, Niigata University School of Medicine

Toshiyuki YAMADA

Department of Laboratory Medicine, Niigata University School of Medicine

We have established human leukemic cell lines, designated as KY-Ra and KY-Rb, which are highly resistant for cytosine arabinoside (AraC) and behenosyl AraC. Intercellular AraC increased in proportion to incubation time in parental KY-821, whereas did not increase in resistant cell lines. Intracellular AraC excluded in the extracellular medium in short time on KY-Ra and KY-Rb. Activity of deoxycytidine kinase was not so different in each cell line. We also obtained one hybridoma which secretes an antibody reacting with only resistant cell lines, although definite characterization has yet determined. Natural IL-1, $\text{INF}\gamma$, and $\text{TNF}\alpha$ inhibited the proliferation of KY-821. In contrast natural IL-1 promoted ^3H -thymidine uptake of KY-Ra and KY-Rb, and no suppressive effect of $\text{INF}\gamma$ and $\text{TNF}\alpha$ was observed in other cell lines. These results indicate that AraC efflux was attributable to unknown membrane protein probably distinct from P-glycoprotein and a different reactivity between resistant and non-resistant cell lines for growth factors is also owing to some changes of cell membrane.

Key words: AraC resistance, leukemic cell line, drug efflux, cell membrane

AraC 耐性, 白血病細胞株, 薬剤排泄, 細胞膜

白血病は他の固形悪性腫瘍と違い悪性細胞が流血中にあることから抗癌剤を用いた治療が主となる。しかし白血病細胞の根絶は難しく再燃することが多く、しかも再燃時には薬剤耐性を獲得していることがしばしばある。最近, adriamycin や vincristine に対する耐性機序としてこれらの薬剤の排泄機構とこれを担う膜蛋白の存在

が明らかにされ¹⁾, この膜蛋白に対するモノクローナル抗体も作製され診断等への応用が研究されている²⁾³⁾⁴⁾。

今回我々は白血病治療に最も汎用されている抗癌剤の一つである cytosine arabinoside (AraC) のその誘導体である behenosyl cytosine arabinoside (BH-AC) に抵抗性のヒト白血病細胞株を用いて、その耐性機序の

Reprint request to: Takeaki FUKUDA M.D
Second Department of Pathology Niigata,
University School of Medicine Asahimachi-Dori 1,
757, Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通一番町
新潟大学医学部第二病理学教室
福田 剛明

一つにやはり薬剤排泄機序が大きく関与していることを突き止め、さらに AraC 耐性株に対するモノクローナル抗体の作製を試みたので報告する。

1. AraC 耐性ヒト白血病細胞株の性状

親株 KY-821 は本学第一内科岸の樹立したヒト骨髄単球性白血病細胞株である。これに AraC を漸増させることにより 1×10^{-4} MAraC 濃度でも安定に増殖する細胞株 KY-Ra と 1×10^{-6} MAraC で耐性になった細胞に AraC の代わりに BH-AC を添加し BH-AC 濃度 1×10^{-5} M で安定に増殖する KY-Rb を樹立した。種々の濃度における各々の細胞の増殖状態を MTT を用いてみたものが Fig. 1 である。これをもちいて計算した IC₅₀ と AraC に対する耐性の程度を Table 1 に示した。



Fig. 1

Table 1 Sensitivity of KY-821, KY-Rb, KY-Ra to Ara-C

cells	Ara-C (IC ₅₀ , M)	relative resistance
KY-821	$4.56 \times 10^{-7} \pm 1.32 \times 10^{-7}$	1
KY-Rb	$2.69 \times 10^{-7} \pm 1.70 \times 10^{-3}$	5,899
KY-Ra	$8.60 \times 10^{-3} \pm 2.31 \times 10^{-3}$	18,860

2. AraC 耐性機序の解明

KY-821, KY-Ra, KY-Rb 各々の AraC の取り込みを ³H-AraC を用いてみたものが Fig. 2 である。KY-821 では時間の経過と共に取り込みが増加するが、KY-Ra ではほとんど増加を示さず、KY-Rb ではその中間を示した。さらに一定量の ³H-AraC を取り込ませた後 AraC を含まない培養液に細胞を浮遊させ、経時的に細胞内の AraC の残存率をみたものが Fig. 3 である。

