

消化器癌関連 MUSE11 抗原の分子生物学的解析

仲川 尚明 日野田裕治 今井 浩三
札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Molecular Biological Analysis of Digestive Organ Cancer-associated Antigen MUSE11

Naoaki NAKAGAWA, Yuji HINODA and Kohzoh IMAI
Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief : Prof. A. YACHI)

ABSTRACT Molecular biological analysis was performed to clarify the epitope structure of digestive organ cancer-associated antigen MUSE11. Consequently, the following results were obtained :

1. Monoclonal antibody (MoAb) MUSE11 reacted with the synthetic peptide corresponding to the tandem repeat domain of human polymorphic epithelial mucin (PEM).
2. A cDNA clone of 735 bp was isolated from a normal human kidney cDNA library and was designated as mucin 700 by using an oligonucleotide probe corresponding to part of the tandem repeat domain. Nucleotide sequencing showed that mucin 700 consisted of 10 tandemly repeated domains.
3. Recombinant mucin 700 was produced with an expression vector, pGEX-2T, in *E. Coli*. MoAb MUSE11 was shown to react with this protein by Western blot analysis and sandwich enzyme immunoassay.
4. PEM core protein mRNA was expressed in both cancerous and non-cancerous regions of the stomach and the colon. It was revealed by Northern blot analysis using total RNAs extracted from surgically resected tissues. At the protein level, this was also confirmed by immunostaining with frozen tissue sections.

(Received February 5, 1992 and accepted February 27, 1992)

Key words : Monoclonal antibody, Human polymorphic epithelial mucin, Mucin core protein, Gastric cancers, Colonic cancers.

1 緒 言

モノクローナル抗体(MoAb)を用いて多くの腫瘍マーカーが見い出され、これらは悪性腫瘍の診断や治療後

の経過観察に応用されてきた^{1,2)}。また、これら新しい腫瘍マーカーの多くは、その抗原分子がムチン様糖蛋白質であり、対応抗原エピトープは糖鎖であることが判明してきた。これらの一部、CA 19-9³⁾、Sialyl Le^{x4)}等

Abbreviations

bp	: base pair	mRNA	: messenger RNA
cDNA	: complementary DNA	PBS	: phosphate-buffered saline
CTL	: cytotoxic T-lymphocyte	PCR	: polymerase chain reaction
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid	PEM	: polymorphic epithelial mucin
IPTG	: isopropyl- β -D-thiogalactoside	SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
kb	: kilobase		

について糖鎖構造が解析されてきたが、ムチン分子自体の構造については全く不明であった。1988年、英国の Gendler *et al.*⁵⁾により乳癌に反応するモノクローナル抗体を用いて human polymorphic epithelial mucin (PEM) の遺伝子クローニングが行われ、そのコア蛋白の一次構造が明らかとなった。

一方、我々の教室で確立したマウスモノクローナル抗体 MUSE11⁶⁾は、既報のように約 300 Kd のムチン様糖蛋白抗原と反応するが、その対応抗原エピトープは糖鎖ではなく蛋白部分に存在することを示唆する成績を得ていた。また、これまで消化器癌とくに肺癌、胃癌、大腸癌患者血清中の MUSE11 抗原を測定し、腫瘍マーカーとしての意義を報告してきた⁷⁾。

本研究では、MUSE11 抗原決定基が PEM のコア蛋白部分に存在することを、主として分子生物学的手法を用いて明らかにした。

2 方 法

2.1 合成ペプチドとの反応性

Gendler *et al.*⁵⁾により報告された PEM コア蛋白 cDNA 断片の塩基配列より予測されるアミノ酸の一次構造を基に、24 個のアミノ酸 (PDTRPAPGSTAPP-AHGVTSPDTR) より成る合成ペプチドをペプチド合成機を用いて作製した(味の素中央研究所)。合成ペプチドとの反応性は菱川らの報告⁸⁾に従った。すなわち、合成ペプチド 0.1 mg/ml の 100 μ l を 96 穴塩化ビニールプレートに 4 $^{\circ}$ C、12 時間反応させ固相化後、phosphate-buffered saline (PBS) により洗浄し、MoAb MUSE11 を産生するハイブリドーマ培養上清と 4 $^{\circ}$ C、5 時間反応させた。その後 PBS で洗浄、¹²⁵I 標識ヤギ抗マウス IgG \cdot Fc 抗体 (Jackson Immunoresearch Laboratory, USA) 1×10^5 cpm/well を加え、さらに 4 $^{\circ}$ C、3 時間反応させたのち PBS により洗浄後、標識抗体の結合 cpm を γ -counter により測定した。なお、対照抗体として CEA 合成ペプチド (No. 119-140) に対する MoAb P1-255⁹⁾を用いた。

2.2 cDNA クローニング

2.2.1 cDNA ライブラリー及びオリゴヌクレオチドプローブ

MUSE11 抗原がヒト腎尿細管上皮に発現していることから正常ヒト腎 λ gt 11 cDNA ライブラリー (Clontec, USA) を用いた。またプローブは、Gendler *et al.*⁵⁾ のムチンコア蛋白繰り返しドメインの塩基配列の報告に基いて 36 mer (3' GGC CTG TGG TCC GGC CGG GGC CCG AGG TGG CGG GGG 5') のオリゴヌク

レオチドを DNA 合成機を用いて作製した (MilliGen, Japan)。

プローブの標識は 5' 末端標識法⁹⁾を用いた。すなわち、200 ng DNA に 10 \times 反応バッファー (660 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT) 1 μ l, γ -³²P-ATP 3000 Ci/mM 1 μ l, T₄ ポリヌクレオチドキナーゼ (TAKARA) 1 μ l を蒸留水で 10 μ l に調整後 37 $^{\circ}$ C、2 時間インキュベートした。その後 65 $^{\circ}$ C、5 分間加熱して反応を止め、Sephadex G50 を用いたゲル濾過により未反応のヌクレオチドを除き、100 $^{\circ}$ C、3 分間加熱後急冷しプローブとして用いた。

