

ヒト腎癌に対するマウスモノクローナル抗体 mAb K2.7 による腎癌特異的抗腫瘍免疫活性

大阪府立成人病センター泌尿器科（部長：古武敏彦）

木内 利明，古武 敏彦

RENAL CANCER SPECIFIC ANTITUMOR ACTIVITIES OF A MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY K2.7 TO HUMAN RENAL CELL CARCINOMA

Toshiaki Kinouchi and Toshihiko Kotake

From the Department of Urology, the Center for Adult Diseases, Osaka

We have prepared a mouse monoclonal antibody (mAb) K2.7 (IgG3) by immunizing mice with renal cancer cell (RCC) line OS-RC-2. In a serological analysis by protein A assay, 25 out of 31 RCC lines reacted with the mAb K2.7 but none of the 50 other cell lines from different organs except for 2 cell lines did. In immunohistological analysis by indirect immunoperoxidase assay, 66 out of 72 renal cancer tissues showed positive staining. Metastatic lesions of renal cancers also reacted similarly to the primary lesion. Some restricted normal tissues including tubules of normal kidney showed positive staining. Specific antitumor activities of mAb K2.7 against RCC lines were investigated in vitro by complement dependent cytotoxicity (CDC) and antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) assays. In CDC assay, all of the 9 RCC lines were killed by mAb K2.7 and normal human serum, and killing activities of mAb K2.7 presumably depend on the number of antibody molecules bound to the cell surface. Sera from 9 patients with renal cancers including low and high stages showed the same killing activities to 3 RCC lines as normal human serum. In the ADCC assay, peripheral leukocytes (PBLs) from 4 healthy donors showed strong killing activities to RCC lines. Killing activity differed with the individual. PBLs from the same 9 patients as in the CDC assay showed significantly positive killing activity against 3 RCC lines. These findings suggest the usefulness of mAb K2.7 for the specific immunotherapy of renal cancer.

(Acta Urol. Jpn. 38: 1325-1331, 1992)

Key words: Renal cancer, Monoclonal antibody, Antitumor immunity

緒 言

腎細胞癌は、現在手術以外に有効な治療法はなく、しかも診断時すでに進行癌であることが多く、その予後は非常に不良である。そこで新たな治療法を確立することは、緊急の研究課題である。最近、非特異的免疫療法として、インターフェロンや IL-2 が使用されているが、その有効性はわれわれが当初期待したほどのものではなかった。そこで、われわれは腎癌に対するマウスモノクローナル抗体 (mAb) を作成し、mAb を用いた特異免疫療法の確立をめざした。

mAb による特異的抗腫瘍免疫は補体依存性殺細胞 (complement dependent cytotoxicity, CDC) と抗

体依存性細胞障害 (antibody dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC) を介して行われる (Fig. 1)。mAb の isotype (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) のなかで、IgG3 mAb は他の isotype の mAb に比して CDC と ADCC の両者を介して抗腫瘍効果をしめし、特異免疫療法を行ううえで IgG3 mAb は非常に有望であると思われる。実際の臨床応用では、malignant melanoma¹⁾ や neuroblastoma²⁾ の治療に IgG3 mAb を使用し、その有効性が報告されている。

今回、われわれは腎癌培養細胞株 OS-RC-2³⁾ を免疫してえられた mAb K2.7 (IgG3)⁴⁾ の抗腫瘍活性を、腎癌培養細胞株 (RCC 株) に対する CDC と

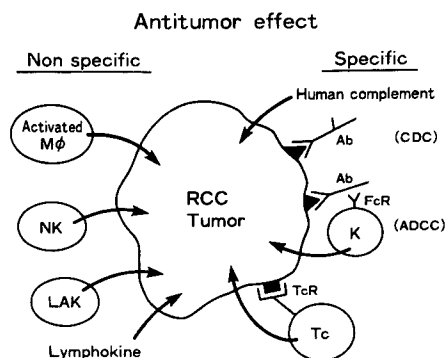


Fig. 1 Scheme of mechanisms of antitumor effect. Specific antitumor effects of mAb are mediated by CDC and ADCC.

ADCC 活性について検討した.

