

## 2016 年奨励賞受賞者論文

## 総合論文

## 抗体作製を基盤とした肺癌の診断並びに予後予測マーカーの獲得

長 塩 亮 \*<sup>1,2</sup>

\*E-mail: nagashio@kitasato-u.ac.jp

<sup>1</sup> 北里大学医療衛生学部医療検査学科臨床検査学：252-0373 神奈川県相模原市南区北里 1-15-1<sup>2</sup> 北里大学大学院医療系研究科応用腫瘍病理学：252-0373 神奈川県相模原市南区北里 1-15-1

(受付 2017 年 4 月 20 日, 改訂 2017 年 5 月 29 日, 受理 2017 年 6 月 1 日)

肺癌の診断や予後予測に有用なバイオマーカーの獲得を目的として、培養細胞や癌組織を免疫源とするランダム免疫法により、肺癌だけでも約 2000 の単クローン性抗体を作製してきた。このランダム免疫法は合成ペプチドなどの精製抗原を用いた従来の抗体作製法とは異なり、疾患特異的な翻訳後修飾を受けたタンパク質に対する抗体の獲得も期待される。また、1 回のランダム免疫法により、一度に数百種類のクローンが得られることからハイブリドーマのスクリーニング法を工夫することで、目的に応じた抗体群をまとめて獲得できる利点がある。実際にこのランダム免疫法で作製した単クローン性抗体を用いた検討により、肺癌の診断に有用な抗体が多数獲得されている。今後も鑑別診断や予後予測に有用なマーカーを探索する研究において、ランダム免疫法の有用性が期待される。

## 1 序 論

肺癌は肺癌とともに難治性癌の代表であり、本邦では男性癌死の第 1 位、女性でも 2 位を占めている。現在、血清腫瘍マーカーを用いた診断も行われているが、肺癌の早期診断に有用なマーカーは少なく、初診時には、すでに進行癌であることが多い。化学療法としては、プラチナ製剤を基本とした多剤併用療法も用いられているが十分な効果は得られておらず予後不良の原因となっている。よって、肺癌患者の予後を改善するためには、より早期に癌を診断し、根治的治療を施す必要があり、それを可能とするための新たな早期診断マーカーの獲得が望まれている。

組織診断や血清診断には抗体を用いた検査が主に行われている。これらの抗体の作製は精製タンパク質や合成ペプチドなどの精製抗原を免疫して獲得するのが一般的であるが、当研究室では癌組織や培養細胞を未固定、あるいはアセトン固定などの前処理を施した後、直接免疫源としてマウスの腹腔に免疫を行い、単クローン性抗体を網羅的に作製するランダム免疫法<sup>1)</sup>を用いており、肺癌だけでも約 2000 の単クローン性抗体を樹立してきた。このランダム免疫法は合成ペプチドなどの精製抗原を用いた従来の抗体作製法では獲得することの出来ない疾患特異的な翻訳後修飾を受けたタンパク質やタンパク質複合体などの立体構造を認識する抗体の獲得が可能である。さらに 1 回の免疫で数百種類のクローンが得られることから、ハイブリド-

マのスクリーニング法を工夫することで、種々の目的に応じたマーカーとして有用な抗体の 1 群をまとめて獲得できる利点がある。この手法を用いて作製した抗体に対して多数の肺癌症例を用いた免疫染色や肺癌患者血清を用いた Reverse-phase protein array (RPPA) 法による血中抗原の検出を行うことでマーカーとしての有用性の評価を行っている。

本稿では肺腺癌を対象にランダム免疫法で作製した単クローン性抗体における肺癌組織を用いた免疫染色法による診断マーカーとしての有用性の検討について紹介する。

## 2 ランダム免疫法を用いた単クローン性抗体の作製

ランダム免疫法による単クローン性抗体作製の過程の概略図を Fig. 1 に示す。肺腺癌細胞株である A549、または AMeX 固定<sup>2)</sup>した肺腺癌組織を PBS(-) 中で超音波破碎装置により、細胞抽出液を調整後、BALB/c マウスの腹腔内に 2 週間毎に合計 3 回の免疫を行った。その後、マウス尾静脈より採血を行い、ドットプロット法や免疫染色法にて抗体価を評価した。抗体価の上昇を認めたマウスに最終免疫を行い、その 3 日後、脾臓を摘出し、リンパ球を回収した。あらかじめ培養しておいたマウスミエローマ細胞である SP2/O 細胞も遠心管に回収し、両者の細胞数をカウントした。リンパ球対ミエローマ細胞が 5 対 1 の割合になるように混合し、ポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行った後、96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり  $1 \times 10^5$

