

犬の骨肉腫の抗体標的化学療法（ミサイル療法）に関する基礎研究

桐澤力雄¹⁾・七戸新太郎¹⁾・金山弓華¹⁾・廉澤剛²⁾

Fundamental Studies on Antibody-conjugated Chemotherapy against Canine Osteosarcoma

Rikio KIRISAWA¹⁾, Shintaro SHICHINOHE¹⁾, Yumika KANEYAMA¹⁾ and Tsuyoshi KADOSAWA²⁾
(Accepted 26 December 2012)

緒 論

骨肉腫は悪性骨腫瘍の1つで、悪性骨腫瘍は原発性悪性骨腫瘍とガンの骨転移による続発性悪性腫瘍に分類される。原発性悪性腫瘍には、骨肉腫の他に軟骨肉腫、骨髄腫、ユーイング肉腫、骨悪性線維性組織球腫、脊索腫などがある。ヒトにおける統計で、悪性骨腫瘍死亡が全ガン死亡に占める割合は0.2%であり、ガン全体からみるとまれな腫瘍である^[15]。悪性骨腫瘍の頻度としては続発性、すなわちガンの骨転移が最も多いが、原発性悪性骨腫瘍としては骨肉腫の頻度が最も高い。骨肉腫の好発年齢は10歳代で、好発部位は長管骨の骨幹端部である。ヒトにおいて原発性悪性骨腫瘍はまれな疾患であり、しかも腫瘍細胞が由来したと考えられる発生母組織は極めて多様性に富むため、同じ由来の腫瘍の発生頻度は他のガン種に比べて大幅に低い^[15]。そのため大規模な臨床試験の実施が困難であり、標準的な治療が科学的根拠をもって確立したものは少ない。骨肉腫の最も効果的な治療は手術による切除であるが、これまでに化学療法を手術と組み合わせることによってさらに効果があることが示されてきた数少ない腫瘍の1つである。1970年代以降、代謝拮抗薬であるメソトレキサートの大量投与療法（HD-MTX）、抗生物質のアドリアマイシン（ADR）と白金製剤のシスプラチン（CDDP）、アルキル化剤のイフォスファミド（IFO）の有効性が次々と示され、現在ではこの4剤が骨肉腫に対する化学療法に標準的に用いられている。現在の骨肉腫に対する標準的化学療法は、

CDDP+ADRを中心として、HD-MTXやIFOを含む3剤または4剤併用の全身化学療法である^[15]。また、白金製剤で抗腫瘍効果は低下するが、副作用の少ないカルボプラチンをシスプラチンの代わりに用いることもある^[10,11,18]。

犬でも骨肉腫は原発性骨腫瘍の中で最もよく見られ、四肢骨格や体軸骨格で発生する。大型の犬種や、中年齢や高齢の犬でよく見られる。生物学的動態として周辺組織への激しい侵潤と、急速な血行性転移が特徴的である^[12]。また、犬の骨肉腫はヒトの骨肉腫と類似する点が見られているため、犬の骨肉腫の株化細胞がヒトの骨肉腫の研究を進める上で有用であると考えられ、これまでにいくつかの細胞株が樹立されている^[6,8]。

近年、腫瘍細胞表面上に発現する腫瘍特異抗原に対するモノクローナル抗体（MAb）を作製し、腫瘍のみを標的として破壊する抗体療法の研究が行われてきている^[7]。この治療では抗体が腫瘍特異抗原に結合し、Fcレセプターを介してNK細胞を活性化させてガン細胞を破壊したり、抗体に毒素や抗ガン剤、さらには放射性同位体を結合させることでより効率良く細胞を殺すことができる。そして、抗体療法はこれまでにいくつかの標的分子に対する抗体を作製したことで実用化されている。悪性リンパ腫の細胞膜上のCD20を標的とするリツキシマブ（ヒト-マウスキメラ抗体）^[2,3,4,5,21,22]、転移性結腸ガンや直腸ガンに高発現している上皮成長因子受容体（EGFR）を標的とするセツキシマブ（ヒト-マウスキメラ抗体）^[2,16,17,19]、転移性乳ガンに高発現している

¹⁾ 酪農学園大学獣医学部獣医学科獣医ウイルス学ユニット
Laboratory of Veterinary Virology, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University