材料と方法

培養細胞：培養細胞株は、おもに Dr. Old (the Laboratory of Human Cancer Immunology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York) からえた。OS-RC-2 とそのシリーズの細胞株はわれわれが樹立した。

血清学的解析：羊赤血球に protein A を結合させた indicator cell を用いた protein A (PA) mixed hemadsorption assay⁵⁾ に行った。Terasaki microplate に細胞株を撒き、一晚培養後抗体を 10 μ l 加え室温にて40分間反応させ、つぎに indicator cell を加え40分後に % rosette formation を顕微鏡下にて測定した。

mAb K2.7 の作成：OS-RC-2 を BALB/c マウスに免疫し、その脾細胞と NS-1 を細胞融合した。clone の screening は OS-RC-2 に対する PA assay に行った⁴⁾。

免疫組織学的解析：手術および剖検よりえられた各正常臓器および癌組織は迅速凍結し、 -80°C で保存した。迅速切片を cold acetone または 2% paraformaldehyde にて10分間固定し、Vectastain ABC kit (Vector Lab. Burlingame, CA) または peroxidase 結合免疫抗マウス Ig (DAKO Corp., Santa Barbara, CA) を二次抗体として用いた indirect immunoperoxidase 法を用いた。

ADCC 法：ヒト末梢リンパ球 (PBL) は lymphocyte separating medium により分離された。Cr-51 でラベルされた標的細胞、希釈された mAb K2.7 と PBL を混合し、96穴の microplate にて4時間培養後、その培養上清の放射活性を測定し % cytotoxicity

を算出した。

CDC 法：標的細胞を Terasaki microplate で一晚培養後、希釈した mAb K2.7 を加え、 37°C で45分間反応させたあと、さらに希釈したヒト血清を加え 37°C で4時間培養した。methanol で10分間固定し、Giemsa 液にて染色したあと生細胞を数え、% cytotoxicity を算出した。

結 果

PA assay を用いた血清学的解析による mAb K2.7 の特異性の解析：ヒト培養細胞株に対する mAb K2.7 の反応性を PA assay にて検討した。31株の RCC 株のうち25株 (81%) が反応した。しかし、他臓器由来の培養細胞50株のうち2株 (4%) のみが反応した。免疫原として用いた OS-RC-2 の提供者より確立した Epstein-Barr virus transformed B cell とも反応しなかった (Table 2)。

免疫組織学的解析により mAb K2.7 の特異性の解析：凍結切片を cold acetone または 2% paraformaldehyde で固定した。正常臓器については、腎尿管、精巣、子宮、Fallopian tube、大脳、小脳、胃、大腸、foreskin と反応するも、それ以外の正常臓器とは反応しなかった (Table 2)。癌組織では、腎癌 72例中66例 (92%) が陽性であった (Table 3)。low grade, high grade に関係なくほとんどの症例が陽性であった。他臓器癌60症例では、胃癌の1例のみ陽性であった (Table 3)。

CDC 活性 11株の RCC 株に対する mAb K2.7 の反応性を PA assay で血清学的に検討するに、9株は陽性であり、2株は陰性であった。陽性の9株では、各細胞株間でその反応の強さが異なった (Fig. 2A)。正常ヒト血清を用いた CDC 活性を調べると、血清学的に陽性であった9株は殺され、陰性であった2株は殺されなかった。殺された9株に対する CDC 活性は血清学的解析による反応の強さと相関した (Fig. 2B)。早期癌および進行癌を含む9例の腎癌患者の血清を用いた CDC 活性を3株の RCC 株について検討した。正常ヒト血清を positive control に用いた。9例すべての腎癌患者の血清は正常ヒト血清と同程度の抗腫瘍活性を示した (Fig. 3)。

ADCC 活性：まず正常ヒト PBL を用いて OS-RC-2 を標的細胞にし、mAb K2.7 の至適濃度を検討した。Fig. 4 のごとく mAb K2.7 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にて最も強い抗腫瘍活性を認めた。抗体のみでは、RCC 株は殺されなかった。以下この濃度を用いて ADCC 活性を検討した。4名の正常ヒト PBL の ADCC