2.2.2 ブラークハイブリダイゼーション法によるスクリーニング

Davis *et al.* の方法¹⁰⁾によりスクリーニングを行った。すなわち 5×10^8 pfu (plaque forming unit) の λ gt 11 cDNA ライブラリー溶液に、E. coli Y1090 300 μ l を加え 37 $^{\circ}$ C、20 分間インキュベート後、6.5 ml の NZ top agarose (NZ アミン 2 g, MgSO₄ \cdot 7H₂O 0.4 g, agarose 1.4 g/200 ml) と混合して NZ agarose (NZ アミン 10 g, NaCl 5 g, MgSO₄ \cdot 7H₂O 2 g, agarose 15 g/L) の plate (ϕ 15 cm ディッシュ) に加え、37 $^{\circ}$ C、約 6 時間インキュベートした。

次いで、ニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell, Germany) を用いて 2 回の lifting を行い、アルカリ変性後、80 $^{\circ}$ C、2 時間乾熱処理した。

さらに 50% formamide, 6 \times SSC (0.15 M NaCl, 15 mM sodium citrate, PH 7.0), 5 \times Denhardt (0.1% BSA/0.1% Ficoll 400/0.1% polyvinylpyrrolidone), 0.5% SDS, 10 mM EDTA (PH 8.0), サケ精巢 DNA (0.5 mg/ml) よりなる混合液中で 37 $^{\circ}$ C、12 時間プレハイブリダイゼーションした。次に dextran sulfate を最終濃度 0.1 g/ml に加えた混合液に 2.2.1 で作製したプローブ (最終濃度 1×10^6 cpm/ml) を加えて、37 $^{\circ}$ C、12 時間ハイブリダイゼーションした。この後、ニトロセルロース膜を室温で 2 \times SSC/0.1% SDS 溶液中で 5 分間 3 回、さらに 42 $^{\circ}$ C で 0.1 \times SSC/0.1% SDS 中で 1 回洗浄し、乾燥後、-80 $^{\circ}$ C、3 日間 X 線フィルム (Kodak, USA) に露光した。

以上のスクリーニング操作を 3 回繰り返し、陽性ブラークの純化を行った。

2.3 cDNA クローンの塩基配列の決定

2.3.1 cDNA 断片の回収

スクリーニングで得られた λ ファージクローンからの cDNA 断片は、プレートライセイト法¹⁰⁾により回収

した。すなわち大腸菌 Y1090 に 2・2 で得られた λ gt 11 ファージを感染後、2・2 と同様に NZ プレートを用いて一枚当たり約 5000 個のファージプラークを作製した。これに 10 ml の SM 溶液 (0.1 M NaCl/10 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ /50 mM Tris·HCl, PH 7.5/0.1% gelatin) を加えて 4°C で 12 時間静置後、溶液を回収し、6000 回転、10 分間遠心して上清を得た。ついで DNase および RNase を終濃度 2 $\mu g/ml$ に加えて 37°C、30 分間加温後、5 M NaCl を 1/5 量、50% polyethylene glycol を 1/5 量ずつ加え、水中に 1 時間静置した。この後、10000 回転 20 分間遠心した沈渣に 10% SDS 12.5 μl 、0.5 M EDTA 5 μl 、RNase (10 mg/ml) 1 μl を加え 65°C、15 分加温し、フェノール/クロロフォルム抽出を 2 回行い、エタノール沈殿後 20 μl の 10 mM Tris·HCl (pH 7.8)/1 mM EDTA-2Na に溶解した。

2・3・2 サブクローニング及び塩基配列の決定

2・3・1 で得られた λ ファージクローン中の cDNA 断片を M13 Cloning Kit (TOYOBO) を用いて M13mp18 及び M13mp19 ファージにサブクローニングし、一本鎖 DNA を調整後 Sequenase ver. 2.0 キット (USB, USA) を用いて dideoxy 法¹¹⁾ により塩基配列を決定した。

2・4 大腸菌を用いた mucin 700 蛋白の発現と精製

2・3 で得られた PEM コア蛋白 cDNA 断片 (mucin 700 と命名) を発現ベクター pGEX-2T (Pharmacia, Sweden) の EcoRI 部位に挿入し、大腸菌 JM105 に移入後、50 $\mu g/ml$ アンピシリンおよび 1.0 mM Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) (Pharmacia, Sweden) 加 2×YT 液 (bacto-tryptone 16 g, bacto-yeast extract 10 g, NaCl 5 g/L, pH 7.0) 中で培養し、glutathione S-transferase (GST) の融合蛋白として mucin 700 蛋白を発現させた。蛋白の精製は Prepacked Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia, Sweden) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより行った。なお、陰性対照として cDNA 断片を組み込まない pGEX-2T を用いて同様の方法で GST 蛋白の発現を行った。

2・5 SDS-PAGE およびウエスタンブロット分析

2・4 で得られた培養後の大腸菌 1 ml を遠心し、沈渣をサンプルバッファー (62.5 mM Tris·HCl, pH 6.8/10% グリセロール/2% SDS/5% 2-メルカプトエタノール/0.0025% ブロムフェノールブルー) 25 μl に溶解後、4-12% gradient gel (岩城硝子株式会社) を用いた sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel 電気泳動

(SDS-PAGE) を行い、Hinoda *et al.*¹²⁾ の方法に従ってクマシーブリリアントブルーによる蛋白染色を行った。また 2・4 で精製した融合蛋白 20 μg を同様に電気泳動後、ニトロセルロース膜へ転写し、酵素抗体間接法により、MoAb MUSE11 との反応性を検討した。

2・6 サンドイッチ酵素免疫測定法

既報⁴⁾ に準じてサンドイッチ酵素免疫測定法により mucin 700 蛋白の測定を試みた。すなわち精製 MoAb MUSE11 (20 $\mu g/ml$) を 96 穴マイクロタイタープレート (Nunc, Denmark) のビーズに 4°C、12 時間反応させて固相化し、3% ウシアルブミン加 PBS により 37°C、2 時間ブロックした後、抗原と 4°C、12 時間反応させた。次いで、0.05% Tween20 加 PBS にて洗浄後、ビオチン化 MoAb MUSE11 と室温で 3 時間反応させた。これを同様に洗浄後、1000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識アビジン (VECTOR, USA) と反応させ、洗浄後、0-フェニレンジアミンを基質として発色し、492 nm で吸光度を測定した。

