

合成 peptide を用いた抗 carcinoembryonic antigen (CEA) モノクローナル抗体の作製と CEA 上の抗原決定基の解析

菱川 法之 辻崎 正幸 今井 浩三

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Preparation of Monoclonal Antibodies to Synthetic Peptide of Carcinoembryonic Antigen (CEA) and Analysis of Epitopes on CEA

Noriyuki HISHIKAWA, Masayuki TSUJISAKI and Kohzoh IMAI

Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief: Prof. A. Yachi)

ABSTRACT The monoclonal antibodies to a synthetic peptide of domain I (119-140 amino acids, P1-peptide) of carcinoembryonic antigen (CEA) were prepared and characterized, in order to analyze the epitope structure of CEA. Antibodies were screened by use of radioimmunoassay employing the P1-peptide as an antigen. The resulting monoclonal antibodies were divided into two groups. Group 1 (SC1) reacted with the synthetic peptide, but not with native CEA preparation. Group 2 (SC2 and SC3) reacted with either type of antigens. Interestingly, after treatment of CEA with periodate, group 1 showed reactivity, suggesting that the amino acid sequence recognized with the monoclonal antibody of group 1 was spatially hidden by carbohydrate residue. These results were confirmed by Western blot analysis and by immunohistochemical method. The monoclonal antibodies of group 2 showed a similar staining pattern to the conventional anti-CEA MoAbs. However, the epitopes recognized by the antibodies of group 2, seem different from the epitope recognized by the conventional MoAbs, when the reactivity patterns of these antibodies against P1-peptide are compared.

The amino acid sequences of the epitopes can possibly be speculated from the reactivity of each antibody to the recombinant domains and from the result obtained by blocking assay. These monoclonal antibodies would be useful for further analysis of the epitopes and as a possible diagnostic and therapeutic tool for cancer.

(Received August 7, 1989 and accepted August 21, 1989)

Key words; Carcinoembryonic antigen, Monoclonal antibodies, Synthetic peptide, Epitope analysis

1 緒 言

Carcinoembryonic antigen (CEA, 癌胎児性抗原) は 1965 年 Gold and Freedman^{1,2)} により, ヒト大腸癌組織より見出された分子量 180 から 200 Kd の糖蛋白で, 当初は大腸癌に特異的な抗原とされていた。その後, radioimmunoassay 法の開発等により, 血中 CEA の測定が行われ血清診断に応用されると, 大腸癌のみならず膵癌, 胃癌, 胆道癌などの消化器癌, 甲状腺腫瘍, 乳癌, 肺癌等にも見出され, 今日最もポピュラー

な腫瘍マーカーのひとつとして広く臨床的に応用されている³⁻⁶⁾。1975 年に Köhler & Milstein⁷⁾ により確立された細胞融合法を用いたモノクローナル抗体 (MoAb) の登場により CEA および CEA 関連抗原の免疫学的解析が進み⁸⁾, CEA の heterogeneity の少なくとも一部は CEA の糖鎖に由来することが推測され⁹⁾, 糖鎖構造の解析¹⁰⁾ も行われるようになった。1987 年には, CEA の gene cloning^{11,12)} により CEA のアミノ酸の全配列が決定し, domain N, I, II, III より成る CEA の一次構造が明らかとなった。この直後に gene cloning の成功し

た他の CEA 関連抗原 (NCA^{13,14}, BGP1¹⁵) 等) との比較検討より, 関連分子間における分子進化が論じられ¹⁶), またアミノ酸レベルでの相溶性から CEA および CEA 関連抗原は immunoglobulin supergene family として位置づけられてきている¹⁷⁻¹⁹). このように gene cloning の成功により CEA 研究の方向性が大きく変わろうとしており, 今後より詳細な CEA の構造解析や機能検索, ならびに血清診断の発展が期待される。

それゆえ, これらの点を検索するため, 基礎モデル実験として CEA 上に存在する 22 個のアミノ酸残基より成る合成 peptide を用い, これに対する MoAb を作製し, 合成 peptide および native CEA 等との反応性を検討した。その結果, 合成 peptide 上の抗原決定基のアミノ酸配列, CEA 分子の糖鎖の影響などについて興味ある成績が得られたので報告する。

2 研究方法

2.1 MoAb の作製

2.1.1 免疫原および免疫方法

アミノ酸配列の決定されている CEA domain I の No. 119~140 のアミノ酸配列に相当する合成 peptide (P1-peptide) を免疫原として用いた。この合成 peptide はオリエンタル酵母工業株式会社より供与されたもので, この部分は, 特に親水性に富み^{20,21}), domain I, II および III に繰り返し構造を有する (Table 1)。なお, P1-peptide は, Sephadex G-15 カラムによるゲル濾過により精製され, 逆相 HPLC (Toyo Soda 0 DS-120T カラム) により純度検定を行い, シークエンサーにより一次構造の確認されたものである。

精製された P1-peptide 1 mg/ml に keyhole limpet hemocyanin (KLH; Sigma, USA) 1 mg を加え, 0.25% glutaraldehyde 下で室温 45 分間反応させた後, 0.01 M リン酸緩衝食塩水 (PBS) pH 7.4 で透析した。次に KLH 結合 P1-peptide 100 μ g を complete

Freund's adjuvant に懸濁し, BALB/c マウスに腹腔内投与した。7 日間隔で 2 回の追加免疫を行い, 最終免疫より 3 日目に BLAB/c マウスからの脾細胞を用い, マウス骨髓腫細胞 X63-Ag8.653 と守谷・今井が記載した方法²²) に従い細胞融合を行った。

