

〈ニセコ(札幌)カンファレンス〉

モノクローナル抗体を用いた脳腫瘍の生長解析

国立がんセンター 脳神経外科 渋井 壮一郎

I. はじめに

悪性腫瘍の治療計画を立てる上で、腫瘍細胞の増殖能を知ることは、極めて重要である。近年、いろいろな物質に対するモノクローナル抗体が作られ、各種診断・治療に応用されているが、細胞の増殖能のひとつの指標として、bromodeoxyuridine(BUdR) に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的染色が可能になり、比較的容易に増殖能を調べられるようになった⁸⁾⁹⁾¹²⁾。これは thymidine の類似物質である BUdR が DNA 合成期 (S 期) の細胞に取り込まれることを利用し、細胞内の BUdR をモノクローナル抗体を用いて染色し、その標識率から S 期の分画を求めるというものである。S 期の細胞は分裂期の細胞数に比べて多数のため、分裂期の細胞の割合を求めるよりはるかに容易であり、正確でもある。しかしながら、腫瘍細胞の増殖状態を知りそれを実際の治療に応用するには、S 期の分画だけでは不十分であり、S 期の持続時間・腫瘍の倍化時間などが必要である。今回はまず、BUdR および IUdR (iododeoxyuridine) に対するモノクローナル抗体を用いて、腫瘍細胞の 2 重染色を行い、これらのパラメータを算出する方法について述べ、さらにその他の方法による生長解析についても言及する。

II. BUdR, IUdR の 2 重染色による生長解析²²⁾

1. 原理¹¹⁾

BUdR, IUdR はいずれも thymidine の類似物質で、DNA 合成過程の細胞に取り込まれる。そこで、IUdR を含む medium 内で一定時間 (t) 培養すると、その時間内

に S 期を通過した細胞はすべて IUdR を取り込むことになる。引き続き BUdR 内で短時間 (30 分間) 培養すると、最終的に S 期にあった細胞のみが BUdR を取り込み、その細胞集団内での IUdR, BUdR は Fig. 1 のように分布する。ここで δS は IUdR 内での培養時間内に S 期から G 2/M 期に移行した分画 (S 期細胞の何%が G 2/M 期に移行したか) である。BUdR, IUdR の 2 重染色を行いそれぞれを取り込んだ細胞を同定することができれば、IUdR のみで標識された細胞の割合から直接 δS が求められ、この δS で IUdR 内での培養時間 t を割れば S 期の持続時間 (Ts) が求められる。

$$T_s = t / \delta S$$

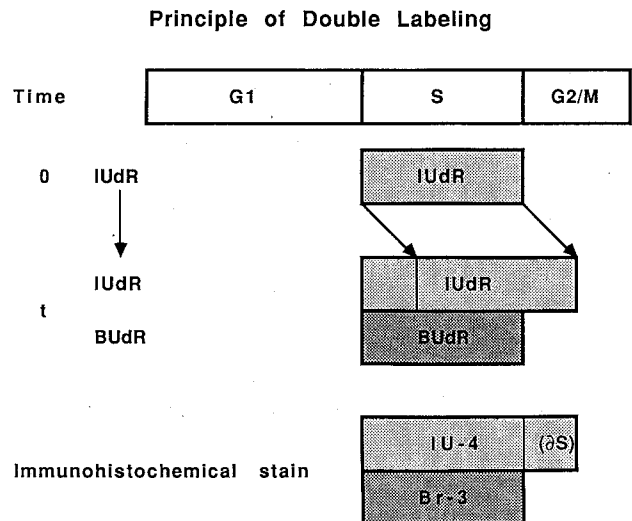


Fig. 1 Diagram for calculating the S-phase by double labeling method. Delta S (δS) is the fraction of S-phase cells that left the S-phase during time t.