2・7 ノーザンブロット法

2・7・1 培養細胞及び癌組織からの total RNA の抽出

培養細胞として胃癌細胞株 KATOIII, 乳癌細胞株 MRK-nu1 を用いた。癌組織としては外科的に切除された大腸癌 3 例及び胃癌 5 例の各組織片を採取後 30 分以内に -80°C に凍結保存し Chirgwin *et al.*¹³⁾ に従い guanidinium thiocyanate 法により total RNA を抽出した。

2・7・2 プロブの標識及びノーザンブロット法

プロブは 2・2・1 と同一であり、その標識も同様に行った。ノーザンブロット法は高橋の方法¹⁴⁾ に従った。なお、プレハイブリダイゼーションは 37°C、12 時間、ハイブリダイゼーションは前述のプロブを最終濃度 1×10^6 cpm/ml に加え 37°C、20 時間インキュベートした。

2・8 免疫ペルオキシダーゼ染色

Yachi *et al.*¹⁵⁾ に従い MUSE11 ハイブリドマー培養上清を一次抗体に用い、間接免疫ペルオキシダーゼ法を行った。なお、組織切片は手術により摘出された癌組織及び非癌部組織を用いて既報¹⁶⁾ に従い凍結切片を作製した。

3 成 績

3・1 合成ペプチドとの反応性

Gendler *et al.*⁵⁾ の報告を基に、PEM コア蛋白繰り返しドメインの一部に相当する合成ペプチドを作製し、

5'	GCC	CCG	GGC	TCC	ACC	GCC	CCC	CCA	GCC	CAC	GGT	GTC	ACC	TCG	GCC	45
	A	P	G	S	T	A	P	P	A	H	G	V	T	S	A	15
	CCG	GAC	ACC	AGG	CCG	GCC	CCG	GGC	TCC	ACC	GCG	CCC	GCA	GCC	CAC	90
	P	D	T	R	P	A	P	G	S	T	A	P	A	A	H	30
	GGT	GTC	ACC	TCG	GCC	CCG	GAG	AGC	AGG	CCG	GCC	CCG	GGC	TCC	ACC	135
	G	V	T	S	A	P	E	S	R	P	A	P	G	S	T	45
	GCG	CCC	GCA	GCC	CAC	GGT	GTC	ACC	TCG	GCC	CCG	GAG	AGC	AGG	CCG	180
	A	P	A	A	H	G	V	T	S	A	P	E	S	R	P	60
	GCC	CCG	GGC	TCC	ACC	GCG	CCC	GCA	GCC	CAC	GGT	GTC	ACC	TCG	GCC	225
	A	P	G	S	T	A	P	A	A	H	G	V	T	S	A	75
	CCG	GAG	AGC	AGG	CCG	GCC	CCG	GGC	TCC	ACC	GCG	CCC	GCA	GCC	CAC	270
	P	E	S	R	P	A	P	G	S	T	A	P	A	A	H	90
	GGT	GTC	ACC	TCG	GCC	CCG	GAG	AGC	AGG	CCG	GCC	CCG	GGC	TCC	ACC	315
	G	V	T	S	A	P	E	S	R	P	A	P	G	S	T	105
	GCG	CCC	GCA	GCC	CAC	GGT	GTC	ACC	TCG	GCC	CCG	GAG	AGC	AGG	CCG	360
	A	P	A	A	H	G	V	T	S	A	P	E	S	R	P	120
	GCC	CCG	GGC	TCC	ACC	GCG	CCC	GCA	GCC	CAC	GGT	GTC	ACC	TCG	GCC	405
	A	P	G	S	T	A	P	A	A	H	G	V	T	S	A	135
	CCG	GAG	AGC	AGG	CCG	GCC	CCG	GGC	TCC	ACC	GCG	CCC	GCA	GCC	CAC	450
	P	E	S	R	P	A	P	G	S	T	A	P	A	A	H	150
	GGT	GTC	ACC	TCG	GCC	CCG	GAG	AGC	AGG	CCG	GCC	CCG	GGC	TCC	ACC	495
	G	V	T	S	A	P	E	S	R	P	A	P	G	S	T	165
	GCG	CCC	GCA	GCC	CAC	GGT	GTC	ACC	TCG	GCC	CCG	GAG	AGC	AGG	CCG	540
	A	P	A	A	H	G	V	T	S	A	P	E	S	R	P	180
	GCC	CCG	GGC	TCC	ACC	GCG	CCC	GCA	GCC	CAC	GGT	GTC	ACC	TCG	GCC	585
	A	P	G	S	T	A	P	A	A	H	G	V	T	S	A	195
	CCG	GAG	AGC	AGG	CCG	GCC	CCG	GGC	TCC	ACC	GCC	CCC	CCA	GCC	CAC	630
	P	E	S	R	P	A	P	G	S	T	A	P	P	A	H	210
	GGT	GTC	ACC	TCG	GCC	C										646
	G	V	T	S	A											215

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of mucin 700 cDNA clone.

それに対する MoAb MUSE11 の反応性を検討した (Table 1). その結果, MUSE11 (IgG1) は陰性対照である抗 CEA 抗体 P1-255 (IgG1) に比べ有意に高い cpm 値を示すと同時に, 合成ペプチドの陰性対照である CEA-P2 に対しては明らかな反応性を認めなかった. このことは MoAb MUSE11 が PEM コア蛋白の繰り返しドメインを認識していることを強く示唆する.