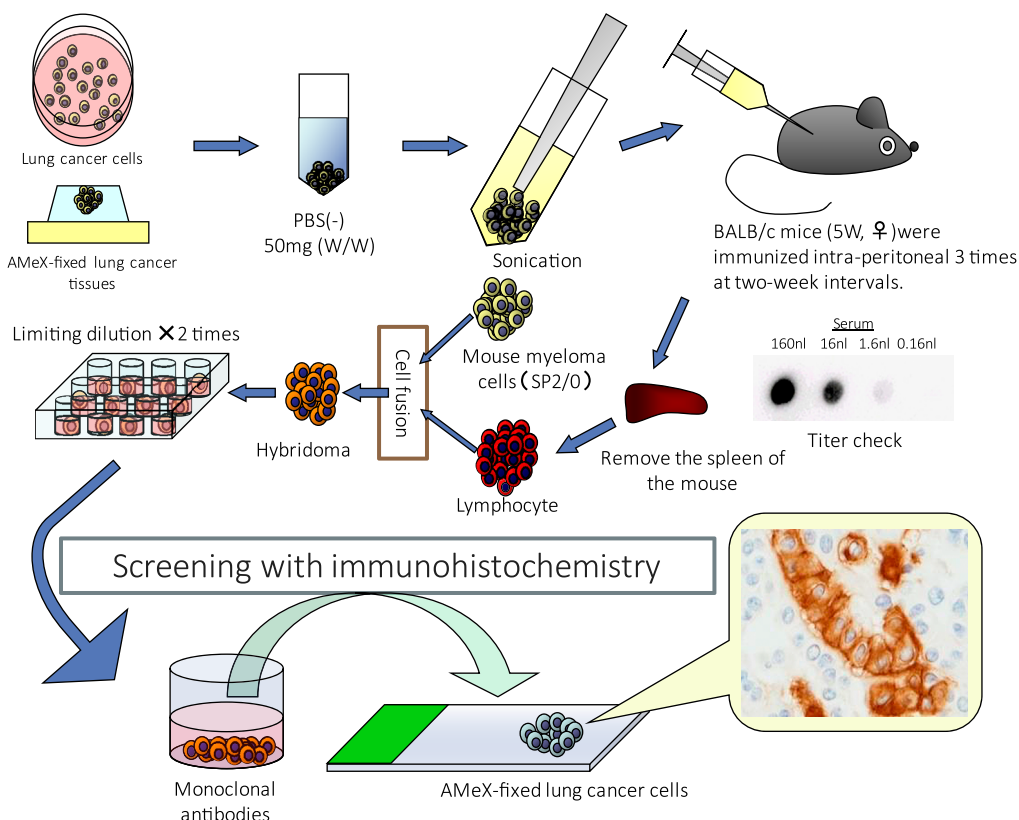


Fig. 1 A schematic of monoclonal antibody production

個のリンパ球が入るように細胞混合液を加えた。ハイブリドーマのスクリーニングには免疫に用いた細胞、あるいは組織を用いた免疫染色によりハイブリドーマの抗体産生能を評価した。免疫染色にて陽性を示したハイブリドーマは2回の限界希釈により単クローン化を行った後、培養上清を回収し、以降の実験に用いた。

### 3 単クローン性抗体の抗原同定

細胞や組織から抽出したタンパク質溶液を免疫源とするランダム免疫法にて作製した単クローン性抗体はどのタンパク質が抗原であるのかが不明であるため、認識する抗原タンパク質を同定する必要がある。当研究室では、免疫源に用いた細胞から抽出したタンパク質溶液を用いた二次元免疫プロット法<sup>3)</sup>による抗原スポットの検出、あるいは免疫沈降法<sup>4)~7)</sup>により抗原タンパク質を回収後、免疫プロット法にて抗原タンパク質のバンドを検出している。検出された抗原タンパク質は対応するスポット、あるいはバンドをゲルから切り出し、トリプシンを用いたゲル内消化を行った後、質量分析装置を用いて抗原タンパク質の同定を行っている。なお、未固定の培養細胞と AMeX 固定を施した肺腺癌組織をそれぞれ免疫源として作製した抗体について、両者の免疫法による抗原同定の難しさに大差はなく、抗原同定において固定の影響は受けないものと思われる。実際に MUC5B も AMeX 固定の組織で免疫して作製

