

平成21年6月22日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590580

研究課題名（和文） 糖鎖がんマーカー開発のためのコア1合成酵素検出システムの構築

研究課題名（英文） Development of the detecting system for Core1 synthetases; for the development of glyco-cancer marker

研究代表者

立花 宏一 Koichi Tachibana

独立行政法人産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・主任研究員

研究者番号：80216986

研究成果の概要：

癌特異的糖鎖抗原の多くの形成に関わるコア1型糖鎖合成酵素を制御する特異的シャペロン Cosmc に対する特異モノクローナル抗体を作製した。この抗体は癌組織標本の解析やコア1合成酵素の機能解析に役立つことが期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	0	0	0
2006年度	0	0	0
2007年度	2600000	780000	3380000
2008年度	1000000	300000	1300000
年度			
総計	3600000	1080000	4680000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：糖鎖、癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 大腸癌・胃がんなどの上皮性がんにおいて、がん特異的糖鎖が主要ながんマーカーであることが知られている。シアリルLewis a、シアリル Tn (sTn)、T、Tn などのがん特異的糖鎖の多くは糖蛋白質糖鎖の一種でありムチン型糖鎖とも呼ばれる O-結合型糖鎖の基本構造（コア構造）そのものであるか、あるいは、O-型糖鎖の非還元末端にあることが多い。Muc1, CA125 などのがんマーカーであるムチン型糖蛋白質上には多数の O-結合型糖鎖結合部位があり、がん抗原としての O-結合型糖鎖量が非常に多いとともに、T, Tn,

sTn など通常あまり見られない O-型糖鎖が多く見られることから、がん細胞と正常細胞では O-型糖鎖の合成に何らかの違いがある可能性が示唆された。O-結合型糖鎖のコア構造の中でも、がん細胞ではコア3よりコア1が優位であるのみならず、特に、Tn, sTn などの伸長の停止したコア1型構造が多く見られることから、がん細胞においてコア1合成酵素に何らかの異常があるか何らかの制御を受けていることが考えられた。

(2) コア1構造合成にはコア1合成酵素 (Core1 GalT) および Core1 GalT に特異的なシャペロンである Cosmc が必要である。Cosmc

は ER に局在すると考えられており、Core1 GalT のみに働いてその folding を助けることでコア 1 合成酵素として働くことを可能にすると考えられている。Cosmc 遺伝子は X 染色体上に座位しており、いくつかのコア 1 合成活性の見られないがん由来細胞株で Cosmc 遺伝子に変異が見つかり、また、自己免疫疾患である Tn syndrome 患者の血液細胞でも Cosmc 遺伝子に異常があることが報告されている。

(3) 上に記したように、がん細胞におけるがんマーカー糖鎖の合成にはコア 1 合成酵素が重要な働きをしていることが示唆された。従って、がん細胞でコア 1 合成酵素および Cosmc を調べることで、がん細胞におけるコア 1 型糖鎖合成のメカニズムとその制御機構を明らかにし、また、がんマーカー糖鎖抗原を予想することが可能であると考えられた。しかしこの時点でヒトコア 1 合成酵素および Cosmc に対する良い抗体は知られておらず、がん細胞・がん組織におけるこれらの蛋白質を解析することは困難であった。

2. 研究の目的

がん患者さんにおいてしばしば O 型糖鎖がんマーカーが末梢血中などに認められるが、これらのがん特異的 O 型糖鎖がんマーカーのがん細胞における合成のメカニズムについて調べ、また、がん細胞より分泌あるいは細胞表面に発現するがんマーカー糖鎖について予測するためには、研究背景に述べたように、コア 1 合成酵素および Cosmc のがん細胞における発現・活性を調べる必要がある。Cosmc 遺伝子の変異も見つかっていることから、上記目的のためにはコア 1 合成酵素および Cosmc の蛋白質を検出できる特異抗体が必要である。しかし、コア 1 合成酵素および Cosmc に対する良い抗体がなかったことから、ヒトコア 1 合成酵素および Cosmc に対する特異抗体の作製を本研究の主目的とした。作製する抗体はヒトコア 1 合成酵素あるいは Cosmc に対する抗原特異性の他に、免疫組織染色に使用可能であることが必須であり、Western blotting や免疫沈降に使用可能であればなお好ましいと考えられた。

