

## インターフェロン- $\gamma$ により発現の増強する分子 ICAM-1 に対する 新しいモノクローナル抗体の作製と遊離型 ICAM-1 の検出

平田博巳 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 New Monoclonal Antibody to Interferon- $\gamma$ Induced Molecule ICAM-1 and Detection of the Solubilized ICAM-1 Antigen with ELISA

Hiromi HIRATA and Kohzoh IMAI

Department of Internal Medicine (Section I), Sapporo Medical College  
(Chief : Prof. A. YACHI)

**ABSTRACT** MoAb HA58 (IgG1) was established by immunizing human colonic cancer BM314 cells, which were treated with IFN- $\gamma$ , to BALB/c mouse. Western blotting revealed that the MoAb HA58 recognizes a 85Kd molecule which is recognized by MoAb CL207 to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). Immunodepletion experiment showed that each antibody reacts with the different epitope on the same ICAM-1 molecule. Using this novel monoclonal antibody, the expression of the ICAM-1 antigen in the cell surface of 12 kinds of cancer cells was found to increase with IFN- $\gamma$ , which was detected with flow cytometry.

We established ELISA system for detecting the ICAM-1 antigen by using two MoAbs, CL207 and biotinylated HA58. We were able to detect, for the first time, a soluble form of the ICAM-1 antigen in spent medium of 11 kinds of cancer cell lines which was also increased with IFN- $\gamma$ . It was also increased by TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , although the amount was less than that of soluble ICAM-1 induced by IFN- $\gamma$ .

These findings suggest that the soluble form of ICAM-1 may play an important role in the immune response between tumor cells and the cells of immune system.

(Received January 18, 1990 and accepted January 30, 1990)

**Key Words:** ICAM-1, Interferon- $\gamma$ , Monoclonal antibody, Tumor cells, ELISA

### 1 緒 言

活性化 T リンパ球より産生される IFN- $\gamma$  の多様な機能のひとつに細胞表面抗原を修飾する作用が知られている。すなわち、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) class I, class II<sup>1)</sup> の誘導をはじめ、いくつかの分子の発現増強が報告されている<sup>2,3)</sup>。また、腫瘍関連抗原のひとつであり、最近細胞接着作用を有するとされる<sup>4)</sup> carcinoembryonic antigen (CEA) も IFN- $\gamma$  により発現が増強することが報告され<sup>5)</sup>、抗原提示や細胞間の認識に IFN- $\gamma$  が調節作用を示す可能性が注目されている。

一方、リンパ球や他の造血幹細胞に発現し、cytotoxic T lymphocyte (CTL) 活性や免疫応答に深く関与する表面抗原として、接着分子のひとつ lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) が知られている。LFA-1 はフィブロネクチンリセプターなど、他の接着分子と同様、リセプターとして作用しており、このリガンドのひとつが intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) であることが判明している<sup>6)</sup>。ICAM-1 は、フィブロネクチン、ラミニン等の細胞外マトリックスと同様に細胞の接着、分化に関与し、さらには癌の転移にも関与<sup>7)</sup> していると考えられ、しかも

その発現はIFN- $\gamma$ により増強することが明らかとなっている<sup>9)</sup>。

我々はこれまで免疫治療における腫瘍細胞上の標的抗原を検索する目的で、IFN- $\gamma$ によりMHC抗原以外にも発現の増強する表面抗原があることに着目し、これに対するMoAbの作製および解析を試みてきた<sup>9,10)</sup>が、最近、IFN- $\gamma$ 処理ヒト大腸癌細胞BM314を免疫原として新しく作製されたMoAb中から、上述のICAM-1分子と反応するMoAb HA58の確立に成功した。本研究においては、このMoAbの検討とともに、これを用いてICAM-1抗原の測定系を確立し、各種癌細胞におけるICAM-1抗原の発現とそれに及ぼすIFN- $\gamma$ 等の影響を検討し、興味ある知見を得たので報告する。

## 2 研究方法

### 2.1 モノクローナル抗体 (MoAb)

#### 2.1.1 HA58

IFN- $\gamma$  200 U/ml で24時間培養したヒト大腸癌細胞BM314をBALB/cマウスに免疫し脾細胞とマウスミエローマ細胞X63-Ag8.653を用いて守谷・今井<sup>11)</sup>の記載に従い細胞融合を行った。抗体活性の検討は、IFN- $\gamma$ 処理および非処理BM314のcell lysateをプレートに固相化し、まず、ハイブリドーマの上清を、次に二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス免疫グロブリンをそれぞれ反応させ、これをO-フェニレンジアミンにて発色させるenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)によった。IFN- $\gamma$ 処理BM314とよく反応し、非処理BM314とはほとんど反応しないハイブリドーマHA58を選択した。次に型のごとく<sup>12)</sup>BALB/cマウスを用いて腹水を採取し、33%硫酸塩析後、DEAEクロマトグラフィーを用い抗体を精製した。MoAb HA58はIgG1であった。

#### 2.1.2 CL207

我々との共同研究によりNew York Medical College (Ferrone教授)において、Matsuiら<sup>13)</sup>により作製されたMoAb CL207(IgG1)については、IFN- $\gamma$ 処理ヒトメラノーマ細胞Colo38を免疫原としており、IFN- $\gamma$ 処理Colo38と強く反応し、非処理のColo38とはほとんど反応しない。この抗体がICAM-1を認識していることはごく最近判明<sup>7)</sup>した。

#### 2.1.3 その他のモノクローナル抗体

ヒトMHC class Iおよびclass II抗原に対するMoAb CR11-115 (IgG1) およびHU-20 (IgG1) は、それぞれFerrone教授(New York Medical College) および協坂明美博士(北大第一病理)より供与された。

AI206 (IgG1)は、腺癌関連モノクローナル抗体YH206に対する抗イディオタイプ抗体<sup>14)</sup>であり、またMT008はCEAに対するMoAb (IgG3)<sup>15)</sup>であり、S1はヒト肝癌細胞c-Hc-4を免疫原として作製され、血型H (II型)およびYハプテンを認識するMoAb (IgG2a)<sup>16)</sup>であり、いずれも当教室で作製された。

### 2.2 モノクローナル抗体の<sup>125</sup>I-標識およびビオチン化

MoAbの<sup>125</sup>I-標識にはクロラミンT法<sup>17)</sup>を用いた。また、抗体のビオチン化はGuesdon *et al.*の方法<sup>18)</sup>に従った。

### 2.3 ヒト培養細胞

大腸癌細胞としてBM314, WiDr, 胃癌細胞としてMKN45, KATO III, 肝癌細胞としてc-Hc-4, c-Hc-20, 膵癌細胞としてPanc-1, PK-1, 肺癌細胞としてHLC-1, T cell lineとしてJurkat, MT-1, B cell lineとしてRPMI1778, Myeloid cell lineとしてK562, MZ-1を10%非働化胎仔牛血清(fetal calf serum: FCS)加RPMI1640培養液(GIBCO, USA)(以下10%FCS-RPMI1640)中で37°C, 5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養維持した。

### 2.4 抗原の抽出

IFN- $\gamma$ 処理BM314細胞 $2 \times 10^7$ を1mlの冷リン酸緩衝食塩液(PBS)に懸濁し、凍結融解後ホモゲナイザーを用いてcell lysateを作製し、12,000回転で5分間遠沈後の上清を抗原抽出物とした。