²⁾ 酪農学園大学獣医学部獣医学科獣医臨床腫瘍学ユニット
Laboratory of Veterinary Clinical Oncology, Department of Small Animal Clinical Science, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University

HER2/neu 蛋白を標的とするトラツズマブ (ヒト化抗体) などが代表例である^[2,20]。

そこで本研究では将来的に抗体療法を行うことを目的として、骨肉腫の腫瘍細胞を免疫したマウスの脾臓細胞と骨髄腫細胞を融合させ融合細胞を作製し、骨肉腫に対する MAb の作出を試みた。

材料と方法

1. 培養細胞株

4 種類の犬骨肉腫株化細胞, POS^[8], OOS^[6], HOS^[6] と D17 細胞^[14] を用いた。POS 細胞は 1.5 歳の雄の雑種犬の大腿骨にできた原発性骨肉腫から樹立され^[8], 組織学的特徴は混合型で, 1% 重曹を加えた RPMI1640 (SIGMA 社) に 10% 牛胎仔血清 (FCS, Biosource 社) を加え, 37°C 5% CO₂ 存在下で培養した。OOS 細胞は 10 歳の雌のマルチーズ犬の下顎の骨肉腫から株化された細胞で組織学的特徴は混合型である^[6]。HOS 細胞は 7 歳の雄の雑種犬の肩甲骨の骨肉腫から株化された細胞であり, 組織学的特徴は線維芽細胞型である^[6]。OOS 細胞と HOS 細胞は 10% FCS 加 RPMI1640 を用い, 37°C 5% CO₂ 存在下で培養した。D17 細胞は, 1% 非必須アミノ酸 (NEAA, GIBCO 社) と 2 mM グルタミン酸を加えた 10% FCS 加 Minimal Essential Medium (MEM, GIBCO 社) で培養した。その他に, 犬腎株化 (MDCK) 細胞, 犬胎子胸腺株化 (CF2th) 細胞^[13] とマウスミエローマ (P3) 細胞を用いた。MDCK 細胞は 10% FCS 加 MEM を用い, 37°C で培養した。CF2th 細胞は 1% NEAA を加えた 10% FCS 加 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DME, GIBCO 社) を加え, 37°C で培養した。P3 細胞は 1% FCS 加ハイブリドーマ SFM 培地 (GIBCO 社) を用いてペトリディッシュシャーレ (BECTON DICKINSON 社) で, 37°C 5% CO₂ 存在下で培養した。

2. モノクローナル抗体 (MAb) の作製

1) マウスの免疫と抗体産生融合細胞の作製

妊娠した BALB/c マウスを日本クレア社より購入した。マウスの飼育取扱は, 酪農学園大学実験動物指針に基づいて行った。出産後 1 日以内のマウスに 5×10^6 個の MDCK 細胞を腹腔投与した。免疫には OOS 細胞と POS 細胞を用い, 以下のように行った。

OOS 細胞は MDCK 細胞投与の 1 か月後に腹腔と背部皮下にそれぞれ 1.5×10^6 個, 計 3×10^6 個を投与した。その後 2 週間ごとに腹腔と背部皮下に同

様の細胞を投与し, 計 4 回免疫した。4 回目の免疫から 4 日後に 1 匹のマウスをエーテル麻酔下で安楽死させた後, 脾臓を取り出し, 定法に従って P3 細胞との細胞融合を行った^[11,9]。残りの 2 匹に対して 4 回目の免疫の 1 か月後に腹腔と背部皮下に同様の細胞を投与し, 5 回目の免疫を行った。5 回目の免疫から 4 日後に 2 匹目の脾臓を取り出し, 細胞融合を行った。残りの 1 匹に対して 5 回目の免疫の 1 か月後に腹腔と背部皮下に同様の細胞を投与し, 6 回目の免疫を行った。6 回目の免疫から 4 日後に脾臓を取り出し, 細胞融合を行った。

