

モノクローナル抗体 A3D4 により検出される 新しい胃癌関連ムチン抗原の解析

明石 浩史

札幌医科大学内科学第一講座 (主任 今井浩三 教授)

A Novel Gastric Cancer-associated Mucin Antigen Defined by a Monoclonal Antibody A3D4

Hirofumi AKASHI

First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University
(Chief : Prof. K. IMAI)

ABSTRACT In this study, to attempt to develop useful markers for gastric cancers, we have purified and deglycosylated gastric mucin and established monoclonal antibodies (MoAbs). Their characterization was immunohistochemically performed and the following results were obtained: 1) Since a MoAb designated A3D4 among established MoAbs was shown to react with gastric cancer with high frequency, but not with normal gastric epithelium, this MoAb was analysed in this study. 2) Among normal digestive organs, only the colon and gall bladder were positive for MoAb A3D4. 3) The incidence of positivity in gastric cancer was 92% for well differentiated adenocarcinoma (n=13), 60% for moderately differentiated adenocarcinoma (n=15) and 33% for poorly differentiated adenocarcinoma (n=12). 4) Intestinal metaplasia (IM) with chronic gastritis or gastric ulcer was negative for MoAb A3D4, whereas 8 out of 13 cases (62%) of IM with gastric cancer were positive. 5) Western blot analysis using the lysate from normal colon tissues revealed a high-molecular-weight (>300 kD), smear-like band. 6) With immunohistochemical analysis, the reactivity of MoAb A3D4 was increased when fixed cultured cells were pretreated with periodic acid, O-glycanase or N-glycosidase, while it was slightly decreased by pretreatment with trypsin or protease V8. 7) There was no reactivity with the synthetic peptide encompassing the tandem-repeat sequence of MUC2 or MUC3.

These data suggest that MoAb A3D4 detects a novel gastric cancer-associated mucin antigen whose epitope may be peptide in nature. (Received December 12, 1996 and accepted December 20, 1996)

Key words: Monoclonal antibody, Gastric mucin, Tumor-associated antigen,
Intestinal metaplasia, Gastric cancer

1 緒 言

ムチンは全重量の 50-80% を占める糖鎖 (主に O 型結合糖鎖) とコアペプチドからなる高分子糖蛋白である。コアペプチドはアボムチンと呼ばれ Thr, Ser を多く含有する¹⁾。これまで胃の腸上皮化生, 悪性腫瘍での様々なムチン分子の変化が報告されており²⁾, これらの胃ムチンの癌性変化を検出する目的で数多くのモノク

ローナル抗体 (MoAb) が作製されてきた³⁻⁹⁾。それらの癌特異性は p53¹⁰⁾, APC¹¹⁾, c-met¹²⁾, k-sam¹³⁾, c-erbB-2¹⁴⁾ などの胃癌の遺伝子マーカーと比較すると低いと言わざるを得ないが, 抗原の免疫学的検出は, 遺伝子異常の分子生物学的分析に比較するとはるかに容易であり, さらに有用な MoAb の開発が望まれている。

最近の研究により, ヒトムチンコア蛋白は MUC と呼ばれる, 少なくとも 9 つの異なった遺伝子によりコー

ドされていることが明らかにされている¹⁵⁻²²⁾。その中で、MUC1 ムチンのコアペプチドは、重要な腫瘍関連抗原であることが示され²³⁾、これまで癌患者において MUC1 コアペプチドに対する自己抗体や、CTL の誘導されることが報告されてきた²⁴⁻²⁷⁾。このことは、癌細胞における糖鎖の形成不全によってコアペプチドエピトープが露出することに基因すると考えられている。N-acetylgalactosamine の類似物質 (O 型糖鎖の合成阻害物質) を用いて培養細胞の脱糖鎖をおこなうと、抗 MUC1 コアペプチド抗体の細胞に対する反応性の増強することが知られている^{28,29)}。また組織切片を過ヨウ素酸処理することによって糖鎖を除去した場合にも抗 MUC1 抗体の反応性は増強する³⁰⁾。従って、脱糖鎖により腫瘍関連抗原エピトープの発現が増強する、あるいは新しいエピトープが露出してくることが期待される。

本研究においては、精製脱糖鎖胃ムチンを用いて、胃癌の免疫組織化学的解析に有用な MoAb の作製を試みた。

2 方 法

2.1 胃ムチンの精製および脱糖鎖

2.1.1 ムチンの精製

健康成人より胃液を採取し 1 N NaOH を加えて中和後、Aquacide II (Calbiochem, La Jolla, CA) を用いて 500 ml より 50 ml に濃縮した。ムチン精製は Podolsky, Isselbacher²¹⁾ の方法に若干の修正を加えて行った。濃縮胃液を 0.1 M NH_4HCO_3 、0.5 M NaCl、0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride 溶液に対して一晩透析後、45 分間 $45,000 \times g$ で遠心した。上清を再び 45 分間 $45,000 \times g$ で遠心し、その上清を 10 mM Tris バッファー pH 8.0 に対して一晩透析した。30 分間 $27,000 \times g$ で遠心後、5.0 \times 95 cm のセファロース CL-4B カラムを用いて、10 mM Tris バッファー pH 8.0 で溶出、void volume 分画を集め、phosphate-buffered saline (PBS), 0.15 M NaCl/10 mM リン酸ナトリウム, pH 7.4 に対して一晩透析した。0.54 g/ml の塩化セシウムを加え、72 時間 $1.6 \times 10^5 \times g$ で遠心 (密度勾配遠心) 後、高密度分画 (1.3-1.5 g/ml) を集め、脱イオン水に対して一晩透析し精製ムチンを得た。

2.1.2 過ヨウ素酸酸化- β 脱離反応 (periodate oxidation- β -elimination) 法によるムチンの脱糖鎖

過ヨウ素酸酸化- β 脱離反応 (periodate oxidation-

β -elimination)³²⁾ は我々の教室では以下のような方法で行った。精製胃ムチン (10 mg/ml) を 0.33 M NaCl 溶液に溶解し 4°C で一晩静置した。終濃度が 0.1 M となるように酢酸を加え、1 N NaOH で pH を 4.5 とした。氷冷した 200 mM NaIO_4 を終濃度が 100 mM となるように加え、酸化反応を開始した。溶液は 0-4°C の暗所に、5 時間から一晩静置した。酸化反応後、未反応の NaIO_4 を破壊するために 400 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ /100 mM NaHCO_3 溶液を 1/2 量加え、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ の終濃度を 133 mM とした。 β 脱離反応は 1 N NaOH で pH を 10.5 とし開始した。氷上で pH を維持しつつ 1 時間静置し、2-5 mM 炭酸緩衝液 pH 10.5 に対して 4°C で一晩透析し、さらに脱イオン水に対して一晩透析した。