した抗体であり問題なく抗原同定可能であった。

## 4 肺癌組織を用いた免疫染色法による単クローン性抗体の評価

### 4-1 免疫染色法

材料には10%ホルマリン固定・パラフィン包埋した培養細胞、あるいは肺癌組織を用いた。3 μm 厚に薄切した切片はキシレンで脱パラフィン後、100 ~ 70%の下降エタノール系列で脱キシレンを行い、流水水洗した。次に、内因性ペルオキシダーゼの不活化を3%過酸化水素水で室温、10分間処理した。その後、抗原性の賦活化のため、0.1% Tween 20 を含む 100 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、オートクレーブ中で 121°C、10分間熱処理後、室温に戻るまで放置した。次に、トリス緩衝生食液 [TBS, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl] で5分間洗浄後、一次抗体の非特異的吸着を防ぐため、0.5% casein [1 M Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl, 0.5% casein] を切片に滴下し、室温、10分間のブロッキング処理を行った。その後、切片は一次抗体と室温で2時間~一昼夜反応させた。TBSで5分間の洗浄を3回行い、HRP 標識高分子ポリマー試薬 (Dako) を室温で30分間反応させ、再度、TBSで5分間の洗浄を3回行った。次に、Stable DAB 溶液 (Invitrogen) を用いて抗原抗体反応産物を可視化し、流水水洗後、マイヤーのヘマトキシリンで核染色を行った。最後に、70 ~ 100%の

上昇エタノール系列で脱水を行い、キシレンで透徹後、非水溶性封入剤を用いて封入した。

#### 4-2 肺癌組織マイクロアレイを用いた鑑別診断に有用な抗体の検出

作製した単クローン性抗体について、肺癌患者の癌組織、並びに同一症例の非腫瘍性末梢肺組織を含む組織マイクロアレイを用いたスクリーニングを行い、診断マーカーとしての有用性を評価している。この組織マイクロアレイには同一患者の癌部と非癌部がセットで24症例分が1枚のスライドガラス上に乗っている。そのため数枚を用いて免疫染色を行い、単クローン性抗体の有用性を評価することでおおよその見当をつけることができる。Fig. 2に肺腺癌細胞、あるいは肺腺癌組織を免疫源として作製した単クローン性抗体の中で、肺腺癌の診断に有用と思われる抗体群の一部を示す。縦軸には腺癌 (AC) と扁平上皮癌 (SCC) の個々の症例における染色スコアに応じて色分けして示している。染色スコアは癌細胞における染色性の強さを0~3 (0は陰性, 1は弱陽性, 2は中等度陽性, 3は強陽性) と癌細胞における陽性細胞の割合を0~4 (0は0%, 1は1~25%, 2は26~50%, 3は51~75%, 4は76~100%) を掛け合わせた値 (0~12) として評価している。肺扁平上皮癌に比して、肺腺癌で陽性率、あるいは染色スコアが高い抗体が多数獲得されている。組織マイクロアレイに使用している患者の臨床病理学的因子の情報は収集済みであるため、抗体の染色性と臨床病理学的因子との関連性を統計的に評価することが可能である。この肺癌組織マイクロアレイを用いたスクリーニングで有用と判断した単クローン性抗体に関しては、より詳細な評価を行うため組織マイクロアレイのように限られた大きさの組織 (直径2 mm) ではなく、多数例の肺癌症例 (大切片) を用いて、各種臨床病理学的因子に加え、予後との関連性についても評価している。作製した単クローン性抗体を用いた免疫染

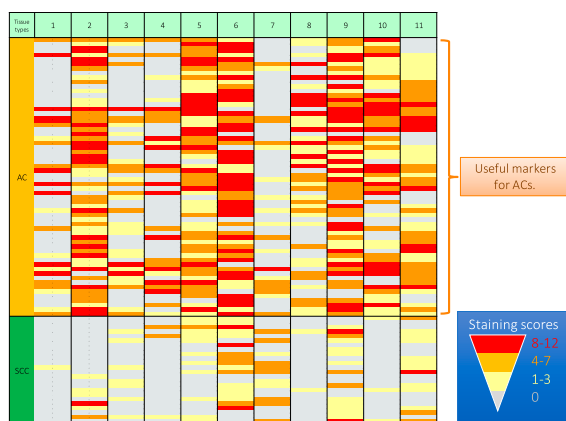


Fig. 2 The monoclonal antibodies which are useful for the diagnosis of lung adenocarcinoma