3・2 PEM コア蛋白 cDNA 断片のクローニング

次に PEM コア蛋白 cDNA を得る目的で, PEM コア蛋白繰り返しドメインの塩基配列を基に作製した, オリゴヌクレオチドプローブを用いて正常ヒト腎 cDNA

ライブラリーをスクリーニングし, 735 bp よりなる cDNA 断片を得た. このクローンは 60 bp より成る繰り返しドメインを 10 個有しており, その 3' 側に繰り返しドメインとは異なる 87 bp の配列が認められた. Fig. 1 にその繰り返しドメインの塩基配列と予測されるアミノ酸の一次構造を示す. 本クローンは Gendler *et al.*⁵⁾ の報告した繰り返しドメイン (PDTRPAPGSTAPPAHGVTS) とアミノ酸のドメインで比較すると, 10 個の繰り返しドメインのうち, 3 つのアミノ酸が異なる PESRPAPGSTAPAAHGVTS という配列が 8 個認められた. さらに, 5' 側に, 1 か所異なっている

Table 1 Binding activity of MoAb MUSE11 to synthetic peptides

	Binding activity(cpm) ^{a)} to peptides	
	Mucin core protein ^{b)}	CEA-P2 ^{c)}
MUSE11	9543 ± 53	2335 ± 65
PI-255 ^{d)}	1870 ± 150	1088 ± 10

^{a)} Detected with an ¹²⁵I-labelled anti-mouse IgG-Fc antibody.

^{b)} A peptide consisting of one repeat and 4 amino acids from the tandem repeat region of mucin core protein.

^{c)} A 20-amino acid peptide from the B1 domain of CEA (amino acid number 202-221).

^{d)} A MoAb against CEA-P1 peptide corresponding to 22-amino acids from the A1 domain of CEA (amino acid number 119-140).

PDTRPAPGSTAPAAHGVTSA, また3'側に2カ所異なるPESRPAPGSTAPPAHGVTSAが、それぞれ1個認められた。

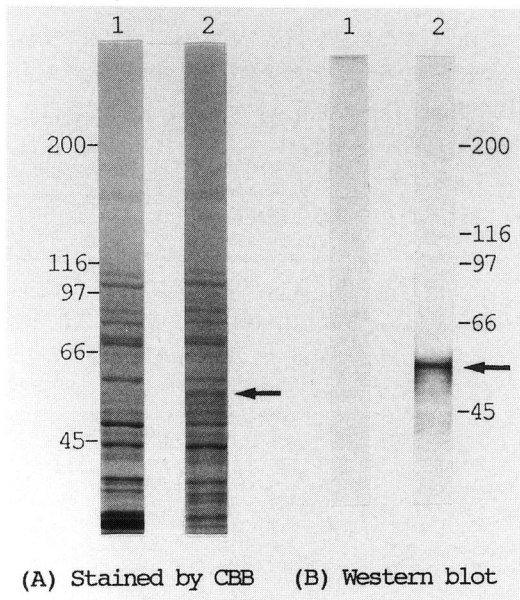


Fig. 2 SDS-PAGE and Western blot analysis of recombinant mucin 700. A bacteria lysate was subjected to electrophoresis on a 4-12% gradient gel.

(A) Coomassie staining.

Lane: 1, glutathione S-transferase protein; 2, recombinant mucin 700 fusion protein.

(B) Immunoblot analysis of the recombinant protein by MoAb MUSE11

Lane: 1, purified glutathione S-transferase protein; 2, purified recombinant mucin 700 protein.

CBB indicates coomassie brilliant blue G250.

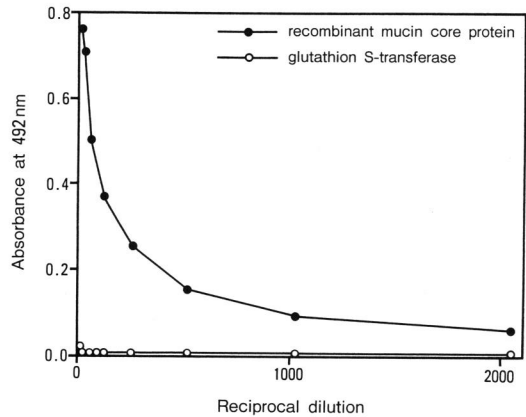


Fig. 3 Sandwich enzyme immunoassay with MoAb MUSE11. Closed circle and open circle indicate recombinant mucin core protein (50 μ g/ml) and glutathione S-transferase (50 μ g/ml).

この一次構造から Kyte and Doolittle の方法¹⁷⁾により hydrophobicity index を計算したところ、成績は示さなかったが、繰り返しドメイン部分は親水性に富んでいることがうかがわれた。

3.3 大腸菌を用いた組み換え mucin 700 蛋白の作意

次いで、mucin 700 cDNA 断片を発現ベクター pGEX-2T に組み込み、大腸菌を用いて組み換え mucin 700 蛋白を作製した。Fig. 2 に示すように SDS-PAGE において mucin 700 を組み込まないレーン 1 に比べレーン 2 において約 60 Kd の位置に新しいバンドを認めた。さらにこの蛋白が MoAb MUSE11 と反応することを確認する目的で Prepacked Glutathione Sepharose 4B を用いて精製後、一次抗体に MUSE11 を用いてウエスタンブロット分析を行った。レーン 2 において 60 Kd の位置にバンドを認めたのに対して GST のみを発現したレーン 1 においてはバンドを認めず、この蛋白が MoAb MUSE11 と反応することが確認された。

次に、組み換え mucin 700 蛋白が MUSE11 抗原エピトープを複数個有していることを確認するため、精製蛋白を 50 μ g/ml より希釈し一次抗体に MUSE11、二次抗体にビオチン標識 MUSE11 を用いたサンドイッチ酵素免疫測定法を行なった。Fig. 3 に示すように、この測定系において、対照として用いた GST 蛋白には全く反応を示さないのに比較して、組み換え mucin 700 蛋白を用いた場合には濃度依存性に測定が可能であった。すなわち、組み換え mucin 700 蛋白は MoAb MUSE11 に反応するエピトープを複数個有していることが明瞭

