

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15201

研究課題名(和文)がん特異的なコアフコシル化糖鎖を認識する抗体の創製

研究課題名(英文)Generation of antibodies that recognize cancer-associated core fucosylation in glycoproteins

研究代表者

奥田 徹哉 (Okuda, Tetsuya)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：20443179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん特異的なコアフコシル化糖タンパク質を特異認識するモノクローナル抗体の開発に向けて、我々が開発した糖鎖抗原特異的な免疫誘導剤の応用の可能性を検証するために必要な実験系の確立と材料調製を実施した。また免疫法の条件検討においてモデルとして用いた天然の糖脂質を認識する新規モノクローナルIgGを獲得した。さらにはイムノアッセイ系の検討過程において、細胞の特定の糖鎖の分解阻害剤を見出した。

研究成果の概要(英文)：To obtain monoclonal antibodies that recognize cancer-associated core fucosylation in glycoproteins, we examined application of our established immunity inducing method using artificial glycosphingolipid as immunogen. Particularly in this project, we have prepared two species of core fucosylated artificial glycosphingolipids and developed a screening method for obtaining the anti-core fucosylated glycoprotein antibody. On the other hand, we have obtained a monoclonal anti-glycosphingolipid IgG and found new activity of specific inhibitors for cellular -hexosaminidases in this project.

研究分野：糖鎖工学、糖鎖免疫学

キーワード：コアフコース モノクローナル抗体 糖鎖抗原 がん 糖タンパク質 スフィンゴ糖脂質 セラミド誘導体 ワクチン

1. 研究開始当初の背景

ヒト細胞は多種多様な構造からなる糖鎖を糖タンパク質や糖脂質という分子形態にて産生しており、細胞に病的変化が生じた場合はこれらの糖鎖が正常細胞には見られない構造へと変化することが以前より知られている。細胞のがん化にともない新たに生じる糖鎖は腫瘍マーカーとして活用できることも知られており、代表例として大腸がん細胞が特異的に産生する Sialyl-Lewis^x 型糖鎖を含有する糖タンパク質抗原 CA19-9 の血中濃度測定による消化器系がんの診断技術などがある。

新規腫瘍マーカーの探索研究において、糖タンパク質の N-結合型糖鎖構造の変化は有望なターゲットである。なかでもその基幹部に見られるコアフコシル化糖鎖構造 (Fuc 1,6GlcNAc-R) は、細胞のがん化にともない新たに産生される糖タンパク質を特徴付ける構造として知られている。例えば、肝細胞が産生する α-フェトプロテインの N-結合型糖鎖は、細胞のがん化にともないコアフコシル化される。このコアフコシル化糖鎖は、レンズマメ由来レクチン (LCA) にて検出できるが、レクチンの特異性・親和性の低さ、不安定さが検出系開発における課題となっている。コアフコシル化糖鎖を特異認識するモノクローナル抗体の開発は、この課題解決の一つの手段である。

一方、我々は様々な糖鎖を認識する抗体を自在に開発するための技術開発を進めていた。本開発の課題は、糖鎖はタンパク質に比べて免疫原性が低く、免疫しても宿主動物に効率良く抗体産生を誘導できないことであったため、標的糖鎖の免疫原性を高めるキャリア分子の開発に取り組んでいた。その結果、セラミド誘導体に目的のキャリア分子としての性質を見出し、本方法の応用により血中主要糖タンパク質のシアリル化糖鎖をエピトープ認識するモノクローナル抗体の獲得に成功していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がんの特異的な糖タンパク質のコアフコシル化糖鎖を特異認識するモノクローナル抗体の獲得において、我々がシアリル化糖鎖をモデルとして開発した糖鎖抗原特異的な免疫誘導法、キャリア分子/免疫誘導剤の応用の可能性を検証することであり、目的のモノクローナル抗体獲得に必要な一連の実験系、すなわち免疫方法の最適化、目的抗体のスクリーニング方法、獲得した抗体の特異性決定のためのイムノアッセイを確立することである。よって最終的にはがん診断や抗体医薬品等の材料として活用できるレベルのモノクローナル抗体を獲得することにある。

