

抗 CEA モノクローナル抗体に対する抗イデオタイプ モノクローナル抗体の解析

得地 茂 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)

Analysis of Anti-idiotypic Monoclonal Antibodies to Anti-CEA Monoclonal Antibody

Shigeru TOKUCHI, Masayuki TSUJISAKI and Kohzoh IMAI
Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief : Prof. A. YACHI)

ABSTRACT Five anti-idiotypic monoclonal antibodies (anti-Id MoAbs) were generated from a BALB/c mouse immunized with anti-CEA MoAb MA208 in a syngeneic system. These anti-Id MoAbs specifically reacted to MoAb MA208 and inhibited CEA-MoAb MA208 binding. These results indicate that all of these anti-Id MoAbs recognized private idiotopes at the paratope of MoAb MA208. Mouse sera, which had been immunized by these anti-Id MoAbs, were analyzed to test the reactivity with CEA. Two kinds of mouse sera (immunized with anti-Id MoAbs M7-625 and M7-914) showed reactivity to CEA by binding assay, Western blot analysis and competition assay. These results suggest that anti-Id MoAbs M7-625 and M7-914 bear an "internal image" of the MA208-defined epitope on CEA.

Anti-anti-Id MoAbs against anti-Id MoAb M7-914 revealed a cross-reactive idiotope for anti-Id MoAb M7-914 and M7-413.

An amino acid analysis of the heavy chain of anti-Id MoAb M7-625 was performed. The resulting amino acid sequence was compared with that of CEA. Some homologies between these two molecules were recognized at certain portions of CDR2 and CDR3 of MoAb M7-625 and domain III of CEA.
(Received February 27, 1991 and accepted March 19, 1991)

Key words: CEA, Monoclonal antibody, Anti-idiotypic antibody, Cross-reactive idiotope, Idiotype analysis

1 緒 言

抗体が持つ抗原特異性は、抗体の可変部領域が異なった構造を持つことに由来する。このような抗体の

有する異なった構造は、イデオタイプ(Id)と定義されている。Jerne¹⁾は Id は免疫系において一種の抗原性を有することに注目し、免疫系がこの Id を介して調節されている可能性を idotype network theory として

Abbreviations

Id	: idiotype	Ab1	: antibody
MoAb	: monoclonal antibody	Ab2	: anti-idiotypic antibody
CEA	: carcinoembryonic antigen	Ab3	: anti-anti-idiotypic antibody
a-Fc	: goat anti-mouse IgG•Fc antibody	V _H	: variable region of heavy chain
FR	: framework	V _L	: variable region of light chain
CDR	: complementarity determining region		

提唱した。この idiotype network theory は今日免疫学の基本概念として受け入れられ、自己免疫疾患²⁾あるいはレセプター病³⁾等の臨床研究においても重要性を増してきている。また、この概念において、彼ら⁴⁾は抗 Id 抗体 (Ab2) のうち、抗原に対する抗体 (Ab1) の抗原結合部位に反応し、抗原の internal image を持つ Ab2 β により、抗原に対する免疫反応の誘導 (Ab1-like Ab3) が期待されることを報告した。

一方、腫瘍関連抗原についても、抗 Id 抗体の作製および、これを用いたイディオタイプの解析が行われるようになり、さらにそれを癌の新しい免疫療法へ応用しようとする機運が高まっている⁵⁾。

本研究においては、最近遺伝子クローニングされ、一次構造が解明されている carcinoembryonic antigen (CEA) に対するモノクローナル抗 Id 抗体を作製し、特に internal image を持つ Ab2 β の確立を主たる目的とした。また、得られた Ab2 β の V_H 領域のアミノ酸解析を行い、CEA との homology を検討した。さらに、Ab2 を免疫原として解析に有用なモノクローナル抗・抗 Id 抗体 (Ab3) を作製し得たので、これを用いて、Ab2 がもつ Id の違いを検討した。

2 研究方法

2.1 抗 CEA モノクローナル抗体の特異性

本研究に用いた抗 CEA MoAb MA208 は、既報⁶⁾に示すごとく、精製 CEA を BALB/c マウスに免疫して得られた、CEA のペプチド鎖を認識する抗体 (IgG1) である。

2.2 抗イディオタイプ MoAb, 抗・抗 Id 抗血清および抗・抗 Id MoAb の作製

精製 MoAb MA208 1mg/ml に keyhole limpet hemocyanin (KLH; Sigma, USA) 1mg および glutaraldehyde (最終濃度 0.25%) を加え、室温、45 分間反応させ、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 MoAb 20 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⁷⁾に従い、細胞融合を行った。

同系抗・抗イディオタイプ抗血清の誘導および抗・抗 Id MoAb の作製は、得られた抗 Id MoAb を用い、上記のごとく免疫原を調整し、最終免疫の 3 日後、採血し血清を得るとともに脾細胞を用いて細胞融合を行った。

2.3 モノクローナル抗体の精製および¹²⁵I-標識

各種 MoAb の精製には、腹水を用い caprylic acid 沈殿法⁸⁾を利用した。一方、MoAb の¹²⁵I-標識には chloramine T 法⁹⁾を用いた。また、ヒツジ抗マウス IgG \cdot Fc 抗体 (a-Fc) は Jackson Immuno Research Laboratory, USA を用いた。

2.4 血清学的検索方法

2.4.1 Sandwich assay

精製 MoAb を 0.1M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) を用いて 0.1mg/ml に調整し、その 100 μ l を 96 穴塩化ビニールプレート (Dynatec, USA) に分注し、4 $^{\circ}$ C、16 時間静置し固相化した。PBS で 3 回洗浄後、非特異的反応を阻止するために、5% ウシ血清アルブミン (BSA; Sigma, USA) を用い 4 $^{\circ}$ C、2 時間静置した。PBS で 3 度洗浄後、PBS で 10 倍希釈した被検マウス血清 100 μ l を加え、4 $^{\circ}$ C、5 時間反応させた。PBS により 3 回洗浄後、¹²⁵I-標識 MoAb を 100 μ l (2 \times 10⁵cpm/well) を加え、4 $^{\circ}$ C、5 時間反応させた。PBS により 5 回洗浄後、結合した radioactivity を γ -counter により測定した。なお、ハイブリドーマ培養上清が測定試料の場合は BSA でのブロッキングは行わなかった。