POS 細胞については MDCK 細胞投与 1 か月後に腹腔と背部皮下にそれぞれ 1×10^6 個, 計 2×10^6 個を投与した。その後 2 週間ごとに 2 回, 腹腔と背部皮下に同様の細胞を投与した。3 回目の免疫から 1 か月後に腹腔と背部皮下に同様の細胞を投与した。これを一度繰り返した。5 回目の免疫から 6 か月後に腹腔と背部皮下に同様の細胞を投与した。その 4 日後に 1 匹のマウスをエーテル麻酔下で安楽死させたのち, 脾臓を取り出し, P3 細胞との細胞融合を行った。残りの 2 匹に対して 6 回目の免疫から 1 か月後に腹腔と背部皮下に同様の細胞を投与した。その 4 日後に 2 匹目の脾臓を取り出し, 細胞融合を行った。残りの 1 匹に対して 7 回目の免疫から 1 か月後に腹腔と背部皮下に同様の細胞を投与し, その 4 日後に脾臓を取り出し, 細胞融合を行った。

融合細胞の選択は, 2% FCS 加 HAT 培地 (GIBCO 社) を用いて行い, 抗体産生をしている融合細胞のスクリーニングは補体依存性細胞傷害試験 (CDAC) (下述) で行った。抗体産生融合細胞のクローニングはハイブリドーマシャーレ (Greiner bio-one 社) で 2% FCS と 5% ブライクローン (DS ファーマバイオメディカル社) を加えた HT 培地 (GIBCO 社) を用いて行った。スクリーニングは CDAC で実施し, 陽性を示した融合細胞は MAb 産生細胞としてセルバンカー (日本全薬工業) に浮遊した後, 液体窒素中で凍結保存した。MAb のアイソタイプの設定は培養上清を用いて IsoStrip (Roche 社) で行った。

2) MAb の腹水化

高濃度の MAb を得るために腹水化を行った。4~6 週齢の BALB/c マウスを日本クレア社から購入し, 各融合細胞あたり 3~4 匹使用した。これらのマウスにプリスタン (和光純薬工業) 0.3 ml を腹腔内接種し, その 5 日後に 1×10^7 個以上の融合細胞を腹腔内投与した。腹部が膨脹してきた時にエーテル

麻酔下で血液と腹水を回収した。回収した腹水は 4℃に静置し、翌日、2,500 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収し、-30℃に保存した。

3. 補体依存性細胞傷害試験 (CDAC)

融合細胞の上清と腹水は CDAC で抗体の反応性を確認した。CDAC は EIA/RIA PLATE (Costar 社) に MAb との反応性を調べる細胞、培養上清または腹水、補体をそれぞれ 1 ウェルあたり 10 μl ずつ入れ、37℃で 45 分間反応させた。その後、0.4% トリパンブルーを 1 ウェルあたり 6 μl ずつ入れ 30~60 分間静置し、死細胞をカウントして死細胞率が全体の 70%以上 (++)、40-50% (+) ならびに反応がなかったとき (-) の 3 段階に分けて判定した。

培養フラスコで培養した細胞は培養上清を除去後、リン酸緩衝食塩水 (PBS, pH7.4) で洗浄し、0.25 mM EDTA を加えた PBS (EDTA-PBS) で培養ボトルからはがし、細胞数を 2×10⁶/ml に調整した。融合細胞の培養上清は原液を用い、腹水の場合は MEM で 100 倍希釈から 4 倍階段希釈し、100 倍における細胞傷害の半分の細胞傷害が起きた希釈倍数を抗体価とした。補体としてはウサギの新鮮血清を用い、MEM で 15 倍に希釈して使用した。

4. 膜蛍光抗体法

培養フラスコに培養した細胞を EDTA-PBS ではがし、マイクロチューブに 5×10⁵ 個入れた。3,500 rpm 4℃で 1 分間遠心し、上清を取り除いた後、冷 0.02% アジ化ナトリウム加 PBS で 3,500 rpm で 1 分間の遠心洗浄を 3 回行った。その後、PBS で 25, 100, 400 倍に希釈した腹水 20 μl で浮遊し、4℃で 20 分間反応させた。その後、冷 0.02% アジ化ナトリウム加 PBS で 4℃ 3,500 rpm 1 分間の遠心洗浄を 3 回行った。その後、FITC 標識ヤギ抗マウス抗体 (Jackson Immuno Research 社) 20 μl で浮遊させ、遮光して 4℃で 20 分間反応させた。その後、冷 0.02% アジ化ナトリウム加 PBS で 4℃ 3,500 rpm