3. 研究の方法

(1) 免疫誘導剤の材料調製

コアフコシル化糖鎖は化学合成また当該糖鎖を含有する糖タンパク質より調製した。糖タンパク質は市販品、培養細胞、マウスの組織より調製した。

(2) イムノアッセイ

抗原糖鎖を有する糖タンパク質や糖脂質を固相化した 96 well プレートを用いた ELISA を確立し、血清やモノクローナル抗体の抗体価を評価した。糖タンパク質の分離解析では、SDS-PAGE により試料を分離し、PVDFメンブレンに転写してイムノプロットを実施した。用いた糖タンパク質試料は必要に応じて免疫沈降による前処理にて濃縮・精製した。糖脂質の分離解析では薄層クロマトグラフィ (TLC) により試料を分離し、TLCプレート上でのイムノプロット (TLC-immunostaining) を実施した。

(3) マウスへの免疫と血清の調製

免疫誘導剤や天然の糖脂質はアジュバンドと混合し、リポソーム法にてマウスに免疫した。追加免疫後3日目と7日目に血清を採取し、ELISAにより抗体価を評価した。

(4) モノクローナル抗体の作製

免疫により血清中への目的抗体の産生を確認できたマウスよりリンパ球を採取し、常法によりハイブリドーマを作製した。標的糖鎖を含有する血清糖タンパク質、糖脂質を抗原とする ELISA にて標的糖鎖に反応するモノクローナル抗体産生株を選別・単離した。

(5) モデル細胞/組織の確立

糖鎖分解阻害剤にて処理することで、抗原エピトープとなる糖鎖の含有量を変化させたヒト由来培養細胞を確立し、その性質を各種生化学アッセイにより決定した。また食餌コントロールにより糖質摂取量を制限した過食性肥満マウスより肝臓を採取し、糖タンパク質や糖脂質の含有量への影響を各種生化学アッセイにより決定した。

4. 研究成果

(1) スクリーニング法の確立

コアフコシル化糖鎖をエピトープ認識するモノクローナル抗体の開発には、ELISAによるスクリーニング法の確立が必要であるため、コアフコースを糖鎖構造として有する糖タンパク質を固相化抗原とする ELISA について検討し、HRP-LCA の反応性を指標とした評価にて系を確立した。

(2) 免疫誘導剤の設計と調製

コアフコシル化糖鎖に最適化した免疫誘導剤について、以前のシアリル化糖鎖を用いた検討により見出したセラミド誘導体をキャリアとする免疫誘導剤/人工糖脂質を設計した。免疫誘導能を増強するために見出していった構造的な利点に加え、免疫方法の条件検

討において新たに見出した知見をもとに、構造上の改良を施した。材料として必要なコアフコシル化糖鎖は化学合成または糖タンパク質からの調製を検討し、必要量を得た。以上の検討を踏まえ、最終的に2種類の人工糖脂質を化学合成により調製し、モノクローナル抗体獲得に必要な量を得た。

(3) 免疫誘導法の改良

我々が確立した免疫誘導剤/誘導法では、任意の糖鎖をエピトープ認識する抗体を高効率に誘導できるが、その主成分はIgMであり、より実用性の高いIgGの高効率な誘導のための改良が必要であった。そこで、天然のスフィンゴ糖脂質(ヒト赤血球由来 globoside: 図1)をモデルとして用いた免疫実験を実施し、アジュバンド組成の改良を試みたところ、Lipid AよりもIgG誘導に適したアジュバンドを発見した。