2.4.2 Inhibition assay

2.4.2.1 ハイブリドーマのスクリーニング

既報¹⁰⁻¹²⁾に従って精製した CEA を PBS を用いて 10 μ g/ml の濃度に調整後、2.4.1 と同様の方法で固相化した。PBS で 3 回洗浄後、4 $^{\circ}$ C、2 時間 preincubation したハイブリドーマ培養上清 50 μ l と¹²⁵I-MA208 50 μ l (1 \times 10⁵cpm) を移し、4 $^{\circ}$ C、2 時間反応させた。5 回洗浄後、各 well に結合している radioactivity を測定した。% 阻止率は対照の結合 cpm で、サンプルにおける結合 cpm を除して算出した。

2.4.2.2 マウス抗血清の解析

MoAb MA208 を 2.4.1 の方法で固相化し、BSA にてブロッキングした。PBS で 3 回洗浄後、4 $^{\circ}$ C、2 時間 preincubation した各抗血清 (100 倍希釈) 50 μ l と¹²⁵I-標識抗 Id 抗体 50 μ l (1 \times 10⁵cpm) を固相化プレートに移し、以下 2.4.2.1 と同様に行った。

2.4.3 直接結合試験

種々の MoAb は 2.4.1 の方法に従い塩化ビニールプレートに固相化し、BSA にてブロッキング後、¹²⁵I-標識抗 Id MoAb 100 μ l (2 \times 10⁵cpm/well) を加え 4 $^{\circ}$ C、3 時間反応させた。PBS により 5 回洗浄後、結合した radioactivity を γ -counter により測定した。

2.5 Ab1-like Ab3の検討

2.5.1 Competition assay

2.4.2.1 で用いた精製 CEA を PBS にて溶解し 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整し、プレートに固相化し、BSA でブロックした。PBS で 3 回洗浄後、10, 50, 250 倍に希釈した抗血清 100 μl を加え 5 時間静置後、血清の 80 μl を除き、 ^{125}I -MA208 80 μl ($9 \times 10^4 \text{cpm}/50 \mu\text{l}$) を加え 2 時間反応させた。PBS により 5 回の洗浄後に結合 cpm を測定した。% 阻止率は対照とした同一希釈正常マウス血清の結合 cpm で、サンプルでの結合 cpm を除いて算出した。

2.5.2 固相化 CEA と抗血清の反応

BSA でブロックした精製 CEA 固相化プレートに、PBS で 10 倍に希釈した抗血清 100 μl を加え 4°C, 3 時間静置した。3 回洗浄後、 ^{125}I -a-Fc 100 μl ($2 \times 10^5 \text{cpm}/\text{well}$) を加え 90 分間反応させ、5 回洗浄後に結合 cpm を測定した。

2.5.3 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel 電動泳動 (SDS-PAGE) および Western blotting

SDS-PAGE は Imai *et al.*¹³⁾ の方法に準じ、7.5% ゲルを使用し、薄層スラブゲル電動泳動槽を用いた。Western blotting は精製 CEA (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 50 μl を SDS-PAGE にて展開後、Hinoda *et al.*¹⁴⁾ 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) へ転写した。一次抗体としては 200 倍希釈マウス血清あるいはマウス抗 CEA MoAb を反応させ、二次抗体としては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) を使用した。

2.6 抗 Id MoAb M7-625 の V_H 領域の cDNA クローニング

2.6.1 アミノ酸マイクロシーケンス

MoAb M7-625 (100~200 pmoles) をプロテイン A カラムにより精製し、還元下に SDS-PAGE にて H 鎖と L 鎖に分離後、Matsudaira¹⁵⁾ の方法に従い 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid buffer を用い、polyvinylidene difluoride 膜 (Immobilon-PTM, Milipore, Bedford, MA) にプロットした。Ponceau S で 1 分間染色後、バンドを切りだし、アミノ酸シーケンサー (Applied Biosystems, Inc., Model

477A) により N 端アミノ酸 10 基を解析した¹⁶⁾。

2.6.2 Polymerase chain reaction (PCR) 法による V_H 領域の cDNA のクローニング

N 末端アミノ酸配列をデータベース¹⁷⁾ と比較し、H 鎖の subgroup を決定し、framework (FR)1 に対応する sense primer と FR4 に隣接する定常部に対応する antisense primer を合成した (Fig. 1)。これらの primer の 5' 側に Chiang *et al.*¹⁸⁾ の方法に従い、EcoRI site を付加した。MoAb M7-625 ハイブリドーマから guanidine isothiocyanate 法¹⁹⁾ により total RNA を抽出し、Kawasaki²⁰⁾ の方法に従い Taq ポリメラーゼ (TAKARA 製) を用いて reverse transcriptase (RT)-PCR を行った。PCR サンプルをフェノール/クロロホルムで抽出しエタノール沈殿後、EcoRI で切断し低融点アガロースゲルより目的のバンドを切り出した。cDNA シークエンスは Blue Script (Stratagene, CA) を用い、dideoxy 法²¹⁾ によった。