1 分間の遠心洗浄を 3 回行った。細胞を 15 μl の 50% グリセリン加 PBS で浮遊させ、スライドガラスに滴下し、カバーガラスを載せて蛍光顕微鏡で観察した。結果は 4 段階 (++, +, ±, -) で評価した。++ は細胞と反応させる腹水のかわりに OOS 細胞もしくは POS 細胞を免疫したマウスの血清を使用した場合 (陽性対照) と同等の光り方、+ は光っているが ++ ほど明るくない光り方、± は暗く光るが輪郭が見える程度の光り方、- は蛍光なし、とした。抗体価は ± の反応があった最大希釈倍数とした。

5. 蛍光抗体法

培養フラスコに培養した細胞を EDTA-PBS ではがし、1,000 rpm 5 分間遠心した。その後、PBS で 1,000 rpm 5 分間の遠心洗浄を 3 回行った。PBS で浮遊させた細胞を MULTITEST SLIDE 15-WELL (ICN Biomedicals 社) の各ウェルに塗抹し、風乾後、冷アセトンで 30 分間固定した。PBS で 25, 100, 400 倍に希釈した腹水を載せ、湿潤箱に入れて 37℃で 1 時間反応させた。その後、PBS で洗浄し、乾燥後、FITC 標識ヤギ抗マウス抗体を載せ、湿潤箱に入れて 37℃で 1 時間反応させた。その後 PBS で洗浄を行い、乾燥後、90% グリセリン加 PBS で封入して蛍光顕微鏡で観察した。結果判定は前述と同様に行った。

成 績

1. モノクローナル抗体 (MAb) の作製とその反応性

OOS 細胞と POS 細胞を免疫したマウスの脾臓細胞と P 3 細胞を融合して融合細胞を作製した。合計 3 回の細胞融合の結果、OOS 細胞と反応する抗 OOS MAb は融合 1 回目では得られなかったが、2 回目で 1 種類 (4A9-A7)、3 回目で 3 種類 (7B7-B7, 8F1-B9, 9E11-E1-H1) の計 4 種類得られた (Table 1)。これらの MAb のアイソタイプを調べたところ、IgM は 3 種類、IgG1 は 1 種類であった。POS 細胞と

Table 1 Antibody titers of MAbs against OOS cells by complement-dependent antibody cytotoxicity (CDAC) test in various cell lines

MAbs anti-OOS	Cell lines						
	OOS	POS	HOS	D17	CF2th	MDCK	
4A9-A7 (IgM) ¹⁾	6400	25600	25600	- ²⁾	1600	-	
7B7-B7 (IgM)	1600	-	100	-	-	-	
8F1-B9 (IgG1)	400	-	100	-	-	-	
9E11-E1-H1 (IgM)	25600	1600	6400	1600	6400	-	

1) Isotype

2) Negative

Table 2 Antibody titers of MAbs against POS cells by complement-dependent antibody cytotoxicity (CDAC) test in various cell lines

MAbs anti-POS		Cell lines					
		OOS	POS	HOS	D17	CF2th	MDCK
1B7B3C7	(IgM) ¹⁾	102400	25600	102400	25600	25600	— ²⁾
6A10-B1	(IgG2b)	25600	6400	25600	25600	25600	—
8A10-C12	(IgG2b)	25600	6400	25600	25600	25600	—

1) Isotype

2) Negative

反応する抗 POS MAb も融合 1 回目では得られなかったが、2 回目で 1 種類 (1B7B3C7)、3 回目で 2 種類 (6A10-B1, 8A10-C12) の計 3 種類得られた (Table 2)。これらの MAb のアイソタイプは IgM が 1 種類、IgG2b が 2 種類であった。

今回得られた MAb の 4 種類の犬骨肉腫株化細胞 (OOS, POS, HOS, D17)、CF2th 細胞と MDCK 細胞に対する反応性を CDAC で調べた。4 種類の抗 OOS MAb の中で OOS 細胞とのみ反応したものはなく、OOS 細胞と HOS 細胞に反応したものが 2 種類、MDCK 細胞を除く全ての細胞と反応したのが 1 種類、そして D17 細胞を除く骨肉腫細胞と CF2th 細胞と反応するものが 1 種類あった (Table 1)。以上の成績より、4 種類の MAb は CDAC の反応性により 3 パターンに分類された。