### 2.5 インターフェロン- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) および他のサイトカインならびに分化誘導因子

ヒト型recombinant IFN- $\gamma$ は東レより供与をうけた。他のサイトカインとしてinterleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , Collaborative Research), interleukin-2 (IL-2, 味の素より供与), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , Genzym)を使用し、またphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma), dimethyl sulfoxide (DMSO, 関東化学)を分化誘導物質として使用した。

### 2.6 フローサイトメトリー

MoAb HA58, CL207の各種細胞表面での反応をEPICS (Coulter Electronics, USA)を用いて検索した。IFN- $\gamma$ 処理および非処理細胞( $1 \times 10^6$ )にHA58およびCL207 10  $\mu$ g/mlを一次抗体として4°C, 60分反応させ、PBSで2回洗浄後、二次抗体として40倍希釈したFITC標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン(DAKO, Denmark)を4°C, 30分反応させ、3回洗浄後、約1mlの冷PBSに懸濁させて、検索試料とした。抗体の各細胞表面抗原との反応は、横軸に蛍光強度、縦軸に細胞数として表現された。陽性率は抗体未使用

のコントロール試料の陽性率を1%未満に設定し、蛍光強度がこの条件を越える細胞の%として表した。

この際、使用するサイトカイン、分化誘導物質等は IFN- $\gamma$  200 U/ml の場合は、24 時間および 48 時間、また IL-1 $\beta$  20 half maximum unit (hmu)/ml, IL-2 1000 U/ml, TNF- $\alpha$  500 U/ml, PMA50 ng/ml, DMSO 1.25% の場合には、それぞれ 48 時間培養細胞に加えた。

## 2.7 結合試験

IFN- $\gamma$  の濃度による表面抗原の誘導能を検索する目的でヒト大腸癌細胞 BM314 ( $5 \times 10^5$ ) に IFN- $\gamma$  0, 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 あるいは 4000 U/ml を添加して 24 時間培養後、 $5 \times 10^5$  個の細胞を minimum essential medium (MEM) により洗浄後、 $^{125}\text{I}$ -標識 HA58 を室温 2 時間反応させ、PBS で洗浄後、その結合能を  $\gamma$ -counter (LKB WALLAC 80000, Sweden) により測定した。また、IFN- $\gamma$  との培養時間による誘導能の変化を検索するため、IFN- $\gamma$  200 U/ml を加えて 30 分, 1, 2, 4, 8, 24, 48 および 72 時間培養後、 $5 \times 10^5$  個の細胞に対し、同様に  $^{125}\text{I}$ -標識 HA58 を反応させ、その結合能を  $\gamma$ -counter により測定した。

## 2.8 結合抑制試験

MoAb HA58 および CL207 のエピトープの異同を検索する目的で、非標識 MoAb を用いた結合抑制試験を行った。ヒト大腸癌細胞 BM314 ( $5 \times 10^5$ ) に、非標識 MoAb として CR11-115 (抗 MHC class I 抗体), HU-20 (抗 MHC class II 抗体), HA58 あるいは CL207 を 4°C, 1 時間反応させ、洗浄後、 $^{125}\text{I}$ -標識 HA58 および CL207 を室温で 2 時間反応させ洗浄後、各標識抗体の結合能を  $\gamma$ -counter にて測定した。

## 2.9 抗原の免疫化学的検討

### 2.9.1 ウェスタン・ブロット法

IFN- $\gamma$  処理 BM314 の cell lysate 200  $\mu\text{g}$  を粗抗原として sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE) で 7.5% ゲルに展開後、Ban *et al.*<sup>19)</sup> の方法に従ってゲルよりニトロセルロース膜へ転写し、各抗体を用いて、酵素抗体間接法にて抗原を検出した。

### 2.9.2 免疫沈降法

MoAb HA58 および MoAb AI206, 各 10 mg を CNBr-activated Sepharose 4B 2 ml にそれぞれ固相化し、それを 1 ml ずつ 2 つに分けた。これに IFN- $\gamma$  処理 BM314 抽出抗原 1 mg をそれぞれのビーズ 1 ml と 4°C, 一夜反応させ、一回吸収後、再度残りの固相化したビーズ 1 ml と 4°C, 一夜反応させ、吸収後の抽出抗

原をそれぞれ HA58 吸収抗原および AI206 吸収抗原とした。それぞれの吸収抗原 200  $\mu\text{g}$  を用いてウェスタン・ブロット法を施行し、MoAb CL207 との反応を確認し、MoAb CL207 と MoAb HA58 との対応抗原の異同を検索した。

## 2.10 ビオチン化 MoAb を利用した ELISA

既報<sup>20)</sup> に準じて抗原の測定を試みた。MoAb HA58, CL207 をそれぞれ 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で 4°C, 一夜、反応させて、96 穴マイクロタイタープレートのビーズに固相化後、3% ウシアルブミン (bovine serum albumin) 加 PBS により 37°C, 2 時間ブロックした。これに IFN- $\gamma$  処理 BM314 の cell lysate 1000  $\mu\text{g}$ , 500  $\mu\text{g}$ , 100  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$  を抗原としてそれぞれ、4°C, 一夜反応させ、次に二次抗体としてビオチン化 HA58, CL207 を 37°C, 2 時間反応させた。さらに、1000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識アビジン (VECTOR, USA) を 37°C, 1 時間反応させた後、O-フェニレンジアミンで発色させ、492 nm で吸光度を測定した。また、各種培養細胞上清中の抗原量も、同様にして測定した。なお、肺癌細胞株 Panc-1 培養上清を標準とした場合に、OD 0.01 より OD 1.50 の間は直線性を示し、この間で OD 値は比較可能であった。

## 3 研究成績

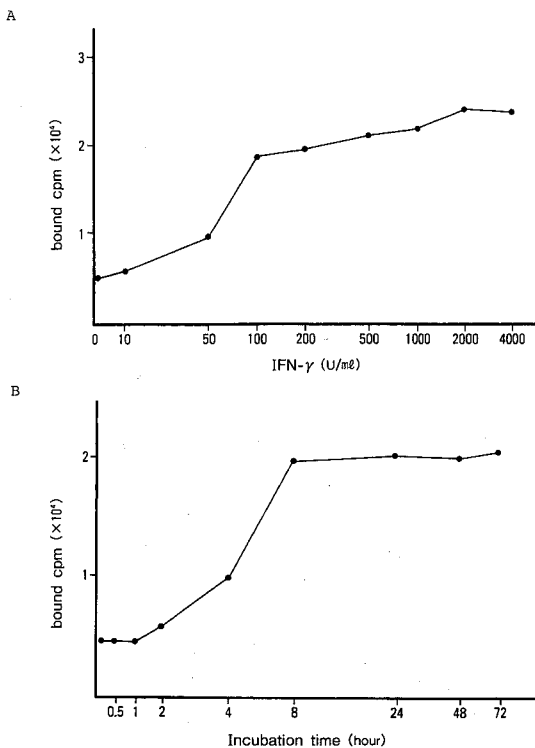
### 3.1 IFN- $\gamma$ による各種腫瘍細胞表面抗原の発現の増強