3 成績

3.1 MoAb MA208 に対する抗イディオタイプモノクローナル抗体の作製

BALB/c マウスに MoAb MA208 を免疫し、得られた脾細胞を用い、型のごとく細胞融合を行った。得られたハイブリドーマのスクリーニング方法は、MoAb MA208 の抗原結合部位の idiotope を認識する抗 Id 抗体の選択を目的とし、inhibition assay により行った。その結果、合計 522 クローンのうち 15 クローン (2.8%) が CEA と ^{125}I -MA208 との結合を強く阻止した。これらのクローン中、MA208 を用いた sandwich assay では 15 クローンすべてが強く MA208 と反応した。この 15 クローンのうち最終的に 5 クローンが確立された。得られた 5 種の抗 Id MoAb の両 assay による結果を Table 1 に示した。

3.2 抗 Id MoAb の特異性

2.4.3 に示した直接結合試験により、これらの ^{125}I -標識精製抗 Id MoAb と MA208 との反応性及び各種 MoAb との交差反応性を検討した (Table 2)。

5 種の抗 Id MoAb は、ともに免疫原である MA208 とのみ特異的に反応するが、その他の抗 CEA MoAb, 抗 NCA MoAb および抗 MAA MoAb 等に対しての交差反応性は示さなかった。

sense primer 5' CCGAATTCGAGGTCAGCTTCAGCAGTCAGGACCTGAG 3'
antisense primer 5' CCGAATTCGGGAAGACATTTGGGAAGGACTGACTCTC 3'

Fig. 1 PCR primers for cDNA cloning of the V_H region of anti-Id MoAb M7-625

Table 1 Characteristics of anti-Id MoAbs elicited with anti-CEA MoAb MA208

Ab2	Isotype	Inhibition assay ^a	Sandwich assay ^b
M7-049	IgG2a	98%	23.969±327 cpm
M7-413	IgG1	73	6.505±227
M7-418	IgG2a	98	21.356±150
M7-625	IgG1	96	8.621±163
M7-914	IgG2a	81	14.728±10
10% FCS		0	1.314±53

^a Inhibition of ¹²⁵I-MA208 binding to CEA by the culture supernatant of each Ab2. ¹²⁵I-MA208 was coincubated with the supernatant of each Ab2. These mixtures were then added to microtiter plates which were coated with CEA. After washing, the reactivity of ¹²⁵I-MA208 to CEA was tested. Results are expressed as % inhibition compared with that of 10% fetal calf serum (FCS).

^b Microtiter plates were coated with MoAb MA208. The supernatant of each Ab2 was added to a well and incubated. After washing, ¹²⁵I-MA208 was added to each well and then the reactivity of ¹²⁵I-MA208 to Ab2 was tested.

Table 2 Specificity of anti-Id MoAbs elicited with anti-CEA MoAb MA208^a

MoAb	Specificity	¹²⁵ I-labeled anti-idiotypic MoAb				
		M7-049	M7-413	M7-418	M7-625	M7-914
MA208	CEA	80.7 ^b	12.7	46.9	59.8	49.9
5B3	CEA	1.2	0.9	1.0	1.1	0.8
010	CEA	0.5	0.3	0.4	0.3	0.7
CEA281	CEA	0.7	0.4	0.5	0.4	0.6
CEA41	CEA	0.7	0.4	0.5	0.4	0.7
T84-66	CEA	0.6	0.4	0.5	0.4	0.5
II 10	CEA	0.5	0.4	0.4	0.3	0.7
II 16	CEA	0.7	0.4	0.4	0.4	0.7
261.15.1	CEA	0.6	0.4	0.4	0.3	0.9
12.140.7	CEA	0.6	0.4	0.5	0.4	0.5
YK024	CEA	0.5	0.4	0.3	0.4	0.5
MT008	CEA	0.6	0.4	0.4	0.5	0.7
MA503	NCA ^c	0.6	0.4	0.5	0.4	0.7
MA504	NCA	0.6	0.5	0.6	0.5	0.7
YH206	Mucin	0.7	0.4	0.5	0.4	0.8
MUSE11	Mucin	0.6	0.4	0.4	0.4	0.7
BM2	X-hapten	0.4	0.4	0.4	0.4	0.6
149.53	HMW-MAA ^d	0.5	0.4	0.5	0.4	0.5
225.28	HMW-MAA	0.6	0.3	0.4	0.4	0.7
CL203	96kd MAA	0.4	0.3	0.3	0.3	0.6
CR11-115	HLA-Class I	0.6	0.5	0.4	0.4	0.5
CR11-351	HLA-A2, A28	0.6	0.3	0.5	0.4	0.7
KSI	HLA-A2, A28	0.5	0.4	0.4	0.4	0.5

^a ¹²⁵I-labeled anti-Id MoAbs were incubated for 3 hours at 4°C with monoclonal antibodies coated microtiter plates. Then the plates were washed and bound radioactivity was counted in a γ -counter.

^b Results are expressed as cpm $\times 10^{-3}$.

^c NCA: nonspecific cross-reacting antigen.

^d HMW-MAA: high molecular weight-melanoma associated antigen.

以上のことより今回得られた5種の抗 Id MoAb が認識する idiotope は MA208 の抗原結合部位上に存在し、かつ MA208 に特異的であることが示唆された。

3・3 抗・抗イディオタイプ抗血清の解析

3・3・1 免疫原特異的抗血清の誘導と解析

以上の結果からこれらの抗 Id 抗体は MA208 の抗原結合部位を認識し、かつ CEA と MA208 との結合を阻止する抗体であることが確認された。従って、この抗 Id 抗体の中には MA208 の paratope (抗原結合部位) を介して、CEA の internal image を持つものが得られている可能性がある。

この点を検討するため、これらの抗 Id MoAb を 2・2 に示した方法で、BALB/c マウスに同系免疫し、抗・抗 Id 抗体の誘導を試みた。

得られた抗血清について、抗 Id MoAb を用いた sandwich assay により、免疫原特異的抗・抗 Id 抗体の誘導の有無を検討した (Table 3-a)。各血清には免

疫原特異的抗・抗 Id 抗体が誘導されているが、これらの抗血清のうち M7-413 と M7-914 により誘導された抗血清および M7-049 と M7-418 による抗血清は互いに交差反応性を示した。