3 種類の抗 POS MAb の中で POS 細胞にのみ反応したものはなく、3 種類は全て、MDCK 細胞を除く全ての細胞と反応した (Table 2)。

2. 膜蛍光抗体法による MAb の反応性

今回得られた MAb が細胞表面の抗原を認識しているかどうかを膜蛍光抗体法で調べた。4 種類の抗 OOS MAb は全て反応したが (Table 3)、それらの反応性に強弱が見られた。MAb を 25 倍希釈して反応させた時、1 種類 (4A9-A7) が陽性 (+) を示した。他の 3 種類は弱陽性 (±) を示した。3 種類の

Table 3 Antibody titers of MAbs against OOS cells by membrane immunofluorescence (MIF) and immunofluorescence (IF) tests in OOS cells

MAbs anti-OOS		MIF test	IF test
4A9-A7	(IgM) ¹⁾	≥400 (+) ²⁾	≥400 (+)
7B7-B7	(IgM)	100 (±)	≥400 (++)
8F1-B9	(IgG1)	25 (±)	25 (±)
9E11-E1-H1	(IgM)	100 (±)	25 (±)

1) Isotype

2) Fluorescence intensity at 25 times dilution of MAb

++: Strongly positive, +: Positive, ±: Weakly positive, -: Negative

抗 POS MAb は全て POS と反応した (Table 4)。MAb を 25 倍希釈して使用した時、3 種類全てが強陽性 (++) を示した。

3. 蛍光抗体法による MAb の細胞内抗原との反応性

今回得られた MAb が細胞内抗原も認識しているかどうかを蛍光抗体法で調べた。4 種類の抗 OOS MAb は全て蛍光抗体法で OOS 細胞と反応したが (Table 3)。それらの抗 OOS MAb の間で反応性に強弱が見られた。MAb を 25 倍希釈して使用した時、1 種類 (7B7-B7) が強陽性 (++) を示した。1 種類 (4A9-A7) は陽性 (+)、そして残りの 2 種類 (8F1-B9, 9E11-E1-H1) が弱陽性 (±) であった。

POS 細胞に対して 3 種類全ての抗 POS MAb が反応した (Table 4)。POS 細胞に対しても抗 OOS MAb の場合と同様、抗 POS MAb 間で反応性に強弱が見られた。MAb を 25 倍希釈して使用した時、2 種類 (6A10-B1, 8A10-C12) が強陽性 (++) を示した。残り 1 種類 (1B7B3C7) は弱陽性 (±) であった。

以上の成績より、CDAC で OOS 細胞と HOS 細胞と反応した 2 種類の MAb は蛍光抗体法と膜蛍光抗体法の反応性で 2 パターンに分類された。さらに、MDCK 細胞を除く全ての細胞と反応した抗 OOS MAb 1 種類と抗 POS MAb 3 種類は 3 パターンに分類された。

Table 4 Antibody titers of MAbs against POS cells by membrane immunofluorescence (MIF) and immunofluorescence (IF) tests in POS cells

MAbs anti-POS		MIF test	IF test
1B7B3C7	(IgM) ¹⁾	≥400 (++) ²⁾	≥400 (±)
6A10-B1	(IgG2b)	≥400 (++)	≥400 (++)
8A10-C12	(IgG2b)	≥400 (++)	≥400 (++)

1) Isotype

2) Fluorescence intensity at 25 times dilution of MAb

++: Strongly positive, +: Positive, ±: Weakly positive, -: Negative

考 察

本研究において4種類のOOS細胞に対するMAbと3種類のPOS細胞に対するMAbを作出した。

細胞融合をOOS免疫マウスとPOS免疫マウスを用いて、ともに3回ずつ行ったところ、いずれも1回目の細胞融合でMAbを得ることはできなかったが、免疫回数が増えるほど免疫した細胞に反応するMAbを多く得ることができた。成書のプロトコールでは多くの場合、2ないし3回の免疫で十分に免疫抗原に対するMAbが得られることが分かっている^[1]。しかし、OOS細胞の場合、4回の免疫でも目的とするMAbを得られなかったことからOOS細胞は抗原性の低い細胞である可能性が考えられた。またPOS細胞の場合、5回目と6回目の免疫の間隔が6か月あったため、成書のプロトコールと異なっており、抗原性が低いという可能性を示すことはできなかった。

