

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592145

研究課題名(和文) 婦人科癌転移の糖鎖機能解析と認識糖鎖抗原に対する新規ヒトモノクローナル抗体の開発

研究課題名(英文) Analysis of carbohydrate structures related to metastasis of gynecologic cancers and establishment of human monoclonal antibodies towards these carbohydrate structures

研究代表者

鈴木 淳 (SUZUKI ATSUSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00255514

研究成果の概要(和文)：我々が作製した婦人科癌特異的ヒト抗体の HMOCC-1 抗体は婦人科癌の中でも卵巣癌に対して抗腫瘍効果を示し、その認識糖鎖抗原は硫酸化糖鎖抗原であることが判明した。本抗体が特異的に認識する糖鎖抗原は婦人科癌では初めて報告される糖鎖構造であり、その抗原決定構造が SO_3 3Gal 1 4GlcNAc 1 3($\pm\text{SO}_3$ 6)Gal 1 4GlcNAc 1 であることを解明した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a gynecologic cancer-specific human monoclonal antibody HMOCC-1 that demonstrates anti-tumor activity towards ovarian cancer, among gynecologic cancers. The antibody has a specific carbohydrate antigen epitope that is a sulfated carbohydrate moiety. The carbohydrate antigen recognized by this antibody is a newly characterized epitope present on gynecologic cancers and its glycan structure was elucidated to be SO_3 3Gal 1 4GlcNAc 1 3($\pm\text{SO}_3$ 6)Gal 1 4GlcNAc 1 .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科癌、抗体医療、糖鎖抗原、モノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

婦人科癌のリンパ節転移陽性例は有意に予後不良であり、手術治療や従来の抗癌剤治療のみでは制御は困難なことが多く、より有効な治療法は重要な目標となる。本研究ではリンパ節転移に対する新たな治療戦略として転移腫瘍の認識糖鎖抗原をターゲットする新規分子標的治療薬の開発が目的である。癌特異的抗体を併用して化学療法の効果をも高めることや、抗体を利用した新たな治療薬を開発することは臨床的には意義が大きい。

2. 研究の目的

本研究では癌化に伴い発現する分子に対して高い特異性を有するヒトモノクローナル抗体を作製し、ヒトに投与した場合は正常細胞に対する傷害を最小限とし、癌細胞を選択的に阻害することを目的とした抗体療法の開発を行う。生体内で機能効果を示す分子標的治療薬の抗体の多くは糖鎖構造を認識抗原としているため、リンパ節転移巣で発現される特異的な糖鎖構造を認識する抗体の選別を行う。

具体的な研究目的として、癌のリンパ行性

転移の機序解明に貴重なツールとなるため、リンパ節転移を特異的に形成する腫瘍細胞の確立へ向けて、in vivo にてリンパ節転移の高い細胞株を樹立する。さらに抗体作製には、ヒト抗体遺伝子の導入により完全ヒト型抗体を産生する KM mouse を用いて、腫瘍細胞を認識するヒト型モノクローナル抗体を作製し、抗腫瘍効果を示す抗体の選別を行う。作製した抗体の認識抗原を同定すると同時に、腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を確認し、その分子レベルでのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) in vivo selection

ヒト婦人科癌由来の細胞株をヌードマウスに同所性移植し、約 6~8 週間後に形成された後腹膜リンパ節転移巣を摘出、初代培養したものを再度同所性移植することを数回繰り返す方法を用いてリンパ節高転移株を樹立した。

(2) RT-PCR

HMOCC-1 の認識糖鎖抗原に必要な遺伝子発現を RT-PCR にて検討した。各種細胞より RNA を通常方法にて抽出し、逆転写酵素反応後に合成された cDNA をテンプレートにて PCR 反応を行った。PCR 反応には今までに報告された primer および反応条件にて行った。

(3) 認識抗原を合成する糖転移酵素の検索

作製した HMOCC-1 抗体の認識糖鎖抗原の解析にて、各種糖転移酵素および硫酸転移酵素の発現ベクターを細胞にトランスフェクションし、細胞染色にて HMOCC-1 の発現を確認した。HEK293T 細胞、RMG-1 細胞、CHO Lec2 細胞はガラスのカバースリップ上に通常方法にて細胞培養を行った。トランスフェクションには lipofectamine を使用し、各種発現ベクターの DNA は 1 μ g づつ使用した。細胞染色はトランスフェクション後 48 時間に行った。

(4) ELISA 抑制アッセイ

HMOCC-1 抗体を抑制する糖鎖構造を決定する検討のため、RMG-1 細胞を 96 well プレートにて細胞培養し、4%PFA にて固定後、HMOCC-1 抗体および各種合成酵素を濃度勾配別に添加し、室温にて 1 時間反応させた。2 次抗体に human IgM 抗体を使用し、発色後 450nm にて吸光度で測定した。