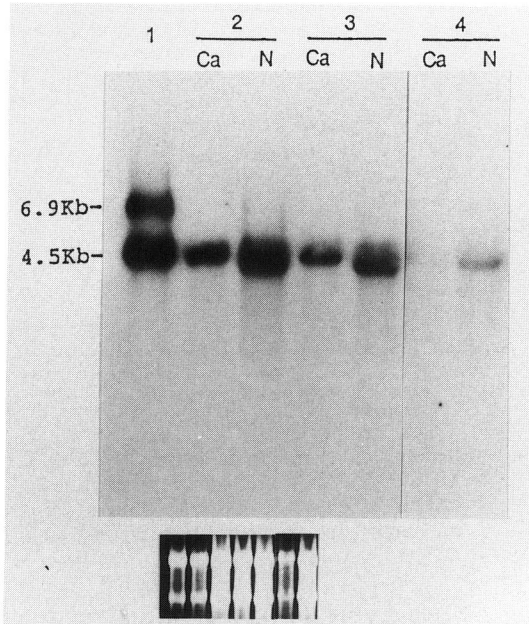


Fig. 4 Northern blot analysis of total RNAs from colonic cancers and adjacent normal tissues with oligonucleotide probe corresponding to part of the tandem repeat domain. Lane: 1, human gastric cancer cell line KATOIII; 2-4, patient No. 1-No. 3. Ca and N indicate colonic cancer and adjacent normal mucosa, respectively. Ethidium bromide staining is shown at the bottom of the figure.

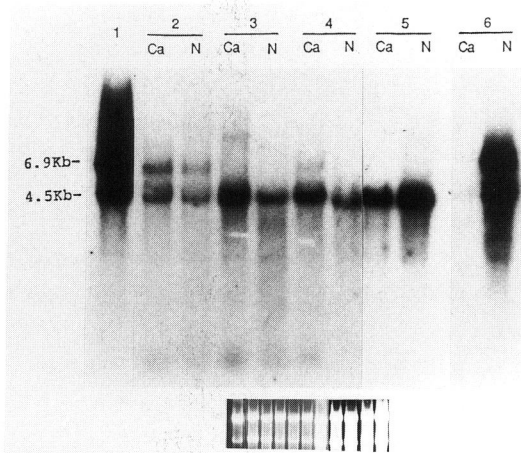


Fig. 5 Northern blot analysis of total RNAs from gastric cancers and adjacent normal tissues with oligonucleotide probe corresponding to part of the tandem repeat domain. Lane: 1, human breast cancer cell line MRK-nul, 2-6, patient No. 1-No. 5. Ca and N indicate gastric cancer and adjacent normal mucosa, respectively. Ethidium bromide staining is shown at the bottom of the figure.

となった。

3・4 消化管における PEM コア蛋白 mRNA の発現

PEM コア蛋白が実際に消化管において発現することを明らかにする目的で、胃癌および大腸癌患者の手術摘出組織より得た total RNA を用いてノーザンブロットを行った(Fig. 4, Fig. 5)。胃癌細胞株 KATOIII, 乳癌細胞株 MRK-nul, 胃癌患者 5 例, 大腸癌患者 3 例のいずれにおいても 4.5 kb の位置にバンドを認め、さらに KATOIII, MRK-nul および、3 例の胃癌患者(レーン 2, 4, 6)においては 6.9 kb の位置にもバンドを認めた。検索した限りにおいて癌部と非癌部における PEM mRNA の発現量は一定の傾向を示さず、個々の症例により異なっていた。例えば Fig. 4 に示す大腸組織については、レーン 3 の癌部において非癌部に比較して PEM コア蛋白 mRNA の発現が低下していた。また、Fig. 5 に示す胃癌患者の場合には、レーン 3 で癌部が非癌部より強く、レーン 6 では癌部が非癌部に比較して弱い mRNA を発現していた。

なお、成績は示さないが、internal control として β -actin mRNA の発現を Fig. 4 のレーン 1-4, および Fig. 5 のレーン 5, 6 において検討した。その結果、各レーン間の濃度差はエチジウムブロマイド染色とほぼ同様であったため、ここではエチジウムブロマイド染色所見のみを示した。

3・5 MUSE11 による免疫組織染色

さらに蛋白レベルでの発現を確認する目的で、大腸癌患者 4 例, 胃癌患者 3 例の手術により得た癌部および非癌部組織より凍結切片を作製し、MoAb MUSE11 を一次抗体に用いて免疫ペルオキシダーゼ染色を行っ

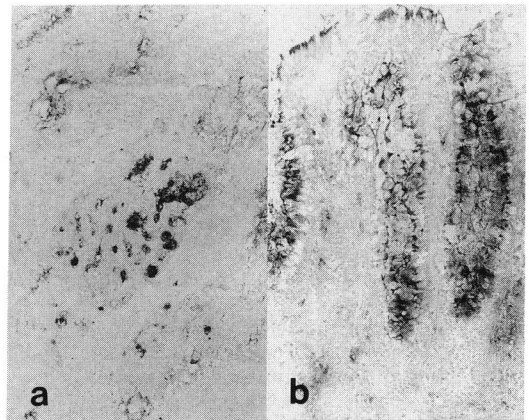


Fig. 6 Immunohistochemical staining of cancerous and non-cancerous frozen tissue sections with MUSE11. (a) Colonic cancer region. (b) Adjacent normal tissue. ($\times 235$)

た. その結果, いずれの症例でも癌部に強い染色性を認めると同時に, 非癌部においても明らかな染色性を認めた. Fig. 6 に大腸癌症例の染色所見を示す. 癌部においては, 細胞質及び分泌物が強く染色されているのに対し, 非癌部では大腸上皮の, 特に apical 部分に明らかな染色所見を認めた.