2.2 モノクローナル抗体の作製

ハイブリドーマは今井ら³³⁾ の方法に従い作製した。月齢 2 から 3ヶ月の BALB/c マウス (メス) 5 匹に健康成人胃液より精製脱糖鎖したムチンと Freund の完全アジュバントおよび不完全アジュバントを腹腔内投与した (1 日目, 8 日目および 15 日目)。最終投与の 3 日後に細胞融合を施行した。免疫されたマウスの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞 P3-X63-Ag8-653 を 10 : 1 の比率で混合し、ポリエチレングリコールを添加することにより細胞融合させた。融合細胞はヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン培地 (HAT 培地) に浮遊させ、96 穴平底プレート (Corning Glass Works, Corning, NY) に 2×10^6 /ウエルの密度で分注した。ハイブリドーマの培養上清はすべて精製脱糖鎖胃ムチンを固相化抗原とした ELISA 法で検討し、ELISA 陽性の上清についてはさらに高分化型胃腺癌のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片に対する免疫組織化学的反応性を検討した。胃癌組織に反応し、正常胃粘膜に反応しないハイブリドーマのみを選び、既報の方法³³⁾ に従い限界希釈法を 2 回施行することで単クローン化した。ハイブリドーマ細胞 (5×10^6 個) をプリスタンで前処置した BALB/c マウスの腹腔内に注入し、2~3 週後に MoAb を含んだ腹水をマウスより回収した。腹水は 3000 回転 10 分間遠心後、上清を -80°C で保存した。免疫グロブリンのサブクラス決定は、既報の方法³⁴⁾ に従い、抗マウス Ig クラス-ウサギ血清 (American Qualex, La Mirada, CA) を用いた ELISA 法により行った。

2.3 培養細胞株

ヒト大腸腺癌細胞株の HT29, WiDr, Colo205, CW2, DLD1, CHC-Y1 およびヒト胃腺癌細胞株の KATO-III, MKN74 は Japanese Cancer Research

Resources Bank より提供を受けた。これらの細胞は10%牛胎仔血清を加えた RPMI1640 培地で培養した。

2.4 ヒト消化器組織

ヒト消化器組織は札幌医科大学にて病理解剖を施行した2症例より、胃癌ならびに消化性潰瘍組織は札幌医科大学第一外科および札幌外科記念病院で外科手術により、また慢性胃炎組織は札幌医科大学第一内科で内視鏡的生検にて、患者ないし患者家族の同意のもとに得られた。新鮮ヒト組織は外科的切除後、直ちに液体窒素により凍結し-80°Cで保存した。腸上皮化生、胃潰瘍および胃癌組織計91例について厚さ5 μ mのホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を作製した。

2.5 免疫組織化学

免疫組織染色はホルマリン固定パラフィン包埋組織切片に対して既報の方法⁹⁾に従い、免疫ペルオキシダーゼ法にておこなった。各切片を脱パラフィン後、0.3%過酸化水素/メタノール中で室温20分間反応させた。PBSで洗浄後、正常ウサギ全血清(5%)を加え室温20分間反応させた。PBSで洗浄後、一次抗体を加え室温で60分間反応させた。PBSで3回洗浄後、PBSで40倍希釈した二次抗体(ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIg)を加え室温で30分間反応させた。PBSで3回洗浄後、塩化ジアミノベンチジン/0.03%過酸化水素/0.05 M Tris-HCl 中で5~10分間反応させ、発色した時点でPBSにて2回洗浄して反応を止め、ヘマトキシリンもしくはメチルグリーンにて核染色を行った。

胃癌の組織学的分類は胃癌研究会編、癌取り扱い規約³⁵⁾に従った。

2.6 モノクローナル抗体

抗p53 MoAb DO-7(DAKO, Glostrup, Denmark)は胃癌組織の免疫染色に使用した。教室で作製した抗Le^x MoAb BM2 (IgM)³⁶⁾および抗 α -fetoprotein MoAb E7 (IgG1)をそれぞれ、免疫染色およびウェスタンブロット解析の対照として使用した。抗MUC2 コアペプチド MoAb CCP58 (IgG1)はELISAによるA3D4抗原解析時の対照として使用した。なおMoAb CCP58はIFC McKenzie博士(Austin Research Institute, Austin Hospital, Heidelberg, Victoria, Australia)より供与を受けた。

2.7 抗原の解析

2.7.1 SDS-PAGE およびウェスタンブロット法

抗原は既報の方法³⁷⁾に従い、ヒト大腸組織の手術材料より調製した。SDS-PAGEはLaemmli³⁸⁾らの報告に従い、5%スラブゲルを用いて行った。分離された蛋白は転写装置を用いてニトロセルロース膜(Milipore,

Bedford, MA)に転写し、転写後、5% skim milk powder/TBSTと1時間反応させた。次いでハイブライダーの培養上清と2時間、室温で反応させた。TBSTバッファーで洗浄後、ニトロセルロース膜を二次抗体(ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIg)と室温1時間反応させた。洗浄後、ECL試薬(Amersham, Buckinghamshire, England)と反応させフィルム上に感光させた。

