

腎細胞癌における抗イデオタイプ抗体の 特異的免疫療法としての有用性

奈良県立医科大学泌尿器科学教室

植村 天受

POTENTIAL TOOLS OF ANTI-IDIOTYPE ANTIBODIES FOR ACTIVE SPECIFIC IMMUNOTHERAPY IN HUMAN RENAL CELL CARCINOMA

HIROTSUGU UEMURA

Department of Urology, Nara Medical University

Received January 30, 1996

Abstract: Anti-idiotypic antibody (Ab 2) mimicking the nominal antigen (internal image Ab 2) may be useful as vaccine for malignancies. Six internal image Ab 2 (NUH 31-91) were isolated directed against MAbG 250 which reacts with a large proportion of human renal cell carcinoma (RCC). Immunization of rabbits and mice with Ab 2 resulted in anti-anti-idiotypic antibodies (Ab 3), which reacted with G 250-positive (G 250⁺) cell lysates but not with G 250-negative (G 250⁻) cell lysates, indicating the presence of specific anti-TAA antibody. Competitive RIA resulted in specific anti-TAA antibodies resembling MAbG 250 (Ab 1') in all Ab 3 sera, i. e., the immunization of mice and rabbits resulted in a specific humoral anti-TAA response. To investigate whether the immunization with Ab 2 could induce cell mediated immunity against antigen-positive cells, delayed type hypersensitivity (DTH) tests were performed with G 250⁺ and/or G 250⁻ cells. For all six Ab 2, a profound DTH reaction was observed with G 250⁺ but not with G 250⁻ cells. The DTH responses could be transferred to naive mice by transfer of lymphocytes from mice sensitized with Ab 2. These results indicate that mice and rabbits immunized with the Ab 2 mount antigen specific humoral and cellular responses. Fine specificity studies of mouse and rabbit Ab 3 sera revealed that the six Ab 2 could be divided into four mutually exclusive groups.

Moreover, the anti-tumor efficacy of Ab 3 sera obtained from mice immunized with different internal image Ab 2 was investigated. Nu/nu BALB/c mice carrying small established NU 12 RCC xenografts or receiving a s. c. injection of 10⁵ SK-RC-52 RCC cells were treated by i. p. injection of 0.2 ml Ab 3 sera. This treatment resulted in complete tumor rejection and significant tumor growth inhibition as compared to control groups ($p < 0.01$). These findings demonstrate that immunization with Ab 2 elicits powerful anti-tumor effects in immune competent animals.

Index Terms

santi-idiotypic antibody, renal cell carcinoma, immunotherapy

結 言

腎細胞癌は極めて予後不良の疾患で、一般に行われている化学療法、放射線療法などはほとんど効果なく、手術療法以外に有用な治療法はないのが現状であり、進行腎細胞癌患者のほとんどは救命することはできない。また、腎細胞癌は転移巣の自然消退や腎摘除術後10年以上経過して再発転移する long dormancy など特異的な生物学的特性をもっており、宿主免疫能に深く関係していると考えられている¹⁾。このような特性より、サイトカインを中心とする免疫療法に期待がもたれ、多くの臨床試験が世界中で実施され検討されてきたが、奏効率は30%を超えるものは少なく満足できるものではない²⁾。過去10年における進行腎細胞癌の治療成績についてみると、最も効果的と思われるサイトカイン免疫療法においても明かな向上はみられず、既存の免疫療法では限界があるように思える。すなわち、腎細胞癌に特異的で革新的な治療法の開発が必要と考えられる。

抗イディオタイプ抗体はイディオタイプネットワーク説に基づき、免疫グロブリンの variable region (V 領域) に存在する抗原決定基に対する抗体として定義される。イディオタイプネットワークとは、1974年に Jerne³⁾ が提唱した概念で、抗体の V 領域は個々の免疫グロブリン特有の抗原性をもっており、V 領域に存在する抗原決定基に対する抗体、つまり抗イディオタイプ抗体 (Ab 2) を生じさせることができる。同様にして抗-抗イディオタイプ抗体 (Ab 3)、抗-Ab 3 抗体 (Ab 4)、抗 Ab 4... 抗 Abn と連鎖的に産生され、くもの巣状に宿主免疫系のネットワークを形成し免疫反応の平衡状態を保っているという仮説である。Ertl ら⁴⁾ は抗イディオタイプを V 領域の結合部位により3つのカテゴリーに分けている。すなわち、1) V 領域の抗原結合部位付近(あるいは部分的に結合部位を含む)を認識し、抗原-抗体結合を阻害するもの (Ab 2 α)、2) 抗原結合部位内部を認識する、すなわち結合する抗原と同じ構造を有するもの、所謂 internal image Ab 2 (Ab 2 β)、3) V 領域の抗原結合部位と離れた部分を認識するもの (Ab 2 ϵ) である。

もとなる同じ抗原性を V 領域にもつ internal image Ab 2 の存在を裏付ける実験的事実が多く報され^{5,6)}、多くの internal image Ab 2 が一次抗体 (Ab 1) より作製された^{5,7-10)}。Internal image Ab 2 はもとなる抗原と機能的に同じ抗原性をもつと考えられ、hepatitis B をはじめとする感染症で抗原の代わりに Ab 2 をワクチンとして使用したところ、抗原と結合可能な機能的に Ab 1 と類似した抗-抗イディオタイプ抗体 Ab 3 (Ab 1')

の誘導を認め、感染を防御するのに十分な免疫が得られた^{11,12)}。

このように、感染症において Ab 2 ワクチンは抗原特異的免疫療法として有用であることが示されたことにより、ヒト悪性腫瘍における Ab 2 の腫瘍ワクチンとしての効果が期待される。

Köhler ら¹³⁾ が、モノクローナル抗体 (MAb) 作製手法を報告して以来、腎細胞癌に対する数多くの MAb が作製されたが¹⁴⁻¹⁷⁾、正常腎組織に結合しない腎細胞癌特異的 MAb の報告は少ない。MAb G 250 は腎細胞癌原発巣の約 90% と反応し、正常腎組織とは反応を示さない非常に特異的な抗体で^{18,19)}、認識する抗原 G 250 は細胞膜および核に存在する 54/58 KD の糖蛋白で、子宮頸癌などにも発現している。

本研究は、Fig. 1 に示すごとく、腎細胞癌特異的抗体 MAb G 250 より、internal image Ab 2 を作製し、抗腫瘍抗体 (Ab 3) の誘導などその腫瘍ワクチンとしての有用性について検討したので報告する。

実験方法

1. 細胞

G 250 抗原陽性細胞株として SK-RC-52、陰性細胞株として SK-RC-59 を使用した。また、細胞融合には SP 2 /0 マウスミエロマ細胞を使用した。

2. Cell lysate

ELISA および RIA の抗原として cell lysate を用い

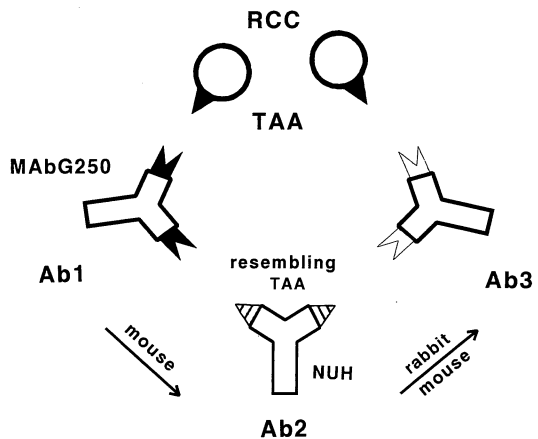


Fig. 1. Production of internal image antibodies directed against MAbG250. The idiotope of Ab2 mimics RCC-TAA, i. e., the "internal image" of TAA. Immunization with Ab2 elicits Ab3 mimicking Ab1 (so-called Ab1').