2.1.2 ハイブリドーマのスクリーニング方法

免疫原の P1-peptide を 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) により 0.1 mg/ml に調整した溶液 100 μ l ずつを 96 穴塩化ビニールプレート (Dynatec, USA) に加え 4 $^{\circ}$ C, 16 時間静置し, P1-peptide を固相化した。PBS で 3 回洗浄後, 5% ウシ血清アルブミン (BSA) に 4 $^{\circ}$ C, 2 時間反応させ, PBS にて 1 回洗浄後にハイブリドーマ培養上清 100 μ l を加え 4 $^{\circ}$ C, 5 時間反応させた。PBS にて 3 回洗浄後, クロラミン T 法²³) により ¹²⁵I で標識したヒツジ抗マウス IgG \cdot Fc 抗体 (Jackson Immuno-research Laboratory, USA) 1×10^5 cpm/well を加え, 4 $^{\circ}$ C, 3 時間反応させた。PBS により 5 回洗浄後, 標識抗体の結合 cpm を γ -counter により測定した。Native CEA についても P1-peptide と同様の方法で固相化し, すでに P1-peptide と反応性を示す培養上清について CEA との反応性を検討した。なお, native CEA は既報²⁴⁻²⁶) に従って精製した。

2.2 MoAb の精製および ¹²⁵I 標識

各 MoAb の精製には caprylic acid 沈澱法²⁷) あるいは, protein A セフアロースによる affinity chromatography 法²⁸) を用いた。また作製された MoAb の ¹²⁵I 標識はクロラミン T 法によった。

2.3 他の CEA 合成 peptide および MoAb

2.1.1 に示した P1-peptide と同様の作製方法で, 対照として用いる合成 peptide P2 (No. 202-221), P3 (No. 367-386), P4 (No. 558-577) および P5 (No. 1-20) を作製し, 実験に用いた。また対照の抗 CEA MoAb としては, CEM 010 (持田製薬, 東京) および CEA モノクローナル抗体国際ワークショップ (議長:

Table 1 Amino acid sequence of synthetic peptide (P1-peptide, No. 119-140) used for immunization. Similar sequences are present in domain II and III of the carcinoembryonic antigen

Domain	Amino acid sequence
I	¹¹⁹ N S K P V E D K D A V A F T C E P E T Q D A ¹⁴⁰
II	²⁹⁷ N S <u>N</u> P V E D <u>E</u> D A V A <u>L</u> T C E P E <u>I</u> Q <u>N</u> T ³¹⁸
III	⁴⁷⁵ N S K P V E D K D A V A F T C E P E <u>A</u> Q <u>N</u> T ⁴⁹⁶

The underlined amino acids are different from those in No. 119-140 in domain I. Figures denote amino acid numbers from the N-terminus of the carcinoembryonic antigen molecule.

Shively 博士)においてエピトープの違いにより4種類に分類され²⁹⁾, 供与された抗 CEA MoAbs を実験に用いた。

2.4 組みかえ型 CEA domain との反応性

組みかえ型 CEA domain は中里 紘博士(サントリー生物医学研究所)からの供与による。なお、各 domain は domain N (No. 1-106), domain I (No. 107-262), domain II (No. 301-478) および domain III (No. 479-668) を用いた。2.1.2 に記載した P1-peptide と同様の操作で domain を固相化し、¹²⁵I 標識精製 MoAb との反応性を検討した。

2.5 各 MoAb 間の blocking assay

Blocking assay は以下の手順で行なった。すなわち、P1-peptide をプレートに固相化した後、cold inhibitor として過剰量の各精製 MoAb (50 µg/well) を加え、4℃, 3時間静置し、洗浄後 ¹²⁵I 標識精製 MoAb を 4℃, 3時間反応させた。洗浄後結合している放射活性を測定し、cold inhibitor として CEA に特異性を有しない対照 MoAb を加えたコントロール群との間で阻止率を算出した。

2.6 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE) および Western blotting

SDS-PAGE は Imai *et al.*³⁰⁾ の報告に準じ、7.5% ゲルを使用し、薄層スラブゲル電気泳動槽を用いた。Western blotting は、native CEA 抗原 (50 µg/ml) 50 µl を SDS-PAGE にて展開後、Hinoda *et al.*³¹⁾ の方法に従ってゲルよりニトロセルロース膜 (pore size 0.45 µm, Schleicher and Schüll, Germany) へ転写し、酵素抗体間接法を用いて抗原を検出した。さらに MoAb の反応性に対する過ヨウ素酸の影響を検討するため、抗原をニトロセルロース膜に転写後 1% 過ヨウ素酸を 10 分間反応させ MoAb との反応性を検討した。

2.7 免疫組織染色

2.7.1 組織材料

手術時採取された大腸癌 16 例、胃癌 9 例を用い、組織を 10% ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋後 4~5 µm にて連続切片をつくり 4℃ に保存した。各例にヘマトキシリン・エオジン染色を行い、病理組織学的に検討した。

2.7.2 免疫ペルオキシダーゼ染色

Yachi *et al.*³²⁾ に準じて間接免疫ペルオキシダーゼ法を行った。パラフィン組織切片をキシレンにて脱パラフィンし、0.6% H₂O₂ メタノールに室温 20 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼを除去した。次に二次

抗体の非特異的吸着を阻止するため、正常ウサギ血清を PBS にて 40 倍希釈し、組織切片に室温 30 分間反応させた。一次抗体として各 MoAb を室温 1 時間反応させ、次に二次抗体として PBS により 40 倍希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン (DAKO, Denmark) を反応させた。さらに、ペルオキシダーゼの基質として 3-3' diaminobenzidine (東京化成) 20 mg/dl を 0.01% H₂O₂ 加 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) 100 ml 中に溶解したものを室温 1~2 分間反応させ発色させた。核染色は 0.1% Hematoxylin (Merck, Germany) による。