2.7.2 過ヨウ素酸, O-glycanase, プロテアーゼ, トリプシンおよび N-glycosidase 処理

過ヨウ素酸, O-glycanase, プロテアーゼ V8, トリプシンおよび N-glycosidase 処理の方法は既報の方法に従った³⁹⁻⁴¹⁾。MoAb A3D4の反応性に対する過ヨウ素酸, O-glycanase 処理の影響についての検討では、ホルマリン固定パラフィン包埋組織およびアセトン固定大腸癌細胞CW2を用いた。プロテアーゼ, トリプシンおよび N-glycosidase 処理はCW2細胞についてのみおこなった。過ヨウ素酸処理に関しては、組織切片およびアセトン固定細胞に20 mM 過ヨウ素酸/酢酸バッファー(0.05 M, pH 5.0)100 μ lを加え室温で30分間反応させた。PBS-Tween-20で3回洗浄後、1%グリシンを加え30分間反応させ酸化反応物質を中和した。さらに3回洗浄後、上述の免疫組織染色を行った。O-glycanase 処理に関しては、組織切片およびアセトン固定細胞に0.6 μ U O-glycanase (Genzyme, Cambridge, MA)/100 mM 酢酸/クエン酸バッファー pH 6.0/100 mg/ml ウシアルブミン/0.02% wt/vol アジ化ナトリウムを100 μ lを加え37°Cで18時間反応させた。3回洗浄後、免疫染色を行った。プロテアーゼ処理では、CW2細胞を30 mM EDTA (disodium dihydrogen ethylenediamine tetraacetate dihydrate)を加えて5分間反応させることにより回収し、PBSで3回洗浄後、RPMI1640 1 mlに再懸濁した。0.1 U/ml プロテアーゼ V8 (ICN Biomedicals Inc, Costa Mesa CA)を1 ml加え、37°C, 1時間反応させた。10%牛胎仔血清を含むRPMI1640を8 ml加えて反応を停止し、スライドガラス上に細胞を遠心吸着させた後、免疫染色を行った。トリプシン処理に関しては、プロテアーゼに代えて0.5 mg/ml トリプシン溶液を用いる以外はプロテアーゼの場合と同様の方法で細胞を処理した。N-Glycosidase に関してはプロテアーゼに代えて2 mg/ml N-glycosidase (Seikagaku Co, Tokyo, Japan)溶液を用いる以外はプロテアーゼと同様の方法で細胞の処理を行った。

2・7・3 酵素免疫定量法

96穴マイクロプレートにA3D4抗原もしくは合成ペプチド (MUC2: PTTTPITTTTTPPTPTPGT-QTPTTTTPTTTTTPPTPTPTGTQT 又は MUC3: TTSHSTPSFTSSITTTETTSHTSPSFT-SSITTE) を加え、4°Cで一晩静置することにより固相化した。各ウエルに3%BSA/PBSを200 μ lづつ加え室温で2時間反応させた。段階的に希釈したMoAb A3D4マウス腹水および抗MUC2 MoAb CCP58腹水を一次抗体として加え室温1時間反応させた。次にPBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgを二次抗体として室温30分間反応させた。再度PBSで洗浄後、OPD基質(10mg O-塩化フェニルジアミン/10ml 0.1Mリン酸クエン酸バッファー、pH 4.0/10 μ l 過酸化水素)を各ウエルに加えて反応させ、次いで、4M H₂SO₄を50 μ l加えて反応停止後、吸光度を490nmで測定した。

3 成績

3・1 モノクローナル抗体の作製

精製脱糖鎖胃ムチンとホルマリン固定パラフィン包埋ヒト胃癌組織の両方に反応する3つの異なるクローンを得たが、それらの組織染色所見は非常に類似していたため、今回は、そのうちの一つをA3D4と命名し解析を加えた。MoAb A3D4のサブタイプはIgMであった。

3・2 正常消化器におけるA3D4抗原の組織分布

正常消化器では、MoAb A3D4は大腸と胆嚢に反応したが、食道、胃、小腸、肝とは反応しなかった。大腸および胆嚢では上皮細胞の細胞質がびまん性に染色された。しかし杯細胞の粘液は陰性であった。

3・3 胃癌及び腸上皮化生でのA3D4抗原の発現

MoAb A3D4の正常胃粘膜、腸上皮化生および胃癌における免疫組織染色の結果の要約をTable 1に、代表的な染色パターンをFig. 1に示した。A3D4抗原は正常胃上皮には全く検出されないが(Fig. 1A)、胃癌では高率な発現を認めた。胃癌の組織型別陽性率は高分化型腺癌では13例中12例(92%)、中分化型腺癌では15例中9例(60%)、低分化型腺癌では12例中3例(33%)であった。高分化ならびに中分化型腺癌では、主として腺管内腔面と腺管内容物に抗原の発現が認められた(Fig. 1B)。低分化型腺癌では主として細胞質が染色された(Fig. 1C)。内視鏡生検にて得られた慢性胃炎に伴う腸上皮化生組織では11例全てが陰性であった(Fig. 1D)。また外科切除により得られた消化性潰瘍に伴う腸上皮化生組織でも7例全てが陰性であった(Fig. 1E)。それに対して癌近傍の腸上皮化生では13例中8例(62%)でMoAb A3D4に対する反応性を認め、特に化生腺の深部が強く染色された(Fig. 1F)。

3・4 p53とA3D4抗原発現の関連性

p53は胃癌近傍の腸上皮化生腺管に発現することが知られているため⁴²⁾、今回、MoAb A3D4に対し陽性で

Table 1 Expression of A3D4 antigen in normal and neoplastic gastric tissues

Tissues (No. tested)	positive/total (%)
Normal (n=12)	0/12 (0)
Intestinal metaplasia	
with chr. gastritis (n=11)	0/11 (0)
with peptic ulcer (n= 7)	0/7 (0)
with gastric cancer (n=13)	8/13 (62)
Gastric cancer	
tub	
well (n=13)	12/13 (92)
mod (n=15)	9/15 (60)
por (n=12)	4/12 (33)
muc (n= 2)	2/2 (100)
sig (n= 6)	1/6 (17)

tub, tubular adenocarcinoma; well, well-differentiated adenocarcinoma; mod, moderately differentiated adenocarcinoma; por, poorly differentiated adenocarcinoma; muc mucinous adenocarcinoma; sig, signet-ring cell carcinoma.