た. G 250 陽性および陰性細胞約 1 g を 4°C PBS にて 2 回洗浄後, 10 ml PBS / 0.5 % aprotinin 中にて tissue homogenizer (Kinemacia, Switzerland) を用い約 1 分間攪拌し, 13000 g 15 分間遠沈する. 沈殿に 10 ml PBS / 0.5 % aprotinin / 0.3 % deoxycholate を加え攪拌後再び 13000 g で 15 分間遠沈し, 上澄を cell lysate として -20°C で保存した. 尚, 以上の手技はすべて氷上で行った.

3. モノクローナル抗体

抗イディオタイプ抗体スクリーニングに, MAbG 250 (IgG 1 および IgG 2 a) F(ab')₂ フラグメントおよびマウス/ヒト キメラ G 250 抗体 (cG 250 IgG 1) を用いた. F(ab')₂ フラグメントは pepsin digestion 法にて作製し, cG 250 は Dr. Warnaar (Centocor BV, The Netherlands) より供与された. また, 免疫グロブリンはマウス腹水法を用い protein A affinity chromatography にて精製, 抗体の ¹²⁵I による radiolabelling は chloramine-T 法を用いて行った. 非特異的マウス IgG, マウスミエローマ蛋白 MOPC-21 (Sigma) をコントロールとして使用した.

4. 免疫および細胞融合

1 % グルタルアルデヒドを用い, MAbG 250 IgG 1 に Keyhole-Limpets-Hemocyanin (KLH) を coupling させ (MAbG 250-KLH), これを immunogen として用いた. 8 週齢雄 BALB/c マウスに 50 μg MAbG 250-KLH 含有完全 Freund アジュバント (CFA) 乳濁液 100 μl を用いて腹腔内に免疫し, 同じ抗原を用いて不完全 Freund アジュバント (IFA) 乳濁液 100 μl にて 3 週間隔で 3 回追加免疫した. 細胞融合の 5 日前より 3 日間連続で追加免疫した後, SP 2/0 マウスミエローマ細胞と standard method にて細胞融合した. ハイブリドーマの培養液は ELISA にてスクリーニングし agarose type VII 培地にて 3 回繰返しクローニングした.

5. Antigen binding ELISA

ハイブリドーマの Ab 2 産生有無については, binding ELISA にて検討した. 96 穴 microtiter plate を MAbG 250 IgG 1 F(ab')₂ あるいは MAbG 250 IgG 2 a F(ab')₂ にて coat し, 1 % 牛血清アルブミンを含む PBS (BSA/PBS) 100 μl にて 1 時間 blocking し, ハイブリドーマ培養液 100 μl を加え, 1 時間室温で incubate した. BSA/PBS にて 5 分間 3 回洗浄後, 二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG Fc にて 1 時間反応させ, 再び BSA/PBS にて 3 回洗浄後, O-phenylenediamine / 0.03 % H₂O₂ で発色させ 492 nm にて OD 測定した.

6. Inhibition RIA

0.01 μg ¹²⁵I-cG 250 と段階希釈した精製 Ab 2 を 45 分

間室温で反応させ, この mixture を cell lysate で coat した 96 穴塩化ビニル plate (Costar) に BSA / PBS で blocking した後, 加えた. 室温で 1 時間反応させた後, 3 回洗浄し, cell lysate に結合した ¹²⁵I-cG 250 をガンマカウンターにて計測した.

7. Western blot

ポリアクリルアミドゲル (reduced/non-reduced) を用い, MAbG 250 IgG 1, MAbG 250 IgG 2 a F(ab')₂ および MOPC-21 を電気泳動し, ニトロセルロース膜に転写した. 3 % BSA/PBS にて block した後, 10 μg/ml の Ab 2 にて 2 時間室温で反応させた. 3 % スキムミルクにて 3 回洗浄した後, ¹²⁵I-MAbG 250 にて blot を 1 時間反応させ, 乾燥させた後オートラジオグラフィーを撮影した.

8. ウサギおよびマウス Ab 3 血清における Ab 1' の検出

ウサギおよびマウス抗-抗イディオタイプ抗体血清は, 6 カ月齢雄性 NZW rabbit および 6 週齢雌性 BALB/c マウスを用い, 各々 250 μg, 50 μg Ab 2-KLH を抗原として CFA を用いて免疫し, 3 週間隔で IFA を用い 3 回追加免疫した後 7-10 日目に採血した. 採取した Ab 3 血清中に G 250 抗原と反応する抗体 (Ab 1') が存在するかどうかは, ELISA にて検索した. G 250 陽性および陰性 cell lysate coat した 96 穴 microtiter plate に段階希釈したウサギおよびマウス Ab 3 血清を加え室温にて 1 時間反応させ二次抗体ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスおよび抗ウサギ抗体を用い, 発色は 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine / 0.03 % H₂O₂ で行い, 450 nm で OD を測定した.

9. Ab 1' 含有 Ab 3 血清の specificity

各 Ab 2 の specificity について各 Ab 3 血清による各 ¹²⁵I-Ab 2 の MAbG 250 F(ab')₂ への結合阻害を RIA にて検討した. すなわち, MAbG 250 F(ab')₂ にて coat した plate に一定量の各 ¹²⁵I-Ab 2 と段階希釈した各 Ab 3 血清を加え 1 時間 incubation した後, 結合した ¹²⁵I-Ab 2 を測定した. 結果は各 ¹²⁵I-Ab 2 の MAbG 250 F(ab')₂ への結合阻害はパーセントで示した.

10. Competitive RIA (Ab 1 vs Ab 3 血清)

Ab 1' 含有 Ab 3 血清が実際に MAbG 250 (Ab 1) と機能的に同じであるかどうか, ¹²⁵I-Ab 1 と各 Ab 3 血清間で競合試験を行った. まずウサギ Ab 3 血清の非特異的抗マウス反応を除去する目的で非特異的マウス IgG conjugate Affigel 10 (Bio-Rad) カラムを用い, 抗マウス抗体を吸着した. G 250 陽性 cell lysate を coat した plate を用い, 一定量の ¹²⁵I-cG 250 と段階希釈したウサギ Ab 3 血清を同時に加え Ab 3 血清の ¹²⁵I-cG 250-抗原結合阻害について検討した.