Cell lines	Reactivities ^d
Renal (31)^b	
SK-RC-1, 6, 7, 9, 18, 28, 29, 39, 42, 44,	● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ●
45, 47, 48, 49, 52, 56, 59, 61, 62	● ○ ● ● ○ ● ● ● ● ● ● ●
OS-RC-2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ●
OUR-10, A498, ACHN, Caki-1	○ ○ ○ ○
Bladder (5)	
639V, RT4, 253J, 647V, T24	○ ○ ○ ○ ○
Melanoma (7)	
SK-MEL-23, 28, 31, 33, 37, 173, MeWo	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
Colon (5)	
HT29, SW403, SW1116, M7609, CaCO ₂	○ ○ ○ ○ ●
Lung (7)	
HLC-1, KNS-62, SK-LU1, QG-90, PC-1, LUCI-3, LUCI-10	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
Astrocytoma (5)	
SK-MG-1, 3, 4, U251MG, U173MG	○ ○ ○ ○ ○
Gastric (4)	
NUGC-2, 3, 4, MKN-1	○ ○ ○ ○
Ovary (3)	
OV3, OV6, 2774	○ ○ ●
Uterus & Cervical (2)	
UT2, ME180	○ ○
Pancreas (3)	
Panc-1, Paca-2, Aspc-1	○ ○ ○
Prostate (1)	
PC-3	○
Breast (2)	
MCF7, BT-20	○ ○
Hematologic (5)	
Daudi, MOLT-4, HPB-ALL, J111, EBV-B ^c	○ ○ ○ ○ ○
Fibroblast (1)	
WI-38	○

^b Number of cell lines tested.

^c EBV transformed B cells of

放射性物質、抗癌剤や毒素などを mAb に結合することなく、mAb そのものが生体内の免疫系を介して作用する抗腫瘍効果は、CDC と ADCC を介して行われる。これらの抗腫瘍免疫活性をうるためには、種々の条件が必要である。第一に重要なことは、Ig isotype である。一般に、IgM は CDC 活性を示す

Table 2. Reactivities of mAb K2.7 with normal human tissues by indirect immunoperoxidase staining.

Tissues	Reactivities ^a	Tissues	Reactivities ^a
Kidney		Thymus	○
Glomerulus	○	Thyroid	○
Tubule	●	Parotis gland	○
Prostate	○	Breast	○
Ureter	○	Lung	○
Bladder	○	Esophagus	○
Testis	●	Stomach	●
Uterus		Colon	●
Cervix	○	Pancreas	○
Endometrium	○	Liver	○
Myometrium	●	Spleen	○
Fallopian tube	●	Adrenal gland	○
Placenta	○	Skin	○
Cerebrum	●	Foreskin	●
Cerebellum	●		

^a Reactivities are as follows : ●, positive ; ○, negative.

Table 3. Reactivities of mAb K2.7 with human tumors by indirect immunoperoxidase staining.

Tumors	Reactivities ^a
Kidney	66/72
Bladder	0/ 9
Prostate	0/ 6
Breast	0/10
Lung	0/ 5
Stomach	1/15
Colon	0/ 6
Liver	0/ 3
Larynx	0/ 3
Uterus	0/ 1
Cholecyst	0/ 1
Nerve	0/ 1

^a Number of specimens with positive staining/number of specimens tested.

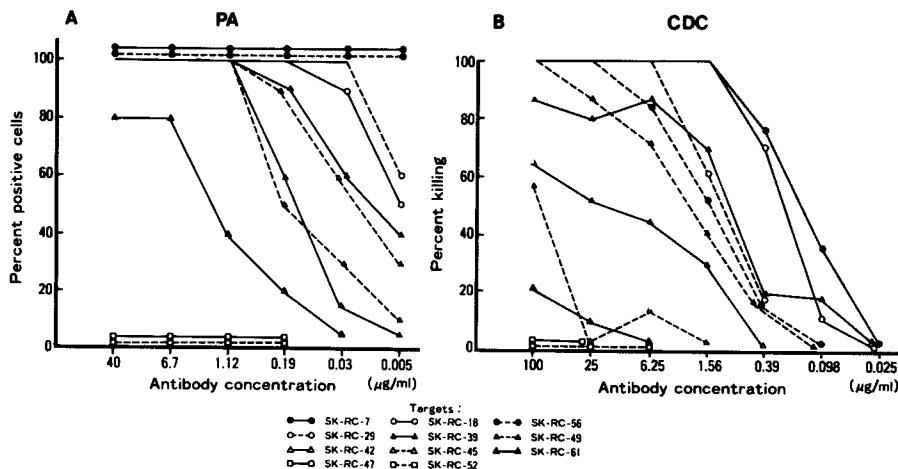


Fig. 2. A, reactivities of mAb K2.7 with RCC cell lines by protein A assay. Nine cell lines reacted with mAb K2.7, but 2 cell lines did not. B, complement dependent cytotoxicity assay of mAb K2.7 and human normal serum. Cell lines reactive with mAb K2.7 were killed. The killing activity of mAb K2.7 against the cell lines was correlated with the reactivity in the serological assay.