#### 3.1.1 結合試験

$^{125}\text{I}$ -標識抗体を用いた実験において、MoAb HA58 は IFN- $\gamma$  非処理 BM314 細胞とはほとんど反応しないが、処理後強い反応性を示した (Fig. 1)。またその対応エピトープは IFN- $\gamma$  の濃度依存的に増加することが明らかとなった (Fig. 1A)。しかし IFN- $\gamma$  100 U/ml 以上では、抗原の発現の増強は軽度であり、以後の実験では 200 U/ml を用いることとした。一方、IFN- $\gamma$  200 U/ml で細胞を培養した場合、対応エピトープは Fig. 1B に示すごとく 8 時間まで増加を認め、以後はほぼ plateau の状態となることが明らかとなった。

#### 3.1.2 フローサイトメトリーによる MoAb HA58 の反応性の変化

フローサイトメトリーを用いてこの点をさらに検討した。Fig. 2 に IFN- $\gamma$  非処理および IFN- $\gamma$  処理後の各種の癌細胞 (大腸癌 2 種, 胃癌 2 種, 肺癌 2 種, 肝癌 2 種, 肺癌 1 種, 血液系細胞 5 種) のフローサイトメトリーでの反応の陽性率をまとめて示した。血液系細胞の一部を除いて、IFN- $\gamma$  処理後、明瞭な反応性の



**Fig. 1** Increase in the antigen of the colonic cancer BM314 cells induced by IFN-γ treatment: analysis with <sup>125</sup>I-MoAb HA58.  
 A. Effect of the concentration of IFN-γ (incubation time: 24 hours)  
 B. Effect of the incubation time (IFN-γ 200 U/ml)

増強を認めた (Fig. 2). RPMI1778 (B cell) および MT-1 (T cell) では処理前より対応抗原を表出しており、処理後も変化はみられなかった。

**3・1・3 フローサイトメトリーによる MoAb HA58 および CL207 の反応性の比較**

大腸癌細胞 BM314 および肝癌細胞 c-Hc-4 について IFN-γ 非処理および IFN-γ 処理後の MoAb HA58 および MoAb CL207 との反応性を Fig. 3 に示した。MoAb HA58 と同様に MoAb CL207 においても、IFN-γ 処理によりその反応性は明瞭な増強を認め、しかも、MoAb HA58 と MoAb CL207 とは、その反応パターンが極めて類似していた。この傾向は、Fig. 2 に示した他の癌細胞においても同様であった。この成績は MoAb HA58 と MoAb CL207 とが、同一の対応抗原を認識している可能性を示唆する。

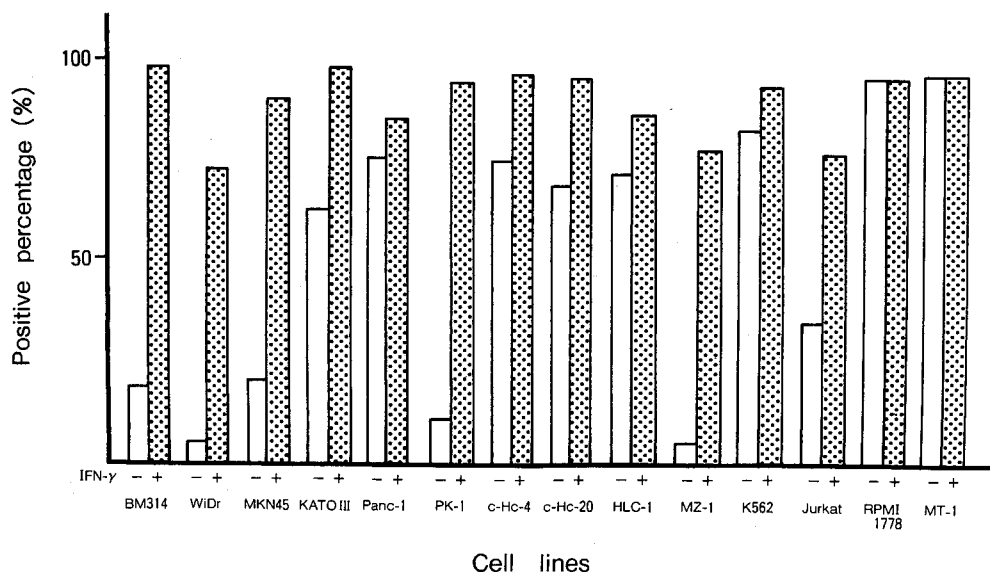
**3・2 対応抗原の免疫化学的検索**

**3・2・1 ウェスタン・ブロット法**

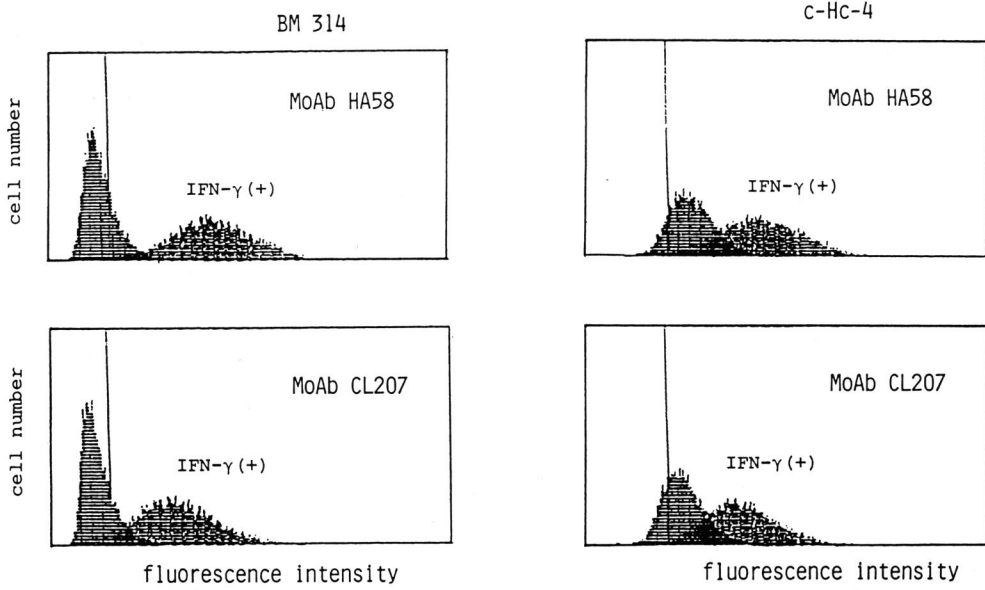
次に、MoAb HA58 および CL207 の対応抗原を検索するためウェスタン・ブロット法を施行した。IFN-γ 処理 BM314 抽出物を抗原としたが、Fig. 4A に示すように HA58 と CL207 とは 85 Kd の同一分子量の抗原を認識することが判明した。