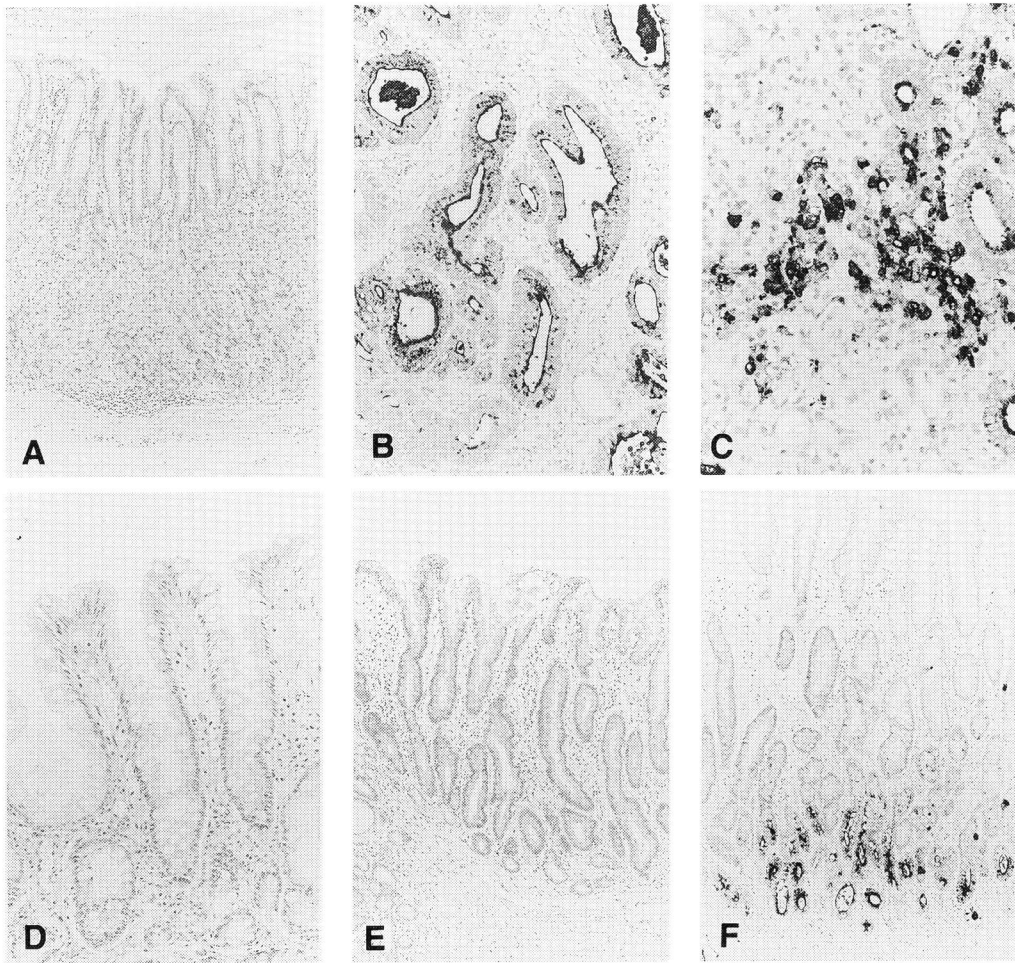


Fig. 1 Immunoperoxidase staining of normal and neoplastic gastric tissues with MoAb A3D4: A, normal mucosa ($\times 85$), B, well differentiated adenocarcinoma ($\times 170$), C, poorly differentiated adenocarcinoma ($\times 340$), D, intestinal metaplasia (IM) with chronic gastritis ($\times 170$), E, IM with peptic ulcer ($\times 85$) and F, IM with gastric cancer ($\times 85$).

あった 8 例の胃癌組織において p53 の発現を免疫組織化学的に検討した。その結果、これらの組織において p53 は癌部だけに発現を認め (Fig. 2C), 化生腺管には全く検出されなかった (Fig. 2B)。一方 A3D4 はこれらの両領域で検出された (Fig. 2A)。

3.5 A3D4 抗原の解析

8 種類の胃及び大腸癌の細胞株の中で、大腸癌細胞株 CW2 に MoAb A3D4 の反応性を認めたので、これを用いて、酵素および過ヨウ素酸処理が MoAb A3D4 の反応性に与える影響について検討した。CW2 細胞を過ヨウ素酸、*O*-glycanase あるいは *N*-glycosidase で処理すると染色強度および陽性細胞の比率が増加した。この効果は過ヨウ素酸処理で最も明瞭であったため、そ

の結果を Fig. 3 に示した。一方、図には示していないがトリプシンやプロテアーゼ V8 処理では MoAb A3D4 の CW2 細胞との反応性は軽度の低下を示した。胃癌組織切片を過ヨウ素酸、*O*-glycanase で処理した場合でも、MoAb A3D4 の反応性の増強が認められた。過ヨウ素酸処理の結果を Fig. 4 に示した。

正常大腸 lysate を用いたウェスタンブロット法にて A3D4 抗原を発現する蛋白を解析した。その結果高分子量 (> 300 kD) のスメア状のバンドが認められ (Fig. 5), 対応抗原分子がムチンであることが示唆された。

既知の MUC 遺伝子の中では、MUC2 と MUC3 蛋白が正常大腸において発現することが知られている⁴³⁾。このため MoAb A3D4 の MUC2 のタンデムリピート

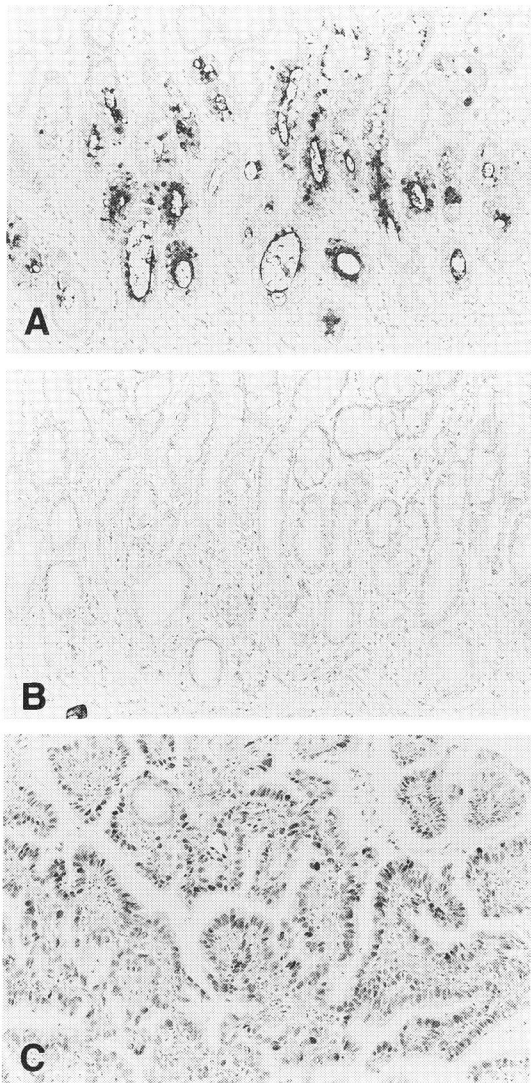


Fig. 2 Comparison of the reactivity with IM adjacent to gastric cancer tissues between MoAb A3D4 (A) and anti-p53 MoAb DO-7 (B) ($\times 170$). The immunostaining of gastric cancer in the vicinity of IM is shown in B with MoAb DO-7 (C) ($\times 170$).