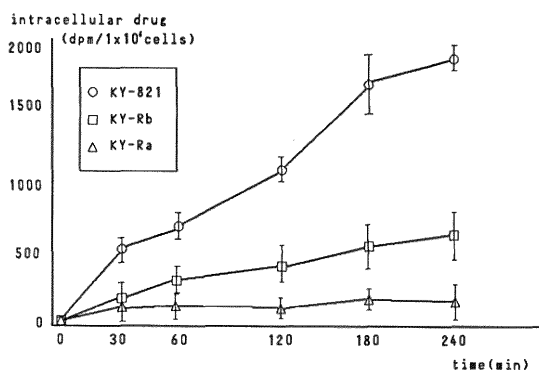


Fig. 2

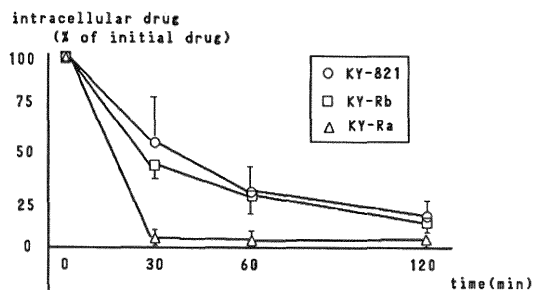


Fig. 3

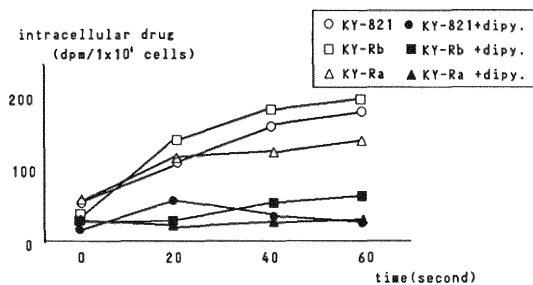


Fig. 4

この結果から KY-Ra では30分以内にはほとんどの AraC が排泄されるのに対し KY-821 ではかなりゆっくりであり、KY-Rb ではおよそその中間を示した。一方は最初の1分間における AraC の取り込みをみるといずれの細胞株においてもほぼ同程度であった。Dipyridamole は nucleotide およびその誘導体の influx を阻害する薬剤として知られているが、dipyridamole の存在下で AraC の取り込みをみてみると Fig. 4 に示すとおりいずれの株においてもその取り込みは抑制された。また、

Table 2 Efflux rates of KX-821, KY-Rb and KY-Ra

cells	efflux rate
KY-821	41.1 ± 7.7
KY-Rb	81.3 ± 3.7 *
KY-Ra	90.0 ± 3.2 **

*: The difference between KY-821 and KY-Rb was statistically significant. ($p < 0.05$)

**: The difference between KY-821 and KY-Ra was statistically significant. ($p < 0.05$)

Table 3 Deoxycytidine kinase activity of KY-821, KY-Rb and KY-Ra

cells	kinase activity (fmol dCMP/min/ μ g protein)
KY-821	1.23 ± 0.35
KY-Rb	0.26 ± 0.03
KY-Ra	0.39 ± 0.06

3株の deoxycytidine kinase 活性は **Table 3** に示すとおりであり、ただか3倍程度の差であった。Cytidine deaminase 活性は測定していないものの以上のような結果から KY-Ra, KY-Rb の AraC 耐性機序には薬剤に efflux 亢進が関与していることは確かであると考えられる。相対的な AraC の排泄率を **Table 2** に示す。

Table 4 Incorporation of ^3H thymidine of various cell lines cultured with various hematopoietic factors

	Control	IL 1 (1U/ml)	IL1 (10U/ml)	IL1 (20U/ml)	rIL1 α (10U/ml)	rIL β (10U/ml)
KY-821	22852 ± 2836	23218 ± 2390	4810 ± 1416 *	2214 ± 922 *	20229 ± 3122	23788 ± 2998
KY-AraC	3460 ± 328	3896 ± 796	16422 ± 2736 *	17023 ± 3446 *	3814 ± 564	3622 ± 366
KY-BH	5519 ± 1175	4743 ± 904	11693 ± 2361 *	12176 ± 2610 *	4432 ± 767	3989 ± 624
KY-VC	3730 ± 787	4378 ± 1095	12797 ± 2465 *	12569 ± 1984 *	4011 ± 883	3899 ± 1001