**3・2・2 免疫沈降法および免疫吸収 (immunodepletion) 試験**

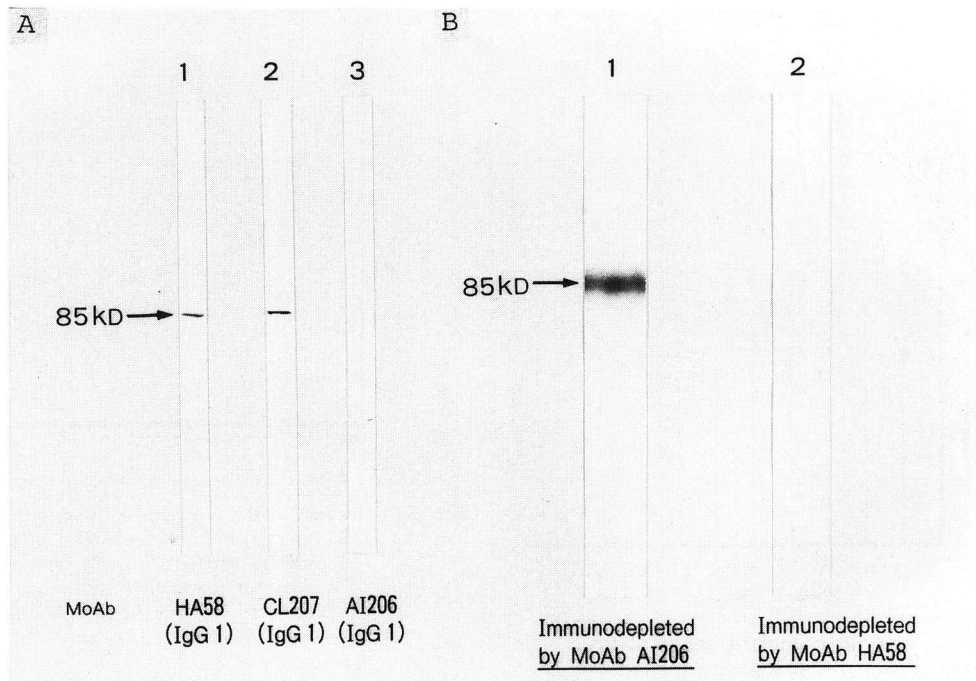
さらに HA58, CL207 の対応抗原の異同を検索するため、IFN-γ 処理 BM314 抽出物を固相化 HA58 で免



**Fig. 2** Increase in the cell surface antigen of cancer cell lines induced by IFN-γ: detection of the antigen by MoAb HA58 using flow cytometry.



**Fig. 3** Increase in the cell surface antigen of the colonic cancer BM314 cells and hepatoma c-Hc-4 cells induced by IFN- $\gamma$ : detection of the antigen by MoAb HA58 and CL207 using flow cytometry.



**Fig. 4** Western blotting analysis of the corresponding antigen detected by MoAb HA58.  
 A. The extract from IFN- $\gamma$  treated colonic cancer BM314 cells was used as an antigen under reducing conditions. Reactivity of the antigen with MoAb HA58 (lane 1), MoAb CL207 (lane 2) and MoAb AI206 (lane 3) was assessed by Western blot (7.5% gel).  
 B. Immunodepletion experiment. The extract from IFN- $\gamma$  treated colonic cancer BM314 cells had been immunodepleted by either MoAb AI206 (IgG 1) (lane 1) or MoAb HA58 (IgG 1) (lane 2) before the remaining ICAM-1 extract was analyzed by Western blotting under reducing conditions using MoAb CL207 to ICAM-1 molecule (7.5% gel).

疫沈降反応により吸収し、その残りの抗原を用い、ウェスタン・ブロット法にて MoAb CL207 との反応を試みた。Fig. 4B に示すごとく免疫吸収した抗原では CL207 との反応が消失した。一方、同様の抽出物を対照 MoAb AI206 で吸収した場合には、MoAb CL207 は吸収前と同様に反応性を示した。以上の成績は MoAb HA58 と CL207 とが同一の対応抗原 (ICAM-1) を認

識していることを強く示唆している。

3・2・3 結合抑制試験

次に MoAb HA58, CL207 それぞれが認識する対応抗原のエピトープの検索を行った。<sup>125</sup>I-標識 HA58 の BM314 への結合は HA58 以外の cold antibody (MHC class I および class II に対する MoAb) では抑制されず、かつ、MoAb CL207 でも抑制されなかった

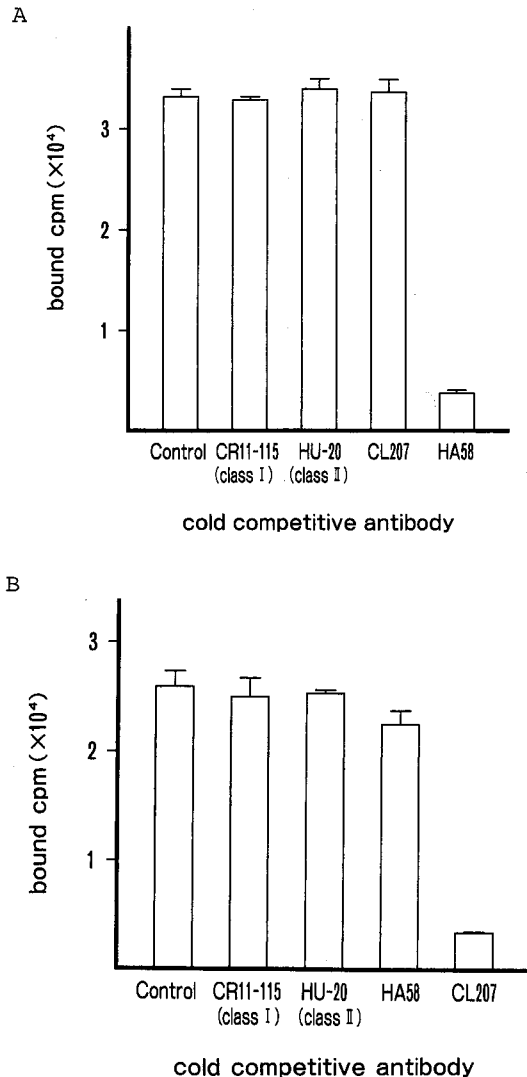


Fig. 5 Binding inhibition assay to examine the difference of the epitopes recognized by MoAb CL207 and MoAb HA58. Colonic cancer BM314 cells treated with IFN- $\gamma$  were used as target cells.  
 A. Reactivity of the cells with <sup>125</sup>I-MoAb HA58  
 B. Reactivity of the cells with <sup>125</sup>I-MoAb CL207