11. 遅延型過敏反応(DTH)の誘導

抗イディオタイプ抗体(Ab 2)により抗原特異的な細胞性免疫が誘導されるかどうかマウス耳翼を用いてDTHテストを行った。

6週齢雄性BALB/cマウスを50 μ g Ab 2-KLH/CFAにて免疫し, Ab 2-KLH/IFAにて2回追加免疫した後, 7日目にSK-RC-52(G 250 陽性)およびSK-RC-59(G 250 陰性)細胞 5×10^4 個/0.01 ml PBSを注射後24, 48時間で耳翼の厚みを測定し, 注射前後での差を検討した。

Table 1. Characterization of anti-idiotypic antibodies

Name of Ab2	Subclass	Affinity binding constant to Abl ($\times 10^{10} M^{-1}$)	50% inhibition of Abl binding to Ag Ab2 conc. (μ g/ml)
NUH11	IgG1	0.93	0.66
NUH21	IgG1	2.13	1.14
NUH31	IgG1	1.18	0.94
NUH44	IgG2a	1.25	0.42
NUH51	IgG1	0.45	0.48
NUH61	IgG1	0.66	0.43
NUH71	IgG1	1.25	0.67
NUH82	IgG1	0.82	0.35
NUH91	IgG1	1.08	0.51

また, 免疫を行っていないマウスをコントロールとして用いた。結果は, specific ear swelling(s. e. s.)として表した²⁰⁾。

次にDTH反応が免疫されたマウスのリンパ球によるものかを確認するため, 無感作マウスに感作リンパ球を移送するリンパ球トランスファーDTHテストを行った。免疫マウスの脾臓と腋窩リンパ節を300 μ mステンレスメッシュにて圧搾し, 40-70 ナイロンメッシュフィルターを通し, 遠沈後single cell suspensionを作り, リンパ球 10^7 個/0.4 ml 生食水をtail veinより無感作マウスに注射し, 30分後に腫瘍細胞を同様に耳翼に注射しDTH反応を観察した。

12. マウス Ab 3 血清の抗腫瘍効果の検討

1) protection 効果

1グループ6匹の6週齢雄性BALB/c nu/nuマウスの右側腹部皮下にSK-PC-52細胞 10^5 個を注射し, 同時に治療を開始した。治療は, 1. NUH 31-KLHで免疫したマウス血清(AB 3-31), 2. NUH 71-KLH免疫マウス血清(AB 3-71), 3. NUH 82-KLH免疫マウス血清(AB 3-82), 4. NUH 91-KLH免疫マウス血清(AB 3-91),

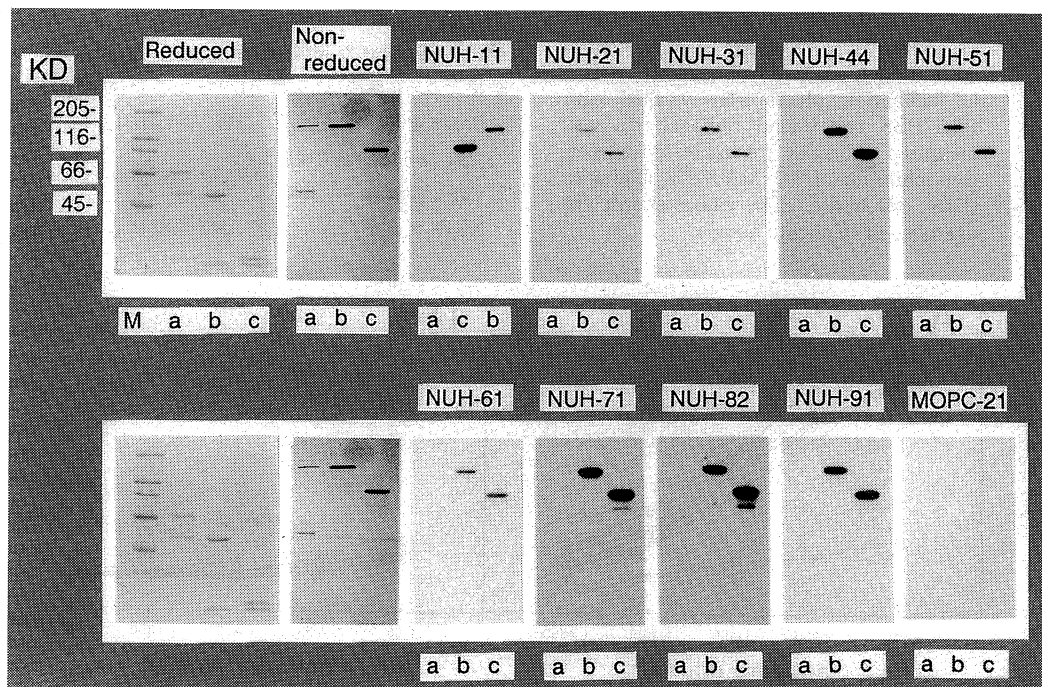


Fig. 2. Western blot analysis of Ab2s with MAbG250 on non-reduced SDS-PAGE. Lane a: MOPC-21, Lane b: MAbG250 IgG1, Lane c: MAbG250 F(ab')₂ IgG2a, M: maker. Reduced & non-reduced: Coomassie Brilliant Blue stained gel, NUH11-91, MOPC-21: autoradiogram of Western blot incubated with NUH11-91, MOPC-21.

5. 無治療群(cont), 6. MOPC-21-KLH 免疫マウス血清 (Ab 3-MOPC), 7. 正常マウス血清(NMS), 8. MAb G 250 IgG 1 で行い, Ab 3 血清, NMS は 0.2 ml, MAbG 250 は 250 μ g/0.2 ml PBS を週 2 回腹腔内投与し 5 週間続行した. 腫瘍サイズは sliding digital calliper (Mitsutoyo) にて測定し, 下記に示す tumor size index (TSI) にて表した.

TSI = 長径 \times 短径 \times 高さ / 2

2) Renal Cell Carcinoma (RCC) xenograft に対する効果

NU 12 ヒト RCC xenograft の 2~3 mm³ 小腫瘍片を 6 週齢雄 BALB/c nu/nu マウス右側腹部皮下に移植し, 2-3 週後腫瘍サイズが約 20 mm³ になった時点で randomize し, 1 グループ 6 匹の 4 グループに分け, 治療を開始した. すなわち, Ab 3-82, Ab 3-91, Ab 3-MOPC, MAbG 250 (250 μ g) および無治療の 5 群で投与方法は前述と同様で治療開始期間は 6 週間, 腫瘍の大きさは TSI にて表した.