2.8 過ヨウ素酸処理

組織切片を内因性ペルオキシダーゼ除去の後、Kiernan の方法³³⁾に従って 1% 過ヨウ素酸にて 10 分間反応させ、MoAb の反応性に対する過ヨウ素酸処理の影響を検討した。なお、Western blotting についても、抗原を転写後に同様の方法で過ヨウ素酸処理を行ない、MoAb の反応性を検討した。

3 成績

3.1 P1-peptide に対する MoAb の作製

P1-peptide を用いて免疫し、得られた脾細胞を 2.1.1 に示した方法に従い型のごとく細胞融合を行った。922 穴中 874 個 (874/922) のクローンを認め、融合効率は 94.8% であったが、このうち免疫原の P1-peptide と強い反応性 (10,000 cpm 以上) を示すクローンは、13/922 (1.4%) であった。この中から 7 クローン (SC1~7) を選択し、native CEA との反応性を検討した。その結果、得られた MoAb はその反応性から 2 つの群に分類された (Table 2)。すなわち、第 1 群: 免疫原の P1-peptide とのみ反応性を有し native CEA とは反応性を示さない MoAb (SC1, 4) および第 2 群: 免疫原の P1-peptide および native CEA の両者に共に反応性を有する MoAb (SC2, 3, 5, 6, 7) である。本研究においては、第 1 群の MoAb SC1 (P1-706) および第 2 群の MoAb SC2 (P1-234), SC3 (P1-255) を用いて以下の実験を行なった。なおこれら 3 種の MoAb の免疫グロブリンクラスはいずれも IgG1 であった。

3.2 MoAb の血清学的検索

3.2.1 合成 peptide との反応性

MoAb SC1, SC2 および SC3 と、合成 CEA peptide (P1~P5), native CEA あるいは陰性対照としての BSA との反応性をみると (Table 3), P1-peptide とアミノ酸配列の異なる他の合成 CEA peptide 4 種 (P2, P3, P4 および P5) とは、いずれの MoAb も反応性を

示さず, P1-peptide とのみ強く反応した. MoAb SC1 は, native CEA と反応せず, SC2 と SC 3 は native CEA と強く反応した. 次に従来の抗 CEA MoAb が合成 peptide と反応し得るか否かを検討した結果, Table 4 に示すように CEA MoAb 国際ワークショップの分類による group 1 ~ 4 に属する MoAb は検索の限りでは, native CEA とは反応するが, どの合成 peptide とも反応性を示さなかった. この成績は今回得られた P1-peptide に対する MoAb が従来のものとは異なる反応性を有することを強く示唆する.

3・2・2 組みかえ型 CEA domain との反応性

次に ^{125}I 標識精製 MoAb を用いて, 固相化された組みかえ型 CEA domain との反応性を検討した (Table 5).

MoAb SC1 は, 組みかえ型 CEA domain のうち P1-peptide を含む CEA domain I とのみ反応し, 他のいづ

Table 2 Reactivity of anti-CEA peptide monoclonal antibodies with synthetic CEA peptide and native CEA.

Monoclonal antibody		Antigen	
		Synthetic peptide P1	Native CEA
Group 1	SC1	21445 ^{cpm} *	2649 ^{cpm}
	SC4	20876	2638
Group 2	SC2	26628	25549
	SC3	23143	23788
	SC5	22555	22543
	SC6	20934	21914
	SC7	20637	21862
Control	MUSE 11**	1418	1656

* Mean cpm of triplicate values

** Control monoclonal antibody MUSE 11 (IgG1) was produced against a pancreas tumor-associated antigen of 300 kilo dalton molecule.

Table 3 Reactivity of anti-CEA peptide monoclonal antibodies with various preparation of synthetic CEA peptides.

Amino acid sequence			Monoclonal antibody		
			SC1	SC2	SC3
Synthetic peptide	P1	119-140	21445 ^{cpm} *	26628 ^{cpm}	23143 ^{cpm}
	P2	202-221	1587	1164	1080
	P3	367-386	1439	1004	1216
	P4	558-577	1665	1022	934
	P5	1- 20	1258	864	832
Native CEA		1-668+CHO**	2649	25549	23788
Control (Bovine serum albumin)			1591	1775	852

* Mean cpm of triplicate values

** CHO: carbohydrate moiety

Table 4 Reactivity of anti-CEA monoclonal antibodies with various preparations of synthetic CEA peptides

Amino acid sequence			^{125}I -labeled conventional anti-CEA MoAb			
			MA208	CEA281	12/140/7	12/140/1
Synthetic peptide	P1	119-140	459 ^{cpm} *	516 ^{cpm}	378 ^{cpm}	390 ^{cpm}
	P2	202-221	419	513	355	387
	P3	367-386	419	515	327	330
	P4	558-577	484	420	368	351
	P5	1- 20	471	460	294	354
Native CEA		1-668+CHO**	20416	6065	19157	16943
Control (Bovine serum albumin)			297	316	266	235

* Mean cpm of triplicate values

** CHO: carbohydrate moiety

Table 5 Reactivity of anti-CEA peptide monoclonal antibodies with recombinant CEA domains

Amino acid sequence			¹²⁵ I-labeled anti-CEA peptide MoAb		
			SC1	SC2	SC3
CEA domain	N	1-106	1910 ^{cpm} *	1226 ^{cpm}	1487 ^{cpm}
	I	107-262	4573	11710	12505
	II	301-478	1941	1413	13689
	III	479-668	1876	11980	13969
P1-peptide		119-140	9940	20883	14176
Native CEA		1-668+CHO**	1175	15812	16849
Control (Bovine serum albumin)			1264	1100	1844

* Mean cpm of triplicate values

** CHO: carbohydrate moiety

Table 6 Reactivity of anti-CEA peptide monoclonal antibodies with periodate-treated CEA assessed by indirect binding assay