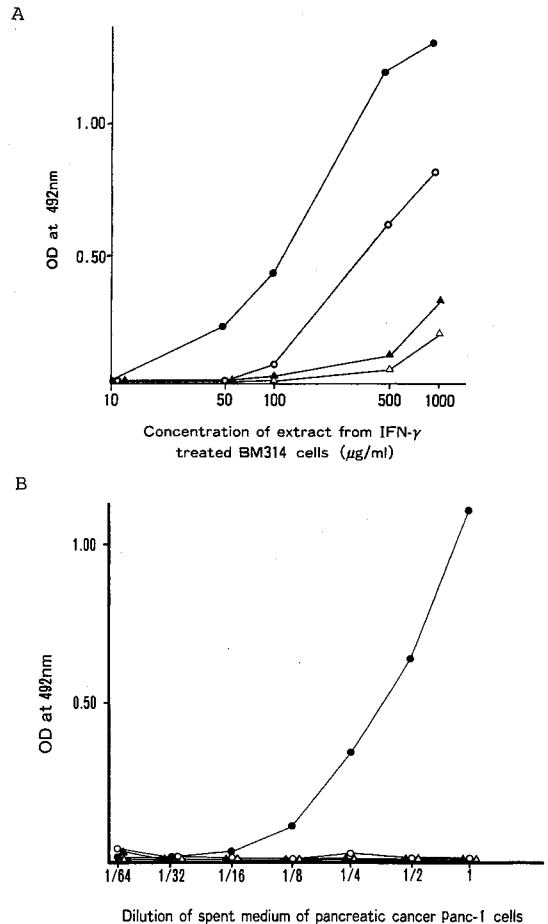


Fig. 6 Detection of the ICAM-1 antigen with ELISA.  
 A. Comparison of the sensitivity of detecting ICAM-1 antigen using biotinylated MoAbs in "sandwich" ELISA. Various concentrations of the extract from IFN- $\gamma$  treated BM314 cells were used as antigens.  
 ●-● CL207-antigen-biotinylated HA58  
 ○-○ HA58-antigen-biotinylated CL207  
 ▲-▲ HA58-antigen-biotinylated HA58  
 △-△ CL207-antigen-biotinylated CL207  
 B. Detection of the solubilized ICAM-1 antigen using biotinylated MoAbs. MoAb CL207 and biotinylated MoAb HA58 (●-●), AI206 (○-○), MT008 (▲-▲), or S1 (△-△) were used.

が, HA58 で著明な抑制を認めた (Fig. 5A). 一方  $^{125}\text{I}$ -標識 CL207 の結合も上記の各種抗体および HA58 では抑制されず, MoAb CL207 でのみ明らかな抑制を認めた (Fig. 5B). これらのことより, HA58 と CL207 とはそれぞれ異なるエピトープを認識していることが判明した.

### 3.3 ICAM-1 抗原の測定

以上の結果から, MoAb HA58 と MoAb CL207 とは対応抗原が 85 Kd の同一抗原分子 (ICAM-1) で, それぞれ異なるエピトープを認識することが判明したので, この 2 つの MoAb HA58, CL207 を用いて抗原の測定を試みた.

#### 3.3.1 ELISA の確立

IFN- $\gamma$  処理 BM314 抽出物を粗抗原として, ELISA により抗原を測定した. その結果, CL207-ビオチン化 CL207, HA58-ビオチン化 HA58 を用いた測定系では, ほとんど抗原の検出はできなかったのに対し, HA58-ビオチン化 CL207 ならびに CL207-ビオチン化 HA58 を組み合わせた系で抗原の測定が可能であった (Fig. 6A). また後者の系が最も感度がよいと判断されたので, 以下の抗原測定には CL207-ビオチン化 HA58 の測定系を用いた.

さらに, ヒト膵癌細胞 Panc-1 の培養上清を段階希釈

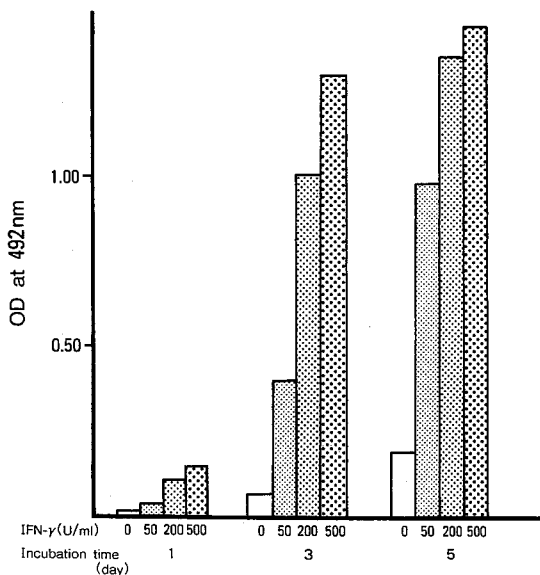


Fig. 7 Detection of the ICAM-1 antigen in the spent medium of cancer cells with ELISA. Effect of the concentration and incubation time of IFN- $\gamma$  upon the accumulation of ICAM-1 was compared. The spent medium of gastric cancer MKN45 cells was used as an antigen.

して抗原の測定を試みたところ, Fig. 6B に示すごとく, 培養上清中の可溶性抗原も測定可能であることが示された. この場合, HA58 以外の他のビオチン化抗体では抗原が検出できないことから, この測定系は ICAM-1 抗原を特異的に検出していると考えられた.

#### 3.3.2 各種癌細胞培養上清中の ICAM-1 抗原の測定

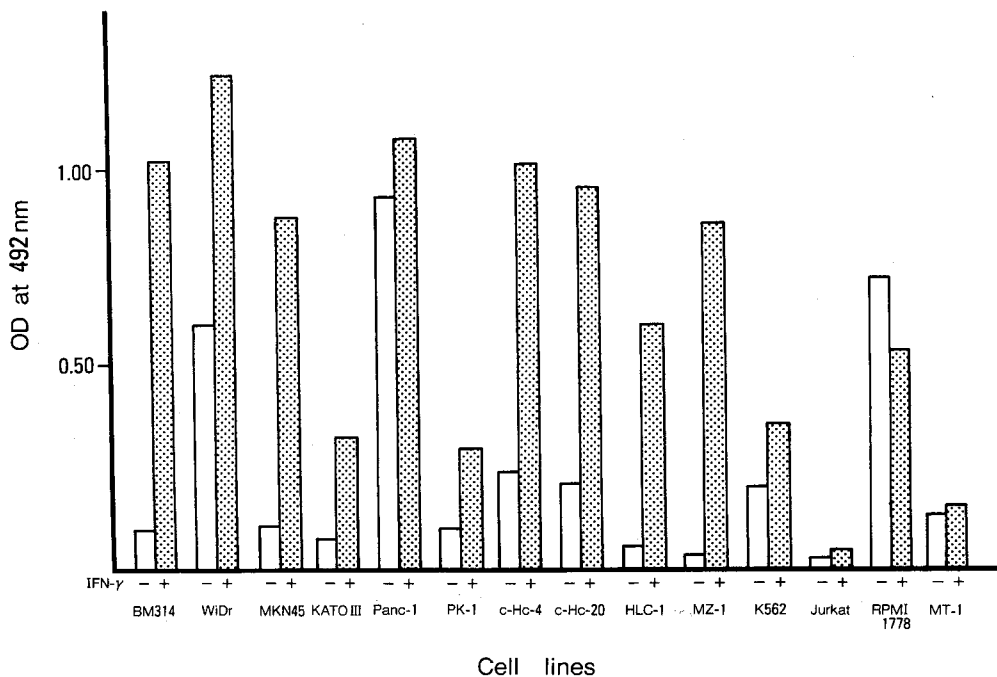
上述のように培養上清中に ICAM-1 抗原が存在していることが判明したため, さらに詳細な検討を加えた. すなわち, ヒト胃癌細胞 MKN45 ( $4 \times 10^5$ ) に, IFN- $\gamma$  を 0, 50, 200 あるいは 500 U/ml 加え, 1, 3, 5 日培養した後の培養上清中の抗原量を測定した. Fig. 7 に示すごとく, IFN- $\gamma$  の濃度と培養日数に依存して培養上清中の抗原量は, 増加を認めた.