さらに、Ts を S 期の分画 (BUdR 標識率) で割ると、その腫瘍を構成している細胞が、理論上すべて置き換わるのに必要な時間 Turnover time (Tover) が算出される。

$$\text{Tover} = (\text{Ts} / \text{BUdR LI}) \times 100$$

また、G.Steel によれば cell loss のない場合での腫瘍の倍化時間 (potential doubling time ; Tp) は Tover にある定数 λ をかけることによって算出されている²³⁾。

$$\text{Tp} = \lambda \times \text{Tover}$$

ここで λ は倍化時間が50時間を超えるものは約0.7、20~30時間では約0.8とされている。

2. 材料および方法

4 × 10⁴/ml 個のヒトグリオーマ細胞株 (U251、U87、343MGA、138MG、SF188)²⁰⁾²⁵⁾ を Lab-Tek tissue culture chamber/slide (Miles Scientific, Naperville, IL) 内で 20% fetal calf serum を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DME) を用いて、37°C (95% air, 5% CO₂) で 3 日間培養し実験を行った。まず、10 μM の IUdR 存在下に 2 時間培養後、medium を交換し、10 μM の BUdR を含む medium でさらに 30 分培養し、phosphate buffered saline (PBS) にて洗浄後、70% ethanol で固定した。これを抗 BUdR モノクローナル抗体 (Br-3)⁷⁾ と反応させ、avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 法にて diaminobenzidine を基質として褐色に発色させた¹⁵⁾。5% 酢酸と一昼夜接触させた後、抗 IUdR モノクローナル抗体 (IU-4)²⁴⁾ を作用させ、alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase (APAAP) 法にて、naphthol AS MX を基質に Fast blue BB base にて青色に発色させた⁴⁾⁵⁾¹⁰⁾。

これと比較するため、別々の chamber で一方は抗 IU-4、他方は Br-3 と反応させ、それぞれ ABC 法にて標識率を出し、その差から δ S を求め、Tover, Tp などを出した。

次に、5 × 10⁵ 個の 9L rat gliosarcoma 細胞²⁾ を CD Fischer rat の脳内に定位的に移植し、2 週間後に腫瘍の直径が約 5 mm になった時点で、40mg/kg の IUdR を rat の腹腔内に投与し、2 時間後に 40mg/kg の BUdR を腹腔内注射して、30 分後腫瘍を摘出し ethanol 固定した。これをパラフィン包埋し組織切片を作成した。この組織標本を xylene によって脱パラフィン後、上記と同様に 2 重染色を行った。

3. 結果

5 種類のヒトグリオーマ細胞株はいずれも ABC およ

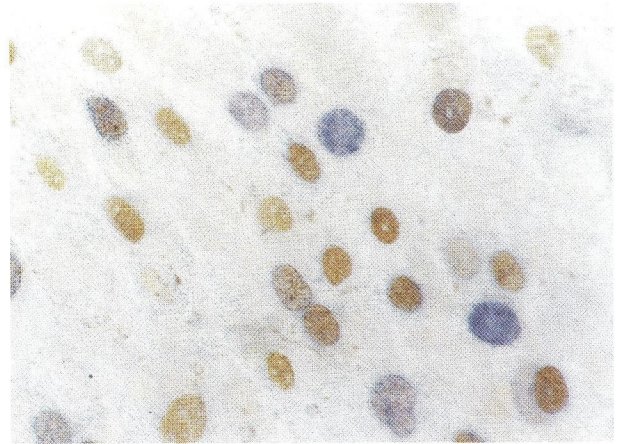


Fig. 2 Photomicrograph of human glioma cell line 138MG stained sequentially with ABC for BUdR and then with APAAP for IUdR. The cells were incubated with IUdR for 2 hr and then with BUdR for 30 min. Nuclei stained blue indicate cells labeled only with IUdR. Nuclei stained brown reaction products indicate cells labeled either with BUdR or BUdR and IUdR. x400