配列の合成ペプチドに対する反応性を ELISA 法で検討した。その結果、Fig. 6 に示すように反応性は全く認められなかった。同様に図には示していないが、MoAb A3D4 は MUC3 タンデムリピート配列の合成ペプチドに対しても全く反応性を認めなかった。

4 考 察

今回の研究において、我々は精製脱糖鎖ムチンを免

疫原として作製した新しい MoAb A3D4 について検討を加えた。MoAb A3D4 は大腸および胆嚢に反応したが、正常胃上皮には反応しなかった。対応抗原は胃癌に高率に発現しており、特に、高分化型および中分化型（腸型）腺癌および癌近傍の腸上皮化生に発現していた。

慢性胃炎および腸上皮化生患者について、これまで疫学的ならびに長期にわたる追跡研究の結果、腸上皮化生と腸型胃癌の間に密接な関係のあることが報告されている⁴⁴⁻⁴⁶。しかしながら、腸上皮化生は良性および悪性疾患の両方で認められる病変であり、胃癌のハイリスクグループのスクリーニング指標としての応用は困難であった。腸上皮化生は I 型（完全型）、IIA（不完全型、スルホムチン陰性）および IIB 型（不完全型、スルホムチン陽性）に分類される⁴⁷。これまでの研究から、IIB 型腸上皮化生と腸型胃癌との密接な関係が示唆されている⁴⁸⁻⁵⁰。しかし、II 型の腸上皮化生やスルホムチンの分泌は慢性胃炎に伴う腸上皮化生でも認められ、また腸上皮化生に対する他のマーカー、例えば硫酸化糖鎖抗原 91.9 H⁹、FU-MK-1⁸、血液型抗原^{51,52}、シアリル Tn 抗原や T 抗原^{53,54} も良性の胃疾患に伴う腸上皮化生で検出される。これに対して、MoAb A3D4 は慢性胃炎や消化性潰瘍に伴う腸上皮化生とは反応を示さず、癌近傍の腸上皮化生とのみ高率に反応することが示された。その場合の染色領域は分化度の低い化生腺の深部に局限していた。この発現パターンは化生腺管における糖鎖形成が癌細胞と同程度に未熟であることを反映しているものと推察される。以上より、MoAb A3D4 は腸上皮化生と腸型胃癌との関連を解析する上で有用であると考えられる。

現在までに、腸上皮化生および胃癌には発現するが、正常胃粘膜には発現していない抗原がいくつか同定されている。それらには、大腸ムチン抗原 (LIMA)⁷、BD-5^{5,6}、FU-MK-1⁸ や 91.9 H⁹ がある。しかしながら、これらは次の点で A3D4 抗原とは異なっている。すなわち LIMA は β 脱離反応に感受性がある。FU-MK-1 抗原は分子クローニングにより 17-1A であることが判明した(黒木政秀博士、福岡大学医学部生化学教室、私信)。17-1A は 40 kD の I 型膜貫通蛋白で接着分子として働くと考えられている。MoAb 91.9 H の対応抗原は硫酸化糖鎖である。MoAb BD-5 は KATO-III 細胞を免疫源として作製されたが、MoAb A3D4 は KATO-III 細胞とは反応しない。以上より、A3D4 抗原は胃癌の新しいマーカーであると言えよう。

最近、p53 が胃癌近傍の腸上皮化生腺管で検出され

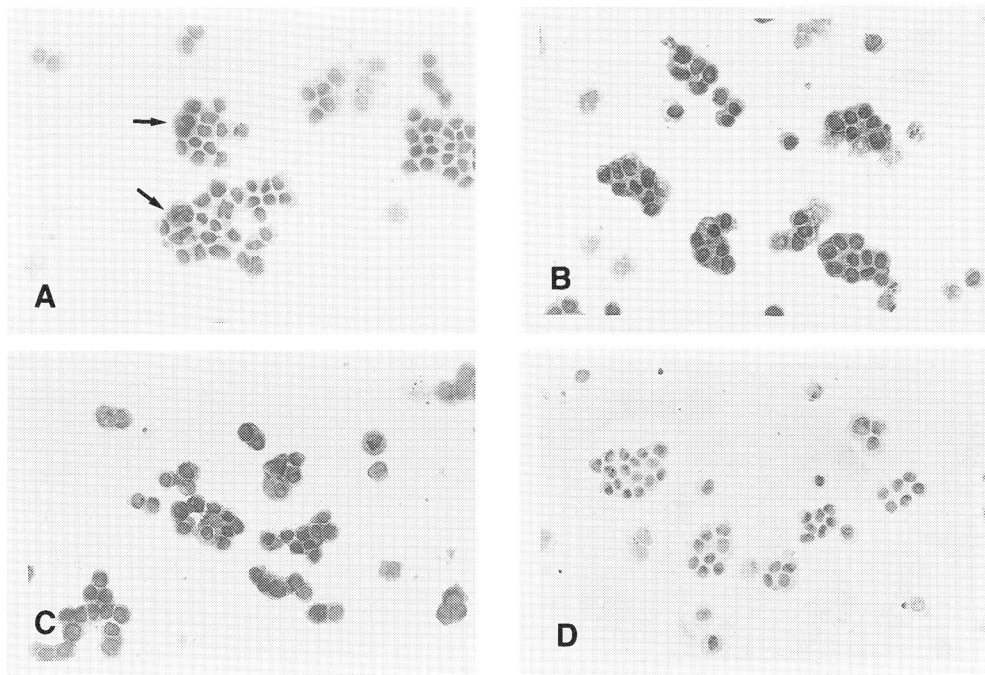


Fig. 3 Effect of periodate treatment on the reactivity of MoAb A3D4 with a colon cancer cell line CW2. The immunostaining of MoAb A3D4 before (A) and after (B) 5 mM periodate treatment, and that of anti-Le^x MoAb BM2 before (C) and after (D) 5 mM periodate treatment ($\times 340$). Arrows indicate positively stained cells (A).