次に各種癌細胞について検討した成績を Fig. 8 に一括して示した. すなわち細胞  $4 \times 10^5$  を IFN- $\gamma$  200 U/ml 添加, 非添加で 72 時間培養後の  $1 \times 10^6$  個あたりの培養上清中の抗原量を測定したところ, 各細胞間で差は認めるが消化器系の癌細胞 (BM314, MKN45, WiDr) では, IFN- $\gamma$  により培養上清中の ICAM-1 抗原量は著明な増加を認め, 同時に施行したフローサイトメトリーでの表面抗原の発現 (Fig. 2) の増加と平行する傾向が認められた. しかし詳細にみると (Fig. 9), 肝癌細胞 (c-Hc-4, c-Hc-20) や肺癌細胞 HLC-1 では表面抗原の増加がむしろ軽度であるが培養上清中の抗原の増加は著明であった. また膵癌細胞 PK-1 のように表面抗原の増加が著しいにもかかわらず培養上清中の抗原の release は少ないものもみられた. 一方, 血液系の細胞 (T cell 系 2 種, B cell 系 1 種, 単球系 1 種, 骨髄系 1 種) では MZ-1 をのぞいて IFN- $\gamma$  による影響はあまり受けないように思われた.

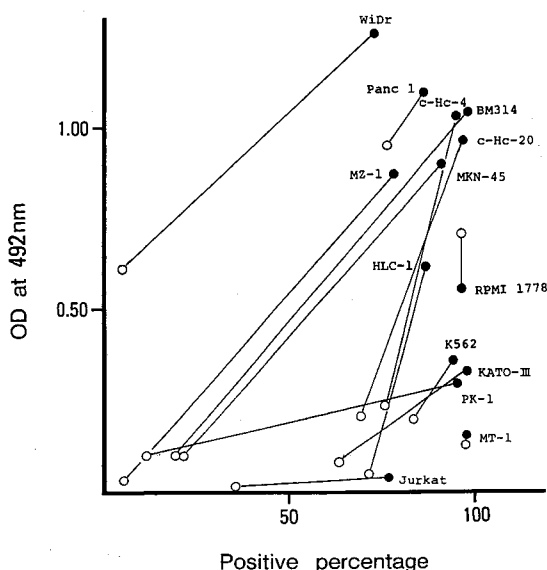
#### 3.3.3 各種サイトカインおよび分化誘導因子の影響

BM314 細胞  $4 \times 10^5$  に 2.5 に示した各種のサイトカイン等を添加し 48 時間後の培養上清中の抗原量を測定した. Fig. 10 に示すごとく, 培養上清中の抗原量は IFN- $\gamma$  において最も強く, また TNF- $\alpha$  ならびに IL-1 $\beta$  においても軽度の増加を認めた. 他の物質 (IL-2, PMA, DMSO) では増加を認めなかった. また, この成績はフローサイトメトリーでの細胞表面の抗原量の発現 (Fig. 10 下段) との関連性を示唆するものであった.

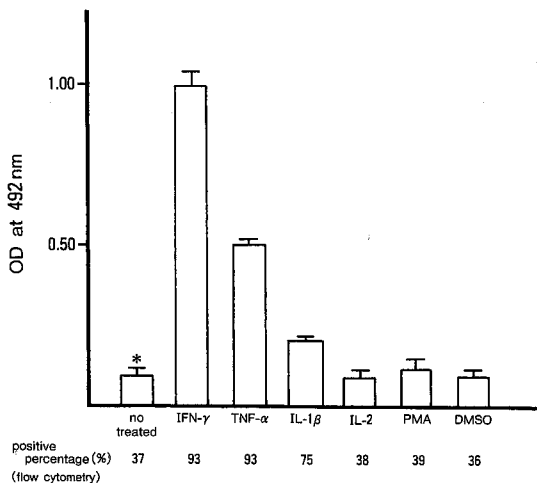
以上より, ICAM-1 抗原は IFN- $\gamma$  により程度の差はあるが各種癌細胞表面に発現の増強を認め, かつ, それと関連して培養上清中に遊離した型で存在することが明らかとなった. さらに TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  には



**Fig. 8** Detection of the ICAM-1 antigen in the spent medium of cancer cells with ELISA. ICAM-1 antigen in the spent medium of cancer cells which were incubated for 72 hours with and without IFN- $\gamma$  (200 U/ml) was assessed by ELISA.



**Fig. 9** Relationship between the expression of ICAM-1 antigen on cancer cells and the level of ICAM-1 antigen in the spent medium before (○) and after (●) cells were treated with IFN- $\gamma$ .



**Fig. 10** The level of ICAM-1 antigen in the spent medium and the expression of ICAM-1 antigen on the cell surface of colonic cancer BM314 cells treated with various cytokines and differentiation-inducing factors. (\*) denotes standard deviation. The amount of ICAM-1 antigen in the spent medium treated with either IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , or IL-1 $\beta$  is significantly higher than that of untreated cells ( $P < 0.01$ ).



軽度ではあるが ICAM-1 抗原増強作用のあることが示唆された。

#### 4 考 察

我々は IFN- $\gamma$  が細胞表面の抗原を modulate し MHC class I, class II<sup>1)</sup>をはじめ, IL-2 リセプター<sup>21)</sup>, TNF リセプター<sup>22)</sup>等のリセプター群, さらには腫瘍関連抗原の発現<sup>5)</sup>を増強することに着目し, 特に腫瘍細胞において, IFN- $\gamma$ により細胞表面に誘導される新たな分子への MoAb の作製を試みてきた<sup>9)</sup>. そのためにまず, IFN- $\gamma$ 処理したヒトメラノーマ細胞 Colo38 を免疫原として MoAb CL207 を作製し<sup>13)</sup>, 次に本研究で述べたごとく IFN- $\gamma$ 処理したヒト大腸癌細胞 BM314 を免疫原として MoAb HA58 を作製することに成功した. 興味あることに, フローサイトメトリーでの我々の検索により, これら MoAbs の対応抗原は免疫原として用いた細胞だけでなく各種の癌細胞において, IFN- $\gamma$ により発現の増強を示すことが明らかとなり, 両 MoAbs の対応抗原は広く種々の癌細胞表面に発現し, かつ IFN- $\gamma$ により発現の増強を認めることから癌細胞にとって重要な機能を担う分子であることが予想された.

これら抗原の解析を試みている過程で, 極めて興味あることに, MoAb CL207 が ICAM-1 を認識することが判明した<sup>7,23)</sup>. ICAM-1 は, LFA-1<sup>24)</sup>のリガンドのひとつであることが明らかとなっており<sup>6,25)</sup>, 我々が認めた種々の癌細胞だけでなく, 正常の上皮細胞, 内皮細胞等にもその発現が知られている<sup>26)</sup>. LFA-1 に関しては, それが CTL と標的細胞との結合や CTL 活性発現に重要であることが明らかにされているが, さらに種々の細胞間接着に重要な分子<sup>27)</sup>であること, すなわち, NK 活性, LAK 活性の発現<sup>28)</sup>, T cell の活性化<sup>29)</sup>に必要であることが報告されている. また, 最近 LFA-1 が T cell receptor と crosslink して T cell receptor からの細胞内刺激伝達を受けることで, 抗原特異的リンパ球接着および, その接着強度が調節されている可能性<sup>30)</sup>が示されており, LFA-1 の免疫応答における重要性とその機序とが解明されつつある. 従って LFA-1 のリガンドのひとつである ICAM-1 も, 主として標的細胞側から, 細胞間接着を介して, 腫瘍免疫を含む免疫応答に重要な役割を果たしていることが十分予想される.