Monoclonal antibody	Non-treated CEA	1 % periodate-treated CEA
MoAb SC1	801 ^{cpm} *	27513 ^{cpm}
MoAb SC2	32515	56167
MoAb SC3	58706	71786
Control (MoAb MUSE11)**	728	536

* Mean cpm of triplicate values

** See Table 2

れの domain とも反応性を示さなかった。一方, MoAb SC2 は, 組みかえ型 CEA domain I および domain III と反応性を示し, MoAb SC3 は CEA domain I, II および III の何れの domain とも反応性を示した。

3.2.3 過ヨウ素酸処理の影響

P1-peptide のみに反応し native CEA には反応しない第 1 群の MoAb SC1 について, CEA を過ヨウ素酸処理することにより, その反応性を示すか否かを検討した。その結果, Table 6 に示すように MoAb SC1 は過ヨウ素酸未処理 CEA には反応性を示さなかったが, 1 % 過ヨウ素酸にて室温 10 分間処理後, CEA との反応性を示した。

3.3 Western blotting による検索

次にこれらの, 3 種類の MoAb について Western blot 法により CEA との反応性を検討した。Fig. 1 に示すように第 1 群の MoAb SC1 では native CEA との反応性を認めなかったが, 第 2 群の MoAb SC2 および SC3 では明らかな反応性を示した。次に MoAb SC1 について, CEA を過ヨウ素酸処理してその反応性を検索した。その結果, Fig. 2, lane 4 に示すように処理後 200 K ダルトン付近に反応性を認めた。

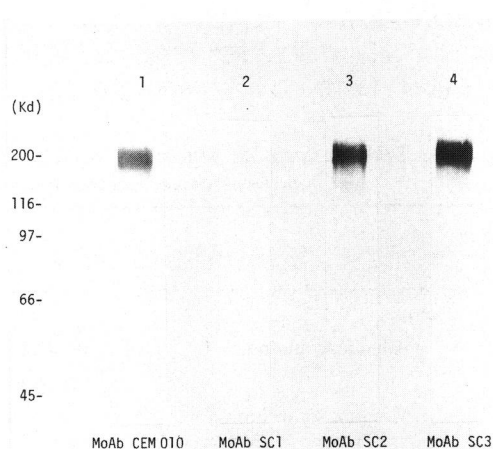


Fig. 1 Immunoblotting analysis of anti-CEA peptide monoclonal antibodies. CEA preparation (2.5 μ g/lane) was used as an antigen under non-reducing condition in 7.5% SDS-PAGE. Lane 1: Positive control (MoAb CEM010) which is a conventional anti-CEA MoAb. Lane 2: MoAb SC1 (group 1) Lanes 3, 4: MoAb SC2 and MoAb SC3 (group 2)

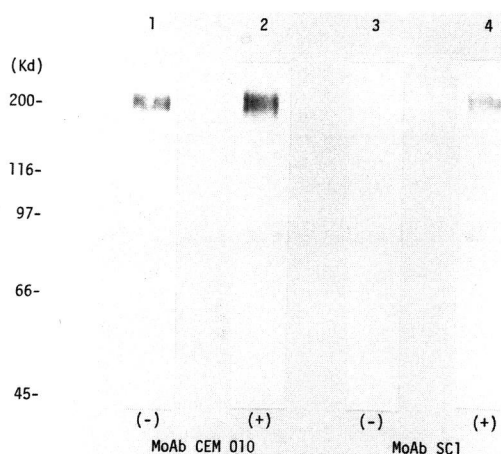


Fig. 2 Immunoblotting analysis of anti-CEA peptide monoclonal antibody. Periodate-treated and non-treated CEA preparation ($2.5 \mu\text{g}/\text{lane}$) was used as an antigen in 7.5% SDS-PAGE. Lanes 1, 3: Non-treated CEA preparation. Lanes 2, 4: Periodate-treated CEA preparation. Control monoclonal antibody CEM010 is a conventional anti-CEA MoAb. Periodate-treated CEA preparation was detected by MoAb SC1 (lane 4).

3.4 免疫組織学的検索

免疫ペルオキシダーゼ染色法を用いて、大腸癌組織および胃癌組織について検討した (Table 7, Fig. 3). 第2群の MoAb SC2, SC3 の場合には、それぞれの MoAb および組織で染色性の強弱、組織分布に若干の

差異を認めるが、大腸癌においてはいずれの MoAb も、従来の抗 CEA MoAb (Fig. 3a) とほぼ同様な染色パターンを示し、腺癌の内腔面に強い染色性を認めた。すなわち、粘膜表層の被覆上皮および円柱上皮細胞において、腺腔に沿って apical に染色性を示した。細胞質にも一部顆粒状に陽性所見を認めた。大腸癌組織については16例中15例に陽性所見を認めた (Table 7)。これに対して胃癌組織においては検索しえた9例については、6例が陽性で、腺癌および印環細胞癌において染色性を有する細胞が腺腔基底部に認められた。

なお非癌部の大腸・胃組織では、大腸組織の一部(粘膜表層の被覆上皮細胞)に弱陽性を示した他は、検索しえた組織においては反応性は認められなかった。次に第1群の MoAb SC1 では検索しえた大腸癌組織16例、胃癌組織9例すべてに陰性であった (Fig. 3d)。しかし、過ヨウ素酸処理 (1%過ヨウ素酸, 室温 10分) 後の組織については、大腸癌の16例中7例に染色性は比較的弱い、腺腔内分泌物および上皮細胞質に Fig. 3e に示すような反応性を認めた。