が、ADCC 活性は示さない。Scholz らは、Y oligosaccharide に反応する mAb BR55-2 (IgG3) の isotype variant を作成し、CDC と ADCC の活性を比較検討した。そして、IgG3 と IgG2a が最も強い活性を示したと報告した⁷⁾。Welt ら⁸⁾、Hellstrom ら⁹⁾や Cheresch ら¹⁰⁾は malignant melanoma 関連抗原である ganglioside GD3 に対する IgG3 mAb を作成し、malignant melanoma に対して CDC と ADCC の活性および動物実験で抗腫瘍効果のあるこ

とを報告した。Welt ら⁸⁾は、また25種類の他の isotype (IgG1, IgG2a, IgG2b) の mAb はまったく CDC 活性を示さなかったと述べた。以上より、IgG3 mAb は腫瘍特異免疫療法を行ううえで有望な isotype であると考えられる。第二に重要なことは、抗体結合部位の数である。Welt ら⁸⁾は GD3 に対する mAb R24 の CDC と ADCC の活性を22株の malignant melanoma について検討した。CDC と ADCC の活性と抗体結合部位の数は明らかに相関し、

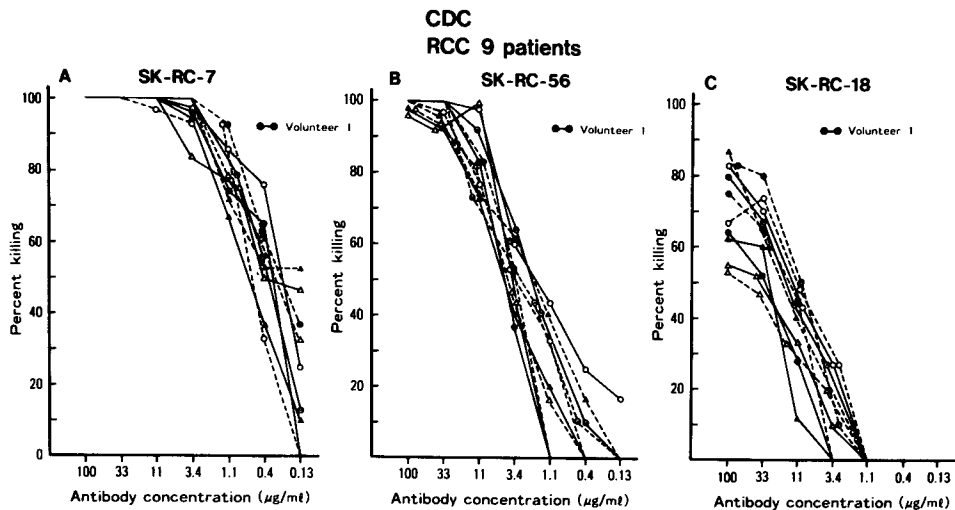


Fig. 3. Complement dependent cytotoxicity assay of mAb K2.7 and sera from 9 patients with renal cancers to 3 RCC cell lines. Human normal serum was used as a positive control. All 9 patients had the same killing activity against each target as a positive control.

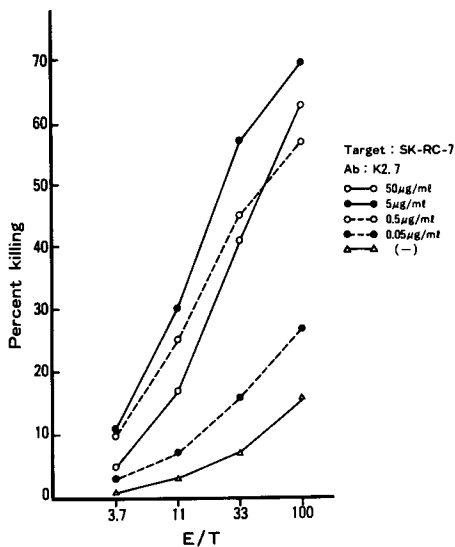


Fig. 4. Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity assay of mAb K2.7 and PBL from a healthy donor. The optimal dose of mAb K2.7 was 5 μ g/ml.

