

氏名	岸 本 晃 治		
学位の種類	歯 学 博 士		
学位授与番号	博甲第 816 号		
学位授与の日付	平成2年 3 月 28 日		
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻（学位規則第5条第1項該当）		
学位論文題目	Epidermal Growth Factor リセプターに対するモノクローナル抗体により誘導される多形核白血球の A431細胞障害作用及びその機序に関する研究		
論文審査委員	教授 松村智弘	教授 谷口茂彦	教授 加藤慶二郎

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

[緒言]

近年、腫瘍細胞の増殖が種々のホルモンや growth factor により制御されていることが注目され、これらのリセプターに対するモノクローナル抗体 (MAb) を癌の治療に応用しようという試みがなされている。1984年 Masui らは、ヒト epidermal growth factor リセプターに対するマウス MAb (抗 EGF-R MAb), 225IgG 1及び528IgG2a がヌードマウスに植え付けられたヒト腫瘍の増殖を完全に阻止することを報告した。一般に腫瘍関連抗原に対する MAb が in vivo で腫瘍細胞を破壊する機序としては、Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) が考えられ、抗 EGF-R MAb も同様に単球、マクロファージまたはリンパ球をエフェクター細胞として腫瘍細胞を破壊することが示されている。しかしながら、IgG に対する Fc リセプター (FcγR) をもち、エフェクター細胞となり得る可能性のある多形核白血球 (PMN) の抗 EGF-R MAb を介する腫瘍細胞障害作用について検討した報告はない。

そこで本研究は、IgG1 ならびに IgG2a isotype をもつ抗 EGF-R MAb を介する PMN による腫瘍細胞障害作用を、単核球 (MNC) による場合と in vitro で比較検討した。さらに、その腫瘍細胞障害における FcγR を介した機序についても検討を加えた。

[材料と方法]

1. 標的腫瘍細胞： $1-3 \times 10^6$ /cell の異常に多くの EGF-R を発現しているヒト類表皮癌である A431細胞を使用した。
2. エフェクター細胞：健康ヒト末梢静脈血より Mono-Poly Resolving Medium により分離した PMN と単球及びリンパ球からなる MNC を使用した。
3. マウス MAb 及び EGF：抗 EGF-R MAb として A431細胞上の EGF-R に対して作

製された IgG 1 isotype をもつ 225 及び LA1 と, IgG2a isotype をもつ 528 及び 579 を使用した。225 及び 528 Fab fragments は, 225IgG1 及び 528IgG2a をそれぞれ papain で消化後, protein A カラムを通し作製した。対照には Hapten (tyrosyl arsenate) に対する MAbARB229IgG1 を用い, EGF はマウス顎下腺由来のものを使用した。また, 抗 Fc γ R MAb には, Fc γ RII (CD_w32) に対する MAb2E1.IgG2a 及び Fc γ RIII (CD16) に対する MAb80H3IgG1 を使用した。

4. 培養液: 5% 非働化ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグルとハム F12 の等量混合培地を用いた。
5. 腫瘍細胞障害活性 (Cytolytic activity: CA) の測定: 仙道らの方法に準じて ³H-Uridine release assay にて行った。即ち, 5×10³/0.2ml の A431 細胞を 96well 平底マイクロプレートの各 well に分注し, 5%CO₂, 37°C で 6-8 時間培養し細胞を well の底面に付着させた後, 0.2μCi/0.05ml の ³H-Uridine を各 well に加え, さらに一昼夜培養した。A431 細胞をプレートに加えてから 24 時間後に各 well を培養液で 3 回洗浄し標識を終えた。次に, 段階希釈した 0.1ml のエフェクター細胞浮遊液と 0.1ml の MAb 又は EGF を各 well に加え全量を 0.2ml とした。3-36 時間培養後, プレートを 200×g, 5 分遠心し, 各 well より上清 0.1ml を採取しその放射能 (cpm) を測定した。そして, CA を以下のごとく計算した。

$$CA(\%) = \frac{(\text{experimental release}) \text{ cpm} - (\text{spontaneous release}) \text{ cpm}}{(\text{maximum release}) \text{ cpm} - (\text{spontaneous release}) \text{ cpm}} \times 100$$

尚, maximum release は, 標識 A431 細胞を含む well に 1% TritonX-100 を 0.2ml 加え培養した後の上清 0.1ml 中の放射能とした。

6. 抗 EGF-R MAb を介する PMN による CA における抗 Fc γ R MAb の影響の検定: 標識 A431 細胞を含む well に, 0.1ml の PMN 浮遊液と 0.05ml の抗 Fc γ R MAb を加え 37°C, 30 分培養した後に, 0.05ml の抗 EGF-R MAb を加え, 以下 5. と同様に実験を行った。

[研究結果]

1. 225IgG1 は, MNC よりも PMN による CA を著明に増強した。また, LA1IgG1 も, 225IgG1 と同様に PMN による CA を著明に増強した。
2. 528IgG2a は, PMN よりも MNC による CA を著明に増強した。また, 579IgG2a も, 528IgG2a と同様に MNC による CA を著明に増強した。
3. 抗 hapten MAbARB229 及び EGF は, PMN 及び MNC による CA を増強しなかった。
4. 225 Fab fragments は, 225IgG1 に比べればその作用は弱いものの, PMN による CA を軽度に増強した。一方, 528 Fab fragments は, MNC による CA を増強しなかった。
5. 抗 Fc γ RII MAb2E1 は, 225IgG1 を介する PMN による CA を強く抑制したが, 抗 Fc γ RIII MAb80H3 は, 抑制しなかった。また, MAb2E1 は, 225 Fab fragments を介

する PMN による CA も抑制した。

[考察及び結論]

IgG2a isotype をもつ抗 EGF-R MAb が MNC による A431細胞障害作用を増強するのに対し、IgG1 isotype をもつ抗 EGF-R MAb はPMN による A431細胞障害作用を増強することが明らかとなった。この所見は、in vivo において IgG1 isotype をもつ抗 EGF-R MAb が抗腫瘍作用を示す機序に PMN の関与を示唆するものと考ええる。また、IgG1 isotype をもつ抗 EGF-R MAb により誘導される PMN の A431細胞障害においては、その抗体の Fc 部分のみならず Fab 部分も PMN 上の FcγRII に何らかの作用をしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、Epidermal Growth Factor リセプターに対するモノクローナル抗体を介する多形核白血球の腫瘍細胞障害作用、及びその障害作用における Fc リセプターを介した機序について検討したものである。その結果、癌のモノクローナル抗体による治療の進歩、発展のために極めて貴重な知見を得たものとして価値ある業績であると考えられる。

よって、本研究者は歯学博士の学位を得る資格があると認める。