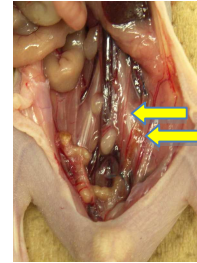
4. 研究成果

(1) リンパ節高転移細胞株の作製

リンパ節高転移の細胞株の in vivo のリンパ

節の転移モデルとして、リンパ節へ特異的に転移を示す婦人科癌の細胞株を複数樹立した。特に子宮体癌 Hec-1A 細胞を用いて、婦人科癌の所属リンパ節への高転移性を示す細胞株を樹立した。確立した高転移性の細胞株はヌードマウスに同所性移植後、骨盤リンパ節へ特異的に転移巣を形成した。

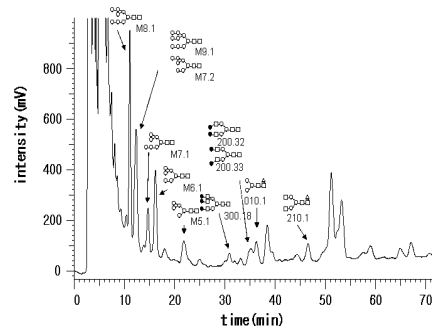
(図 1 : 腫大後腹膜リンパ節転移巣を示す)



(2) リンパ行性転移細胞の糖鎖構造解析

リンパ行性転移過程においては細胞間の認識に細胞表面糖鎖は重要な役割を果たすため、今回の研究ではリンパ節高転移細胞株と低転移細胞株の細胞表面糖鎖構造解析を行ない、質量分析にてリンパ節転移との関連性が高い糖鎖構造を特定した。解析結果にて子宮体癌 Hec 1-A の高転移細胞株は低転移細胞株に比べて高マンノース型の糖鎖構造が相対的に増加し、低転移株ではより複合型糖鎖構造が増加していることが判明した。

(図 2 : 高転移細胞株の質量分析結果)



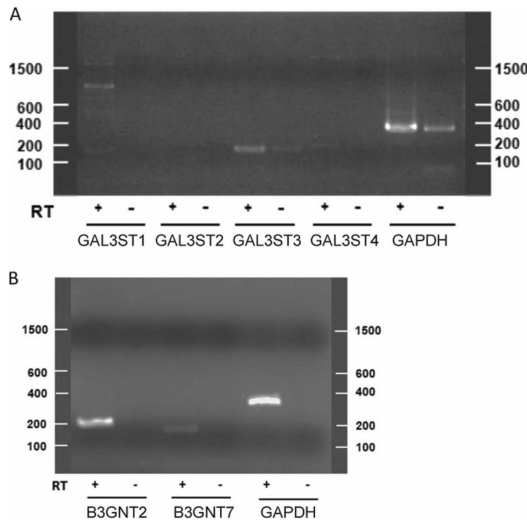
(3) 抗原解析

HMOCC-1 の認識抗原の合成に必要な糖転移酵素を確認するため、HEK293T 細胞を 8 種類の糖転移酵素および 6 種類の硫酸転移酵素の発現ベクターを導入し、細胞染色にて HMOCC-1 抗体の陽性細胞を認めた。遺伝子導入にて認識抗原の発現が確認できたため、次の段階の検討では 1 種類づつの糖転移酵素または硫酸転移酵素を除いたその他の酵素の発現ベクターを導入する実験を行った。その結果、B3GNT および GAL3ST が HMOCC-1 の認識抗原の合成に必要であることが判明した。

次に HMOCC-1 の認識抗原の合成に必要な糖転移酵素の B3GNT および硫酸転移酵素の

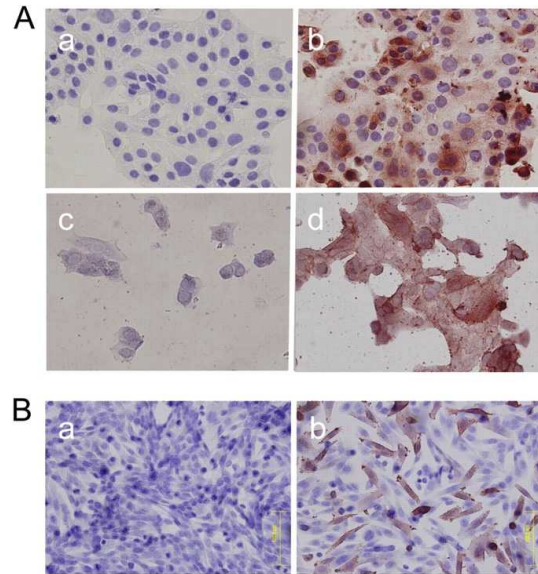
GAL3ST の isozyme を確認するため、糖転移酵素の遺伝子産物の発現を RT-PCR にて発現を確認した。卵巣明細胞腺癌細胞 RMG-1 を用いて検討を行った結果、GAL3ST1, GAL3ST2, GAL3ST3, GAL3ST4 の発現の比較では GAL3ST3 のみの mRNA の発現を認め、その他の GAL3ST の mRNA は発現を認めなかった。B3GNT は B3GNT2 および B3GNT7 の両酵素の発現を認めた。この結果、HMOCC-1 の認識抗原の発現には B3GNT7 および GAL3ST3 の発現が必要であることが判明した。