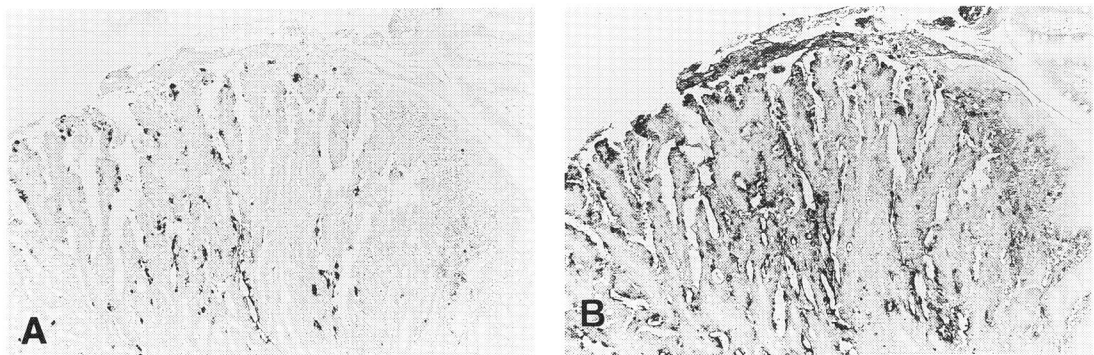


Fig. 4 Effect of periodate treatment on the reactivity of MoAb A3D4 with a gastric cancer tissue. The immunostaining of MoAb A3D4 before (A) and after (B) 5 mM periodate treatment ($\times 170$).

ることが報告されている⁵⁵⁾。しかしながら、今回、p53はA3D4陽性の化生腺管に検出されなかった。この結果はA3D4抗原の発現が、胃癌において、p53とは異なる診断的意義を持つ可能性を示唆している。

SDS-PAGEおよびウェスタンブロット法により決定されたA3D4抗原の分子量は300KD以上を示し、対応抗原はムチンであることが示唆された。また大腸癌

細胞株CW2を過ヨウ素酸、O-glycanaseまたはN-glycosidaseにより脱糖鎖処理すると、A3D4抗原の発現は明らかな増加を示したが、トリプシンやプロテアーゼV8処理では染色性の軽度の低下を認めた点はMoAb A3D4のエピトープがペプチドである可能性を示唆する。正常胃粘膜には既知のムチンコア蛋白MUC1-8のうち、MUC1、MUC5とMUC6のmRNAおよび蛋白の発現

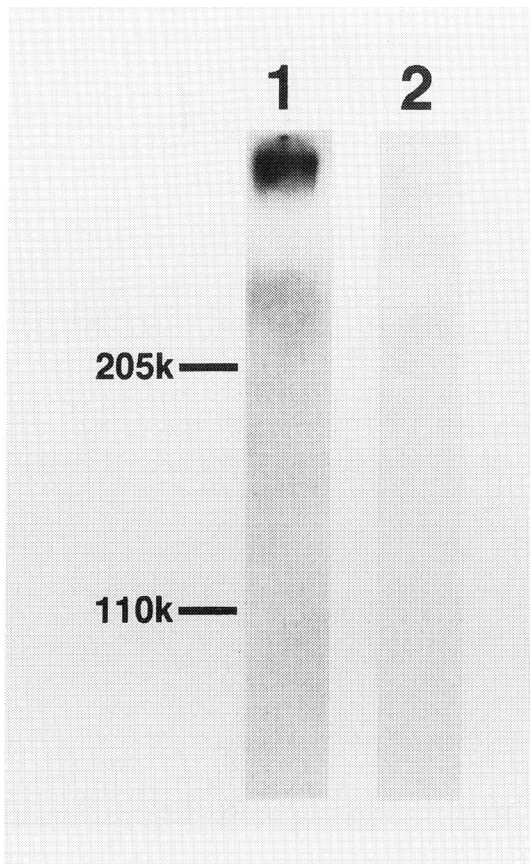


Fig. 5 SDS-PAGE and Western blot analysis of A3D4 antigen using normal colon tissue lysate. The nitrocellulose sheet is probed with MoAb A3D4 (Lane 1) or anti- α -feto-protein MoAb E7 as a negative control (Lane 2).

していることが明らかにされている⁵⁶⁾。一方、MUC2、MUC3のmRNAおよび蛋白は胃では腸上皮化生に高レベルに発現することも報告されている⁵⁶⁾。正常消化器においてはMoAb A3D4は大腸上皮と反応するが、胃上皮には反応性を示さず、A3D4抗原の組織分布はMUC2およびMUC3と類似している。しかしながら、MUC2とMUC3は共に慢性胃炎に伴う腸上皮化生の腺管全体に検出される⁵⁶⁾。さらに、今回、MUC2およびMUC3の合成ペプチドに対して、MoAb A3D4は全く反応性を示さなかった。これらのことはA3D4抗原のエピトープがMUC2やMUC3のコアペプチドとは異なることを示唆する。

A3D4抗原は新しいムチン抗原であり、内視鏡的生検組織標本を用いた腸上皮化生や腺腫などの前癌病変の

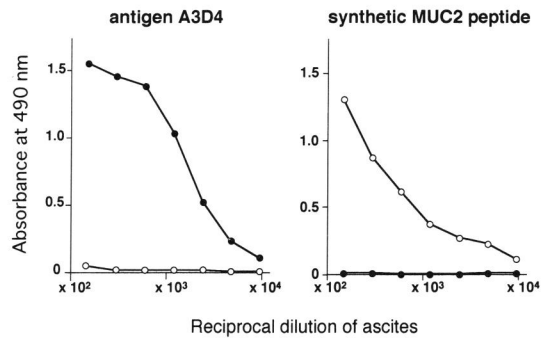


Fig. 6 Reactivity of MoAb A3D4 with a synthetic peptide consisting of 2 tandem repeat domains of MUC2. The reactivities of MoAb A3D4 (●) and anti-MUC2 core peptide MoAb CCP58 (○) with antigen A3D4 and a synthetic MUC2 peptide when determined by enzyme-linked immunosorbent assay.

免疫組織化学的な評価に有用であろう。さらにホルマリン固定パラフィン包埋組織でも反応性が維持されることより、レトロスペクティブな研究にも応用可能と考えられる。

5 要 約

本研究では、胃癌の有用なマーカーの開発を目的として、胃ムチンの精製脱糖鎖をおこない、それを免疫原としてモノクローナル抗体(MoAbs)を確立した。その特性を免疫組織化学的に解析し、以下の結果を得た。

1. 確立した MoAb の中で A3D4 と命名した抗体は胃癌と高率に反応するが、正常胃上皮とは反応しなかった。

2. 正常消化器では大腸と胆嚢のみが MoAb A3D4 に対して陽性であった。

3. 胃癌における陽性率は、高分化型腺癌では 92% (n=13)、中分化型腺癌では 60% (n=15)、低分化型腺癌では 33% (n=12) であった。

4. 慢性胃炎や消化性潰瘍に伴う腸上皮化生は MoAb A3D4 に反応しないが、胃癌に伴う腸上皮化生では 13 例中 8 例 (62%) が陽性であった。

5. 正常大腸 lysate を用いたウエスタンブロットでは高分子量 (>300 kD) のスメア様のバンドを認めた。

6. 免疫組織化学的解析では、固定した培養細胞を過ヨウ素酸、O-glycanase または N-glycosidase で処理すると、MoAb A3D4 の反応性の増強を認めた。一方、トリプシンやプロテアーゼ V8 の前処理によって軽度の反応性低下を認めた。