OOS細胞は様々な細胞の形態(線維芽細胞様、多角形の細胞など)を含んでいる混合型である。HOS細胞は混合型ではなく線維芽細胞様の形態を示しているが、OOS細胞と形態が似ている。POS細胞は混合型であるが個々の細胞の大きさが大きく、OOS細胞やHOS細胞とは形態的に異なる。D17細胞は犬骨肉腫株化細胞であるがOOS細胞、HOS細胞ならびにPOS細胞のいずれとも形態が異なっている。CF2th細胞は正常犬胎子胸腺株化細胞、MDCK細胞は正常犬腎株化細胞である。抗OOS MAbのCDACの結果から全ての抗OOS MAbはHOS細胞と反応していた。これは抗OOS MAbが認識している抗原と同じものもしくは類似した抗原がHOSにも発現している可能性が考えられた。今回使用した全ての犬骨肉腫株化細胞(OOS, POS, HOS, D17)に共通して反応したMAbは得られなかった。同じ骨肉腫の細胞であるが、それぞれの細胞株の由来が異なることで発現している抗原の種類が異なっている可能性が考えられた。このことは由来となる組織の多様性が全ての骨肉腫に共通して効果を示す抗体療法を確立する障害になるかもしれない。OOS細胞、POS細胞、HOS細胞とCF2th細胞に反応する抗OOS MAbが1種類(4A9-A7)、MDCK細胞以外のCF2th細胞を含む全ての細胞に反応する抗OOS MAbが1種類(9E11-E1-H1)、抗POS MAbが3種類(1B7B3C7, 6A10-B1, 8A10-C12)あった。ヒトの腫瘍マーカーとしてガンと胎児細胞で発現するアルファ胎児蛋白(alfa-1-fetoprotein: AFP)、ガン胎

児性抗原(carcinoembryonic antigen: CEA)、シアリルルイスA糖鎖抗原などの糖鎖、ムチン蛋白の抗原CA125、絨毛性ゴナドトロピン(human chionic gonadotropin: hCG)、前立腺ガン抗原(prostate specific antigen: PSA)などが知られており^[15]、CF2th細胞は胎児由来の細胞株であるのでこのような抗原が発現している可能性が考えられた^[13]。

膜蛍光抗体法と蛍光抗体法の両方で4種類の抗OOS MAbは全てOOS細胞と反応した。CDACで高い抗体価を示した抗OOS MAbが膜蛍光抗体法、蛍光抗体法においても必ず高い反応性を示したわけではなかった。膜蛍光抗体法では細胞膜表面の抗原を、蛍光抗体法では主として細胞内抗原を検出している。膜蛍光抗体法と蛍光抗体法の両方で反応した4種類のMAbのうち膜蛍光抗体法の方が高い抗体価もしくは強い反応性を示したMAbは1種類(9E11-E1-H1)、蛍光抗体法の方では1種類(7B7-B7)、そして同じ反応性を示したMAbは2種類(4A9-A7, 8F1-B9)であった。このように膜蛍光抗体法と蛍光抗体法で反応性に違いが見られたことから4種類のMAbが細胞内と細胞膜で発現量が異なる抗原を認識した可能性が考えられた。抗POS MAbは3種類全て膜蛍光抗体法、蛍光抗体法の両方で反応した。そのうち2種類は同じ反応性であった。膜蛍光抗体法の方で強い反応性が見られたMAbが1種類あった(1B7B3C7)。上記の抗OOS MAbと同様に、認識している抗原が細胞内と細胞膜のどちらにも発現しているが、細胞内と細胞膜での発現量が異なっている可能性が考えられた。

今回得られたMAbの中で、抗体療法に用いることが可能なものは、第一に骨肉腫細胞にのみ反応するもの、次いで骨肉腫細胞とCF2th細胞に反応するものと考えられる。すなわち、OOS細胞とHOS細胞に反応した抗OOS MAb(7B7-B7, 8F1-B9)、そして骨肉腫細胞とCF2th細胞に反応した抗OOS MAb(4A9-A7, 9E11-E1-H1)と抗POS MAb(1B7B3C7, 6A10-B1, 8A10-C12)である。抗体療法では抗原に対する親和性の高さや精製の容易さなどからIgGが用いられている。上記のMAbのうちIgGは3種類のみで、他はIgMであった。しかし、4種類のIgM抗体のうち3種類はCDACで高い値(6,400倍以上)を示したことから、遺伝子工学的方法を用いてこれらのMAbの抗原結合部位である超可変領域をIgGの定常部位と組み合わせることでIgGにすることができれば治療用抗体として使用できる可能性があると思われた。3種類のIgG型のMAbのうちCDACで低い抗体価を示した8F1-B9