本研究においては, MoAb HA58 も MoAb CL207 と同様に ICAM-1 (85 Kd) を認識していることが明らかにされた. 成績には示していないが, 他の抗 ICAM-1 MoAb RR1/1 (T. A. Springer 博士からの供与によ

る)との immunodepletion 試験においても, MoAb HA58 が ICAM-1 を認識していることを確認している. また, 注目すべきことには, MoAb HA58 と CL207 は ICAM-1 分子の異なるエピトープを認識することが明らかにされた.

さらに ICAM-1 は大多数の培養細胞株において, IFN- $\gamma$ により著明な発現の増強を認めることも確認されたが, 本研究においてはじめて, これらの分子は細胞表面から遊離ないしは分泌されていることが判明した. すなわち 2 種類の MoAb を用いて ICAM-1 の定量法を確立したが, 培養上清中に存在する ICAM-1 の量は IFN- $\gamma$ 処理後に著しく増加することを認めた. しかもその増加は細胞表面における表出度の増加と関連性のあることがうかがわれた.

これらの成績は *in vitro* において得られたものであるが, *in vivo* においてもこのような現象がみられるとすれば, 腫瘍細胞とエフェクター細胞群との相互関係を考える上で重要な現象といえよう. すなわち, 第 1 に, IFN- $\gamma$ 投与に伴う腫瘍細胞表面における ICAM-1 の表出増加は, ICAM-1 が LFA-1 のリガンドであることを考えあわせると, エフェクター細胞側よりみてその殺細胞効果を発揮するのに都合がよいことになろう. つまり CTL, LAK および NK 細胞等が標的細胞に結合しやすい条件を作り出すことが考えられる. 他方, 第 2 に腫瘍細胞からの ICAM-1 分子の放出は, エフェクター側の LFA-1 分子と結合して, その抗腫瘍効果をむしろ阻止する可能性も考えられる. このように ICAM-1 分子は, 腫瘍細胞側よりみると増殖に都合の悪い状況とむしろ好都合な状況の両面を生ぜしめる可能性があるとするれば, これがいかなる機序により調節されるのかを今後明らかにする必要がある.

一方, ICAM-1 が癌の転移に関与している可能性を示唆する報告がいくつか認められる. すなわち, Maio M. *et al.*<sup>7)</sup>はメラノーマ細胞 MeWo と metastatic variant である MeM50-10 で IFN- $\gamma$ による ICAM-1 の誘導の程度を検索したところ, MeM50-10 においては MeWo に比べ ICAM-1 の発現は増強し, また, 原発巣より転移巣において ICAM-1 の発現増強を認めたとしており, ICAM-1 が転移に関与する可能性を示唆している. また, ICAM-1 の発現がメラノーマ細胞の腫瘍の増大に伴い増加し, これが転移を促進する可能性を示唆する報告もある<sup>31)</sup>.

従って腫瘍部へのリンパ球の浸潤は, ICAM-1 の発現を増加させて転移を促進させる可能性と cell mediated cytotoxicity により生体防御に働く可能性の両方が

考えられ、今後明らかにすべき課題である。

ところで、ICAM-1は遺伝子クローニングでの解析により、免疫グロブリン様の5つのドメインを有し<sup>32)</sup>、myelin associated glycoprotein (MAG) や neural cell adhesion molecule (NCAM) と homology があり<sup>33)</sup>、immunoglobulin (Ig) supergene family の一員であることが最近明らかとなった<sup>34)</sup>。また、CEA も同様に Ig supergene family の一員であり<sup>35)</sup>、IFN- $\gamma$  により大腸癌細胞で発現が増強することも明らかとなっている<sup>36)</sup>。さらには CEA 遺伝子を transfect した細胞が aggregate しやすいことから、CEA が adhesion molecule として機能している可能性も示唆<sup>4)</sup> されており、転移に促進的に作用している可能性も示唆されている<sup>37)</sup>。以上の事実は、同じく Ig supergene family の一員であり、かつ IFN- $\gamma$  によりその発現の増強を認める接着分子 ICAM-1 は CEA の性格と極めて類似した面をもつものと考えられる。

本研究においては2つの MoAbs を用いて遊離型 ICAM-1 の測定系を確立し得た。この遊離型 ICAM-1 が CEA のような腫瘍マーカー的な意義をもつか否か、また NK 活性、LAK 活性等の免疫応答にどのような作用を及ぼすかを検討する必要がある。

また、IFN- $\gamma$  だけでなく TNF- $\alpha$  ならびに IL-1 $\beta$  も軽度ながら ICAM-1 を増強させることを明らかにし得た。このような事実は、*in vivo* において IFN- $\gamma$  等のサイトカインによる複雑な細胞間ネットワークが存在していることをうかがわせるが、同時にこれらの分子の働きの解明が特にヒトの腫瘍免疫を考える場合に極めて重要であることを示している。

## 要 約

IFN- $\gamma$  処理ヒト大腸癌細胞株 BM314 を免疫原として新しい MoAb の確立に成功し、これを用いて以下の結果を得た。

1) MoAb HA58 は、抗 ICAM-1 MoAb CL207 の認識する 85 Kd の同一対応抗原と反応し、本 MoAb は ICAM-1 分子に対する抗体であることを証明した。また、MoAb HA58 の認識するエピトープは、MoAb CL207 のそれとは異なっていることが判明した。

2) 固相化 MoAb CL207 およびビオチン化 MoAb HA58 を用いた ELISA による遊離型 ICAM-1 の測定系を確立した。

3) ICAM-1 は、IFN- $\gamma$  により大多数の培養癌細胞表面において発現の増強を認めた。また、培養上清中に遊離することが本研究により新たに判明した。

4) さらに遊離型 ICAM-1 も IFN- $\gamma$  により増加することが明らかとなった。またその増加量と細胞表面の表出度との間に関連性のあることが示唆された。

以上より、標的細胞およびエフェクター細胞間の免疫応答に ICAM-1 分子が深く関与していることが推測された。

## 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、とくに貴重なご意見をいただいた杉山敏郎博士、辻崎正幸博士に深謝いたします。

本研究は、文部省がん特別研究 I (63010058, 01010054, 谷内)、がん特別研究 II (01015095, 今井) ならびに厚生省がん研究助成金(61-5, 谷内, 今井)の補助による。

## 文 献

1. Virelizier, J., Perez, N., Arenzana-Seisdedos, F. and Devos, R.: Pure interferon gamma enhances class II HLA antigens on human monocyte cell lines. *Eur. J. Immunol.* **14**, 106-108 (1984).
2. Real, F. X., Carrato, A., Schuessler, M. H., Welt, S. and Oettgen, H. F.: IFN- $\gamma$  regulated expression of a differentiation antigen of human cells. *J. Immunol.* **140**, 1571-1576 (1988).
3. Dumont, F. J., Palfree, R. G. E. and Fisher, P. A.: The T-cell activating protein (TAP) is up-regulated by endogenous IFN- $\gamma$  in activated T cells. *Immunology* **64**, 267-271 (1988).
4. Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N. and Shirota, K.: Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* **57**, 327-334 (1989).
5. Kantor, J., Tran, R., Greiner, J., Pestka, S., Fisher, P. B., Shively, J. E. and Schlom, J.: Modulation of carcinoembryonic antigen messenger RNA levels in human colon carcinoma cells by recombinant human  $\gamma$ -interferon. *Cancer Res.* **49**, 2651-2655 (1989).
6. Rothlein, R., Dustin, M. L., Marlin, S. D. and Springer, T. A.: A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* **137**, 1270-1274 (1986).
7. Maio, M., Gulwani, B., Langer, J. A., Kerbel, R. S., Duigou, G. J., Fisher, P. B. and Ferrone, S.: Modulation by interferons of HLA antigen, high-molecular-weight melanoma associated antigen,