3.5 MoAb SC1, SC2 および SC3 により認識される P1-peptide 上の抗原決定基の位置関係

MoAb SC1, SC2 および SC3 により認識される合成 CEA peptide (P1-peptide) 上の抗原決定基の相互の位置関係を解析するため ^{125}I 標識精製 MoAb を用いて 2.5 に示した方法により blocking assay を行なった。Table 8 に示すように MoAb SC3 と SC1 また SC3 と SC2 の間では、互いに P1-peptide との結合性をそれぞれ

Table 7 Staining pattern of anti-CEA peptide monoclonal antibody SC3 in colonic and gastric cancerous tissues assessed by immunoperoxidase method

			No. tested	Staining intensity		
				++	+	—
Colon						
Adenocarcinoma	Well differentiated	11	9	2	0	
	Moderately differentiated	4	2	1	1	
Mucinous carcinoma		1	0	1	0	

Stomach						
Adenocarcinoma	Well differentiated	2	0	2	0	
	Moderately differentiated	1	0	1	0	
	Poorly differentiated	2	0	1	1	
Signet-ring cell carcinoma		3	0	2	1	
Mucinous carcinoma		1	0	0	1	

Total		25	11	10	4	

(++) Strong positive, (+) Positive, (-) Negative

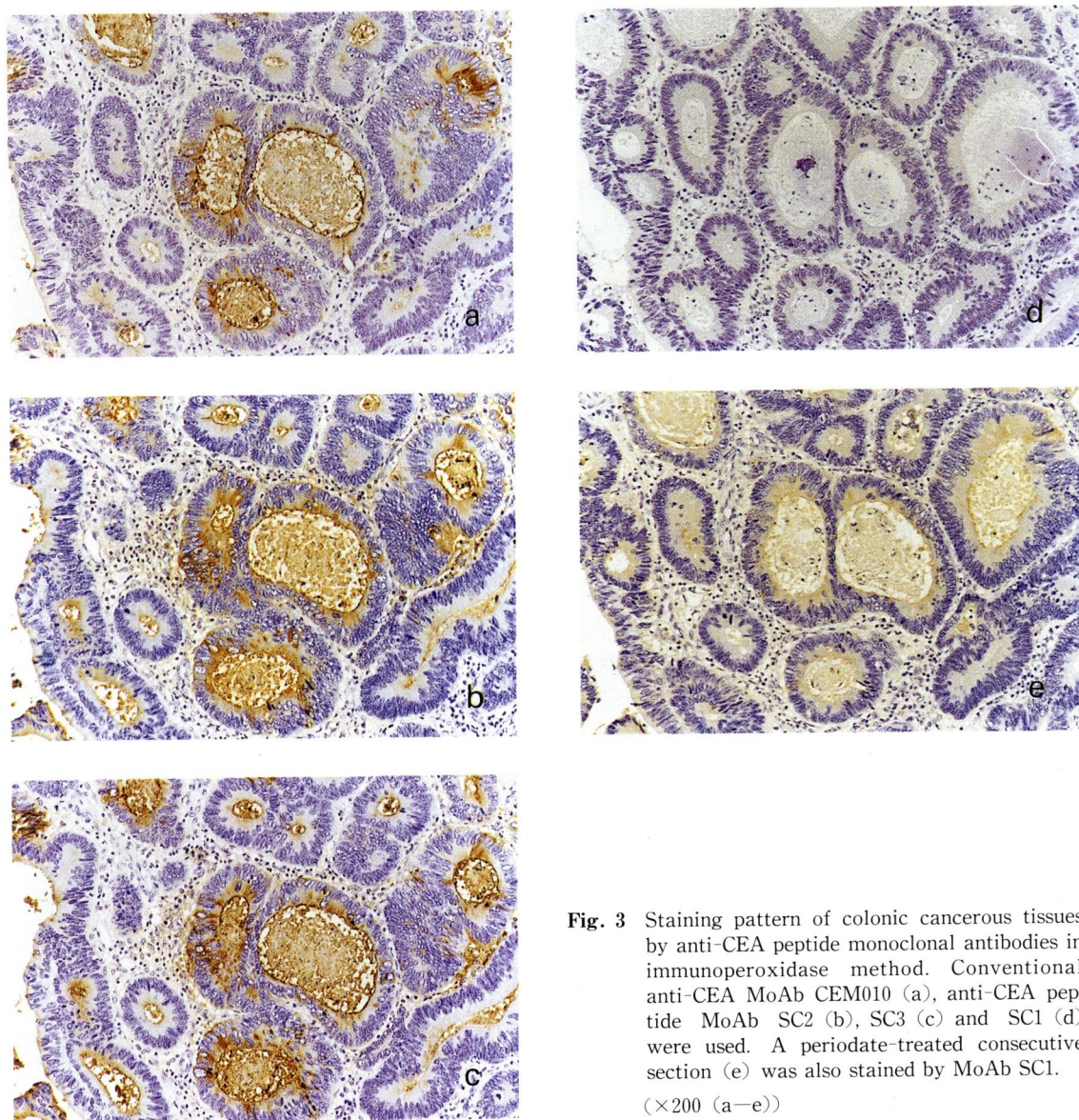


Fig. 3 Staining pattern of colonic cancerous tissues by anti-CEA peptide monoclonal antibodies in immunoperoxidase method. Conventional anti-CEA MoAb CEM010 (a), anti-CEA peptide MoAb SC2 (b), SC3 (c) and SC1 (d) were used. A periodate-treated consecutive section (e) was also stained by MoAb SC1. ($\times 200$ (a-e))

れ阻止する反応傾向を示した。一方 MoAb SC1 と SC2 との間では互いに阻止反応をほとんど示さなかった。この成績は、MoAb SC1 により認識される抗原決定基と MoAb SC2 により認識される抗原決定基とは比較的遠い位置関係にあるが、これらと MoAb SC3 の認識する抗原決定基とは互いに近接した位置関係にあることを示唆している。

4 考 察

これまでに合成 peptide による MoAb の作製の試み

Table 8 Epitope on P1-peptide recognized with monoclonal antibodies in blocking assay*

Cold inhibitor	¹²⁵ I-labeled anti-CEA peptide MoAb		
	MoAb SC1	MoAb SC2	MoAb SC3
MoAb SC1	81%	6%	53%
MoAb SC2	12	85	41
MoAb SC3	79	87	90

* Microtiter plates coated with P1-peptide were incubated with an excess of cold MoAbs and then tested for their ability to bind ¹²⁵I-labeled MoAbs. Results are expressed as % blocking.