び APAAP 法により 2 重染色が可能であった (**Fig. 2**)。この内、IUdR のみによって標識された細胞 (青色に染色) が δ S の分画に相当する。この細胞数の S 期細胞に対する比率 δ S は、2 時間の培養時間では 0.15~0.24 であり、この δ S から求めた Tover は 32~40 時間であった (**Table 1**)。さらに、Tp は 25~32 時間という値になり、それぞれの細胞の増殖曲線から求めた実際の doubling time (Td) ときわめて近い数値を示した。2 重染色法と比較する意味で、BUdR, IUdR を別個に染色してその

Table 1 S phase (Ts), turnover time (Tover) and estimated potential doubling time (Tp) in human glioma cell lines calculated from double-staining technique

Cell line	Ts	Tover	Tp	Td ^a
U251	9.5 ± 0.3 ^b	37.8 ± 3.4	30.2	30.8
U87	8.8 ± 0.2	35.0 ± 0.9	28.0	27.9
SF188	11.8 ± 0.3	32.0 ± 1.0	25.6	29.0
138MG	8.4 ± 0.4	35.3 ± 1.7	28.2	24.6
343MGA	12.9 ± 0.3	40.6 ± 1.3	32.5	32.7

^a Average actual doubling time ; coefficients of variation were approximately 10%.

^b Value are means ± SE.

標識率の差から、同様に ∂S を求めた結果を Table 2 に示す。この方法によってもほぼ同様な結果が得られるが、2重染色法と比較すると、standard error の値がきわめて大きくなった。

Table 2 Labeling Index (LI) for BUdR-and IUdR-labeled cells and fraction of cells labeled only with IUdR (∂S)^a

Cell line	BUdR LI (%)	IUdR LI (%)	$\partial S(1)^b$	$\partial S(2)^c$
U251	24.2±1.0 ^d	29.1±0.6	.205±.048	.211±.008
U87	25.1±0.4	31.3±1.0	.247±.044	.228±.008
SF188	36.8±0.5	43.4±1.4	.179±.039	.170±.005
138MG	23.7±0.6	30.1±0.7	.269±.040	.239±.010
343MGA	31.7±1.0	36.5±0.5	.144±.035	.155±.004

a Cells were exposed to IUdR for 2 hr and then to BUdR for 30 min.

b Measured from specimens stained singly for IUdR or BUdR.

$$\partial S(1) = (IUdR LI - BUdR LI) / (BUdR LI)$$

c Measured from specimens stained doubly for IUdR and BUdR.

d Values are means ± SE.

ラット脳内移植腫瘍においても本法により、BUdR, IUdR を取り込んだ細胞群をそれぞれ同定することが可能であった (Fig. 3)。

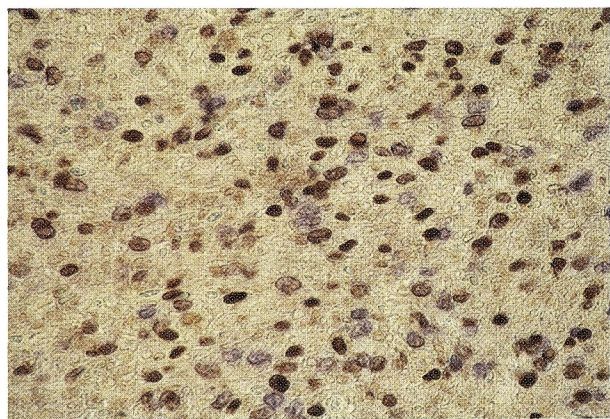


Fig. 3 Photomicrograph of transplanted 9L rat gliosarcoma stained sequentially with ABC for BUdR and then with APAAP for IUdR. x400

3. 考 察

BUdR モノクローナル抗体の開発により、in vitro のみならず in vivo でも腫瘍細胞の S 期の同定が容易になり、臨床的にも広く用いられるようになった¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾。しかしながら、BUdR の標識率のみでは、細胞の増殖状態の一部を示すのみであり、診断面での参考にはなっても、