ある一定数以上の抗体が結合しないと細胞は殺されなかった。われわれの結果でも、血清学的に抗体結合部位数が多い細胞株ほど CDC と ADCC を介して強く殺された。

同一の細胞株に対して健常人および腎癌患者の ADCC 活性は個人間に差が認められた。ADCC 活性を測定する場合には、一般に Ficoll gradient にて

Table 4. ADCC activities of PBLs from 4 healthy donors to renal cell lines

Targets	% cytotoxicity Effector cells from 4 healthy donors			
	1	2	3	4
SK-RC-18	81 ^a (2) ^b	56 (4)	39 (8)	ND
- 7	79 (19)	63 (9)	41 (12)	42 (10)
-56	63 (8)	62 (8)	76 (25)	47 (3)
-29	36 (2)	ND ^c	ND	ND
-49	12 (1)	ND	ND	ND
1	22 (12)	ND	ND	ND

^a % cytotoxicity at effector/target ratio 100. Concentration of mAb K2.7 was 5 μ g/ml.

^b % cytotoxicity of PBL alone without mAb K2.7.

^c Not done.

末梢血から effector 細胞を分離している。Ortaldo ら¹¹⁾は、GD3 に対する IgG3 mAb MB3.6 を用いて末梢血から分離した種々の effector 細胞の ADCC 活性を検討した。最も活性が強かったのは large granular lymphocyte (LGL) であり、monocyte や T細胞には活性が認められなかったと報告した。また、chondroitin sulfate proteoglycan の core protein に対する IgG2a mAb 9. 2. 27 を用いた場合には、やはり LGL のみが ADCC 活性を示したが、MB3.6 に比しその活性は弱かった。このことより、Ficoll gradient にて末梢血より分離された effector 細胞内の LGL の比率が ADCC 活性を左右するものと考えられる。

Table 5. ADCC activities of PBLs from 9 patients of renal cancers to renal cell lines.

Patients	Robson stages	% cytotoxicity Targets		
		SK-RC-7	-56	-18
1	IVb	23* (6) ^b	43 (20)	33 (17)
2	I	66 (7)	57 (17)	44 (4)
3	I	49 (17)	53 (16)	39 (5)
4	I	49 (17)	30 (7)	31 (4)
5	IVb	52 (1)	49 (2)	38 (1)
6	I	50 (2)	54 (6)	53 (4)
7	I	87 (15)	88 (54)	82 (15)
8	IIIa	62 (6)	79 (37)	50 (11)
9	I	62 (20)	71 (35)	66 (32)

^a See Table 4, Footnote a.^b See Table 4, Footnote b.

抗体による特異免疫療法を行ううえで、非常に重要であることは患者自身の血清または末梢白血球が抗体を介して、細胞株を殺しうるかどうかである。Oltaldo ら¹¹⁾は4名の malignant melanoma 患者の ADCC 活性を調べ、2名に有意な抗腫瘍活性を認めたと報告したが、4名についての臨床的背景は不明である。また、Hellstrom ら⁹⁾は、進行した malignant melanoma 患者では ADCC 活性が認められなかったと述べた。われわれの結果では、すべての腎癌患者に ADCC 活性を認めたが、これらの相違は癌の種類により患者血液中の LGL の比率が異なるのかもしれない。また、さらに多くの進行した腎癌患者を調べれば、ADCC 活性を示さない患者が存在するのかもしれない。このことに関しては、更なる症例の検討が必要であろう。CDC に関しては、患者血清にて CDC を介して細胞株が殺されたとの報告は見られないので、われわれの結果を比較検討することはできない。しかし、今回のわれわれの結果より mAb K2.7 は腎癌患者においても、CDC と ADCC を介して RCC 株を殺すことが明らかとなり、特異免疫療法を行ううえで非常に有用であると思われる。

mAb を臨床応用する場合に非常に重要なことは、標的細胞である腫瘍組織内の抗原の発現量の不均一性の有無を検討することである。なぜならば、個々の患者の腎癌組織での抗原量、原発巣と転移巣での抗原量、また、同一患者の癌組織内での個々の細胞での抗原量は、一般に均一ではないので、治療を行う前に組織内の抗原量を調べることが治療の有効性を決定するからである。癌組織は、一般に病理組織学的に不均一な像を呈し、免疫組織学的にも抗原の表現型が不均一