色により、RACK1<sup>3)</sup> や MYH9<sup>4)</sup> などについて、肺癌に有用なマーカーとして報告してきたが、ここでは MUC5B<sup>5)</sup> について紹介する。

#### 4-3 肺癌における抗 MUC5B 抗体の診断的有用性について

肺腺癌組織を免疫源として獲得した抗 MUC5B 抗体は扁平上皮癌の陽性率 (8.2%)・染色スコア (0.3) に比べ腺癌で陽性率 (65.2%)・染色スコア (4.2) ともに有意に高く ( $p < 0.00001$ ), 肺腺癌の鑑別診断に有用であることが示された (Fig. 3). 肺腺癌における MUC5B の発現と臨床病理学的因子との関連性の検討では、分化度 ( $p = 0.0303$ ) と病理学的ステージ ( $p = 0.0153$ ) で関連していることが分かった。また、MUC5B 発現と肺腺癌患者の予後との関連を解析した結果、MUC5B 低発現群 (スコア 9 未満) に比して、高発現群 (スコア 9 以上) で有意に予後不良であることが示された。さらに COX 比例ハザード回帰による多変量解析を行った結果、MUC5B の発現は独立した予後不良因子であることも分かった ( $p = 0.0017$ )。

MUC5B は肺の発生や発癌の過程に関わる転写因子である TTF-1 の標的遺伝子であり、TTF-1 の発現は MUC5B 発現を強く抑制することが報告されている<sup>8)</sup>。この TTF-1 は肺腺癌の有用な診断マーカーとして知られており、実際に臨床で使用されている。TTF-1 は肺腺癌において非常に高い陽性率を示すが、粘液産生性の腺癌では発現していない、あるいは低発現である傾向がある。TTF-1 と MUC5B はいずれも腺癌における特異性が高く、また両者の発現が拮抗することから、粘液産生性の腺癌に弱い TTF-1 と粘液産生性の腺癌でも高い陽性率を示す MUC5B を組み合わせて診断に用いることで、肺腺癌の鑑別診断の正確度は上昇するのではないかと考えた。そこで MUC5B の評価に使用した肺癌症例と同じ切片を用いて TTF-1 の発現を免疫組織化学的に評価した。その結果、論文の報告をサポー

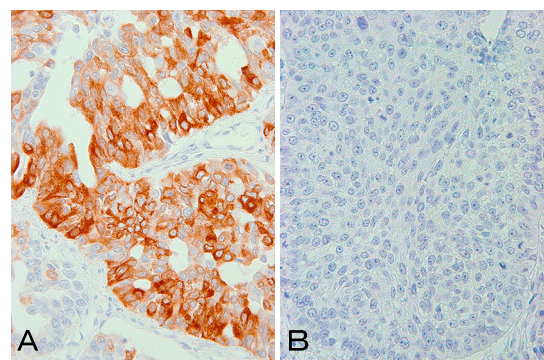


Fig. 3 Expression of MUC5B in lung cancers

Strong staining of MUC5B was found in the cytoplasm of lung adenocarcinoma (A). The staining was almost completely absent in squamous cell carcinomas (B).



Table 1 Evaluation of the diagnostic accuracy of MUC5B in combination with TTF-1 for lung ACs

Marker	Sensitivity	Specificity	Accuracy
MUC5B only	65.2%	91.8%	70.4%
TTF-1 only	81.3%	93.9%	83.8%
Combined MUC5B and TTF-1	96.0%	87.8%	94.3%

トするように全ての症例ではないものの、MUC5B の発現が高い部分では、TTF-1 の発現が低く、逆に TTF-1 の発現が高い部分では MUC5B の発現が低いといった傾向が示された<sup>5)</sup>。免疫染色の結果から、それぞれの分子における肺腺癌の診断の正確度は、MUC5B が 70.4%、TTF-1 が 83.8% であり、MUC5B および TTF-1 を組み合わせた場合（いずれか一方でも陽性の場合）の正確度は 94.3% と飛躍的に向上することが示された（Table 1）。さらに MUC5B と TTF-1 の発現の組み合わせと予後との関連を評価した結果、MUC5B 高発現かつ TTF-1 陰性の症例群はその他の組み合わせの群に比して、有意に予後不良であることが示された。このように MUC5B と TTF-1 の組み合わせることで、鑑別診断に有用であるだけでなく、患者の予後予測にも有用であることが明らかとなった。