これらの抗血清の交差反応性をさらに 2・4・2・2 に示した inhibition assay にて検討した (Table 3-b)。Sandwich assay の結果と同様に、M7-413 と M7-914、M7-049 と M7-418 により誘導された抗血清は互いに阻止能を有することが確認されたが、他の血清には交差反応性は認められなかった。すなわち、この2組の抗 Id MoAb は、MoAb MA208 に対する抗原結合部位上において、各々共通する idiotope を有する cross-reactive Id であることが推測された。

3・3・2 抗 Id MoAb のイディオタイプ解析における抗・抗 Id MoAb (Ab3) の応用

Cross-reactive Id に関してさらに、モノクローナル Ab3 を用いて詳細な検討を試みた。すなわち、Ab2 で

Table 3-a Analysis of anti-anti-idiotypic antisera generated with anti-Id MoAbs to anti-CEA MoAb MA208 by sandwich assay

Monoclonal anti-idiotypic antibodies (Ab2)	Anti-anti-idiotypic antiserum (Ab3) generated with				
	M7-625	M7-413	M7-914	M7-049	M7-418
M7-625	22495 ^a	647	777	839	1001
M7-413	300	17115	7852	291	499
M7-914	394	5032	21197	524	749
M7-049	659	965	739	11446	4737
M7-418	388	731	423	10434	6991

Anti-anti-idiotypic antisera were incubated with anti-Id MoAbs coated on microtiter plates, and then the reactivity of ¹²⁵I-labeled anti-Id MoAbs was tested in a sandwich assay.

^a The results are expressed as bound cpm.

Table 3-b Analysis of anti-anti-idiotypic antisera generated with anti-Id MoAbs to anti-CEA MoAb MA208 by inhibition assay

Monoclonal anti-idiotypic antibodies (Ab2)	Anti-anti-idiotypic antiserum (Ab3) generated with				
	M7-625	M7-413	M7-914	M7-049	M7-418
M7-625	96 ^a	0	0	0	4
M7-413	6	93	89	0	0
M7-914	3	42	97	0	0
M7-049	0	0	0	88	75
M7-418	9	1	7	86	76

The inhibited binding ability of ¹²⁵I-anti-Id MoAbs to MA208 coated on microtiter plates after preincubation with anti-anti-Id antisera was compared to that after preincubation with non-immunized mouse sera.

^a The results are expressed as % inhibition.

Table 4 Characteristics of anti-anti-idiotypic MoAbs (Ab3) to anti-Id MoAb M7-914 by sandwich and inhibition assays

Monoclonal Ab3	Sandwich assay ^a		Inhibition assay ^b	
	M7-914	M7-413	M7-914	M7-413
M9-314	8357 cpm	4157	85%	87
M9-468	6767	4436	98	97
M9-422	12367	522	98	8
M9-409	6122	871	89	7
10%FCS	822	935	0	0

^a Supernatant was incubated with monoclonal Ab2 (M7-914 or M7-413) coated on a microtiter plate, and then the reactivity of ¹²⁵I-monoclonal Ab2 was tested.

^b Inhibition of ¹²⁵I-monoclonal Ab2 to MA208 by Ab3.

¹²⁵I-monoclonal Ab2 was coincubated with the supernatant of each Ab3. These mixtures were then added to microtiter plates coated with MA208. After washing, the reactivity of ¹²⁵I-monoclonal Ab2 to MA208 was tested. Results are expressed as % inhibition compared with that of 10% FCS.

ある M7-914 を BALB/c マウスに免疫して、モノクローナル Ab3 を作製した。Table 4 に代表的な 4 抗体の M7-914 と M7-413 に対する反応性を示した。抗・抗 Id MoAb (Ab3) である M9-314 および M9-468 は M7-914 と M7-413 の両者に反応性を有するが、M9-422 および M9-409 は M7-914 のみに反応し M7-413 には反応しなかった。なお、抗・抗 Id MoAb M9-314, M9-468, M9-422 および M9-409 は他の抗 Id MoAb M7-625, M7-049 および M7-418 とは反応しなかった。

以上の成績は、M7-914 と M7-413 には Ab3 である M9-314 および M9-468 が共通に反応する cross-reactive idiotope が存在することを強く示唆する。

3・4 Ab1-like Ab3 の検出

CEA の internal image を持つ抗 Id 抗体を免疫することにより誘導されるポリクローナル抗・抗 Id 抗血清中には、元の抗 CEA MoAb である MA208 と同様に、CEA との反応性を有する抗体 (Ab1-like Ab3) が存在する可能性が考えられ、この点について検討を加えた。

Competition assay は、固相化した CEA と ¹²⁵I-MA208 との結合が、血清中に含まれている MA208 相当の抗体により競合阻止を受けることを利用した assay で、Ab1-like Ab3 の存在を検索することが可能である。結果を Fig. 2 に示した。抗 M7-625 と抗 M7-914 抗血清において ¹²⁵I-MA208 との間に競合阻止が認められたが、抗 M7-049 と抗 M7-418 抗血清、コントロールとした抗 T4-212, 抗 T3-503 (ともに抗 CEA MoAb 5B3 に対する抗 Id MoAb, IgG1) 抗血清には競合阻止がみられなかった。この結果から M7-625 と M7-914 の抗血清中には、その反応性からみて MA208 様の抗体が誘

導されていることが示唆された。

次に、これら競合阻止が認められた抗血清と CEA との反応性を検討した。Fig. 3 にその成績を示したが、Ab2 である M7-625 および M7-914 により誘導された