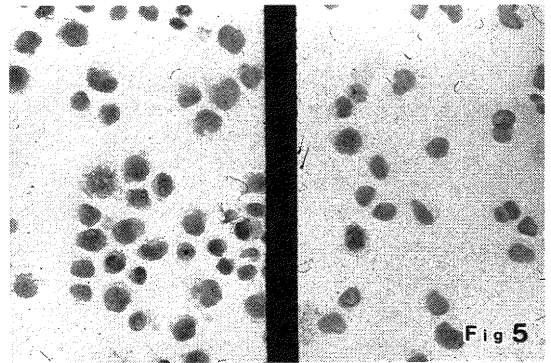
	G-CSF (100U/ml)	M-CSF (100U/ml)	GM-CSF (100U/ml)	IL3 (100U/ml)	IFN γ	IFN α	TNF α
KY-821	22372 ± 2082	19920 ± 2032	19012 ± 2221	20022 ± 2748	7108 ± 1604 *	19665 ± 2787	13062 ± 4825 *
KY-AraC	3442 ± 446	3629 ± 716	3464 ± 596	3519 ± 585	3712 ± 585	3786 ± 995	3528 ± 677
KY-BH	5350 ± 965	5778 ± 965	5438 ± 760	3964 ± 1137	6110 ± 1137	5987 ± 1103	5696 ± 958
KY-VC	3224 ± 655	3096 ± 576	4057 ± 549	3903 ± 638	3306 ± 668 *	18401 ± 2052	11679 ± 2289 *

dpm/ 2×10^4 cells

*: significant difference ($p < 0.01$), when compared with the controls.

3. モノクローナル抗体の作製と反応性

KY-Ra の細胞膜分画を精製し Balb/c マウスに 8 回注射しその後脾細胞とマウスミエローマ細胞とで hybridoma を作り、KY-Ra にのみ反応する抗体を産生している clone を捜した。その結果 1 個の clone が得られ、細胞との反応所見を **Fig. 5** に示した。左が KY-Ra で膜に陽性であり、対照では染まっていない。この抗体がいかなる膜蛋白と反応しているかについてはまだ検索中である。



4. 各種血液造血因子に対する反応性

各種血液造血因子に対する反応性を ^3H -thymidine の取り込み能を用いて検討した結果を **Table 4** に示す。KY-821 は natural IL-1, IFN γ , TNF α により取り込みは低下したが、KY-Ra, KY-Rb においては natural IL-1 は明かな取り込み増加を示し、IFN γ , TNF α では変化がなかった。奇妙なことに recombinant IL-1

は α , β ともになんの効果も示さなかった. その他の因子については thymidine 取り込みには特に効果を示さなかった.

考 察

AraC 耐性に関しては deaminase 活性の増加や deoxycytidine kinase 活性の低下が主たる機序であると言われてきた⁵⁾⁶⁾. しかし今回の実験結果で示された通り AraC 耐性にも薬剤排泄機序が働いていることは確かであり, 特殊な膜蛋白がこれに関与している可能性が示唆される. Adriamycin や vincristine に耐性となった細胞の膜には P-glycoprotein という蛋白が発現されており, これが薬剤排泄のポンプの役割をしていることは既に示されている通りである. しかし今回の data には示してはいないが, KY-Ra, KY-Rb はいずれも adriamycin, vincristine と交叉耐性を示さないこと, また, adriamycin, vincristine 耐性株では verapamil によってその耐性が解除されるが⁷⁾, AraC 耐性2株はいずれも verapamil による耐性解除がないことなどから P-glycoprotein とは異なる膜蛋白が AraC 耐性に関与しているものと思われる. したがって今回得られた AraC 耐性株にのみ反応するモノクローナル抗体が如何なる物質を認識しており, それが膜蛋白か否か, 耐性に関与する蛋白か否か, もしそうであるならばどれくらいの分子量のものか今後さらに詳細に解析すべき問題であろう.

さらに AraC 耐性株では種々の生物学的活性物質に対する反応性にもちがいがあることが示された. 最近 myeloma 株とその薬剤耐性株において TNF に対する感受性が異なり, 薬剤耐性株がより TNF に感受性が強いことが報告されている⁸⁾. これらの事実は薬剤耐性獲得により薬剤排泄に関与する膜蛋白の発現のみではなく他の膜蛋白にも変異が起きていることを示唆している.

このように薬剤排泄に関与する膜蛋白も P-glycoprotein 以外にも存在すると思われ, 今後同様な蛋白に対する抗体を作製することは白血病の再燃の早期発見や治療指針の決定などの上でかなり役立つものと考えられる.

参 考 文 献

- 1) Juliano, R.L. and Ling, V.: A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem. Biophys. Acta*, **455**: 152, 1976.