結 果

1. 抗イデオタイプ抗体の作製

ハイブリドーマ培養液のスクリーニングにより, MAbG 250 IgG 1 F(ab')₂ および MAbG 250 IgG 2 aF (ab')₂ 両者に結合する抗イデオタイプ抗体は Table 1 に示すごとく 9 種あり, Affinity binding constant も類似していた. また, Western blot ではいずれも non-reduced gel でのみ MAbG 250 および MAbG 250 F (ab')₂ に結合が認められ, reduced gel では全く結合しなかった (Fig. 2). Inhibition RIA ではすべての Ab 2 が dose dependent な inhibition を示し (Fig. 3), これらの結果より, 9 種の Ab 2 は Ab 2 α あるいは Ab 2 β タイプであることが示唆された. 以後, NUH 31, 44, 51, 71, 82, 91 の 6 種について検討した.

2. Ab 3 の誘導

NZW ウサギにおいて各 Ab 2 免疫により得られた

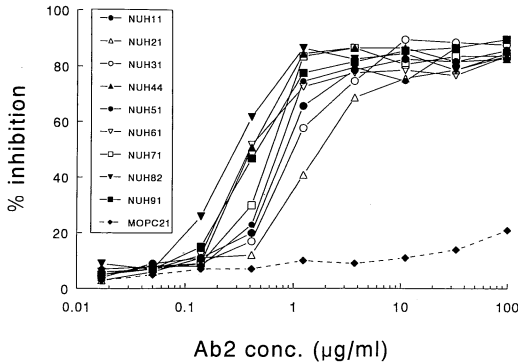


Fig. 3. Inhibition of MAbG250 binding to antigen positive cell lysates by Ab2. Mixtures of ¹²⁵I-MAbG250 and serial diluted Ab2s or MOPC-21 were added to wells coated with antigen positive cell lysates. After 1 hr incubation, plates were washed with BSA/PBS and bound radioactivity was measured. Results are expressed as percent inhibition of ¹²⁵I-MAbG250 binding to G250⁺ cell lysate. The values shown are averages of triplicate assays.

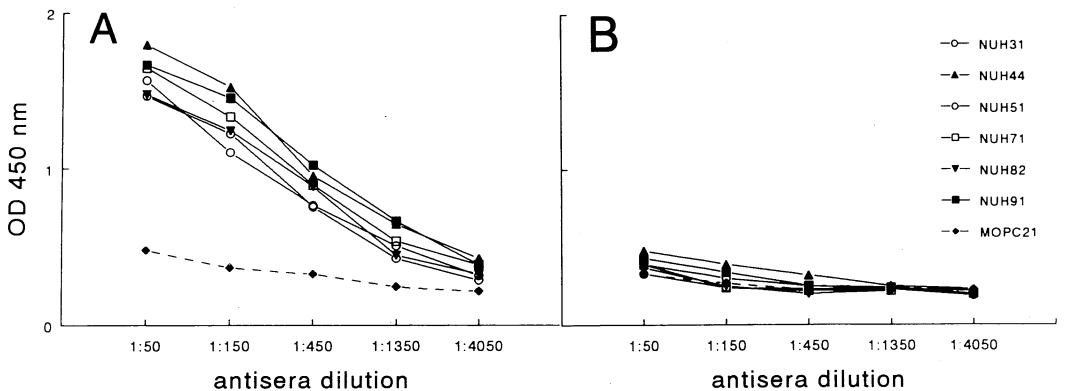


Fig. 4. Detection of anti-anti-idiotypic antibody (Ab1') in rabbit sera. Microtiter plates were coated with G250-positive (A) and G250-negative cell lysates (B) and incubated with serial dilutions of rabbit sera. After washes with BSA/PBS, bound Ab3 was detected with swine anti-rabbit IgG conjugated to horse radish peroxidase.

Ab 3-NUH 血清はいずれも G 250 抗原陽性 cell lysate と反応するもの (Fig. 4 A), G 250 陰性 cell lysate とは反応を認めなかった (Fig. 4 B). また control として MOPC-21 免疫にて得られた Ab 3-MOPC は G 250 抗原陽性, 陰性 cell lysate とともに反応しなかった. すなわち, Ab 3-NUH 血清中には, G 250 抗原特異的な抗体 (Ab'1) の存在が示唆された. また, Ab 3-NUH 血清と ^{125}I -cG 250 との competitive RIA では差はあるものの, すべての Ab 3 血清にて ^{125}I -cG 250 の G 250 陽性 cell lysate への結合を競合し, 以上より, 6 種の Ab 2 は G 250 抗原の internal image を有していると考えられた (Fig. 5).

3. DTH 反応の誘導

抗イディオタイプ抗体 (Ab 2) により G 250 抗原特異的な細胞性免疫反応が誘導されるかどうか抗原陽性細胞に対する DTH 反応にて検討した. 各 Ab 2 (NUH 31, 44, 51, 71, 82, 91) で免疫された BALB/c マウスはいずれも G 250 抗原特異的な DTH 反応を示したが, G 250 抗原陰性細胞の challenge に対しては特異な DTH 反応を示さなかった. また, MOPC-21 にて免疫されたマウスでは G 250 抗原陽性および陰性細胞にも特異な DTH 反応を示さなかった (Fig. 6). この抗原特異的 DTH 反応は Ab 2 免疫によって感作されたリンパ球によるものと

考えられることから, Ab 2 免疫マウスのリンパ球 1×10^7 個を naive マウスに transfer して DTH 反応の誘導の有無を確かめた. 結果は感作リンパ球を transfer されたマウスすべてに抗原特異的な DTH 反応を認め, G 250

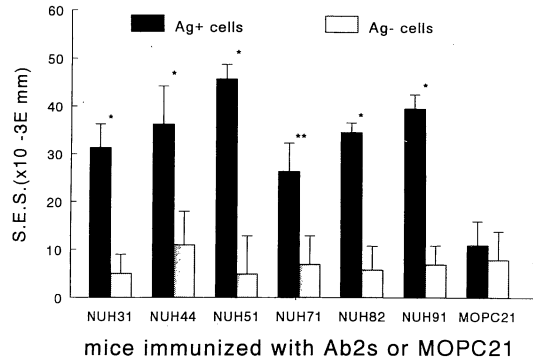


Fig. 6. Specificity of DTH responses to G250⁺ (A) and G250⁻ (B) cells in Ab2s-sensitized BALB/c mice. BALB/c mice were immunized with Ab2 or MOPC-21 conjugated to KLH in CFA. After 2 boosters, 5×10^4 cells were injected into the ear pinna. The increase of ear thickness was measured 24 and 48 hrs after tumor challenge. The ear swelling is expressed as s. e. s. $\times 10^{-3}$ mm (see Material and Methods). * : $p < 0.01$, ** : $p < 0.05$.