は比較的低分子量のホルモンや神経 peptide を中心に行なわれてきた³⁴⁾が、最近では高分子蛋白抗原エピトープについても検討が行なわれつつある。本研究においては CEA 遺伝子ファミリーが遺伝子レベルで次々と明らかにされてゆく現状に基づいて、CEA のエピトープレベルの解析とその応用としての血清あるいは免疫組織診断への利用を目指して、1) 親水性に富み、2) 各 domain 間で繰り返し構造が判明している peptide 部分を合成してモノクローナル抗体を作製した。

4.1 MoAb SC1 の特性と CEA 上の糖鎖の影響

抗 CEA peptide MoAb SC1 は CEA domain I とのみ反応性を有し、他の domain N, II, III および native CEA とは反応性を示さなかった。CEA 上の糖鎖の影響を検索するため、native CEA の他に過ヨウ素酸処理を行った CEA を用いて、それぞれの反応性を比較検討した。その結果 RIA 法による結合試験および Western blot 法において、過ヨウ素酸処理後の CEA と未処理のものとはその反応性に著しい差異を認め、MoAb SC1 は過ヨウ素酸処理後の CEA にのみ強い反応性を示した。さらに Fig. 3e に示したように、免疫組織染色においても同様の傾向がみられた。これらの成績から、MoAb SC1 の反応するエピトープは、CEA 分子上の糖鎖により、強く影響を受けることが示唆された。すなわち、このことは native な抗原分子を免疫原として用いてもその蛋白骨格内部に結合する MoAb を得ることは困難なことを示唆している。従って合成 peptide を用いて作製されたこのような MoAb は極めてユニークであり、サンプルに過ヨウ素酸処理などを加えることにより、新しい試薬として使用し得る可能性がある。

4.2 MoAb SC1, SC2 および SC3 に認識される抗原決定基の解析

P1-peptide に対する MoAb SC1, SC2, SC3 の

CEA domain N, I, II, III および native CEA に対する反応性は Table 5 に示したごとくであるが、これらの結果をもとにそれぞれの MoAb の反応するエピトープをアミノ酸レベルで明らかにできる可能性がある。すなわち、これらの成績と対応しうるアミノ酸残基をコンピューターに入力して解析を試みた。その結果、それぞれの MoAb の認識する P1-peptide 上の抗原決定基の考えうる可能なアミノ酸配列が推定された (Fig. 4)。MoAb SC1 によって認識される抗原決定基は、P1-peptide 上のアミノ酸残基 ETQDA を含む No. 119~140 のアミノ酸配列上に存在する。MoAb SC2 により認識される抗原決定基は P1-peptide 上のアミノ酸配列 f2 (NSKPVEDKDAVAFTCEPE) 上に存在する。MoAb SC3 により認識される抗原決定基は、f3 (PVED) または f4 (DAVA) あるいは f5 (TCEPE) 上のいずれかのアミノ酸配列が候補として考えられる。

以上の結果とともに、3・5 で示した各々の MoAb 間における blocking assay によって得られた抗原決定基の位置関係の結果を考慮に入れると、MoAb SC1, SC2 および SC3 により認識される抗原決定基の最も可能性のあるアミノ酸配列は、MoAb SC1 については ETQDA, MoAb SC3 については DAVA または TCEPE に相当し、MoAb SC2 については、SC3 が DAVA のときは VEDKDAV, TCEPE のときは VEDKD あるいは AVAFTCE の一部を認識するものと推察された。

このような解析は、さらにそれぞれの合成 peptide のフラグメントを作製して確認作業を行う必要があるが、今回の研究の延長上にはそれぞれの MoAb の対応エピトープがアミノ酸レベルで明確になることは疑いが無い。またこのような成果は、CEA 遺伝子ファミリーについては、それぞれの抗原分子固有のエピトープに対する MoAb の作製を可能とするため、これまでの CEA

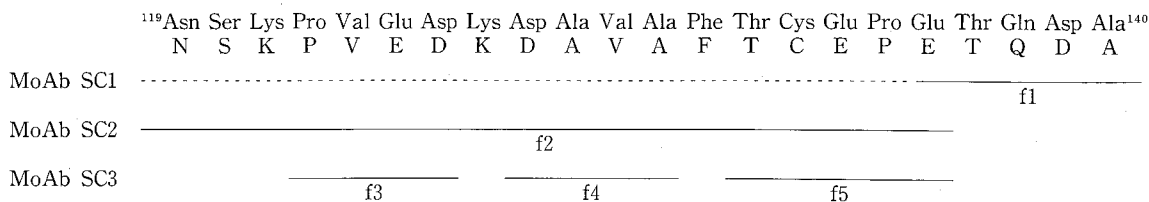


Fig. 4 Possible sequences of amino acids of CEA recognized by anti-CEA peptide monoclonal antibodies. It is suggested that MoAb SC1 recognizes a sequence within No. 119-140 at least including f1 (ETQDA), MoAb SC2 recognizes a sequence within f2 (NSKPVEDKDAVAFTCEPE) and MoAb SC3 recognizes either sequence f3 (PVED), f4 (DAVA) or f5 (TCEPE).