- 2) Ma DDF, Scurr, R.D., Davey, R.A., MacKertich, S.M., Harman, D.H., Dowden, G., Isbister, J.P. and Bell, D.R.: Detection of multidrug resistant phenotype in acute non-lymphoblastic leukemia. *Lancet*, **11**: 135, 1987.
- 3) Hamada, H. and Tsuruo, T.: Functional role for the 170-to 180-kDa glycoprotein apespecific to drug-resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**: 7785, 1986.
- 4) Ito, Y., Tanimoto, M., Kumazawa, T., Okumura, M., Morishima, Y., Ohno, R. and Saito, H.: Increased P-glycoprotein expression and multidrug-resistant gene (mdr1) amplification are infrequently found in fresh acute leukemia cells. *Cancer*, **63**: 1534, 1989.
- 5) Bhalla, K., Nayak, R. and Grant, S.: Isolation and characterization of a deoxycytidine kinase-deficient human promyelocytic leukemic cell line highly resistant to 1- β -D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.*, **44**: 5029, 1984.
- 6) Kees, U.R., Ford, J., Dawson, V.M., Piali, E. and Aherne, G.W.: Development of resistance to 1- β -D-arabinofuranosylcytosine after high-dose treatment in childhood lymphoblastic leukemia: analysis of resistance mechanism in established cell lines. *Cancer Res.*, **49**: 3015, 1989.
- 7) Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.: Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res.*, **42**: 4730, 1983.
- 8) Salmon, S.E., Soehnlen, B., Dalton, W.S., Meltzer, P. and Scuderi, P.: Effects of tumor necrosis factor on sensitive and multidrug resistant human leukemia and myeloma cell lines. *Blood*, **74**: 1723, 1989.

司会 共通の研究者も多いと思うのですが何か御討議ございましたらここでどうぞ.

追手 本当に膜表面とそのモノクローナル抗体は結合しているのでしょうか.

福田 本当にと言われると何て答えていいのか判りま

せんけども、そういう風に僕らは考えているということでもあります。

追手 IF では確認されたでしょうか。

福田 IF は写真撮ってなかったものですから出さなかったのですが、IF での確認も何回もしております。で、同じ結果であります。

追手 どのような pattern だったのでしょうか。

福田 diffuse pattern じゃないですね。これは dot pattern が主でしたですね。中には diffuse になるようなものもありましたけど、点状に染まってくるやつもありあったということですね。

追手 モノクローナル抗体はどのように作られたのでしょうか。

福田 これは実際に作られたのは検査診断学の山田先生ですので、山田先生ちょっとお願いできますか。

山田 膜分画をマウスに免疫してハイブリドーマを作製しました。

追手 普通の場合、生きた細胞を免疫するということは非常にいい方法なんですよ。それで皆さん御承知のとおり、Thy 1 関連抗原 Thy 1.1、昔 θ 抗原と言われていましたけれど、その場合の免疫方法は生きた Thymocyte を免疫して、それでやるとかなり膜に特異的なものができる。それが一つですね。それからもう一つは、できるだけ adjuvant を使わないで免疫する。それから多免疫しない。シェディングなんかで膜から離れ易いようなタンパクの場合には軽く固定してやる、パラフォルムみたいので。そういう方法があると思うんですよ。敢えて膜分画を使った理由というのは何かあるんですか。

福田 これさっきも言いましたように、癌研でこういう仕事をよくやられているんですよ。で、MRK の 16、17、20 っていうの今作られていますけども、これ whole でやりまして、6000 個の中に 1 個、2 個かな、という風に、作る確率が非常に少なかったということを考えましてですね、要するに、膜タンパクのみとしてやったほうが効率としてはいいんじゃないかという風に単純に考えたいということです。それだけの話で、深い意味はありません。

追手 膜タンパクをとるとすごい解析し易いですよ。先程先生が講演のときに言われたみたいに、どのくらいのタンパク量で抗体ができた、或いはその抗原タンパクの分子量はどのくらいだとか、或いは糖タンパクなのか、でないのか。そういう解析はし易いです。膜タンパクにすることによって細胞内のものを拾ってくる可能性がある

ります。いくら膜タンパクをとったといっても細胞質のものはくっついてきますよね、どうしても。あれは除外するっていうのはなかなか大変なことだと思います。

福田 そうですね。従って実際のところは、はっきりそういう風なのはやってないわけですけども、差としてですね、parent なやつと明らかに差があるというところでやっぱり違うものが発現されているんじゃないかと。