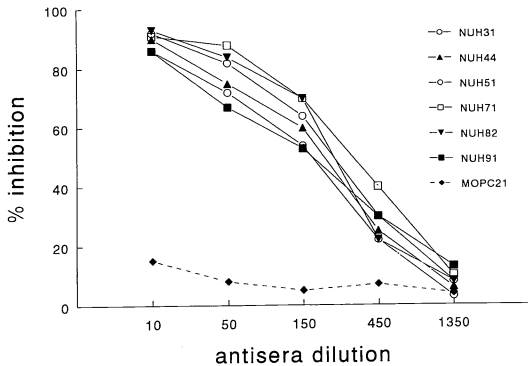


Fig. 5. Competitive assay of Ab1 and Ab3 to antigen positive cell lysates. Microtiter plates coated with G250-positive cell lysates were incubated with serial dilutions of Ab3 sera pre-absorbed with mouse serum. A fixed amount of ^{125}I -MABG250 was added and incubated for 1 hr. After washes, bound radioactivity was determined. Results are expressed as percent inhibition of ^{125}I -MABG250 binding to G250⁺ cell lysate. The values shown are averages of triplicate assays.

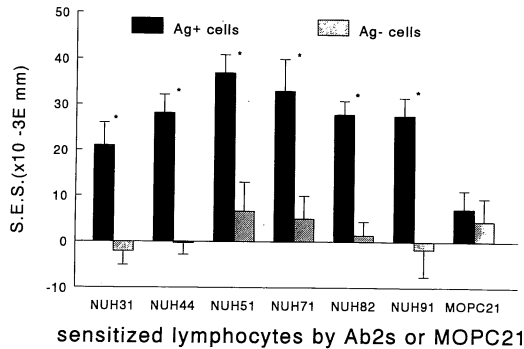


Fig. 7. DTH responses to G250⁺ (A) and G250⁻ (B) cells in naive mice that received 2×10^7 lymphocytes harvested from sensitized mice. 30 min. after the lymphocytes transfer, 5×10^4 antigen-positive and negative cells were injected into the ear pinna and DTH responses were measured 24 and 48 hrs after challenge. The increment of ear thickness is expressed in s. e. s. $\times 10^{-3}$ mm. * : $p < 0.01$, ** : $p < 0.05$.

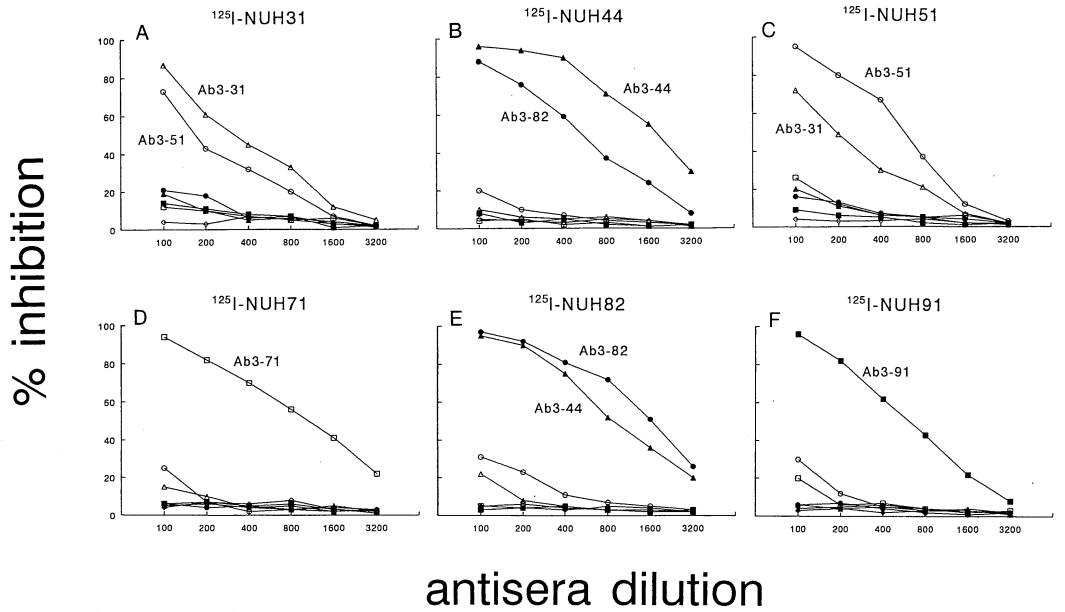


Fig. 8. Fine specificity of Ab3 antisera. Microtiter plates coated with MAbG250 F (ab')₂ fragments were incubated with a fixed amount of any of the ¹²⁵I-Ab2 and serial dilutions of Ab3 sera for 1 hr at room temperature. After four washes, bound ¹²⁵I-Ab2 was measured. The results were expressed as the percent inhibition of binding of ¹²⁵I-Ab2 to Ab1 F(ab')₂.

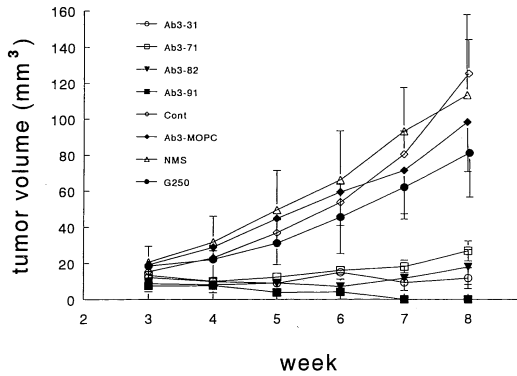


Fig. 9. Tumor growth curves of RCC challenged animals treated with Ab3. BALB/c nu/nu mice received s. c. injections of 10⁶ SK-RC-52 cells in the right flank, and treatment was started. Four groups of mice were treated with i. p. injections of Ab3 sera (Ab3-31, 71, 82 or 91), and three groups served as controls: no treatment was given (None), mice were treated with serum from MOPC21 immunized mice (Ab3-MOPC), mice received normal mouse serum (NMS), or MAbG250 (250 μg). Tumor volumes are expressed as mean ± SE. Figure is representative for several independently performed experiments.

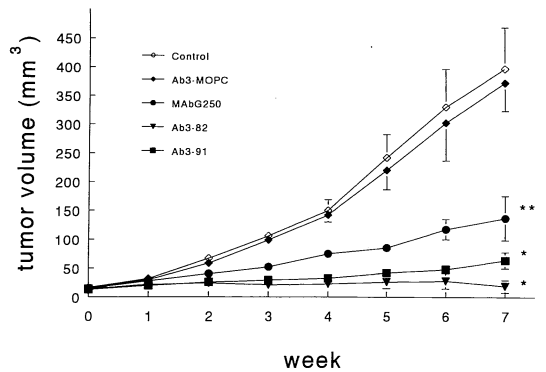


Fig. 10. Anti-tumor effects of Ab3 therapy, in mice with NU12 established RCC xenografts. Significant reduction in tumor growth was achieved with Ab3-82, -91, or MAbG250 treatment as compared to Ab3-MOPC treated and non-treated mice (*: p < 0.01, **: p < 0.05 vs Ab3-MOPC treated and non-treated tumors).