7. MUC2 および MUC3 の合成ペプチドに対しては全く反応を認めなかった。

以上の結果より, MoAb A3D4 の対応抗原は新しい胃癌関連ムチン抗原であり, そのエピトープは蛋白である可能性が示唆された。

謝 辞

御指導御校閲いただいた本学内科学第一講座教授今井浩三先生に深謝いたします。また御協力いただいた諸先生, 特に実験全般にわたりご指導いただいた本学内科学第一講座助教授日野田裕治先生に深謝いたします。また手術材料を御供与いただいた本学外科学第一講座教授平田公一先生, 札幌外科記念病院長山本直也先生に深謝いたします。

参考文献

1. Verma M, Davidson EA. Mucin genes: structure, expression and regulation. *Glycoconjugate J* 1994, 11: 172-179.
2. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988, 48: 3554-3560.
3. Bara J, Hamelin L, Martin E, Burtin P. Intestinal M3 antigen a marker for the intestinal-type differentiation of gastric carcinomas. *Int J Cancer* 1981, 28: 711-719.
4. Dohi T, Abe K, Ohshiba S, Yamaguchi K, Oshima M. Immunohistological and biochemical detection of fucosylated polylectosamine antigen with monoclonal antibody ACFH18 in gastric cancer and normal gastric mucosa. *Jpn J Cancer Res* 1990, 81: 676-681.
5. Fiocca R, Villani L, Tenti P, Cornaggia M, Finzi G, Capella C, Prat M, Bussolati G, Solcia E. Widespread expression of intestinal markers in gastric carcinoma: a light and electron microscopic study using BD-5 monoclonal antibody. *J Clin Pathol* 1988, 41: 178-187.
6. Part M, Rossino P, Bussolati G, Morra I, Comoglio PM. Production of monoclonal antibodies for the immunohistochemical detection of gastric carcinomas. *Cancer Detect Prev* 1987, 10: 293-301.
7. Hertzog PJ, Robinson HC, Ma J, Mackay IR, Linnane AW. Oncofetal expression of the human intestinal mucin glycoprotein antigens in gastrointestinal epithelium defined by monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 1991, 48: 355-363.
8. Watanabe R, Johzaki H, Iwasaki H, Kikuchi M, Ikeda S. A new tumor-associated antigen defined by a monoclonal antibody directed to gastric adenocarcinoma. *Cancer* 1993, 71: 2139-2147.
9. Ohe Y, Hinoda Y, Irimura T, Imai K, Yachi A. Expression of sulfated carbohydrate chains detected by monoclonal antibody 91.9H in human gastric cancer tissues. *Jpn J Cancer Res* 1994, 85: 400-408.
10. Imazeki F, Omata M, Nose H, Ohto M, Isono K. p53 gene mutations in gastric and esophageal cancers. *Gastroenterology* 1992, 103: 892-896.
11. Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Kato Y, Yanagisawa A, Nakamura Y. The APC gene, responsible for familial adenomatous polyposis, is mutated in human gastric cancer. *Cancer Res* 1992, 52: 3231-3233.
12. Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Ito H, Tahara E. Frequent amplification of the *c-met* gene in scirrhus type stomach cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1992, 189: 227-232.
13. Hattori Y, Odagiri H, Nakatani H, Miyagawa K, Naito K, Sakamoto H, Katoh O, Yoshida T, Sugawara T, Terada M. *K-sam*, and amplified gene in stomach cancer, is a member of the heparin-binding growth factor receptor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, 87: 5983-5989.
14. Yokota J, Yamamoto T, Miyajima N, Toyoshima K, Nomura N, Sakamoto H, Yoshida T, Terada M, Sugimura T. Genetic alterations of the *c-erbB-2* oncogene occur frequently in tubular adenocarcinoma of the stomach and are often accompanied by amplification of the *v-erbA* homologue. *Oncogene* 1988, 2: 283-287.
15. Gendler SJ, Burchell JM, Duhig T, Lamport D, White R, Parker M, Taylor-Papadimitriou J. Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, 84: 6060-6064.
16. Gum JR, Byrd JC, Kim YS. Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism. *J Biol Chem* 1989, 264: 6480-6487.
17. Gum JR, Hicks JW, Swallow DM, Lagace RL, Byrd JC, Lamport DT, Siddiki B, Kim YS. Molecular cloning of cDNAs derived from a novel human intestinal mucin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, 171: 407-415.
18. Porchet N, Nguyen VC, Dufosse J, Audie JP,