実際の治療に応用するまでの情報を得るのは困難である。かつては³H-および¹⁴C-thymidine の 2 重標識により、腫瘍の doubling time など求めていたが、これら放射性同位元素は取り扱い上の注意が必要であり、しかも結果を得るまでに長時間を要するため、広く一般に普及するには至らなかった¹¹⁾。これに対し、今回報告した方法によれば放射性物質を使うことなく、免疫組織化学的方法のみで短時間に腫瘍細胞の S 期の時間、doubling timeなどを計算することが可能である。今回用いたヒトグリオーマ細胞株では、S 期の時間は 8～13 時間、cell loss がない場合での doubling time である potential doubling time は 25～32 時間であり、実際に増殖曲線から求めた doubling time ときわめて近い値を示した。また、ラット脳内に移植した腫瘍でも in vitro と同様に 2 重染色が可能であり、臨床応用への期待が持たれる。すでに BUdR によるヒト脳腫瘍の標識は行われている。手術的に腫瘍を摘出する一定時間前に、BUdR を投与し、それに引続き IUdR 投与できればこの方法をそのまま臨床に適用できるわけであるが、IUdR の使用ができない現在は、in vitro の標識法も可能である²⁶⁾。すなわち、摘出した腫瘍を細切し、IUdR を含む medium 内で 3 気圧に加圧して、1 時間培養する。この方法によっても十分に IUdR の標識が可能であるため、2 重染色法が応用できる。こうして個々の腫瘍の増殖特性が把握できれば、それぞれに対する固有の治療計画を立てることもでき、今後の悪性腫瘍の治療にも大いに役立つものと期待される。

III. Thymidylate synthase による生長解析

腫瘍細胞の BUdR の臨床応用はすでに始まっているが、BUdR や IUdR は直接生体内の DNA に組み込まれるため、人体への投与には十分な安全性への配慮が必要である。そこで、このような薬剤を用いずに細胞増殖のパラメータを調べられれば理想的である。その可能性のひとつとして thymidylate synthase (TS) に対するモノクローナル抗体を用いる方法がある。TS は DNA 合成の key enzyme のひとつであり、DNA 合成期にその活性が高まるといわれている¹⁾³⁾⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁷⁾。1985年 Jastreboff らは HeLa 細胞から TS に対するモノクローナル抗体 (M-TS-4) を作製した¹⁶⁾。これを用いることにより、細胞レベルで TS の染色を行い、その陽性率から S 期の推定が可能となった²¹⁾。

1. 材料および方法

4種類の glioma細胞株 (U251,U87,343MGA,SF188) を上記と同様に Lab-Tek tissue culture chamber/slide 内で培養し、対数増殖期のものを用いた。3.7% formaldehyde にて5分間固定し、PBS にて洗浄後、抗 TS モノクローナル抗体 (M-TS-4) と室温にて2時間反応させ ABC 法にて diaminobenzidine を基質として発色させた。一方、別の chamber は BUdR と30分反応させた後、70% ethanol にて固定し、抗 BUdR モノクローナル抗体を用いて ABC 法にて BUdR を染色した。TS および BUdR それぞれの陽性率を求め、その関連性を比較した。

また、TS 陽性細胞と S 期との関係を調べる目的で、細胞を trypsin 処理した後に、3.7% formaldehyde にて固定し、M-TS-4 と反応させた。これを FITC 標識抗マウス IgG と30分反応させた。さらに DNA 染色を行うため、これを ethanol にて再固定し、RNA 処理を行った後、propidium iodide にて染色した。この細胞を X 軸を DNA、Y 軸を TS とした flow cytometry 分析を行い、細胞回転と TS の出現時期の関係を調べた。

2. 結果

用いた4種類の glioma 株はいずれも M-TS-4 を使用した ABC 法にて TS の検出が可能であった (Fig. 4)。本法にて同定される TS の反応産物は主に細胞質に存在し、核内にはむしろ少なかった。一方、同じ条件で培養した細胞の BUdR 染色による S 期細胞の分画と TS 陽性率を比較すると、いずれの細胞も TS 陽性率が BUdR

標識率の1.2~1.4倍であった (Table 3)。Flow cytometry 分析による TS/DNA の分布を Fig. 5 に示す。M-TS-4 によって検出される TS は主に G1 期に出現し、S 期にはむしろ減少していた (Fig. 5)。