- and intercellular adhesion molecule 1 expression by cultured melanoma cells with different metastatic potential. **Cancer Res.** **49**, 2980-2987 (1989).
8. Dustin, M. L., Rothlein, R., Bhan, A. K., Dinarello, C. A. and Springer, T. A.: Induction by IL-1 and interferon- $\gamma$ : tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). **J. Immunol.** **137**, 245-254 (1986).
  9. Imai, K., Ng, A.-K., Glassy, M. C. and Ferrone, S.: Differential effect of interferon on the expression of tumor-associated antigens and histocompatibility antigens on human melanoma cells: Relationship to susceptibility to immune lysis mediated by monoclonal antibodies. **J. Immunol.** **127**, 505-508 (1981).
  10. 平田博巳, 杉山敏郎, 松井雅二, 中西俊博, 今井浩三, 谷内 昭: インターフェロン- $\gamma$ により発現が増強する腫瘍細胞表面抗原と, その治療への応用. **Biotherapy** **2**, 75-78 (1988).
  11. 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.
  12. Imai, K., Ng, A.-K. and Ferrone, S.: Characterization of monoclonal antibodies to human melanoma-associated antigens. **J. Natl. Cancer Inst.** **66**, 489-496 (1981).
  13. Matsui, M., Temponi, M. and Ferrone, S.: Characterization of a monoclonal antibody-defined human melanoma-associated antigen susceptible to induction by immune interferon. **J. Immunol.** **139**, 2088-2095 (1987).
  14. 山本公雄: 腺癌関連モノクローナル抗体 YH206 に対する抗イディオタイプ抗体の作製とその臨床応用. **札幌医学雑誌** **57**, 197-207 (1988).
  15. Imai, K., Fujita, H., Moriya, Y., Tanda, M., Endo, T., Kawaharada, M., Dempo, K., Mori, T. and Yachi, A.: Immunohistological distribution of the antigenic determinants recognized by monoclonal antibodies reacting with carcinoembryonic antigen. **Protides Biological Fluids** **31**, 805-808 (1984).
  16. Fukuda, Y., Imai, K., Miura, K., Matsui, M., Nakanishi, T., Nakazato, H., Masukawa, J., Hinoda, Y., Noguchi, T. and Yachi, A.: A monoclonal antibody to carbohydrate chain on human hepatocellular carcinoma-associated antigen suppressed tumor growth in nude mice. **Cancer Immunol. Immunother.** **27**, 26-32 (1988).
  17. Greenwood, F. C., Hunter, W. M. and Glover, J. S.: The preparation of  $^{125}\text{I}$ -labeled human growth hormone of high specific radioactivity. **Biochem. J.** **89**, 114-123 (1963).
  18. Guesdon, J. L., Ternynck, T. and Avrameas, S.: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. **J. Histochem. Cytochem.** **27**, 1131-1139 (1979).
  19. Ban, T., Imai, K. and Yachi, A.: Immunohistological and immunochemical characterization of a novel pancreas cancer-associated antigen MUSE 11. **Cancer Res.** **49**, 7141-7146 (1989).
  20. Hinoda, Y., Imai, K., Ban, T., Endo, T. and Yachi, A.: A sandwich enzyme immunoassay of an adenocarcinoma-associated antigen, YH206, in cancer sera. **Jpn. J. Cancer Res. (Gann)** **78**, 607-613 (1987).
  21. Rambaldi, A., Young, D. C., Herrmann, F., Cannistra, S. A. and Griffin, J. D.: Interferon- $\gamma$  induces expression of the interleukin 2 receptor gene in human monocytes. **Eur. J. Immunol.** **17**, 153-156 (1987).
  22. Tsujimoto, M., Yip, Y. K. and Vilcek, J.: Interferon- $\gamma$  enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor. **J. Immunol.** **136**, 2441-2444 (1986).
  23. Stauton, D. E., Merluzzi, V. J., Rothlein, R., Barton, R., Marlin, S. D. and Springer, T. A.: A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. **Cell** **56**, 849-853 (1989).
  24. Dabignon, D., Martz, E. and Reynolds, T.: Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): A surface antigen distinct from Lyt-2, 3 that participates in T lymphocyte-mediated killing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **78**, 4535-4539 (1981).
  25. Makgoba, M. W., Samders, M. E., Ginther Luce, G. E., Dustin, M. L., Springer, T. A., Clark, E. A., Mannonic, P. and Shaw, S.: ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T and myeloid cells. **Nature** **331**, 86-88 (1988).
  26. Renkonen, R.: Regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression on endothelial cells with correlation to lymphocyte-endothelial binding. **Scand. J. Immunol.** **29**, 717-721 (1989).
  27. Rothlein, R. and Springer, T. A.: The requirement for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol ester. **J. Exp. Med.** **163**, 1132-1149 (1986).
  28. Nishimura, T., Yagi, H., Yagita, H., Uchiyama, Y. and Hashimoto, Y.: Lymphokine-activated

- cell-associated antigen involved in broad-reactive killer cell-mediated cytotoxicity. *Cell. Immunol.* **94**, 122-129 (1985).
29. Noesel, C., Miedema, F., Brouwer, M., Rie, M. A., Aarden, L. A. and van Lier, R. A. W.: Regulatory properties of LFA-1  $\alpha$  and  $\beta$  chains in human T-lymphocyte activation. *Nature* **333**, 850-852 (1988).
  30. Dustin, M. L. and Springer, T. A.: T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* **341**, 619-624 (1989).
  31. Johnson, J. P., Stade, B. G., Holzmann, B., Schwäble, W. and Riethmüller, G.: De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 641-644 (1989).
  32. Dustin, M. L., Staunton, D. E. and Springer, T. A.: Supergene families meet in the immune system. *Immunol. Today* **9**, 213-215 (1988).
  33. Simmons, D., Makgoba, M. W. and Seed, B.: ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature* **331**, 624-627 (1988).
  34. Staunton, D. E., Marlin, S. D., Stratowa, C., Dustin, M. L. and Springer, T. A.: Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* **52**, 925-933 (1988).
  35. Oikawa, S., Imajo, S., Noguchi, T., Kosaki, G. and Nakazato, H.: The carcinoembryonic antigen (CEA) contains multiple immunoglobulin-like domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**, 634-642 (1987).
  36. Hareyama, M., Imai, K., Ban, T., Koshiha, H., Kubo, K., Shidou, M., Oouchi, A. and Morita, K.: Effect of radiation on the expression of carcinoembryonic antigen on the membranes of human gastric adenocarcinoma cells—immunological study using monoclonal antibodies—. *Nippon Acta Radiol.* **48**, 90-92 (1988).
  37. Boucher, D., Cournoyer, D., Stanners, C. P. and Fuks, A.: Studies on the control of gene expression of the carcinoembryonic antigen family in human tissue. *Cancer Res.* **49**, 847-852 (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 平田博巳