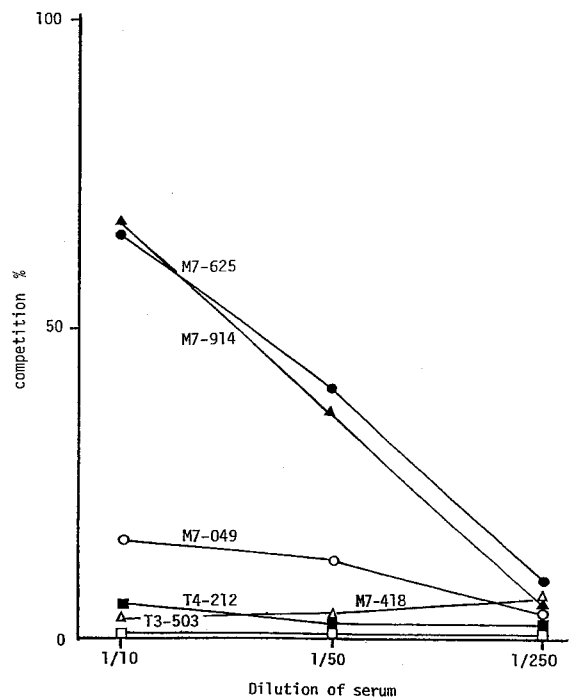


Fig. 2 Competition of ¹²⁵I-MA208 binding to CEA by anti-anti-idiotypic antiserum. The competitive binding ability of ¹²⁵I-MA208 to CEA coated on microtiter plates after preincubation with anti-anti-Id antisera was compared to that after preincubation with non-immunized mouse sera.

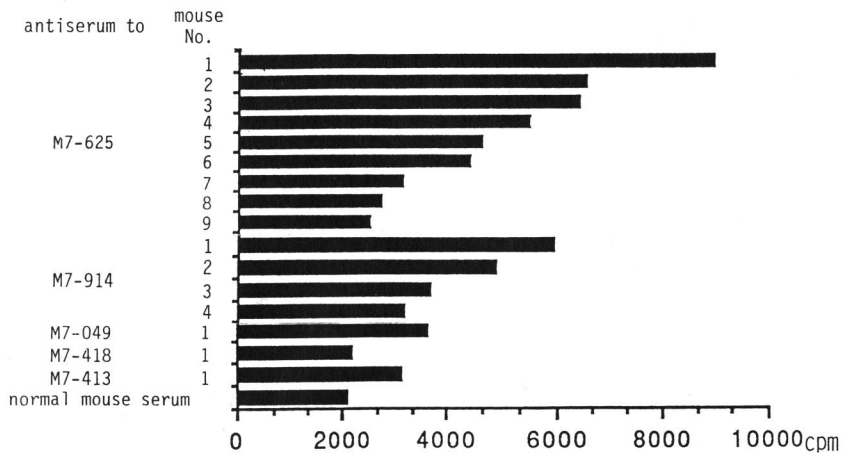


Fig. 3 Reactivity of anti-anti-idiotypic antiserum to CEA.

Each diluted mouse serum was incubated for 3 hours at 4°C on a CEA coated microtiter plate. After washing the plate, ¹²⁵I-labeled goat anti-mouse IgG·Fc antibody was reacted for 90 min. Then the plate was washed and bound radioactivity was counted in a γ -counter.

それぞれの抗血清中に、他の抗血清および正常マウス血清と比較し、より強くCEAとの反応性を示す場合(抗M7-625抗血清No.1および抗M7-914抗血清No.1)が経験された。

そこで、これらの抗血清のうち抗M7-625抗血清No.1を用いてさらにCEAとの反応性をWestern blotting法にて検討した(Fig.4)。CEAとは無関係な抗体

で免疫して得られた抗血清と正常マウス血清を対照として用いた。これらの対照血清ではCEAとの反応性は認められないが、抗M7-625抗血清No.1はCEAと反応性を示した。

以上の結果より、抗Id MoAbであるM7-625はCEAの internal image を有する抗体であることが強く示唆された。

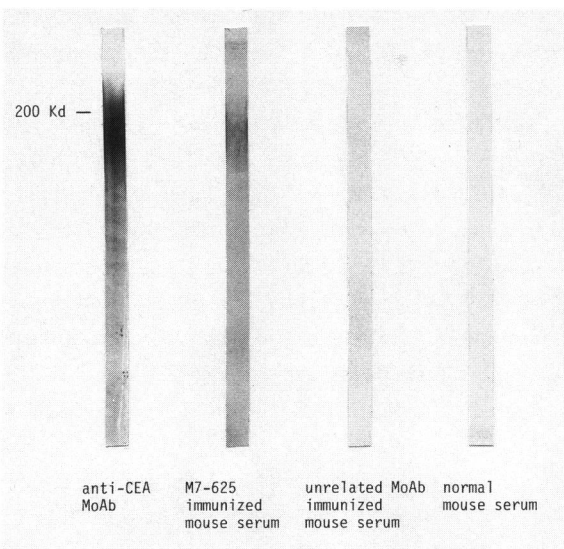


Fig. 4 Reactivity of mouse anti-M7-625 antiserum to CEA by Western blotting.

Amount of CEA preparation used per lane was 2.5 μ g each. Each serum was diluted $\times 200$ by PBS. Unrelated MoAb means anti-HLA-Class I MoAb CR11-115.

3.5 M7-625のV_H領域のアミノ酸解析

CEAの internal image を有する抗体のアミノ酸解析を行い、CEAとのhomologyの検討を試みた。Fig.5にM7-625のV_H領域のcDNAとアミノ酸配列を示し

48	T TCA GIG AAG ATA TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC TCA TTC	87
17	S V K I S C K A S G Y S F	29
88	ACT GCC TAC TAC ATG CAC TGG GTG AAG CAA AGC CAT GTT AAG	129
30	T <u>G Y Y M H</u> W V K Q S H V K	43
	CDR1	
130	AGC CTT GAG TGG ATT GGA CGT ATG AAT CCT TAC AAT GGT GCT	171
44	S L E W I G <u>R M N P Y N G A</u>	57
	CDR2	
172	ATT AGG TTC GAC CCG AAT TTC AAG GAC AAG GCC AGG TTG ACT	213
58	<u>I R F D P N F K D</u> K A R L T	71
214	GTA GAT AAG TCC TCC AGC ACA GCC TTC ATG GAG CTC CAC AGC	255
72	V D K S S S T A F M E L H S	85
256	CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAT TGT GCA AGG GGT	297
86	L T S E D S A V Y Y C A R <u>G</u>	99
	CDR3	
298	AAT CCC GGG TAT TTC GAT GTC TGG GGC GCA GGG ACC ACG GTC	339
100	<u>N P G Y F D V</u> W G A G T T V	113
340	ACC GTC TCC TCA	351
114	T V S S	117

Fig. 5 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the V_H cDNA of MoAb M7-625.