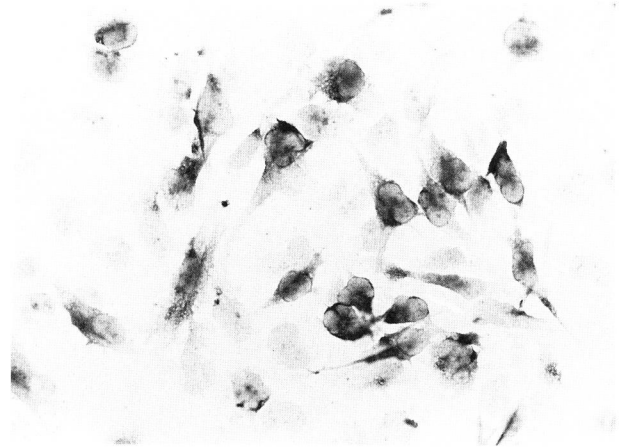


Fig. 4 Photomicrograph of human glioma cell line U251 stained with ABC utilizing anti-TS monoclonal antibody (M-TS-4). x400

Table 3 TS positivity and BUdR positivity of human glioma cell lines

Cell line	TS positive (%) (mean ± SE)	BUdR positivity (%) (mean ± SE)	TS/BUdR ratio
U251	30.3±2.5	24.2±2.3	1.25±0.16
U87	22.2±1.5	15.8±1.2	1.40±0.15
343MGA	32.8±2.2	27.4±1.7	1.20±0.11
SF188	41.1±2.4	30.1±0.8	1.36±0.09

Comment: SF188 TS-4(+) FITC-PI

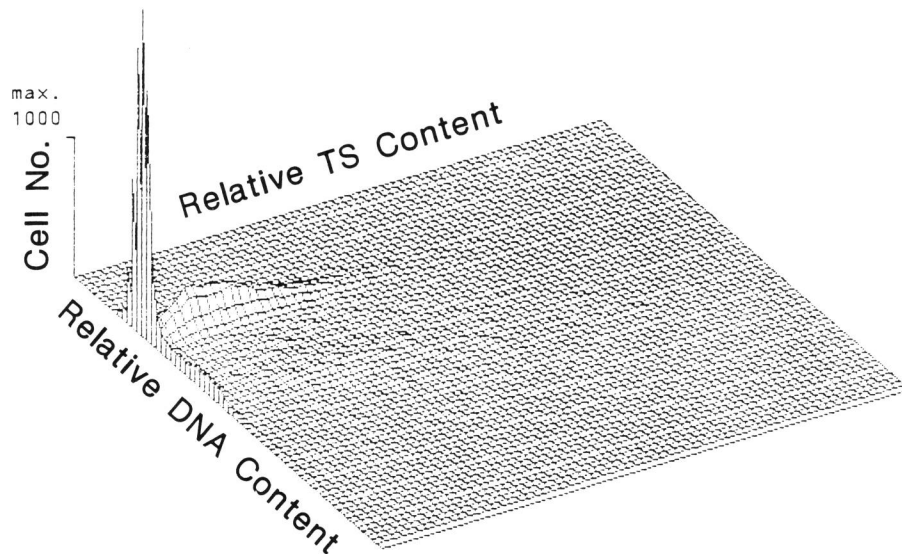


Fig. 5 Three-dimensional display of the relative DNA and TS contents measured in human glioma cell line SF188 by flow cytometry.