追手 ええ、僕はそれはその通りだと思います。問題はそれが膜なのかどうかでことと、そうですね、そこが非常に。

福田 それは結局まだ解析をやってませんもんですから、実際 blotting して膜のタンパクとちゃんとくっつくかどうかというのをやってみないとだめだと思います。

追手 はい、どうも有難うございました。

司会 他にございませんでしょうか。

吉谷 MDR-gene や p-glycoprotein の発現を認める耐性の株というのは、多剤耐性を示すと理解しているんですが、今日発表された cell line は、Ara-C 以外の抗癌剤に対してどのような感受性を示すんでしょう。

福田 p-glycoprotein は先生今おっしゃられたとおりなんですけども、やった範囲では Adriamycin でもこれは死にます。従って MDR とは、multi drug resistance になっているという証拠はありません。Ara-C にのみ耐性である可能性のほうが高いんじゃないかと思っています。Vincristine のやつに関してはあまりデータはないんですけども、うちの柿原先生が Verapamil を加えたところだと、Vincristine に耐性になっているやつというのは Verapamil を加えるとやはり耐性解除が起こって死にます。ところが、Ara-C のやつは起こりません。で、真の意味で MDR とは言えない可能性もあると思います。

司会 宜しうございますか。どうぞ。

永井 第一内科の永井ですけども、Ara-C の抗腫瘍作用というのは、確かちょっと間違いかもしれないんですけども、体の中に入っていわゆる、活性化物質に変わって抗腫瘍作用が働くという風に理解してたんですけども、その Ara-CTP かなんかの濃度とか、そういう変換酵素の働きによってそういうことが起こってくるような風に理解してたんですけども、例えば酵素活性とか、或いは直接作用も確かにあると言われている活性化物質に関しては何かやっておられますか。

福田 残念ながら先程示したとおり in flax のところは dipyrindamole で抑制されるということを示しまして、そこは問題ないだろうと、耐性株も親株も同じよ

うに、それと deoxycytidine kinase に関しましては、さっき示したとおりで確かに減っている。減っているということは resistance になっていることなわけですが、その程度が、たった4、5倍程度の差で2万倍も強くなれるかどうか、というのは問題があると思います。で、僕らはやっぱり排泄機序がかなり大きいんじゃないかと考えております。もう一つは cytidine deaminase というのがあるんですが、これは僕ら実はやれないですよ、HPLC みたいなやつでないと。この中の deaminase の活性、或いは先生がおっしゃられた Ara-CTP とかでですね、そういうやつはちょっと僕らのところで測れないもんですから、実際にはそっちのほうが、例えば deaminase が活性化されている可能性も否定はできないんです。しかし、僕らのこの結果は十分、排泄機序がこれに関与しているというのを説明するに足る結果じゃないかと考えているんですけども、実際にそういう一つ

一つの enzyme, deaminase のほうは特にそうなんですけども、テクニックをちょっと持っていないもんですからやっておりません。

大西 第一内科の大西ですけども、ちょっと聞き逃したかもしれないんですけども、Ara-C の耐性株に、先生の唯一あったモノクローナル抗体をつけてですね、そして Ara-C を入れたらやはりその耐性は感受性のものになるんですか。

福田 今やっている最中というか、なかなかうまくそれがいかないもんですから、本当にそうかと言われると、ですから実際問題、まだ判りません。

司会 そこではまだあると思いますが、総合討論のときにまた御発言いただくことにして。では二番目が、CEA および CEA 関連抗原 (NCA) 分子の性状について、検査診断の内山君。

2) CEA 及び CEA 関連抗原 (NCA) 分子の性状について

新潟大学医学部検査診断学教室 (主任: 屋形 稔教授)

内 山 一 晃

Molecular Characteristics of Carcinoembryonic Antigen and Nonspecific Cross-reacting Antigen

Kazuaki UCHIYAMA

Department of Laboratory Medicine, Niigata School of Medicine
(Director: Prof. Minoru YAKATA)

Carcinoembryonic antigen (CEA) is one of the most famous laboratory tests of tumor markers. CEA was first reported in 1965, but molecular structure of CEA was not clear until recent years. Amino acid sequence of CEA was reported in 1987, by the success of cDNA cloning of CEA. The CEA molecule is composed of five major domains, called domain N, I, II, III, C from the $-NH_2$ terminal. But sugar chains of CEA are complicated and have much variety, so there are few informations about

Reprint requests to: Kazuaki UCHIYAMA,
Department of Laboratory Medicine,
Niigata University, School of Medicine,
Asahimachi-Dori 1, Niigata City, 951,
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部検査診断学教室
内山一晃