陰性細胞に対して有意な反応を示さなかった。また、MOPC-21 免疫マウスは G 250 抗原陽性および陰性細胞にも特異的な DTH 反応を示さなかった (Fig. 7)。

4. Ab 2 fine specificity の検討

各 Ab 2 免疫により誘導された G 250 抗原特異抗体 Ab 1' の特異性について Ab 3 血清を inhibitor とした¹²⁵I-Ab 2 の Ab 1 への結合に対する inhibition RIA を施行した。その結果、6 種の Ab 2 は 4 つの異なったグループに分けることができた。すなわち、NUH 71 と 91 は各々自ら誘導した Ab 3-71, 91 によってのみ inhibition を認め (Fig. 8 D, F), NUH 31 と 51 はほぼ同一の Ab 2 と考えられ NUH 31 は Ab 3-31, 51, また NUH 51 も Ab 3-31, 51 によって類似した inhibition を示した (Fig. 8, A, C)。同様に NUH 44 と NUH 82 は類似したイデオトープを認識していると考えられ、同じグループであった (Fig. 8 B, E)。

5. Ab 3 血清による抗腫瘍効果

1) SK-RC-52 cell challenge に対する治療効果

Protection 効果については前述の 4 グループより Ab 3-31, 71, 82, 91 を用いて治療した。治療群は治療開始後より著明な腫瘍発育抑制を認め、治療開始後 4 週ではコントロール群と比較し、すでに腫瘍サイズは有意に小さく ($p < 0.05$)、治療終了後 3 週 (開始後 8 週) では Ab 3-82, 91 治療群において完全消失した腫瘍もあり、著明な抗腫瘍効果を認めた ($p < 0.01$) (Fig. 9)。

2) NU 12 RCC Xenograft に対する抗腫瘍効果

腫瘍サイズ 20 mm³ と確立された腫瘍に対する治療効果は、Ab 3-NUH および MAbG 250 治療群で治療開始後より Ab 3-MOPC 治療群 (コントロール) に比べ著明な腫瘍発育抑制を認め、治療開始後 7 週 (終了後 1 週) では Ab 3-82 治療群で complete tumor remission の症例も認められるなどコントロールに比べ有意な抗腫瘍効果を示した (Ab 3-NUH : $p < 0.01$, MAbG 250 : $p < 0.05$)。また Ab 3-NUH 治療群は有意差はないものの MAbG 250 治療群より強い抗腫瘍効果を示した (Fig. 10)。

考 察

進行性腎細胞癌において、現在のところ一般に行われている治療法は有用ではない。また腎細胞癌は前述した如く特異的な生物学的特性より宿主免疫が disease course に重要な役割を担っていると考えられている。それ故、免疫療法がもっとも適切な期待されている治療法である。しかし BRM による多種多彩な治療にもかかわらず、その奏効率は 30 % を超えることは少なく、進行腎細

胞癌患者のほとんどは救命できない。明らかに、より腫瘍に特異的な治療法が必要と考えられる。

最初に行われた腎細胞癌特異的免疫療法は腫瘍ワクチンであった。Tykkä ら²¹⁾や Sahasrabudhe ら²²⁾は進行性腎細胞癌患者の自己癌細胞を腫瘍ワクチンとして用い、生存率の改善などについて報告しているが、その後の多施設での検討では、自己 RCC ワクチンによる治療は無効であったと報告が続いた。また最近では腎細胞癌の tumor infiltrating lymphocyte (TIL) より cytotoxic T lymphocyte (CTL) が単離されるようになり、特異的免疫療法として非常に期待の大きいところであるが、単離される確立は非常に低く今後の課題となっている²⁵⁾。

Passive な特異的免疫療法として腫瘍関連抗原に特異的なモノクローナル抗体を使用することも可能である。モノクローナル抗体による癌免疫療法はメラノーマやリンパ腫などで報告されており²⁶⁾、complete response の報告もあるが、多くは奏効率が低く奏効期間も短い。また腎細胞癌においても数多くのモノクローナル抗体が開発されたが、その多くは正常腎組織 (近位尿管) とも反応し、腎細胞癌に特異的なものは少ない²⁷⁾。

腎細胞癌におけるモノクローナル抗体の臨床応用は非常に少なく、ほとんどラジオイムノシンチグラフィによる診断目的で使用され^{27,28)}、安全性、有用性が示されたものの、患者全例に抗マウス抗体 (HAMA) が認められ、治療目的の使用には少し問題がある。

やはり腎細胞癌特異的免疫療法においては革新的なアプローチが必要であると考えられる。

その中で最近 "gene therapy" がもっとも注目されており、トピックとなっている。すなわち、宿主にとって無抗原性となっている腫瘍細胞にサイトカイン遺伝子を導入し、抗原性を modify して腫瘍ワクチンとして使用したり、あるいは自殺遺伝子を導入して腫瘍を殺すという idea である。"gene therapy" の 1 つとして、抗イディオタイプ抗体 (Ab 2)、特に、腫瘍抗原の mirror image を抗原結合部位にもつ internal image 抗イディオタイプ抗体も、腫瘍ワクチンとしてその臨床効果に期待がもたれている。数年前より抗腫瘍抗体 (Ab 1) より、Ab 1 が認識する抗原すなわち腫瘍抗原 (TAA) と同様の機能をもつ internal image Ab 2 が開発されてきている²⁹⁻³⁵⁾。興味深いことには、動物実験において TAA を発現している腫瘍細胞で免疫しても抗腫瘍抗体 (Ab 1) を誘導しないにもかかわらず、Ab 2 ワクチンにより TAA と結合する抗腫瘍抗体 (Ab 1') が誘導された報告もある³⁶⁾。おそらく、これは Ab 2 による少し異なった抗原提示が、免疫原性を enhance したものと推測される。

そこで、このような現況を鑑みて、腎細胞癌治療における Ab 2 を腎細胞癌特異的抗体 MAbG 250 より NUH 31, 51, 71, 82, 91; IgG 1 および NUH 44; IgG 2 a を作製した。この 6 種の Ab 2 は Western blot, inhibition および competition RIA により MAbG 250 の抗原結合部位に特異的、すなわち G 250 抗原の internal image を有しており、この 6 種の Ab 2 ワクチン全てにおいて Ab 1' の誘導が確認できた。しかしながら、癌免疫療法における抗腫瘍効果の主体となるものは、細胞性免疫反応である。Ab 2 ワクチンによる T 細胞反応の誘導の報告は、最近、実験的だけでなく臨床的にも散見される³⁶⁻³⁹⁾。

本研究においても 6 種の Ab 2 の認識するイディオトープは fine specificity study によりそれぞれ若干異なるものの、G 250 抗原陽性細胞にのみ特異的な DTH 反応を示し、これら Ab 2 ワクチンは抗原特異的液性免疫だけでなく細胞性免疫も誘導することが示され、実際の治療における抗腫瘍効果が期待される。

そこで、さらに臨床試験に供与し得る基礎データの確立を試み、ヒト RCC SK-RC-52 および NU 12 Xenograft を使ったヌードマウスモデルにて、Ab 2 誘導 Ab 3 血清を用いた治療実験を行ったところ、いずれのモデルでも T 細胞不全マウスにもかかわらず、コントロールと比較し著明な抗腫瘍効果を示した ($p < 0.01$)。また、MAbG 250 単独治療群よりも優れた治療効果を示し、Ab 3 血清治療の有用性が示唆された。