3. 研究の方法

(1) ヒトコア 1 合成酵素および Cosmc に対する特異抗体を作製するために、まずこれらの蛋白質の抗原を用意した。ヒト cDNA より RT-PCR 法を用いてヒトコア 1 合成酵素および Cosmc 全長の cDNA をクローニングした。この cDNA を用いて蛋白質の種々の部分のリコンビナント蛋白質を GST あるいは His タグを付けた形で大腸菌用発現ベクターを構築し、大腸菌で発現誘導することでタグ

付き蛋白質を発現させ、タグを用いて精製して抗原・スクリーニング用材料とした。また、蛋白質の一部のペプチドを合成して抗原として用いた。

(2) これらの抗原を常アジュバントと混合してマウスに免疫し、末梢血中の抗体価が上昇したのを確認後リンパ球を採取してマウスミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製し、HAT 選択培地を用いて 96 well プレートで培養した。抗原をコーティングしたプレートを用いたエライザアッセイでハイブリドーマ培養上清をスクリーニングして陽性の培養上清を選択した。次に、陽性のハイブリドーマ培養上清を、リコンビナント蛋白質を用いた Western blotting で解析して特異抗体を産生するハイブリドーマを絞り込み、選択したハイブリドーマをクローニングして単一のハイブリドーマクローンにしてその培養上清およびマウス腹水を採取して免疫染色に用いた。

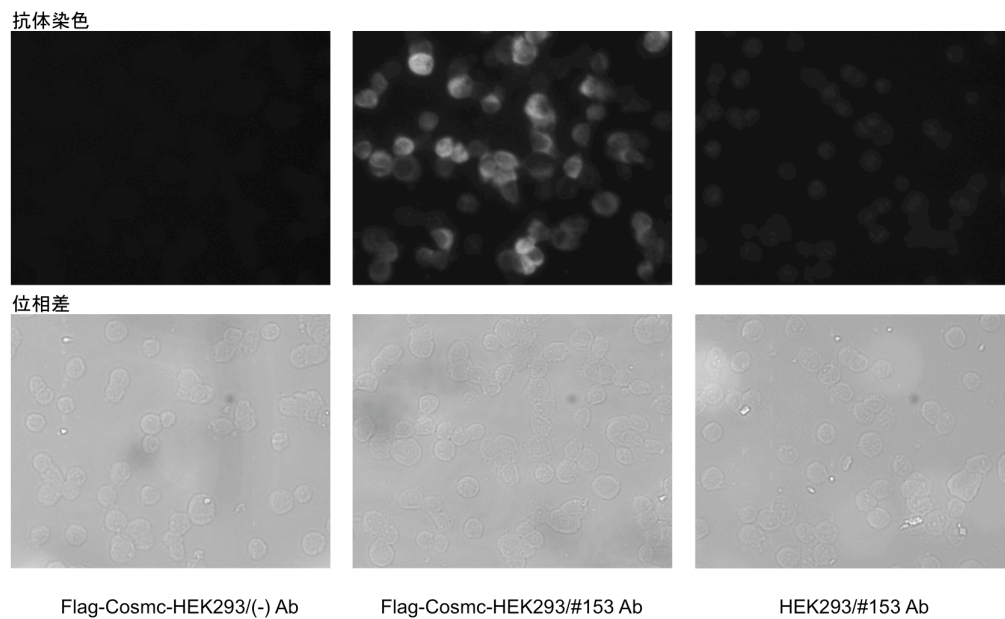
(3) 上記ヒト Cosmc の cDNA を用いて、動物細胞用発現ベクターを構築し、Cosmc 蛋白質を培養細胞に強制発現させた。この Cosmc 蛋白質強制発現細胞等種々の培養細胞を培養後、パラホルムアルデヒドないしメタノールで固定・permeabilize した後、得られたハイブリドーマクローンの培養上清による免疫染色を行い、標的蛋白質を免疫染色で特異的に認識する特異抗体産生株を決定した。