ファミリー間の交叉反応性の問題を解決し、それぞれの抗原分子の組織分布についても明瞭な解答を与えることになる。このような成果は当然抗原分子固有の機能の解析へと研究を進めることになるとともに、得られる MoAb を選択することにより、診断応用上、腫瘍マーカーとしてよりの確な試薬を提供する可能性も秘めている。さらに最近注目を集めている抗イディオタイプ・モノクローナル抗体の研究³⁵⁾に貢献する可能性が強い。すなわち、抗原エпитープを合成 peptide として免疫し、モノクローナル抗体 (Ab1), 抗イディオタイプ・モノクローナル抗体 (Ab2) を作製した場合、Ab2 に internal image が存在するか否かをアミノ酸レベルで確かめることが可能となるからである。本研究はそれらをも指向して基礎的研究を行ったものであるが、いずれにしても合成 peptide に対する MoAb の作製はヒト腫瘍の診断と治療へ広く貢献する可能性がある。

5 要 約

CEA 分子の抗原決定基の解析ならびに新しい血清診断を目指して合成 CEA peptide に対する MoAb の作製に成功し、次のような成績を得た。

- 1) 得られた MoAb はその反応性から 2 群に分類された。すなわち、第 1 群：免疫原の合成 CEA peptide とのみ反応性を有し、native CEA とは反応性を示さないもの (SC1, 4), および第 2 群：合成 peptide および native CEA の両者に共に反応性を示すもの (SC2, 3, 5, 6, 7) である。
- 2) このうち第 2 群の MoAb (SC2 および 3) は、免疫組織染色パターンおよび Western blot 法において、既存の抗 CEA MoAb と類似していた。
- 3) しかし、免疫に使用した合成 peptide との反応性からみると、今回作製された MoAb は、これまでに報告のある国際ワークショップで分類された MoAb とはそのエпитープ特異性が異なっている可能性がある。
- 4) 第 1 群の MoAb SC1 は、CEA を過ヨウ素酸処理することにより反応性を示すことが判明し、その抗原決定基に糖鎖が影響している可能性が強く示唆された。
- 5) 今回詳細な検討を加えた 3 種の MoAb の認識する抗原決定基について、組みかえ型 CEA domain との反応性ならびにそれぞれの抗体による阻止反応を利用して解析を行った。その結果、それぞれの抗原決定基がアミノ酸レベルで決定される可能性が、きわめて強くなった。

謝 辞

ご指導、ご校閲いただいた谷内 昭教授ならびにご協力いただいた諸先生に深謝いたします。また、組みかえ型 CEA domain を供与下さったサントリー生物医学研究所、中里 紘博士に謝意を表します。

本研究は、厚生省がん研究助成金(谷内)、文部省がん特別研究 I 及び II (谷内、今井) 及び上原生命科学財団(谷内)の補助による。

文 献

1. Gold, P. and Freedman, S. O.: Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.* **121**, 439-462 (1965).
2. Gold, P. and Freedman, S. O.: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* **121**, 467-481 (1965).
3. Thomson, D. M. P., Krupey, J., Freedman, S. O. and Gold, P.: The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **64**, 161-167 (1969).
4. Moore, T. L., Kupchik, H. Z., Macon, N. and Zamcheck, N.: Carcinoembryonic antigen assay in cancer of the colon and pancreas and other digestive tract disorders. *Am. J. Dig. Dis.* **16**, 1-7 (1971).
5. Kodama, T., Fujino, M., Endo, Y., Obara, T., Fujimoto, Y., Adachi, I., Abe, K., Oda, T. and Wada, T.: Family study of serum carcinoembryonic antigen in inherited medullary carcinoma of the thyroid. *Cancer* **44**, 661-664 (1979).
6. Gropp, C., Lehmann, F. G., Bauer, H. W. and Havemann, K.: Carcinoembryonic antigen, α_1 -fetoprotein, ferritin, and α_2 pregnancy associated glycoprotein in the serum of lung cancer patients and its demonstration in lung tumor tissues. *Oncology* **34**, 267-272 (1977).
7. Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
8. Yachi, A., Imai, K., Fujita, H., Moriya, Y., Tanda, M., Endo, T., Tujisaki, M. and Kawaharada, M.: Immunohistological distribution of the antigenic determinants detected by monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen. *J. Immunol.* **132**, 2998-3004 (1984).
9. Imai, K., Moriya, Y., Fujita, H., Tujisaki, M.,