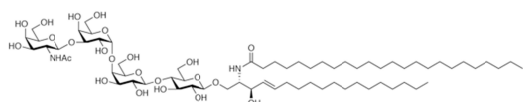


図1 ヒト赤血球由来 globoside の構造

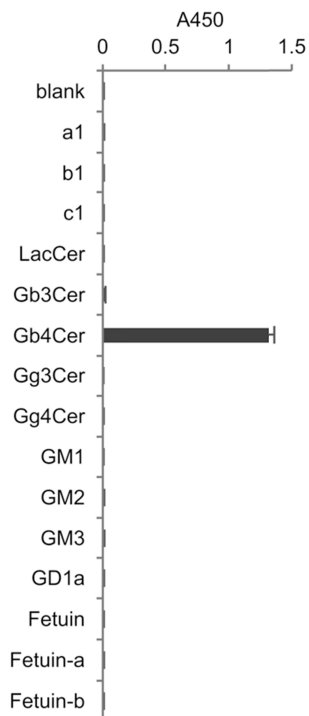


図2 ELISAによるanti-globoside IgG3()の特異性解析

獲得したモノクローナル IgG3()は globoside(Gb4Cer)の糖鎖構造を特異的にエピトープ認識し、類似の糖脂質や糖タンパク

質の糖鎖は認識しない。

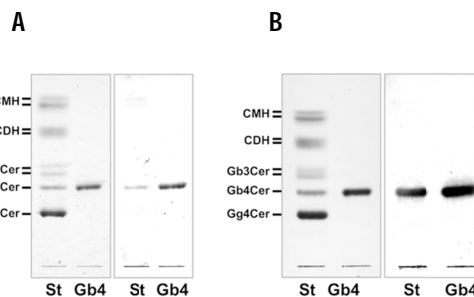


図3 TLC-immunostainingによる分離解析

A, anti-globoside IgG3()
 B, anti-globoside IgM()
 Left panels, orcinol- H_2SO_4
 Right panels, immunostaining

また実際にIgGクラスのモノクローナル抗体が獲得できることを確認するため、globoside免疫マウスよりハイブリドーマを作製し、モノクローナル抗体を単離したところ、これまで報告のないanti-globoside IgG3()の獲得に成功した(図2, 3A)。同時に、globosideに特異的かつ強い反応性を有するanti-globoside IgM()の獲得にも成功した(図3B)。これらのモノクローナル抗体はグロボテトラオース糖鎖構造を特異的にエピトープ認識する。

以上の研究成果は、「5. 主な発表論文等」に記載の学術論文(①~⑤)において公表した。

(4) 抗糖鎖モノクローナル抗体を用いた各種免疫アッセイの確立

抗コアフコシル化糖鎖モノクローナル抗体の特異性評価のために必要な免疫アッセイについて、獲得した抗globoside糖鎖モノクローナル抗体や、市販の抗糖タンパク質モノクローナル抗体を用いて検討し、定性・定量的免疫アッセイを各種確立した。本検討には、ヒト由来培養細胞に糖鎖分解阻害剤を処理して抗原糖鎖量を増加させる細胞モデルと、糖質摂取制限にて飼育することで抗原糖鎖量を変化させた動物(過食性肥満マウス)モデルを用いた。本検討過程において、細胞内糖タンパク質(O-GlcNAc化タンパク質)が2-deoxy-D-glucose処理により増加すること、その代表的な検出用モノクローナル抗体であるRL2とCTD110.6が糖タンパク質の異なるO-GlcNAcエピトープを認識することを、新たに確立した免疫沈降法と分離解析法により見出した。またO-GlcNAcやスフィンゴ糖脂質GM2の-N-アセチルヘキサミン構造の分解酵素のインヒビターであるPUGNAcが、globosideの分解抑制効果も有し、PUGNAc処理がヒト血管内皮細胞内にglobosideを蓄積させることを見出した。さらには過食性肥満マウスの肝臓にて脂肪肝

形成にともないスフィンゴ糖脂質の含有量が低下していることも見出した。以上の研究成果は、「5. 主な発表論文等」に記載の学術論文(~⑦)において公表した。

(5) 抗コアフコシル化抗体の免疫誘導

調製した免疫誘導剤を改良した免疫法にてマウスに投与したところ、確立した ELISA により評価にてコアフコース含有糖タンパク質に対する抗体の産生を示すデータを得た。そこで抗体価の上昇が確認されたマウスを用いてモノクローナル抗体の獲得へ向けた検討を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Tetsuya Okuda,

Data on immunoglobulin G antibodies induced by immunization of mice with globoside carrying very long-chain fatty acids, Data in Brief, 査読有, vol. 19, 2018, pp256-260
DOI: 10.1016/j.dib.2018.05.014