4. 研究成果

抗コア 1 合成酵素抗体に関しては他グループが抗体を作製していることが当該研究期間中に明らかになってきた。また、コア 1 合成酵素遺伝子は常染色体上にあることから遺伝子変異の影響が出にくいと考えられた。コア 1 合成酵素に対しても抗体作製を試みていたが、これらの理由により、ヒト Cosmc に対する抗体の作製に研究を集中することにした。

(1) まず、ヒト Cosmc 蛋白質の一部領域に相当するペプチドを抗原として免疫したマウスよりリンパ球を採取してハイブリドーマを作製し、96 well plate 15 枚より抗原ペプチド、あるいは、発現ベクターを用いて作製した Cosmc リコンビナント蛋白質を用いたエライザ法でスクリーニングし、リコンビナント蛋白質を用いた Western blotting でハイブリドーマを絞り込み、最終的に 4 つの独立の陽性ハイブリドーマを選別した。しかし、これらの抗体のクラスを調べたところ、これらのクローンが産生する抗体はすべて IgM 型であることが判明した。IgM 型では抗体としての用途が限定されることから、これらの抗体の開発およびこれ以上の評価は中断することにした。

図：抗 Cosmc 抗体(#153)免疫染色



(2) そこで、ヒト Cosmc の stem 領域を GST あるいは His タグの融合させた蛋白質を大腸菌に発現させ、タグを用いて精製し、抗原およびスクリーニング材料として用いた。この抗原を免疫したマウスのリンパ球より作製した 96 well plate 24 枚分のハイブリドーマ培養上清を GST-Cosmc 融合蛋白質を用いたエライザ法でスクリーニングし、得られた 46 well の陽性培養上清を、Cosmc リコンビナント蛋白質を用いた Western blotting で解析して、少なくとも 4 つの陽性培養上清を確認し、そのうち 3 well からハイブリドーマをクローニングして抗ヒト Cosmc 抗体産生ハイブリドーマクローンを得た。

(3) 次に、これら 3 つのハイブリドーマクローンの培養上清を用いて免疫染色を行った。免疫染色の評価には Cosmc を発現ベクターの導入により過剰発現させた HEK293 細胞および元株を用いた。その結果、上記ハイブリドーマ培養上清のうち、2 つのクローンの培養上清は Cosmc を過剰発現した HEK293 細胞をコントロールに比較して強く染色することから (図参照)、免疫染色で Cosmc を認識する抗体を含んでいると考えられる。また、Cosmc を過剰発現していない HEK293 細胞もこれらの抗体で染色される。これらの抗 Cosmc 抗体により強拮では HEK293 細胞細胞質の内膜系が染色される。Cosmc はおもに ER に局在すると考えられており、これらの結果は従来考えられている Cosmc の局在と矛盾しない。以上をまとめると、免疫染色に使用できる抗 Cosmc 抗体産生ハイブリドーマクローンの樹立に成功したと考えられる。

(4) 研究上の成果は以上であるが、免疫染色に使用可能な抗ヒト Cosmc マウスモノクローナル抗体クローンが得られたことから、この抗体を用いてヒトがん細胞・がん組織の免疫組織染色による Cosmc 発現解析が可能になると考えられる。コア 1 合成酵素が働くためには Cosmc 必要とされていることから、Cosmc の発現を調べることで細胞のコア 1 合成活性を示唆することが出来る。従って、この抗体を用いることにより、Tn, sTn などのコア 1 型糖鎖がんマーカー形成のメカニズム解明と O-結合型糖鎖がんマーカーの予測に役立つことが期待される。また、Western blotting や免疫沈降による Cosmc 蛋白質の生化学的解析により、Cosmc とコア 1 合成酵素の機能解明に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 件)

〔学会発表〕 (計 件)

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立花 宏一

独立行政法人産業技術総合研究所・セルエ
ン지니어リング研究部門・主任研究員

研究者番号：80216986

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。