625VH CDR2	50	RMNPYNGA <u>TRFD</u> PN <u>E</u> KD	66
		* * * *	
CEA	538	GIQNSVSN <u>ANRSD</u> PV <u>IT</u> LDV	554
		* * **	
625VH CDR3	98	RG <u>NE</u> GY <u>FD</u> V	106

(Amino acid No. 98 is FR3.)

Fig. 6 Alignment of the amino acid sequence between CDRs of MoAb M7-625 and CEA. A star mark (★) denotes identical amino acid.

た。CDR1は5個、CDR2は17個、CDR3は8個のアミノ酸より構成されている抗体であることが判明した。そこで、このCDR部のアミノ酸とCEAのアミノ酸とのhomologyを調べた結果、Fig. 6に示した成績が得られた。すなわち、CEAのdomain IIIの部位に対しCDR2の5個とCDR3の4個のアミノ酸が一致していることが明らかになった。

4 考 察

抗Id抗体を利用した癌の治療方法は大きく2通りある。まず、Brown *et al.*²²⁾のBリンパ球系腫瘍に対する抗Id抗体による治療がその例として挙げられる。モノクローナルに増殖する腫瘍細胞表面に存在する免疫グロブリンには、他の正常リンパ球には存在しない特有のIdがあり、このIdをターゲットとして抗Id抗体の直接的な腫瘍細胞の増殖抑制効果を期待するものである²³⁾。この考えはT細胞抗原リセプター上のIdにも適応され、応用が試みられている^{24,25)}。

次の抗Id抗体の応用は、癌関連(特異)抗原のinternal imageを有する抗Id抗体を免疫原として生体に投与するactive immunotherapyである。この場合、癌抗原と反応するAb1様の抗・抗Id抗体(Ab3)が担癌患者に誘導されることが期待され、このヒト型抗体(Ab3)はマウス型抗体よりもADCC活性等エフェクター機構が強く働き、さらに細胞性免疫応答を誘導し、抗腫瘍効果を示すと推測されている。

本研究においては治療への応用を念頭におき、標的分子としてCEAに注目し、モノクローナル抗Id抗体を作製し、CEAのinternal imageを有する抗Id抗体を探求した。

CEAは1987年Oikawa *et al.*²⁶⁾により遺伝子クローニングが行われ、その全構造が判明している。その組織分布は大腸癌などの消化器癌(特に腺癌)に多量に存在し、非癌部部位には微弱にしか存在しない。我々

の教室の伊藤²⁷⁾は、CEA mRNAの発現を大腸癌部と非癌部において*in situ* hybridization法にて検討した。その結果CEA mRNAの局在は免疫組織学的検索による産物としてのCEAの局在部位とはほぼ一致して、大腸癌部に高率にその発現を認めたが、非癌部にはほとんど検出し得なかったとしている。CEAは細胞膜に、phosphatidyl inositolglycanと結合して存在していることが判明しているが、実際、RI標識抗CEA抗体を用いたimmunoscintigraphyでは良好な腫瘍集積性^{28,29)}が得られている。また、Traub *et al.*³⁰⁾は癌患者に抗CEA MoAbを投与した結果、臓器障害はみられなかったと報告した。以上の点から考えると、この分子が免疫治療の標的となり得るものと考えられる。以下に二、三の項目に分けて考察する。

本研究の目的とした、CEAのinternal imageを有する抗Id抗体(Ab2)は、理論的には、抗CEA MoAbであるMA208(Ab1)の抗原結合部における同一の決定基と結合するはずである。今回作製した5種の抗Id MoAbはすべて、免疫原であるMA208とのみ特異的に反応し、検索した範囲ではその他のMoAbに対して、交差反応性を示さなかった。この成績は得られた抗Id MoAbが抗CEA MoAb MA208上のprivate idiotopeを認識する抗体であることを示唆する。さらに、inhibition assayによりこれらの抗Id MoAbが認識するMA208上のidiotopeの存在部位について検討した結果、すべての抗Id MoAbはCEAとMA208との結合を強く阻止したことより、そのidiotopeはMA208のparatope内に存在すると推測された。

次に抗Id MoAbをさらに同系免疫して得られたポリクローナル抗・抗Id抗血清を用いて、免疫原である抗Id MoAbのIdの解析を試みた。Table 3-a, -bに示したように、これらの抗血清には一部に交差反応性を認め、これらの抗Id抗体間には互いに共通するidiotopeが存在することが示唆された。さらに、この共通するidiotopeは、これらの抗血清(Ab3)が互いにMA208(Ab1)と抗Id MoAb(Ab2)との結合を阻止することより、抗Id抗体の抗原結合部位に位置すると推測された。

そこでこの点を詳細に解析するため、M7-914を免疫し、モノクローナルAb3の作製を試み、4種の抗・抗Id MoAbの作製に成功した。これらのモノクローナルAb3は4個ともM7-914(Ab2)とMA208(Ab1)との結合を阻止することより、M7-914の抗原結合部位に存在するidiotopeを認識するものと考えられた。さらに、M9-314とM9-468は、M7-413とMA208との結