3. 考 察

生化学的手法による TS の同定は以前から行われているが、M-TS-4 を用いることにより、細胞レベルでの TS の検出が可能となった。TS は DNA 合成酵素のひとつであり、その活性は S 期に高まると言われていることから、当然 S 期細胞と TS 陽性細胞は一致するものと考えられたが、結果は常に TS 細胞が BUdR 陽性細胞より多かった。ただし、その比はほぼ一定であり、一方の値から他方の値を予測することが可能である。すなわち、TS 陽性率を求めれば、S 期細胞の割合を予測できることになる。また、両者間の関係については flow cytometry 分析結果が示すように、M-TS-4 にて検出される TS は主に G1 期にあり、S 期には検出されにくい。DNA 合成の準備段階として G1 後期に TS が細胞質内で合成され、この状態での TS には M-TS-4 は結合し得るが、これが S 期に核内に移動して DNA 合成を行う状態になると、何らかの構造上の変化を来し、M-TS-4 と反応しなくなる。実際、M-TS-4 の TS への結合部位は、活性基とは若干異なると言われている¹⁶⁾。その他の可能性としては、固定等の問題で M-TS-4 が核内に入って行けないとも考えられる。いずれにせよ、DNA 合成の前段階の TS を捉えていることは事実である。また、同じ G1 期でも TS 陽性細胞と陰性細胞が区別され、G1 期自体も 2 つに分けられる可能性がある。

IV. おわりに

細胞の増殖状態を示すパラメータを調べるための手法を 2 つ紹介したが、この他にも TS と同じ様に S 期に活性が高まると言われている DNA polymerase α や G0 期以外のすべての増殖細胞を同定する Ki-67 など生長解析に応用可能なモノクローナル抗体がいくつか開発されている。これらを用いることで、より正確に腫瘍細胞の増殖状態をつかみ、個々の腫瘍に対する効果的な治療方法が開発されて行くことを願って止まない。

文 献

- 1) Ayusawa D, Shimizu K, Koyama H, et al : Cell cycle directed regulation of thymidylate synthase messenger RNA in human diploid fibroblasts stimulated to proliferate. *J Mol Biol* 190 : 559-567, 1986.
- 2) Barker M, Hoshino T, Gurcay O, et al : Development of an animal brain tumor model and its response to ther-

- apy with 1,3 bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Res* 33 : 976-986, 1973.
- 3) Blakey RL : *The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines*, pp232-238, Wiley, New York
- 4) Burstone MS : Histochemical comparison of naphthol-phosphates for the demonstration of phosphates. *J Natl Cancer Inst* 20 : 601, 1958
- 5) Claassen E, Boorsma DM, Kors N, et al : Double-enzyme conjugates, producing an intermediate color, for simultaneous and direct detection of three different intracellular immunoglobulin determinants with only two enzymes. *J Histochem Cytochem* 34 : 423-428, 1986
- 6) Conrad AH and Ruddle FH : Regulation of thymidylate synthase activity in cultured mammalian cells. *J Cell Sci* 10 : 471-486, 1972
- 7) Dolbeare F, Kuo WL, Vanderlaan M, et al : Cell cycle analysis by flow cytometric analysis of the incorporation of iododeoxyuridine (IdUrd) and bromodeoxyuridine (BrdUrd). *Proc AACR* 29 : 1896, 1988
- 8) Gratzner, HG : Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine : a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218 : 474-475, 1982
- 9) Gray JW, Mayall BH (eds) : *Monoclonal antibodies against bromodeoxyuridine*. Alan R. Liss, Inc., New York, 1986
- 10) Hohmann A, Hodgson AJ, Wang D, et al : Monoclonal alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase (APAAP) complex : production of antibody, optimization of activity, and use in immunostaining. *J Histochem Cytochem* 36 : 137-143, 1988
- 11) Hoshino T, Barker M, Wilson CB, et al : Cell kinetics of human gliomas. *J Neurosurg* 37 : 15-26, 1968
- 12) Hoshino T, Nagashima T, Cho KG, et al : S-phase fraction of human brain tumors in situ measured by uptake of bromodeoxyuridine. *Int J Cancer* 38 : 369-374, 1986
- 13) Hoshino T, Nagashima T, Murovic JA, et al : *In situ* cell kinetic studies on human neuroectodermal tumors using bromodeoxyuridine. *J Neurosurg* 64 : 453-459, 1986
- 14) Hoshino T, Pradios M, Wilson CB, et al : Prognostic implications of bromodeoxyuridine labelling index of human gliomas. *J Neurosurg* 71 : 335-341, 1989
- 15) Hsu SM, Raine L, Fanger H : Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques : a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29 : 577-580, 1981
- 16) Jastreboff MM, Todd MB, Malech HL, et al : Isolation and functional effects of monoclonal antibodies binding to thymidylate synthase. *Biochemistry* 24 : 587-592, 1985
- 17) Kornberg A : *DNA Replication*, pp39-85, WH Freeman,