- Kawaharada, M. and Yachi, A.: Immunologic characterization and molecular profile of carcinoembryonic antigen detected by monoclonal antibodies. **J. Immunol.** 132, 2992-2997 (1984).
10. Yamashita, K., Totani, K., Kuroki, M., Matsuoka, U., Ueda, I. and Kobata, A.: Structural studies of the carbohydrate moieties of carcinoembryonic antigens. **Cancer Res.** 47, 3451-3459 (1987).
 11. Oikawa, S., Nakazato, H. and Kosaki, G.: Primary structure of human carcinoembryonic antigen (CEA) deduced from cDNA sequence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 142, 511-518 (1987).
 12. Zimmermann, W., Ortlieb, B., Friedrich, S. and von Kleist, S.: Isolation and characterization of cDNA clones encoding the human carcinoembryonic antigen reveal a highly conserved repeating structure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84, 2960-2964 (1987).
 13. Thompson, J. A., Pande, H., Paxton, R. J., Shively, L., Padma, A., Simmer, R. L., Todd, C. W., Riggs, A. D. and Shively, J. E.: Molecular cloning of a gene belonging to the carcinoembryonic antigen gene family and discussion of a domain model. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84, 2965-2969 (1987).
 14. Oikawa, S., Kosaki, G. and Nakazato, H.: Molecular cloning of a gene for a member of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family; signal peptide and N-terminal domain sequence of nonspecific crossreacting antigen (NCA). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 146, 464-469 (1987).
 15. Hinoda, Y., Neumaier, M., Hefta, S. A., Drzeniek, Z., Wagener, C., Shively, L., Hefta, L., Shively, J. E. and Paxton, R. J.: Molecular cloning of a cDNA coding biliary glycoprotein I; primary structure of a glycoprotein immunologically crossreactive with carcinoembryonic antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85, 6959-6963 (1988).
 16. Neumaier, M., Zimmermann, W., Shively, L., Hinoda, Y., Riggs, A. D. and Shively, J. E.: Molecular cloning and characterization of a full length cDNA to the nonspecific crossreacting antigen (NCA) and comparison to carcinoembryonic antigen (CEA). **J. Biol. Chem.** 263, 3202-3207 (1988).
 17. Paxton, R. J., Mooser, G., Pande, H., Lee, T. D. and Shively, J. E.: Sequence analysis of carcinoembryonic antigen; identification of glycosylation sites and homology with immunoglobulin super gene family. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84, 920-924 (1987).
 18. Oikawa, S., Imajo, S., Noguchi, T., Kosaki, G. and Nakazato, H.: The carcinoembryonic antigen (CEA) contains immunoglobulin-like domains. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 144, 634-642 (1987).
 19. Williams, A. F. and Barclay, A. N.: The immunoglobulin superfamily domains for cell surface recognition. **Ann. Rev. Immunol.** 6, 381-405 (1988).
 20. Imai, K., Tsujisaki, M., Hishikawa, N., Tokuchi, S., Higashide, T., Ito, J., Sato, Y., Ono, A., Sugiyama, T. and Yachi, A.: Preparation of monoclonal antibodies to synthetic CEA peptide. In: Yachi, A. and Shively, J. E.: The Carcinoembryonic Gene Family. 1-11, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, New York and Oxford (1989).
 21. Hoop, T. P. and Woods, K. R.: Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequence. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 78, 3824-3828 (1981).
 22. 守谷保夫, 今井浩三: モノクローナル抗体を用いた CEA の免疫学的研究. **札幌医学雑誌** 53, 455-467 (1984).
 23. Greenwood, F. C., Hunter, W. M. and Glover, J. S.: The preparation of ^{131}I -labeled human growth hormone of high specific radioactivity. **Biochem. J.** 89, 114-123 (1963).
 24. Yachi, A., Araki, A., Kawaharada, M., Imai, K., Akahonai, Y. and Wada, T.: Carcinoembryonic antigen and the related antigens in gastric carcinoma. **Protides Biol. Fluids** 24, 473-476 (1976).
 25. Burtin, P. and Chavanel, G.: A new and fast method of preparation of CEA. **Ann. Immunol. (Paris)** 124, 583-587 (1973).
 26. von Kleist, S., Chavanel, G. and Burtin, P.: Identification of an antigen from normal human tissue that crossreacts with the carcinoembryonic antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 69, 2492-2494 (1983).
 27. Russo, C., Callegaro, L., Lanza, E. and Ferrone, S.: Purification of IgG monoclonal antibody by caprylic acid precipitation. **J. Immunol. Methods** 65, 269-271 (1983).
 28. Ey, P. L., Prowes, D. J. and Jenkin, C. R.: Isolation of pure IgG 1, IgG 2a and IgG 2b immunoglobulins from mouse serum using proteinA-Sepharose.

- pharose. **Immunochemistry** **15**, 429-436 (1978).
29. Hammarström, S., Shively, J., Beatty, B. G., Larsson, A., Ghosh, R., Bormer, O., Buchegger, F., Mach, J. P., Burtin, P., Seguin, P., Darbouret, B., Degorce, F., Sertour, J., Jolu, J. P., Fuks, A., Kalthof, H., Schmiegell, W., Arndt, R., Kloppel, G., Kleist, S. V., Grunert, F., Schwarz, K., Matsuoka, Y., Kuroki, M., Wagener, C., Weber, T., Yachi, A., Imai, K., Hishikawa, N. and Tsujisaki, M.: Antigenic sites in carcino-embryonic antigen -Summary of an international workshop on the epitope reactivity of monoclonal antibodies against CEA. **Cancer Res.** (in press) (1989).
30. Imai, K., Galloway, D. R. and Ferrone, S.: Serological and immunochemical analysis of the specificity of the xenoantiserum 8986 elicited with hybrids between human melanoma and murine fibroblasts. **Cancer Res.** **41**, 1028-1033 (1981).
31. Hinoda, Y., Imai, K., Ban, T., Endo, T. and Yachi, A.: Immunochemical characterization of adenocarcinoma-associated antigen YH206. **Int. J. Cancer** **42**, 653-658 (1988).
32. Yachi, A., Imai, K., Endo, T. and Hinoda, Y.: Immunohistochemical analysis of human adenocarcinoma-associated antigen YH206 detected by a monoclonal antibody. **Jpn. J. Med.** **25**, 127-134 (1986).
33. Kiernan, J. A.: Histological and histochemical methods. Theory and Practice. 153-156 Phargamon press. Oxford (1981).
34. Yanaihara, C., Matsumoto, T., Nishida T., Uchida, T., Kobayashi, S., Moody, A. J., Orci, L. and Yanaihara, N.: Chemical approach to develop glicentin C-terminal specific radioimmunoassay. **Biomed. Res.** **5**, 19-32 (1984).
35. 谷内 昭, 辻崎正幸, 今井浩三: 抗イディオタイプ抗体の応用, **癌と化学療法**(印刷中)(1989).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 菱川法之