4 考 察

MUSE11 は胃癌患者腹水を免疫原として我々の教室で作製したマウスモノクローナル抗体 (IgG1) であり, 対応抗原は, 分子量約 300 Kd, PAS 染色陽性であることより高分子糖蛋白と考えられていた. また, 抗原決定基は, 1% 過ヨウ素酸, ノイラミニダーゼ処理に抵抗性であり, トリプシン, プロテアーゼ V8 処理に感受性であることから, 主にペプチド部分に存在することが示唆された⁶⁾. さらに一次抗体に精製 MoAb MUSE11, 二次抗体にビオチン標識 MoAb MUSE11 を用いたサンドイッチ酵素免疫測定が可能なることから, 対応抗原エピトープは同一分子上に複数個存在することが予測された⁶⁾.

一方 PEM^{18,19)} は, human milk fat globule membrane や乳癌細胞に対して作製されたいくつかのモノクローナル抗体の対応抗原分子であり, 分子量 250 Kd 以上, セリン, スレオニンに結合する O-グリコシド結合型糖鎖が約 50% を占めることからムチン様高分子糖蛋白と考えられた. 免疫学的検討から乳腺上皮および乳汁中に存在するのみならず, 転移を有する乳癌患者血清中において高値を示すことが知られていた²⁰⁻²²⁾.

1988 年 Gendler *et al.*⁵⁾ は乳癌細胞株から作製した cDNA ライブラリーを 3 種類の抗体でスクリーニングし, PEM コア蛋白 cDNA 断片のクローニングをおこない, その塩基配列を報告した. その後 Siddiqui *et al.*²³⁾ のグループも乳癌に特異性の高いモノクローナル抗体 DF3 を用いて, 乳癌細胞株 cDNA ライブラリーより同じく 60 bp の繰り返しドメインを有する cDNA 断片を得ている.

本研究においては, まず MoAb MUSE11 がこの PEM コア蛋白繰り返しドメインを認識する可能性を合成ペプチドを用いて示した. さらに, この点を確認するために, 正常人腎臓より作製した cDNA ライブラリーを, 繰り返しドメインの一部に相当するオリゴヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングし, このドメインを 10 個有する mucin 700 クローンを得, これを大腸菌を用いて組み換え蛋白として発現し, この蛋白と MoAb MUSE 11 が反応することを明らかにした.

mucin 700 クローンは, 10 個の繰り返しドメインのうち 8 個が同一であり, そのアミノ酸配列は, これまで Gendler *et al.*⁵⁾ や Kufe *et al.*^{23,24)} のグループが報告した繰り返しドメインと比較して 3 個のアミノ酸の置換を有していた. 最近, 乳癌細胞株の cDNA ライブラリーより full-length クローンを得た Hareuveni *et al.*²⁵⁾ の報告でも, これまでのクローンは 1 ヶ所異なったアミノ酸配列が得られている. このような繰り返しドメイン内の 1-3 個のアミノ酸配列の差異が, 組織特異性や癌化による変異を示すものか否かは現在のところ不明であり, 今後さらに数多くのクローンの解析が必要と思われる.

最近 Price *et al.*²⁶⁾ は合成ペプチドを用いて乳癌に対して作製された PEM コア蛋白を認識する 8 種類の抗体の epitope mapping を行い, いずれも PDTRPAPG-STAPPAHGVTSA の繰り返しドメインのうち, hydrophilic で β ターン上の PDTRPAP 部分の一部を認識することを報告した. しかし, ほぼ同様なペプチド部位を認識している抗体の間でも, その抗原特異性は必ずしも一致していない. すなわち, 乳汁中のムチンを化学的に処理して得たコア蛋白を免疫原として作製した MoAb SM-3²⁷⁾ は免疫組織染色において, 乳癌, 大腸癌, 肺癌, 卵巣癌などの癌細胞に明らかな反応性を有するが, 腎臓の尿細管や集合管などの一部の例外を除きほとんどの正常上皮細胞には反応を示さない.

Price *et al.*²⁶⁾ によると, この SM-3 抗体は PDTRP を認識しているが, ほぼ同様の部位, すなわち PDTRP および PDTRPA を認識するいくつかの抗体²⁸⁻³⁰⁾ は, これまでの報告から SM-3 のような高い癌特異性を示さず, 組織分布も異なっている事が知られている.

MUSE11 エピトープについても, J. Bara 博士 (フランス国立癌研究所) との共同研究において最近, PDTRP を含めた部分に T (スレオニン) 残基の末端糖鎖も一部関与する可能性が示唆された (私信). これらの点は抗体の特異性を考える上で, 糖鎖構造を含めた立体構造など, アミノ酸の一次構造以外の要因も考慮すべきことが示唆され, 更に詳細な分子解析が必要となろう.

mucin 700 クローンの 3' 側にはこれまでに報告のない, 41 bp の繰り返しドメインとは異なる翻訳部分, および 46 bp の非翻訳部分が含まれていた. 成績には示していないが, polymerase chain reaction (PCR) 法を用いてこのユニーク部位を増幅し, これをプローブとして乳癌細胞株より抽出した total RNA を用いてノーザンプロットを行ったところ, 4.5 kb, 6.9 kb 以外の

位置に複数本のバンドを検出した。また、mucin 700 をプローブに用いて行ったノーザンブロットではオリゴヌクレオチドプローブを用いた場合と同様、4.5 kb, 6.9 kb の位置にバンドを認めた。この事は、本クローンの3'側の配列は、PEM コア蛋白とは関係なく、cDNA ライブラリー作製時に認められる artificial gene fusion の結果と解釈された。