は、毒素や抗ガン剤を結合させる等の工夫をすることで抗腫瘍効果を増強させて治療に使用できる可能性が考えられた^[7]。

今回得られた MAb は今回用いた 6 種類の細胞株に対する CDAC の反応性で 3 パターンに分類され、さらに膜蛍光抗体法と蛍光抗体法で認められた MAb の反応性の違いを加えると少なくとも 6 種類のパターンに分類された。これらのことから今回作製した MAb がそれぞれ異なる抗原を認識している可能性が示唆された。今後、これらの抗原をウエスタンブロット法や TOF-MS などで詳細に解析していきたい。

要 約

骨肉腫は原発性悪性骨腫瘍の中で最も発生頻度の高い腫瘍である。腫瘍に対するモノクローナル抗体 (MAb) を用いた抗体療法は乳がん、大腸ガンや悪性 B リンパ腫等で実用化されている。今回、犬骨肉腫に対する抗体療法の実用化を目的として、犬骨肉腫株化細胞に対する MAb の作出を試みた。2 種類の犬骨肉腫株化細胞 (OOS, POS) を免疫したマウスの脾細胞とマウス P3 細胞を融合させた。補体依存性細胞傷害試験 (CDAC) により免疫に使用した細胞と反応し犬腎株化 (MDCK) 細胞と反応しない抗体を産生する融合細胞を選択し、マウスの腹腔内に投与し、MAb を腹水として得た。細胞融合の結果、抗 OOS MAb は 4 種類、抗 POS 抗体は 3 種類得られた。これらの MAb を 4 種類の犬骨肉腫株化細胞 (OOS, POS, HOS, D17) と犬胎子胸腺株化細胞 (CF2th) に対する反応性を CDAC で調べたところ、OOS 細胞あるいは POS 細胞とのみ反応するものはなかった。5 種類の細胞と全て反応する MAb は抗 OOS で 1 種類、抗 POS では 3 種類全てが反応した。残りの 3 種類の抗 OOS MAb は 2 ないし 3 種類の骨肉腫株化細胞と反応した。膜蛍光抗体法と蛍光抗体法でそれぞれの MAb と細胞の反応性を調べたところ、両方で反応性の差異の認められるものがあり、それらの差異を加えると今回作出した MAb パネルは少なくとも 6 種類の腫瘍細胞の抗原を認識していることが示唆された。

謝 辞

本研究は 2009 年度酪農学園大学・酪農学園大学短期大学部共同研究の助成を受けて行われた。

参 考 文 献

1. 安東民衛, 千葉 丈. 1991. 単クローン抗体実

験操作入門 講談社, 東京.

2. Borghaei, H., Smith, M. R. and Campbell, K. S. 2009. Immunotherapy of cancer. *Eur. J. Pharmacol.* 625: 41-54.
3. Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P. and Watier, H. 2002. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc gamma RIIIa gene. *Blood.* 99: 754-758.
4. Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G. and Ravetch, J. V. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* 6: 443-446.
5. Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., Morel, P., Van Den Neste, E., Salles, G., Gaulard, P., Reyes, F., Lederlin, P. and Gisselbrecht, C. 2002. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 346: 235-242.
6. Hong, S. H., Kadosawa, T., Mochizuki, M., Matsunaga, S., Nishimura, R. and Sasaki, N. 1998. Establishment and characterization of two cell lines derived from canine spontaneous osteosarcoma. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 757-760.
7. Janeway, C. A. Jr., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. J. 2003. 免疫生物学, 原書第五版 pp.573-574 (笹月健彦 監訳), 南江堂, 東京.
8. Kadosawa, T., Nozaki, K., Sasaki, N. and Takeuchi, A. 1994. Establishment and characterization of a new cell line from a canine osteosarcoma. *J. Vet. Med. Sci.* 56: 1167-1169.
9. Köhler, G. and Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
10. Meyer, W. H., Pratt, C. B. and Poquette, C. A. 2001. Carboplatin / ifosfamide window therapy for osteosarcoma: results of the St Jude Children's Research Hospital OS-91 trial. *J. Clin. Oncol.* 19: 171-182.
11. Muggia, F. M. 1989. Overview of carboplatin: replacing, complementing, and extending the therapeutic horizons of cisplatin. *Semin.*