### 5 単クローン性抗体を用いた RPPA 法による血清診断マーカーの獲得

作製した単クローン性抗体は組織を用いた検討だけではなく、血清診断マーカーとしての有用性も評価するため、多数例の肺癌患者血清を用いた RPPA 法により患者血清中に存在する抗原タンパク質の解析も行っている<sup>6,7)</sup>。これらの評価において血中 CA12 抗原量は健常者に比して肺癌患者血清で有意に高値を示し<sup>6)</sup>、また、診断精度の指標となる ROC 解析において健常者を対照群、肺癌患者を判別群とした結果、AUC の値が 0.98 を示すような抗 CANX 抗体も獲得されている<sup>7)</sup>。

この他、未発表の抗体についても同様の解析において AUC が 0.8 を超す抗体が多く存在しており、抗原の同定が待たれている。

### 6 結論

ランダム免疫法で肺腺癌細胞が有するタンパク質に対し、網羅的に単クローン性抗体を作製することで、肺腺癌の診

断に有用な多数の抗体が獲得されている。近年、分子標的治療薬の発展に伴い、より正確な診断が可能な検査の重要性が増してきている。そのため、このランダム免疫法のスクリーニング法を工夫することで、鑑別診断や予後予測、さらには血清診断に有用な特徴ある抗体の獲得に今後も取り組んでいきたい。

### 利益相反

著者らに開示すべき利益相反状態は無い。

### 文献

- 1) Hirohashi S, Watanabe M, Shimosato Y, *et al.* Monoclonal antibody reactive with the sialyl-sugar residue of a high molecular weight glycoprotein in sera of cancer patients. *Gann.* 1984;75:485-488.
- 2) Sato Y, Mukai K, Watanabe S, *et al.* The AMeX method. A simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining. *Am J Pathol.* 1986;125:431-435.
- 3) Nagashio R, Sato Y, Matsumoto T, *et al.* Expression of RACK1 is a novel biomarker in pulmonary adenocarcinomas. *Lung Cancer.* 2009;69:54-59.
- 4) Katono K, Sato Y, Jiang SX, *et al.* Prognostic significance of MYH9 expression in resected non-small cell lung cancer. *PLoS ONE.* 2015;10:e0121460.
- 5) Nagashio R, Ueda J, Ryuge S, *et al.* Diagnostic and prognostic significances of MUC5B and TTF-1 expressions in resected non-small cell lung cancer. *Sci Rep.* 2015;5:8649.
- 6) Kobayashi M, Matsumoto T, Ryuge S, *et al.* CAXII Is a sero-diagnostic marker for lung cancer. *PLoS ONE.* 2012;7:e33952.
- 7) Kobayashi M, Nagashio R, Jiang SX, *et al.* Calnexin is a novel sero-diagnostic marker for lung cancer. *Lung Cancer.* 2015;90:342-345.
- 8) Jonckheere, N, Velqhe A, Ducourouble MP, *et al.* The mouse Muc5b mucin gene is transcriptionally regulated by thyroid transcription factor-1 (TTF-1) and GATA-6 transcription factors. *FEBS J.* 2011;278:282-294.

## Acquisition of Diagnostic and Prognostic Markers for Lung Cancer Using Generated Antibodies

Ryo Nagashio\*<sup>1,2</sup>

\*E-mail: nagashio@kitasato-u.ac.jp

<sup>1</sup>Department of Molecular Diagnostics, School of Allied Health Sciences, Kitasato University, 1-15-1, Kitasato, Minami, Sagami-hara, Kanagawa 252-0373, Japan

<sup>2</sup>Department of Applied Tumor Pathology, Graduate School of Medical Sciences, Kitasato University, 1-15-1, Kitasato, Minami, Sagami-hara, Kanagawa 252-0373, Japan

(Received: April 20, 2017; Revised: May 29, 2017; Accepted: June 1, 2017)

Antibodies are usually developed using purified proteins or synthetic peptides. We have exhaustively generated monoclonal antibodies against various tumor-associated proteins using lung cancer cell lines or tissues as antigens with the random immunization method, and have obtained over 2,000 monoclonal antibodies. This method is expected to generate antibodies against proteins with tumor-specific post-translational modifications that are difficult to obtain by conventional immunization methods. Moreover, random immunization method can select antibodies which react with only tumor cells at the time of screening and is useful to obtain many potential immunostaining antibodies in a short time. Actually, monoclonal antibodies generated by this random immunization method are useful as diagnostic and prognostic markers for lung cancers. In a study to search for the marker which is useful for differential diagnosis and prognosis, the use of the random immunization is expected.

**Keywords:** diagnostic marker; lung cancer; monoclonal antibody; prognostic marker; random immunization method.