血清中の MUSE11 抗原はサンドイッチ酵素免疫測定法を用いたこれまでの検討^{6,7)}から、正常人血清に比べ、肺癌、胃癌、大腸癌などの消化器癌患者血清で高い陽性率を示す。また、これまでに PEM cDNA クローンが得られているのは、いずれも乳癌細胞株や乳癌組織より作製した cDNA ライブラリーからであった^{5,23,25)}。そこで、消化器癌患者より手術摘出された癌部および非癌部組織の total RNA を用いたノーザンブロットを行い、mRNA レベルでの PEM コア蛋白の発現を検討した。胃癌 5 例、大腸癌 3 例の検討で、癌部及び非癌部いずれにおいても約 4.5 kb の位置にバンドを認め、また、一部の症例では 6.9 kb の位置にもバンドを認めた。この二本のバンドは乳癌細胞株 MRK-nul においても認められ、その長さはこれまでの報告^{23,31)}と一致していた。癌部、および非癌部における mRNA の発現量は、エチジウムブロマイド染色による 28 S, 18 S のリボソーム RNA 量の差を考慮にいれても両者の間に明らかな差はなく、むしろ非癌部に高い発現を示す症例も認められた。さらにこの点を蛋白レベルでも確認する目的で、凍結組織切片を用いた免疫組織染色による検討を行った。これまで MUSE11 の免疫組織染色はホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて行われており、非癌部組織に対する反応はごく弱い⁶⁾とされており、筆者らも同様の結果を得ている。しかし、今回のように凍結組織切片を用いて検討すると、胃及び大腸の癌部のみならず、非癌部でも管腔内分泌物および apical 部分が明らかに染色された。このことは血中 PEM の腫瘍マーカーとしての出現機序を考える上で興味深い知見と思われた。すなわち、非癌部組織では apical 部分が染色されるのに対し、癌部においては分泌物に加えて細胞質も染色されることから、これまで carcinoembryonic antigen (CEA) において指摘されたのと同様に^{14,32,33)}、癌化による組織構築の変化や細胞の極性変化により、癌患者血清中に MUSE11 抗原量が増加する可能性も考えられる。

PEM の機能に関しては、これまで十分な検討はなされていないが、最近 Jerome *et al.*³⁴⁾ は、乳癌患者のリンパ節から得たリンパ球を乳癌細胞株 CAMA-1 で刺激

して作製した cytotoxic T-lymphocyte (CTL) line が CAMA-1 以外の乳癌細胞株や肺癌細胞株を標的とした細胞障害活性を示し、PEM コア蛋白が superantigen³⁵⁾ として働いている可能性を示唆している。PEM の免疫療法への応用を考える上で興味深い知見と思われる。

これまでの我々の MUSE11 抗原に関する詳細な検討にひき続いて、今回、MUSE11 抗原エピトープが PEM のコア蛋白部分に存在することを見出し、さらに PEM コア蛋白繰り返しドメインの一部を組み換え蛋白として大腸菌を用いて発現させることに成功した。今後は、これらの抗原や蛋白を用いて PEM の機能解析がさらに進むものと思われる。

5 要 約

1. PEM コア蛋白繰り返しドメインの cDNA 塩基配列から予測されるアミノ酸配列をもとに作製した合成ペプチドに MoAb MUSE11 は明らかな反応性を示した。
2. 正常人腎臓 cDNA ライブラリーを PEM コア蛋白繰り返しドメインの一部に相当するオリゴヌクレオチドプローブを用いてスクリーニングし、10 個の繰り返しドメインを有する mucin 700 クローンを得た。
3. mucin 700 クローンを大腸菌を用いて組み換え蛋白として発現したところ、MoAb MUSE11 はウエスタンブロットおよびサンドイッチ酵素免疫測定法において、本蛋白に対し明らかな反応性を示した。
4. 大腸癌及び胃癌組織より抽出した total RNA を用いたノーザンブロットによって、PEM コア蛋白 mRNA は癌部、非癌部のいずれにおいても発現しており、凍結切片を用いた免疫組織染色により蛋白レベルにおいてもこの点は確認された。

以上より、MUSE11 対応抗原決定基は、PEM コア蛋白の繰り返しドメイン上に存在し、本蛋白が胃、大腸上皮とその癌において発現することを明らかにした。

謝 辞

御指導、御校閲いただいた本学内科学第 1 講座 谷内 昭教授、ならびに組織検体を御提供いただいた札幌外科記念病院、山本直也院長、さらにご協力いただいた諸先生に深謝いたします。

本研究は文部省科学研究費補助金がん特別研究 I (02151056 谷内)及び重点領域研究(02262231 今井)および厚生省対癌 10 年戦略研究(徳永班, 谷内:高