San Francisco, 1980

- 18) Navalgund LG, Rossana C, Muench AJ, et al : Cell cycle regulation of thymidylate synthase gene expression in cultured mouse fibroblasts. J Biol Chem 255 : 7386-7390, 1980
- 19) Rode W, Scanlon KJ, Moroson BA, et al : Regulation of thymidylate synthase in mouse leukemia cells (L1210). J Biol Chem 255 : 1305-1311, 1980
- 20) Rutka JT, Giblin JR, Dougherty DY, et al : Establishment and characterization of five cell lines derived from human malignant gliomas. Acta Neuropathol 75 : 92-103, 1987
- 21) 渋谷壯一郎, 松岡浩司, 野村和弘, 他 : Thymidylate synthase に対する単クローン抗体 (M-TS-4) を用いた腫瘍細胞の生長解析. 癌と化学療法 15 :135-139, 1988
- 22) Shibui S, Hoshino R, Vanderlaan M, et al : Double labeling with iodo- and bromodeoxyuridine for cell kinetic studies. J Histochem Cytochem 37 : 1007-1011, 1989
- 23) Steel GG : Cell loss from experimental tumors. Cell Tissue Kinet 1 : 193-207, 1968
- 24) Vanderlaan M, Watkins B, Thomas C, et al : Improved high-affinity monoclonal antibody to iododeoxyuridine. Cytometry 4 : 499-507, 1986
- 25) Westermarck B, Ponten J, and Hugosson R : Determinants for the establishment of permanent tissue culture lines from human gliomas. Acta path microbiol scand Section A 81 : 791-805, 1973
- 26) Sasaki K : Measurement of tritiated thymidine labeling index by incubation *in vitro* of surgically removed cervical cancer. Gann 68 : 307-313, 1977
- 27) Walsh C : Enzyme Reaction Mechanisms, pp838-846, WH Freeman, San Francisco, 1979

質疑応答

(鎌田先生)

渋井先生どうもありがとうございました。生長解析についてでありますけれども、理論的には今までいろいろなペーパーで言われていましたが、今、渋井先生がお話しなされたような doubling time も含めまして実際の数値をなかなか知るすべがなかった訳です。今の2重染色法を用いた手法によって、かなり近い値が出てくるということは、非常に大きな事だと思います。それからもう一つは、生長解析の中において、どういった酵素がG1期の late phase において細胞を増殖期へ向かわせるか、向かわせないかという分かれ目になっているかという点で、この thymidylate synthase が大きな意味をもってくると思います。何か質問はございませんか。

BUdR の染色に関しては、私たちも臨床的に使っている訳ですが、それで大まかな腫瘍の増殖能をつかむことができる訳です。最終的には growth fraction, すなわち一体どの程度の割合の細胞が増殖を続けているかというようなことを知りたい訳ですが、BUdR を何時間かおきにパルスでやればそれに近い値が出てきます。実際には BUdR の毒性の問題などがあって、なかなか出来ず行き詰まっている訳です。先生の2重染色法を用いて growth fraction を間接的に大まかに知る事は可能でしょうか。

(渋井先生)

このままの形では無理だと思います。やはり BUdR で pulse labeling を繰り返すなど、何らかの形で BUdR と長時間接触させる必要があると思います。それ以外に growth fraction を調べる方法として、最近では Ki-67 もありますし、DNA polymerase- α に対するモノクローナル抗体も活用できると考えています。

(鎌田先生)

他にないでしょうか、それでは渋井先生どうもありがとうございました。