Tetsuya Okuda,

Design of Carrier Molecules Suitable for Inducing Immunity to Oligosaccharide Antigens: Application to Anti-Glycoprotein Monoclonal Antibodies, Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 査読有, vol. 30, No. 175, 2018, pp. E1-E4
DOI: 10.4052/tigg.1762.1E

奥田 徹哉,

オリゴ糖の免疫原性増強に適したキャリア分子の開発と糖タンパク質認識抗体獲得への応用, Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 査読有, Vol. 30 No. 175, pp. J1-J4
DOI: 10.4052/tigg.1762.1J

Tetsuya Okuda, Asami Fukui,

Generation of anti-oligosaccharide antibodies that recognize mammalian glycoproteins by immunization with a novel artificial glycosphingolipid, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, vol.497, 2018, pp. 983-989
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.113

Tetsuya Okuda,

PUGNAc treatment provokes globotetraosylceramide accumulation in human umbilical vein endothelial cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, vol.487, 2017, pp. 76-82
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.113

Tetsuya Okuda,

Western blot data using two distinct anti-*O*-GlcNAc monoclonal antibodies showing unique glycosylation status on cellular proteins under 2-deoxy-D-glucose treatment, Data in Brief, 査読有, vol. 10, 2017, pp449-453
DOI: 10.1016/j.dib.2016.12.001

Tetsuya Okuda, Naoki Morita,

A very low carbohydrate ketogenic diet increases hepatic glycosphingolipids related to regulation of insulin signalling, Journal of Functional Foods, 査読有, vol. 21, 2016, pp.70-74
DOI: 10.1016/j.jff.2015.11.040

[学会発表](計11件)

奥田 徹哉,

超長鎖脂肪酸を含むスフィンゴ糖脂質類を用いた糖鎖認識抗体の開発, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018

奥田 徹哉,

ケトン食摂取モデルマウスに見られる糖脂質代謝関連分子の発現増加とその分子基盤, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017

奥田 徹哉,

ケトン食摂取モデルマウスに見られるグリオシドの発現増加とその分子基盤, 第 36 回日本糖質学会年会, 2017

奥田 徹哉,

低炭水化物食摂取下の肥満マウス肝臓に見られる脂質代謝関連遺伝子の発現変化, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017

奥田 徹哉,

低炭水化物食摂取下の肥満マウス肝臓に見られる脂質代謝関連遺伝子の発現変化, 第 16 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会, 2017

奥田 徹哉,

PUGNAc 処理後の血管内皮細胞に見られる Gb4Cer の増加と関連酵素遺伝子の発現解析, 第 89 回日本生化学会大会, 2016

奥田 徹哉,

PUGNAc 処理による血管内皮細胞での Gb4Cer 発現増加と関連酵素遺伝子の発現解析, 第 35 回日本糖質学会年会, 2016

奥田 徹哉,

A very low carbohydrate ketogenic diet increases hepatic glycosphingolipids related to regulation of insulin signaling, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016

奥田 徹哉

持続的な低炭水化物食の摂取は肥満モデルマウス肝臓においてインスリン感受性関連糖脂質の発現量を増加させる、第15回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会、2016

奥田 徹哉

A very low carbohydrate ketogenic diet increases hepatic glycosphingolipids related to regulation of insulin signaling、微生物研究の新展開、2016

奥田 徹哉

Alteration in liver glycosphingolipid content of mice fed a very low carbohydrate ketogenic diet、BMB2015、2015

〔産業財産権〕

取得状況（計3件）

名称：Monoclonal Antibody Recognizing Sialylated Sugar Chains

発明者：奥田 徹哉

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：9796785B2

取得年月日：2017年10月24日

国内外の別：国外（米国）

名称：シアリル化糖鎖を認識するモノクローナル抗体

発明者：奥田 徹哉

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：第6172687号

取得年月日：2017年7月14日

国内外の別：国内

名称：糖鎖抗原の免疫誘導剤

発明者：奥田 徹哉、清水弘樹

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：第6143240号

取得年月日：2017年5月19日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

免疫誘導活性を有する人工糖脂質のデザインとモノクローナル抗体開発への応用

<https://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-design/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 徹哉 (OKUDA, Tetsuya)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：20443179