- Oncol. 16: 7-13.
12. Nelson, R. W. and Guillermo, C. 2003. *スモールアニマルインターナルメディスン 第3版* pp. 1190-1192 (長谷川篤彦, 辻本 元 監訳), インターズー, 東京.
 13. Nelson-Rees, W. A., Owens, R. B., Arnstein, P. and Kniazeff, A. J. 1976. Source, alterations, characteristics and use of a new dog cell line (Cf2Th). *In Vitro* 12: 665-669.
 14. Nieves, M. A., Vahle, J., Ackermann, M., Howard, M., Dietz, A. B., Carpenter, S. L. and Cheville, N. 1998. Production and characterization of canine osteosarcoma cell lines that induce transplantable tumors in nude mice. *Am. J. Vet. Res.* 59: 359-362.
 15. 日本臨床腫瘍学会 編集 2006, *新臨床腫瘍学* pp. 198-199, pp. 301-315, pp. 522-529 南江堂, 東京.
 16. Prewett, M. C., Hooper, A. T., Bassi, R., Ellis, L. M., Waksal, H. W., and Hicklin, D. J. 2002. Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clin. Cancer Res.* 8: 994-1003.
 17. Riemer, A. B., Kurz, H., Klinger, M., Scheiner, O., Zielinski, C. C. and Jensen-Jarolim, E. 2005. Vaccination with cetuximab mimotopes and biological properties of induced anti-epidermal growth factor receptor antibodies. *J. Natl. Cancer Inst.* 97: 1663-1670.
 18. Robson, H., Meyer, S., Shalet, S.M., Anderson, E., Roberts, S. and Eden, O. B. 2002. Platinum agents in the treatment of osteosarcoma: efficacy of cisplatin vs. carboplatin in human osteosarcoma cell lines, *Med. Pediatr. Oncol.* 39: 573-580.
 19. Roda, J. M., Joshi, T., Butchar, J. P., McAlees, J. W., Lehman, A., Tridandapani, S. and Carson, W. E. 3rd. 2007. The activation of natural killer cell effector functions by cetuximab-coated, epidermal growth factor receptor positive tumor cells is enhanced by cytokines. *Clin. Cancer Res.* 13: 6419-6428.
 20. Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J. and Norton, L. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344: 783-792.
 21. Smith, M. R. 2003. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 22: 7359-7368.
 22. Voso, M. T., Pantel, G., Rutella, S., Weis, M., D'Alò, F., Urbano, R., Leone, G., Haas, R., and Hohaus, S. 2002. Rituximab reduces the number of peripheral blood B-cells in vitro mainly by effector cell-mediated mechanisms. *Haematologica* 87: 918-925.

Abstract

Osteosarcoma is the most common bone malignancy. Antitumor monoclonal antibodies (MAb) targeting specific antigens on the tumor membrane are increasingly being applied in the treatment of various malignancies, such as breast cancer, colon cancer and malignant B lymphoma. In this study, we attempted to produce MAbs against canine osteosarcoma cell lines in order to develop MAb-conjugated chemotherapy against canine osteosarcoma. Two cell lines, OOS cells and POS cells, were used to immunize mice. Spleen cells of the immunized mice were cell-fused with the murine myeloma cell line P3, and four antibody-secreting hybridomas against OOS cells and three hybridomas against POS cells were obtained by screening the culture supernatants with a complement-dependent antibody cytotoxicity (CDAC) test using both OOS and POS cells. Positive hybridomas were expanded in mouse abdominal cavities and ascites were used as mouse MAbs. Reactivity of these MAbs against five cell lines including OOS, POS and two other osteosarcoma cell lines, HOS and D17, and a normal canine fetal thymus cell line, CF2th, were examined by the CDAC test. There was no MAb that reacted with only OOS or POS cells. One MAb against OOS cells and all three MAbs against POS cells reacted with all five cell lines. Residual three MAbs reacted with two or three osteosarcoma cell lines. A membrane immunofluorescence (MIF) test and immunofluorescence

(IF) test revealed differences of reactivity against both OOS and POS cells. The results of CDAC, MIF and IF tests suggested that the MAb panel used in this study might distinguish six antigens expressed on canine osteosarcoma cells.