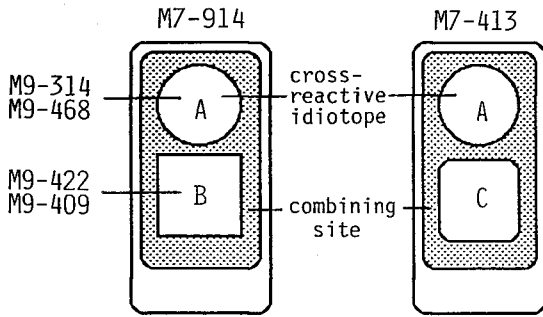



Fig. 7 Idiotype mapping of M7-914 and M7-413. Cross-reactive idiotope (A) recognized by M9-314 and M9-468 is at the combining site of both M7-914 and M7-413. However, M7-914-specific idiotope (B) recognized by M9-422 and M9-409 is at that of M7-914, but not that of M7-413. A denotes cross-reactive idiotope.  denotes combining site of Ab2.

合も阻止することより、M7-914とM7-413の両抗体上のcross-reactive idiotopeを認識するモノクローナルAb3であった。

これらのモノクローナルAb3を¹²⁵I-標識し、他のAb2との反応性を検討したが、交差反応性はみられなかった。また、CEAとの反応性についても、結合試験を用いて検索したが、このモノクローナルAb3のCEAへの結合はみられなかった(成績には示していない)。

以上の成績から抗Id MoAb M7-914 (Ab2)は抗・抗Id MoAb M9-314, M9-468 (Ab3)に認識され抗Id MoAb M7-413にも存在するcross-reactive idiotopeと、抗・抗Id MoAb M9-422, M9-409で認識される独自のidiotopeであるprivate idiotopeの少なくとも2つのidiotopeを有していた。結果を模式化しFig.7に示す。なお、これらのidiotopeは、モノクローナルAb3が、CEAに反応しないことから抗原のinternal imageに相当しないことが示唆された。

次に抗・抗Id抗血清を用いて抗Id MoAbがinternal imageを持つか否かを検討した。

本研究でAb2 (M7-625とM7-914)を免疫して誘導された抗血清 (Ab3)はCEAとMA208との結合を阻止する作用を有し (Fig. 2), かつ血清学的検索 (Fig. 3) およびWestern blotting (Fig. 4)等によりCEAとの反応性を有することが判明した。これらの成績から両抗血清中にはMA208と類似の抗体 (Ab1-like Ab3)が誘導されていることが示唆され、M7-625とM7-914はCEAのinternal imageを持つ抗Id抗体であることが強く推測された。

一方、近年の遺伝子工学技術の進歩により、internal imageを持つAb2と抗原との一次構造の比較検討がそれぞれの構成アミノ酸レベルにおいて可能となり、Bruck *et al.*³¹⁾はreovirus type 3 hemagglutinin (HA3)のneutralization/cell-attachment部を認識する中和抗体を用いてAb2を作製し、それらのアミノ酸sequenceの解析から、Ab2と元の抗原との類似部分の存在を示した。それによると、Ab2のV_L領域ではCDR2を含む11個のアミノ酸のうちの5個に、またV_HのCDR2に隣接したframework部には連続した3個に、HA3の構成アミノ酸との一致がみられている。

CEAについても、その分子構造が明らかであるため、同様のアプローチを試み、本研究において明らかにされたinternal imageを有する抗Id抗体M7-625について、V_H領域のcDNAクローニングに成功した。その結果、CEAとのhomologyは、CEAのdomain IIIに対してV_H領域のCDR2の4個およびCDR3の5個の構成アミノ酸と部分的に一致することが判明した。以上の成績をあわせて考えると、抗Id抗体M7-625はCEAのinternal imageを有しているものと推測され、今後、V_Lについても同様の検討を加えることによりinternal imageの実態が一層明らかになるものと期待される。

5 要 約

1. 抗CEA MoAb MA208をAb1とし、これをBALB/cマウスに同系免疫し、5種の抗Id MoAb (Ab2)を作製した。
2. これらの抗Id MoAbの解析により、得られた抗Id抗体は特異的にMA208上の抗原結合部位に存在するprivate idiotopeを認識し、他のMoAbとは反応性を認めなかった。
3. Ab2をさらに同系免疫して得たポリクローナル抗・抗Id抗体の解析により、Ab2にはcross-reactive idiotopeの存在が推測された。この点はモノクローナルAb3を作製して解析することにより証明された。
4. Ab2の5種のうち2種 (抗Id MoAb M7-625, M7-914)より誘導されたポリクローナル抗・抗Id抗体はCEAとの反応性を、血清学的結合能、Western blot analysis, さらにAb1とCEAの結合に対する競合性から検討し、CEAのinternal imageを持つAb2であることが強く示唆された。
5. このCEAのinternal imageを持つことが示唆される抗Id MoAb M7-625のV_H領域のアミノ酸解析を行い、そのCDR2およびCDR3の一部に、CEAの一部のアミノ酸配列とのhomologyを認めた。

謝 辞

ご指導, ご校閲をいただいた谷内 昭教授, ならびに御協力いただいた諸先生に深謝いたします。本研究は文部省がん特別研究 I (谷内 02151056) 及び II (今井 01015095, 辻崎 02152096) の補助による。