であることが多い。よって、最も多くの癌細胞や癌組織と反応する mAb が理想であるが、これには限界があるために他の抗原に対する IgG3 mAb との併用が望まれる。また、抗原量が少なく、CDC や ADCC に必要な抗体結合部位数に達しない癌細胞に対しては、生体側の免疫能を高める方法、たとえば、少量の IL-2 との併用による ADCC 活性の増強¹²⁾や補体制御因子に対する mAb の併用による CDC 活性の増強¹³⁾などが考えられ、今後の研究課題である。

結 語

mAb K2.7 による腎癌に対する腫瘍特異免疫療法の確立への試みとして、腎癌培養細胞株に対する抗腫瘍効果を検討した。

1. IgG3 isotype である mAb K2.7 は腎癌原発巣および転移巣の92%の症例と反応した。
2. 健常人からの血清および PBL にて mAb K2.7 は CDC と ADCC を介して腎癌細胞株を殺した。
3. 9例の腎癌患者からの血清および PBL も健常人と同程度の CDC と ADCC 活性を認めた。
4. 腎癌の臨床病期に関係なく、すべての腎癌患者に抗腫瘍活性を認めた。
5. 抗腫瘍活性は腎癌細胞株の細胞表面上の抗原量に相関した。

なお、本研究の一部は厚生省がん研究助成金「進行がんの新しい治療法の開発に関する研究」班2-21の分担研究（モノクローナル抗体による腎癌特異免疫療法に関する研究）の助成を受けた。

文 献

- 1) Houghton AN, Mintzer D, Cordon-Cardo C, et al.: Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: A phase I trial in patients with malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 1242-1246, 1985
- 2) Cheung NKV, Lazarus H, Miraldi FD, et al.: Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: A phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma. *J Clin Oncol* **5**: 1430-1440, 1987
- 3) Kinouchi T, Kotake T, Mori Y, et al.: Human renal cell carcinoma: establishment of a new cell line (OS-RC-2). *In Vitro Cell Dev Biol* **21**: 195-199, 1985
- 4) Kinouchi T, Nakayama E, Ueda R, et al.: Characterization of a kidney antigen defined by a mouse monoclonal antibody K2.7. *J Urol* **137**: 151-154, 1987

- 5) Pfreundschuh M, Shiku H, Takahashi T, et al.: Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 5122-5126, 1978
- 6) Kinouchi T, Saiki S, Naoe T, et al.: Correlation of c-myc expression with nuclear pleomorphism in human renal cell carcinoma. *Cancer Res* **49**: 3627-3630, 1989
- 7) Scholz D, Lubeck M, Loibner H, et al.: Biological activity in the human system of isotype variants of oligosaccharide-Y-specific murine monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* **33**: 153-157, 1991
- 8) Welt S, Carswell EA, Vogel CW, et al.: Immune and nonimmune effect or functions of IgG3 mouse monoclonal antibody R24 detecting the disialoganglioside GD3 on the surface of melanoma cells. *Clin Immunol Immunopathol* **45**: 214-229, 1987
- 9) Hellstrom I, Brankovan V and Hellstrom KE: Strong antitumor activities of IgG3 antibodies to a human melanoma-associated ganglioside. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 1499-1502, 1985
- 10) Cheresch DA, Honsik CJ, Staffileno LK, et al.: Disialoganglioside GD3 on human melanoma serves as a relevant target antigen for monoclonal antibody-mediated tumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 5155-5159, 1985
- 11) Ortaldo JR, Woodhouse C, Morgan AC, et al.: Analysis of effector cells in human antibody-dependent cellular cytotoxicity with murine monoclonal antibodies. *J Immunol* **138**: 3566-3572, 1987
- 12) Morgan AC Jr, Sullivan W, Graves S, et al.: Murine monoclonal IgG3 to human colorectal tumor-associated antigens: enhancement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by interleukin 2. *Cancer Res* **49**: 2773-2776, 1989
- 13) Seya T, Hara T, Matsumoto M, et al.: Complement-mediated tumor cell damage induced by antibodies against membrane cofactor protein (MCP, CD 46). *J Exp Med* **172**: 1673-1680, 1990

(Received on August 19, 1992)

(Accepted on August 22, 1992)

(迅速掲載)