久班, 今井)の補助によった。

文 献

- 腫瘍マーカーの新展開—分子レベルの最新知見と病理・臨床応用の現状—。 *病理と臨床* 8, (臨時増刊号) (1990)。
- 谷内 昭, 今井浩三: 腫瘍マーカーの現状と展望。 *消化器内科* 5, 315-321 (1990)。
- Magnani, J., Brockhaus, M., Smith, D. and Ginsberg, V.: A monosialoganglioside is a monoclonal antibody defined antigen of colon carcinoma. *Science* 212, 55-57 (1981)。
- Kannagi, R., Fukushi, Y., Tachikawa, T., Noda, A., Shin, S., Shigeta, K., Hiraiwa, N., Fukuda, Y., Inamoto, T., Hakomori, S. and Imura, H.: Quantitative and qualitative characterization of cancer-associated serum glycoprotein antigens expressing fucosyl or sialosylfucosyl type 2 chain polyactosamin. *Cancer Res.* 46, 2619-2626 (1986)。
- Gendler, S., Taylor-Papadimitriou, J., Duhig, T., Rothbard, J. and Burchell, J.: A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. *J. Biol. Chem.* 263, 12820-12823 (1988)。
- Ban, T., Imai, K. and Yach, A.: Immunohistological and Immunochemical characterization of a novel pancreatic cancer-associated antigen MUSE11. *Cancer Res.* 49, 7141-7146 (1989)。
- Yachi, A., Imai, K., Ban, T., Endo, T., Sugiyama, Y. and Hinoda, Y.: Immunodiagnosis of pancreatic cancer in the serum employing novel monoclonal antibodies. *J. Tumor Marker Oncol.* 2, 181-186 (1987)。
- 菱川法之, 辻崎正幸, 今井浩三: 合成 peptide を用いた抗 carcinoembryonic antigen (GEA)モノクローナル抗体の作製と GEA 上の抗原決定基の解析。 *札幌医学雑誌* 58, 295-305 (1989)。
- Davis, L. G., Dibner, M. D. and Battey, J. F.: Probing nucleic acid with labeled synthetic probes In: Davis, L. G., Dibner, M. D. and Battey, J. F.: Basic methods in molecular biology, 72-74, Elsevier science publishing Co., Inc., New York (1986)。
- Davis, L. G., Dibner, M. D. and Battey, J. F.: cDNA cloning into λ gt10 and λ gt11, In: Davis, L. G., Dibner, M. D., Battey, J. F.: Basic methods in molecular biology, 72-74, Elsevier science publishing Co., Inc., New York (1986)。
- Davis, L. G., Dibner, M. D. and Battey, J. F.: M13 cloning and sequencing, In: Davis, L. G., Dibner, M. D., and Battey, J. F.: Basic methods in molecular biology, 72-74, Elsevier science publishing Co., Inc., New York (1986)。
- Hinoda, Y., Imai, K., Ban, T., Endo, T. and Yach, A.: Immunochemical characterization of adenocarcinoma-associated antigen YH206. *Int. J. Cancer* 42, 653-658 (1988)。
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., and Rutter, W. J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299 (1979)。
- 高橋裕樹: 大腸癌及び大腸腺腫における Carcinoembryonic Antigen 及び Nonspecific Cross-reacting Antigen の遺伝子発現。 *札幌医学雑誌* 58, 87-98 (1989)。
- 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)。
- 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。 *札幌医学雑誌* 59, 129-141 (1990)。
- Kyte, J. and Doolittle, R. F.: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132 (1982)。
- Abe, M. and Kufe, D. W.: Identification of a family of high molecular weight tumore-associated glycoproteins. *J. Immunol.* 139, 257-261 (1987)。
- Hilkens, J., Buijs, F. and Ligtenberg, M.: Complexity of MAM-6, an epithelial sialomucin associated with carcinomas. *Cancer Res.* 49, 786-793 (1989)。
- Hayes, D. F., Sekine, H., Ohno, T., Abe, M., Keefe, K. and Kufe, D. W.: Use of a murine monoclonal antibody for detection of circulating plasma DF3 antigen levels in breast cancer patients. *J. Clin. Invest.* 75, 1671-1678 (1985)。
- Hilkens, J., Kroezen, V., Bonfrer, J. M. G., De Jong-Bakker, M. and Bruning, P. F.: MAM-6 antigen, a new serum marker for breast cancer monitoring. *Cancer Res.* 46, 2582-2587 (1986)。
- Price, M. R.: High morecular weight epithelial mucins as markers in breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 24, 1799-1804 (1988)。
- Siddiqui, J., Abe, M., Hayes, D., Shani, E., Yunis, E. and Kufe, D.: Isolation and sequenc-

- ing of a cDNA coding for the human DF3 breast carcinoma-associated antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **85**, 2320-2323 (1988).
24. Merlo, G. R., Siddiqui, J., Cropp, C. S., Liscia, D. S., Lidereau, R., Callahan, R. and Kufe, D. W.: Frequent alteration of the DF3 tumor-associated antigen gene in primary human breast carcinomas. **Cancer Res.** **49**, 6966-6971 (1989).
 25. Hareuveni, M., Tsarfaty, I., Zaretsky, J., Kotkes, P., Horev, J., Zrihan, S., Weiss, M., Green, S., Lathe, R., Keydar, I. and Wreschner, D. H.: A transcribed gene, containing a variable number of tandem repeats, codes for a human epithelial tumor antigen. **Eur. J. Biochem.** **189**, 475-486 (1990).
 26. Price, M. R., Hudecz, F., O'Sullivan, C., Baldwin, R. W., Edwards, P. M. and Tendler, S. J. B.: Immunological and structural features of the protein core of human polymorphic epithelial mucin. **Mol. Immunol.** **27**, 795-802 (1990).
 27. Girling, A., Bartkova, J., Burchell, J., Gendler, S., Gillett, C. and Taylor-Papadimitriou, J.: A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas. **Int. J. Cancer** **43**, 1072-1076 (1989).
 28. Taylor-Papadimitriou, J., Peterson, J. A., Arklie, J., Burchell, J. and Ceriani, R. L.: Monoclonal antibodies to epithelium-specific components of the human milk fat globule membrane: production and reaction with cells in culture. **Int. J. cancer** **28**, 17-21 (1981).
 29. Burchell, J., Durbin, H. and Taylor-Papadimitriou, J.: Complexity of expression of antigenic determinants, recognized by monoclonal antibodies HMFG-1 and HMFG-2, in normal and malignant human mammary epithelial cells. **J. Immunol.** **131**, 508-513 (1983).
 30. Heyderman, E., Strudley, I., Powell, G., Richardson, T. C. and Cordell, J. L.: A new monoclonal antibody to epithelial membrane antigen (EMA)-E29. A comparison of its immunocytochemical reactivity with polyclonal anti-EMA antibodies and with another monoclonal antibody, HMFG-2. **Br. J. Cancer** **52**, 355-361 (1985).
 31. Gendler, S. J., Burchell, J. M., Duhig, T., Lampion, D., White, R., Parker, M. and Taylor-Papadimitriou, J.: Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**, 6060-6064 (1987).
 32. Yachi, A., Imai, K., Fujita, H., Moriya, Y., Tanda, M., Endo, T., Tsujisaki, M., and Kawaharada, M.: Immunohistochemical distribution of the antigenic determinants detected by monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen. **J. Immunol.** **132**, 2998-3004 (1984).
 33. Rogers, G. T. and Keep, P. A.: CEA like activity in normal colon tissue. **Eur. J. Cancer** **16**, 127-131 (1979).
 34. Jerome, K. R., Barnd, D. L., Bendt, K. M., Boyer, C. M., Taylor-Papadimitriou, J., McKenzie, I. F. C., Bast, R. C. B., Jr. and Finn, O. J.: Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. **Cancer Res.** **51**, 2908-2916 (1991).
 35. White, J., Herman, A., Pullen, A., Kubo, R., Kappler, J. W. and Marrack, P.: The V β -specific superantigen staphylococcal elimination in neonatal mice. **Cell** **56**, 27-35 (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 仲川尚明