文 献

1. Jerne, N. K.: Towards a network theory of the immune system. **Ann. Immunol. (Paris)** **125**, 373-389 (1974).
2. Hahn, B. H. and Ebling, F. M.: Suppression of murine lupus nephritis by administration of an anti-idiotypic antibody to anti-DNA. **J. Immunol.** **132**, 187-190 (1984).
3. Burman, K. D. and Baker, J. R.: Immune mechanisms in Graves' disease. **Endocr. Rev.** **6**, 183-232 (1985).
4. Jerne, N. K., Roland, J. and Cazenave, P. A.: Recurrent idiotopes and internal images. **EMBO J.** **1**, 243-247 (1982).
5. Kennedy, R. C., Zhou, E., Lanford, R. E., Chanh, T. C. and Bona, C. A.: Possible role of anti-idiotypic antibodies in the induction of tumor immunity. **J. Clin. Invest.** **80**, 1217-1224 (1987).
6. Kitagawa, H., Ohkouchi, E., Fukuda, A., Imai, K. and Yachi, A.: Characterization of carcinoembryonic antigen-specific monoclonal antibodies and specific carcinoembryonic antigen assay in sera of patients. **Jpn. J. Cancer Res. (Gann)**, **77**, 922-930 (1986).
7. 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. **札幌医誌** **53**, 455-467 (1984).
8. 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).
9. Greenwood, F. C., Hunter, W. M. and Glover, J. S.: The preparation of ^{125}I -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. **Biochem. J.** **89**, 114-123 (1963).
10. Yachi, A., Araki, A., Kawaharada, M., Imai, K., Abe, H., Akahonai, Y. and Wada, T.: Carcinoembryonic antigen and the related antigens in gastric carcinoma. **Protides Biol. Fluids** **24**, 473-476 (1976).
11. Burtin, P. and Chavanel, G.: A new and fast method of preparation of CEA. **Ann. Immunol. (Paris)** **124**, 583-587 (1973).
12. von Kleist, S., Chavanel, G. and Burtin, P.: Identification of an antigen from normal human tissue that cross reacts with the carcinoembryonic antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **69**, 2492-2494 (1983).
13. 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 cells and murine fibroblasts. **Cancer Res.** **41**, 1028-1033 (1981).
14. 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).
15. Matsudaira, P.: Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. **J. Biol. Chem.** **262**, 10035-10038 (1987).
16. Yuen, S. W., Chui, A. H., Wilson, K. J. and Yuan, P. M.: Microanalysis of SDS-PAGE electroblotted proteins. **BioTechniques** **7**, 74-82 (1989).
17. Kabat, E. A., Wu, T. T., Reid-Miller, M., Perry, H. M. and Gottesman, K. S.: Sequences of protein of immunological interest, 4th ed. U. S. Dept. Health and Human Services. (1987).
18. Chiang, Y. L., Sheng-Dong, R., Brow, M. A. and Larrick, J. W.: Direct cDNA cloning of the rearranged immunoglobulin variable region. **BioTechniques** **7**, 360-366, (1989).
19. Davis, L. G., Dibner, M. D. and Battey, J. F.: Guanidine isothiocyanate preparation of total RNA. In: Davis, L. G., Dibner, M. D. and Battey, J. F.: Basic methods in molecular biology. 130-135, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York (1986).
20. Kawasaki, E. S.: Amplification of RNA. PCR protocols: A guide to methods and applications. Edited by Innis, M. A. Academic Press, 21-27 (1990).
21. Hinoda, Y., Neumaier, M., Hefta, S. A., Drezeniek, Z., Wagener, C., Shively, L., Hefta, L. J. F., 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).
22. Brown, S. L., Miller, R. A., Horning, S. J., Czerwinski, D., Hart, S. M., McElderry, R.,

- Basham, T., Warnke, R. A., Merigan, T. C. and Levy, R.: Treatment of B-cell lymphomas with anti-idiotype antibodies alone and in combination with alpha interferon. **Blood** **73**, 651-661 (1989).
23. Rubinstein, L. J. and Bona, C. A.: Regulation of myeloma growth in mice by antigen and regulatory idiotopes. **Cancer Res.** **46**, 1603-1607 (1986).
24. Takahasi, T., Imai, K., Sugiyama, T., Sasaki, T., and Yachi, A.: Preparation of anti-T idiotype monoclonal antibody reacting with human T leukemic cell lines and with a small percentage of peripheral T lymphocytes. **Clin. Exp. Immunol.** **82**, 590-595 (1990).
25. Meeker, T. C., Lowder, J., Maloney, D. G., Miller, R. A., Thielemans, K., Warnke, R. and Levy, R.: A clinical trial of anti-idiotype therapy for B cell malignancy. **Blood** **65**, 1349-1363 (1985).
26. 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).
27. 伊藤 淳: In situ hybridization 法による CEA 及び NCA mRNA の検出: 大腸癌及び大腸腺腫における検索. **札幌医誌** **59**, 129-141 (1990).
28. Beatty, J. D., Duda, J. B., Williams, L. E., Sheibani, K., Paxton, R. J., Beatty, B. G., Philben, J., Werner, J. L., Shivery, J. E., Vlahos, W. G., Kosal, W. A. and Riihimaki, D. U.: Preoperative imaging of colorectal carcinoma with ¹¹¹I-labeled anticarcinoembryonic antigen monoclonal antibody. **Cancer Res.** **46**, 6494-6502 (1986).
29. Delaloye, B., Bischof-Delaloye, A., Buchegger, F., Fliedner, V. V., Grob, J. P., Volant, J. C., Pettarel, J. and Mach, J. P.: Detection of colorectal carcinoma by emission-computerized tomography after injection of ¹²³I-labeled Fab or F(ab')₂ fragments from monoclonal anticarcinoembryonic antigen antibodies. **J. Clin. Invest.** **77**, 301-311 (1986).
30. Traub, U. C., DeJager, R. L., Primus, F. J., Losman, M. and Goldenberg, D. M.: Antiidiotype antibodies in cancer patients receiving monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen. **Cancer Res.** **48**, 4002-4006 (1988).
31. Bruck, C., Co, M., Slaoui, M., Gaulton, G. N., Smith, T., Fields, B. N., Mullins, J. I. and Greene, M. I.: Nucleic acid sequence of an internal image-bearing monoclonal anti-idiotype and its comparison to the sequence of the external antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **83**, 6578-6582 (1986).

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 得地 茂