しかし、Ab 3 血清中にはサイトカインをはじめとする soluble factor が含有されており、本実験の結果はサイトカイン等による抗腫瘍効果も考えられるが、Van Dijk ら⁴⁰⁾が同じ NU 12 Xenograft モデルを用いて行った治療実験では、大量のサイトカインコンビネーション療法によってのみ有意な抗腫瘍効果を示したことから、本研究の治療実験における抗腫瘍効果は、主に Ab 2 ワクチンにより誘導されたものと考えられる。

次に、Ab 2 による臨床試験は、非常に限られた施設ではあるが、すでに high stage のメラノーマと消化器癌患者で行われている。両疾患の Ab 2 ワクチン使用患者においては、抗原特異的な抗体 (Ab 1') や DTH 反応を認め、Ab 2 を使用しなかったコントロール群と比較し有意な生存期間の延長を認めるなど、Ab 2 のワクチンとしての有用性が臨床的にも示されている^{39,41)}。

予後不良の難治性疾患である進行性腎細胞癌において、腫瘍ワクチンとして internal image Ab 2 を使用することは、革新的な特異的免疫療法と言える。本研究において開発した 6 種の internal image Ab 2 は、動物実験において抗原特異的な液性および細胞性免疫反応を惹起し、

腫瘍ワクチンとしての有用性が確認され、臨床応用への重要な基礎になると考えられる。

結 語

腎細胞癌に対するマウス特異的抗体 MAbG 250 より 6 種の抗イディオタイプ抗体 (MUH 31, 44, 51, 71, 82, 91) を作製し、以下の結果を得た。

1. 6 種の抗イディオタイプ抗体 (Ab 2) は、Western blot, inhibition および competition RIA により、MAbG 250 の抗原結合部位に特異的と考えられ、G 250 抗原の internal image を有していると考えられた。

2. 6 種の Ab 2 で免疫することにより、G 250 抗原に結合する抗体 (Ab 1') および G 250 抗原特異的 DTH 反応が誘導され、これらの Ab 2 ワクチンは、抗原特異的液性および細胞性免疫を誘導することが証明された。

3. SK-RC-52 および NU 12 Xenograft ヒト腎細胞癌担癌ヌードマウスにおいて、これら Ab 2 により誘導されたマウス Ab 3 血清による治療は、著明な抗腫瘍効果を示し ($p < 0.01$)、一部のマウスでは complete response も認められた。

以上の結果より、internal image 抗イディオタイプ抗体は腫瘍ワクチンとして有用であり、腎細胞癌における特異的革新的なアプローチと考えられた。

稿を終えるに当たり、御指導、御校閲を賜りました恩師岡島英五郎教授ならびに御助言、御校閲を賜った公衆衛生学教室米増國雄教授、寄生虫学教室石坂重昭教授に深甚なる謝意を表しますとともに、さらに研究遂行にあたり御指導、御協力をいただきましたオランダナイメヘン大学泌尿器科学教室 Prof. Frans M. J. Debruyne ならびに Dr. Egbert Oosterwijk に感謝いたします。

文 献

- 1) Ritchie, A. W. S and deKernioin, J. B. : The natural history and clinical features of renal carcinoma. *Semin. Nephrol.* 7 : 131, 1987.
- 2) Heicappell, R. and Ackermann, R. : Current strategies for immunotherapy of renal cell carcinoma. *World J. Urol.* 9 : 204, 1991.
- 3) Jerne, N. K. : Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol.* 125 C : 373, 1974.
- 4) Ertl, H. C. J. and Bona, C. A. : Criteria to define anti-idiotypic antibodies carrying the internal image of an antigen. *Vaccine* 6 : 80, 1988.
- 5) Sege, K. and Peterson, P. A. : Use of anti-

- idiotypic antibodies as cell-surface receptor probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** : 2443, 1978.
- 6) **Urbain, J., Wuilmart, C. and Cazenave, P. A.** : Idiotypic regulation in immune networks. *Contemp. Topics Mol. Immunol.* **8** : 113, 1981.
- 7) **Marasco, W. A. and Becker, E. L.** : Antiidiotype as antibody against the formyl peptide chemotaxis receptor of the neutrophil. *J. Immunol.* **128** : 963, 1982.
- 8) **Gaulton, G. N., Co, M. S., Royer, H. D. and Greene, M. I.** : Antiidiotypic antibodies as probes of cell-surface receptors. *Mol. Cell. Biochem.* **65** : 5, 1985.
- 9) **Homcy, C. J., Rockson, S. G. and Haber, E.** : An antiidiotypic antibody that recognizes the β -adrenergic receptor. *J. Clin. Invest.* **69** : 1147, 1982.
- 10) **Wasserman, N. H., Penn, A. S., Freimuth, P. I., Treptow, N., Wentzel, S., Cleveland, W. L. and Erlanger, B. F.** : A new route to anti-acetylcholine receptor antibodies and experimental myasthenia gravis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79** : 4810, 1982.
- 11) **Nisonoff, A.** : Idiotypes : Concepts and applications. *J. Immunol.* **147** : 2429, 1991.
- 12) **Sikorska, H. M.** : Therapeutic applications of anti-idiotypic antibodies. *J. Biol. Response Mod.* **7** : 327, 1988.
- 13) **Köhler, G. and Milstein, C.** : Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **265** : 495, 1975.
- 14) **Luner, S. J., Ghose, T., Chatterjee, S., Cruz, H. N. and Belitsky, P.** : Monoclonal antibodies to kidney and tumor-associated surface antigens of human renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **46** : 5816, 1986.
- 15) **Vessella, R. L., Moon, T. D., Chiou, R. K., Nowak, J. A., Arfman, E. W., Palme, D. F., Peterson, G. A. and Lange, P. H.** : Monoclonal antibodies to renal cell carcinoma : recognition of shared and restricted tissue antigens. *Cancer Res.* **45** : 6131, 1985.
- 16) **Finstad, C. L., Cordon-Cardo, C., Bander, N. H., Whitmore, W. F., Melamed, M. R. and Old, L. J.** : Specificity analysis of mouse monoclonal antibodies defining cell surface antigens of human renal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 2955, 1985.
- 17) **Wahlström, Y., Närvänen, A., Suni, J., Pakkanen, R., Lehtonen, T., Saksela, E., Vaheri, A., Copeland, T., Cohen, M. and Oroszlan, S.** : Mr 75,000 protein, a tumor marker in renal cell adenocarcinoma, reacting with antibodies to a synthetic peptide based on a cloned human endogenous retroviral nucleotide sequence. *Int. J. Cancer* **36** : 379, 1985.
- 18) **Oosterwijk, E., Ruiter, D. J., Hoedemaeker, P. J., Pauwels, E. K. J., Jonas, U., Zwartendijk, J. and Warnaar, S. O.** : Monoclonal antibody G 250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney. *Int. J. Cancer* **38** : 489, 1986.
- 19) **Oosterwijk, E., Ruiter, D. J., Wakka, J. C., Huiskens vd Mey, J. W., Jonas, U., Fleuren, G. J., Zwartendijk, J. Hoedemaeker, P. J. and Warnaar, S. O.** : Immunohistochemical analysis of monoclonal antibodies to renal antigens. *Am. J. Pathol.* **123** : 301, 1986.
- 20) **Vandebriel, R. A., De Weger, R. A., Los, G., Van Loveren, H., Wiegers, G. J., Oude Weernink, P. A. and Den Otter, W.** : Two specific T cell factors that initiate immune responses against murine tumor allografts. A comparison of biologic functions. *J. Immunol.* **143** : 66, 1989.
- 21) **Tykkä, H., Oravisto, K. J., Lehtonen, T., Sarna, S. and Tallberg, T.** : Active specific immunotherapy of advanced renal-cell carcinoma. *Eur. Urol.* **4** : 250, 1978.
- 22) **Sahasrabudhe, D. M., De Kernion, J. B., Pontes, J. E., Ryan, D. M., O'Donnell, R. W., Marwuis, D. M., Mudholkar, G. S. and McCune, C. S.** : Specific immunotherapy with suppressor function inhibition for metastatic renal cell carcinoma. *J. Biol. Response Mod.* **5** : 581, 1986.
- 23) **Fowler, J. E.** : Failure of Immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma. *J. Urol.* **135** : 22, 1986.
- 24) **Schärfe, T., Müller, S., Riedmiller, H., Jacobi, G. H. and Hohenfellner, R.** : Immunotherapy of metastasizing renal cell carcinoma. Results of a