- Guyonnet-Duperat V, Gross MS, Denis C, Degand P, Bernheim A, Aubert JP. Molecular cloning and chromosomal localization of a novel human tracheo-bronchial mucin cDNA containing tandemly repeated sequences of 48 base pairs. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, 175: 414-422.
19. Meerzaman D, Charles P, Rose MC. Cloning and analysis of cDNA encoding a major airway glycoprotein, human tracheobronchial mucin (MUC5). *J Biol Chem* 1994, 269: 12932-12939.
20. Toribara NW, Robertson AM, Kim YS. Human gastric mucin. Identification of a unique species by expression cloning. *J Biol Chem* 1993, 268: 5879-5885.
21. Bobek LA, Tsai H, Biesbock AR, Levine MJ. Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7). *J Biol Chem* 1993, 268: 20563-20569.
22. D'Cruz OJ, Dunn TS, Pichan P, Hass GG Jr, Sachdev GP. Antigenic cross-reactivity of human tracheal mucin with human sperm and trophoblasts correlates with the expression of mucin 8 gene messenger ribonucleic acid in reproductive tract tissues. *Fertil Steril* 1996, 66: 316-26.
23. Finn OJ, Jerome KR, Henderson AR, Pecher G, Domenech N, Magarian-Blander J, Barratt-Boyes SM. MUC-1 epithelium tumor mucinbased immunity and cancer vaccines. *Immunol Rev* 1995, 145: 63-89.
24. Hinoda Y, Nakagawa N, Nakamura H, Makiguchi Y, Itoh F, Adachi M, Yabana T, Imai K, Yachi Y. Detection of a circulating antibody against a peptide epitope on a mucin core protein, MUC1, in ulcerative colitis. *Immunol Lett* 1993, 35: 163-168.
25. Kotera Y, Fontenot JD, Pecher G, Metzgar RS, Finn OJ. Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. *Cancer Res* 1994, 54: 2856-2860.
26. Barnd DL, Lan MS, Metzgar RS, Finn OJ. Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86: 7159-7163.
27. Takahashi T, Makiguchi Y, Hinoda Y, Kakiuchi H, Nakagawa N, Imai K, Yachi A. Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient. *J Immunol* 1994, 153: 2102-2109.
28. Makiguchi Y, Hinoda Y, Imai K. Effect of MUC1 mucin, an anti-adhesion molecule, on tumor cell growth. *Jpn Cancer Res* 1996, 87: 505-511.
29. Burchell J, Taylor-Papadimitriou J. Effect of modification of carbohydrate side chains on the reactivity of antibodies with core-protein epitopes of the MUC1 gene product. *Epithelial Cell Biol* 1993, 2: 155-162.
30. Bara J, Imberty A, Perez K, Imai K, Yachi A, Oriol R. A fucose residue can mask the MUC1 epitopes in normal and cancerous gastric mucosae. *Int J Cancer* 1993, 54: 607-613.
31. Podolsky DK, Isselbacher KJ. Composition of human colonic mucin: Selective alteration in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1983, 72: 142-153.
32. Gerken TA, Gupta R, Jentoft N. A novel approach for chemically deglycosylating O-linked glycoproteins. The deglycosylation of submaxillary and respiratory mucins. *Biochemistry* 1992, 31: 639-648.
33. Imai K, Moriya Y, Fujita H, Tsujisaki M, Kawaharada M, Yachi A. Immunologic characterization and molecular profile of carcinoembryonic antigen by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1984, 132: 2992-2997.
34. Durrant LG, Jacobs E, Price MR. Production of monoclonal antibodies recognising the peptide core of MUC2 intestinal mucin. *Eur J Cancer* 1994, 30A: 355-363.
35. 胃癌研究会編. 胃癌取扱の規約 (改訂第12版). 東京, 金原出版株式会社, 1993.
36. Hinoda Y, Imai K, Ban T, Itoh F, Yachi A. Co-expression of X-hapten-like antigen and antigen YH206 on mucin molecules. *Gastroenterol Jpn* 1991, 26: 56-61.
37. Toyota M, Hinoda Y, Itoh F, Takaoka A, Imai K, Yachi A. Complementary DNA cloning and characterization of truncated form of c-kit in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1994, 54: 272-275.
38. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227: 680-685.
39. Bara J, Decaens C, Loridon-Rosa R, Oriol R. Immunohistological characterization of mucin epitopes by pretreatment of gastro-intestinal sec-

- tion with periodic acid. *J Immunol Meth* 1992, 149: 105-113.
40. Campbell BJ, Finnie IA, Hounsell EF, Rhodes JM. Direct demonstration of increased expression of Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in colonic adenocarcinoma and ulcerative colitis mucin and its concealment in normal mucin. *J Clin Invest* 1995, 95: 571-576.
 41. McEntire KD, Mowery J, Hixson DC. Comparison of the structural characteristics of cell-CAM 105 from hepatocytes with those of an altered from expressed by rat transplantable hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1989, 49: 6795-6802.
 42. Tahara E, Kuniyasu H, Yasui W, Yokozaki H. Gene alterations in intestinal metaplasia and gastric cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994, 6 Suppl 1: S97-102.
 43. Ho SB, Niehaus GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1993, 53: 641-651.
 44. Monoz N, Matko I. Histological types of gastric cancer and its relationship with intestinal metaplasia. *Recent Results Cancer Res* 1972, 39: 99-105.
 45. Imai T, Murayama H. Time trend in the prevalence of intestinal metaplasia in Japan. *Cancer* 1983, 52: 353-361.
 46. Correa P, Sasano N, Stemmerman GN, Haenszel W. Pathology of gastric carcinoma in Japanese populations: comparisons between Miyagi prefecture and Hawaii. *J Natl Cancer Inst* 1973, 51: 1449-1559.
 47. Jass JR. Role of intestinal metaplasia in the histogenesis of gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 1980, 33: 801-810.
 48. Silva S, Filipe MI. Intestinal metaplasia and its variants in the gastric mucosa of Portuguese subjects: A comparative analysis of biopsy and gastrectomy material. *Hum Pathol* 1986, 17: 988-995.
 49. Huang CB, Xu J, Huang JF, Meng XY. Sulphomucin colonic type intestinal metaplasia and carcinoma in the stomach. a histochemical study of 115 cases obtained by biopsy. *Cancer* 1986, 57: 1370-1375.
 50. Ectors N, Dixon MF. The prognostic value of sulphomucin positive intestinal metaplasia in the development of gastric cancer. *Histopathology* 1986, 10: 1271-1277.
 51. Sakamoto J, Watanabe T, Takahiko T, Takagi H, Nakazato H, Lloyd KO. Expression of Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, Lewis^y, sialyl-Lewis^a, and sialyl-Lewis^x blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue. *Cancer Res* 1989, 49: 745-752.
 52. Murata K, Egami H, Shibata Y, Sakamoto K, Misumi A, Ogawa M. Expression of blood group antigens, ABH, Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, Lewis^y, CA19-9, and CSLEX1 in early cancer, intestinal metaplasia, and uninvolved mucosa of the stomach. *Am J Clin Pathol* 1992, 98: 67-75.
 53. Yamashita Y, Chung YS, Horie R, Kannagi R, Sowa M. Alterations in gastric mucin with malignant transformation: Novel pathway for mucin synthesis. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87: 441-446.
 54. Carneiro F, Santos L, David L, Dabelsteen E, Clausen H, Simoes MS. T (Thomsen-Friedenreich) antigen and other simple mucintype carbohydrate antigens in precursor lesions of gastric carcinoma. *Histopathology* 1994, 24: 105-113.
 55. Ochiai A, Yamauchi Y, Hirohashi S. p53 mutations in the non-neoplastic mucosa of the human stomach showing intestinal metaplasia. *Int J Cancer* 1996, 69: 28-33.
 56. Ho SB, Shekels LL, Toribara NW, Kim YS, Lyftogt C, Cherwitz DL, Niehaus GA. Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium. *Cancer Res* 1995, 55: 2681-2690.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部内科学第1講座 明石浩史