- multicentered trial. *Urol. Int.* **44** : 1, 1989.
- 25) **Schendel, D. J.** and **Gansbacher, B.** : Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor-infiltrating lymphocytes : Modulation of recognition through retroviral transduction of tumor cells with interleukin 2 complementary DNA and exogenous α interferon treatment. *Cancer Res.* **53** : 4020, 1993.
 - 26) **Foon, K. F.** : Biological response modifiers : the new immunotherapy. *Cancer Res.* **49** : 1621, 1989.
 - 27) **Schmitz-Dräger, B. J., Ebert, T.** and **Decken, K.** : Monoclonal antibodies and renal cell carcinoma-current possibilities and future options. *World J. Urol.* **9** : 198, 1991.
 - 28) **Oosterwijk, E., Bander, N. H., Divgi, C. R., Welt, S., Wakka, J. C., Finn, R. D., Carswell, E. A., Larson, S. M., Warnaar, S. O., Fleuren, G. J., Oettgen, H. F.** and **Old, L. J.** : Antibody location in human renal cell carcinoma : A phase I study of monoclonal antibody G 250. *J. Clin. Oncol.* **11** : 738, 1993.
 - 29) **Raychaudhuri, S., Saeki, Y., Fuji, H.** and **Kohler, H.** : Tumor-specific idiotype vaccines. I. Generation and characterization of internal image tumor antigen. *J. Immunol.* **137** : 1743, 1986.
 - 30) **Monestier, M., Debbas, M. E.** and **Goldenberg, D. M.** : Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to murine anticarcinoembryonic antigen monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **49** : 123, 1989.
 - 31) **Austine, E. B., Robins, R. A., Durrant, L. G., Prince, M. M.** and **Baldwin, R. W.** : Human monoclonal anti-idiotypic antibody to the tumor-associated antibody 791 T/36. *Immunology* **67** : 525, 1989.
 - 32) **Lehmann, H.-P., Zwicky, C., Waibel, R.** and **Stahel, R. A.** : Tumor-antigen-specific humoral immune response of animals to anti-idiotypic antibodies and comparative serological analysis of patients with small-cell lung carcinoma. *Int. J. Cancer* **50** : 86, 1992.
 - 33) **Viale, G., Grassi, F., Feragi, M., Alani, R., Menard, S., Miotti, S., Buffa, R., Gini, A.** and **Siccardi, A. G.** : Anti-human tumor antibodies induced in mice and rabbits by "internal image" anti-idiotypic monoclonal immunoglobulins. *J. Immunol.* **139** : 4250, 1987.
 - 34) **Durrant, L. G., Denton, G. W. L., Jacobs, E., Mee, M., Moss, R., Austin, E. B., Baldwin, R. W., Hardcastle, J. D.** and **Robins, R. A.** : An idiotypic replica of carcinoembryonic antigen inducing cellular and humoral responses directed against human colorectal tumours. *Int. J. Cancer* **50** : 811, 1992.
 - 35) **Chattopadhyay, P., Kaveri, S.-V., Byars, N., Starkey, J., Ferrone, S.** and **Raychaudhuri, S.** : Human high molecular weight melanoma associated antigen mimicry by an anti-idiotypic antibody : Characterization of the immunogenicity and the immune response to the mouse monoclonal antibody IMel-1. *Cancer Res.* **51** : 6045, 1991.
 - 36) **Nepom, G. T., Nelson, K. A., Holbeck, S. L.** and **Hellstöm, K. E.** : Induction of immunity to a human tumor marker by in vivo administration of anti-idiotypic antibodies in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 2864, 1984.
 - 37) **Dunn, P. L., Johnson, C. A., Styles, J. M., Pease, S. S.** and **Dean, C. J.** : Vaccination with syngeneic monoclonal anti-idiotypic protects against tumor challenge. *Immunology* **60** : 181, 1987.
 - 38) **Austin, E. B., Robins, R. A., Baldwin, L. G.** and **Durrant, L. G.** : Induction of delayed hypersensitivity to human tumor cell with a human monoclonal anti-idiotypic antibody. *J. Natl. Cancer Inst.* **83** : 1245, 1991.
 - 39) **Durrant, L. G., Buckley, T. J. D., Denton, G. W. L., Hardcastle, J. D., Sewell, H. F.** and **Robins, R. A.** : Enhanced cell mediated tumor killing in patients immunized with human monoclonal anti-idiotypic antibody 105 AD 7. *Cancer Res.* **54** : 4837, 1994.
 - 40) **Van Dijk, J., Uemura, H., Beniers, A. J. M. C., Peelen, W. P., Zegveld, S. Th., Fleuren, G. J., Warnaar, S. O.** and **Oosterwijk, E.** : Therapeutic effects of monoclonal antibody G 250, interferons and tumor necrosis factor in mice with renal cell carcinoma xenografts. *Int. J. Cancer* **56** : 262, 1994.

- 41) **Mittelman, A., Chen, Z. J., Yang, H., Wong, G. Y. and Ferrone, S.:** Human high molecular weight melanoma-associated antigen (HMWMAA)mimicry by mouse anti-idiotypic monoclonal antibody MK 2-23: Induction of humoral anti-HMW-MAA immunity and prolongation of survival in patients with stage IV melanoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 466, 1992.