(図 3: RT-PCR)



HMOCC-1 の糖鎖抗原の in vitro での合成経路を解明する目的で、糖鎖構造の化学処理を行い、さらに一部の糖鎖構造を欠如する細胞株を用いて検討を行った。HEK293T 細胞はシアル酸転移酵素を有するため、HMOCC-1 の認識抗原におけるシアル酸の関与を確認するため、HMOCC-1 抗原を発現する卵巣癌明細胞腺癌 RMG-1 細胞を弱酸性処理し、脱シアル化を行った結果、HMOCC-1 の発現には変化がなく、認識抗原にはシアル酸が含まれないことが示唆された。シアル酸の影響を in vitro にて確認するために、シアル酸転移酵素を欠如している CHO Lec2 細胞および卵巣明細胞腺癌 RMG-1 細胞にて上記同様の糖転移酵素の導入実験を行い、免疫組織学的に HMOCC-1 の抗原解析を行った。これにより、HMOCC-1 抗原には GAL3ST3 および B3GNT7 の糖転移酵素が必要であることが判明し、さらにシアル酸合成が欠如する CHO Lec2 での導入実験にて認識抗原にはシアル酸は含まれていないことが判明した。

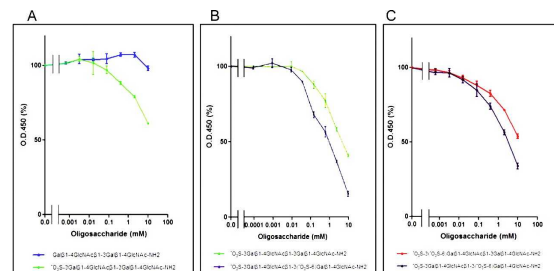
(図 4) A にて RMG-1 細胞の弱酸性処理前 (a,b) および後 (c,d)。HMOCC-1 抗体を 1 次抗体として (+: b,d) または (-: a,c) の場合を示す。B にて CHO Lec 2 細胞を mock vector (a) または GAL3ST3+B3GNT7 発現ベクター (b) を細胞に遺伝子導入した場合を示す。



(4) ELISA 抑制アッセイ

HMOCC-1 認識抗原の糖鎖構造を決定するため、遺伝子導入にて予想される糖鎖構造に合わせ、化学合成にて sulfated N-acetyl-lactosaminyl tetrasaccharides を作製し、in vitro の細胞-抗体の阻害実験として ELISA 抑制アッセイを行った。各グラフの下記に示す合成糖鎖構造を濃度勾配にて 96 well プレート上で培養した RMG-1 細胞に添加し、固定後に HMOCC-1 抗体と反応させ、ELISA にて比較検討した。その結果、SO₃ 3Gal 1 4GlcNAc 1 3(±SO₃ 6)Gal 1 4GlcNAc 1 が SO₃ 3(SO₃ 6)Gal 1 4GlcNAc 1 3Gal 1 4GlcNAc 1 より抗原性が高いことが判明した。

(図 5 A: nonsulfated, monosulfated 糖鎖、B: monosulfated, disulfated 糖鎖、C: disulfated 糖鎖。)



以上の in vitro の認識抗原の検証実験にて、硫酸転移酵素である Gal3ST3 および 3GNT7 遺伝子の発現が本抗体の認識糖鎖構造を合成することが確認された。本抗体が特異的に認識する糖鎖抗原は婦人科癌では初めて報告される糖鎖構造であり、その抗原決定構造が SO₃ 3Gal 1 4GlcNAc 1 3(±SO₃ 6)Gal 1 4GlcNAc 1 であることを解明した。現在臨床応用へ向けて本抗体の詳細な

抗腫瘍効果およびリンパ節抑制効果についての解析を進めている。

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 8 件)

- (1) Shibata T, Matsumura F, Wang P, Yu SY, Khoo KH, Kitayama K, Akama T, Sugihara K, Kojima-Aikawa K, Seeberger P, Fukuda M, Suzuki A, Aoki D, Fukuda MN. Identification of mono- and di-sulfated N-acetyl-lactosaminyl oligosaccharide structures as epitopes specifically recognized by humanized monoclonal antibody HMOCC-1 raised against ovarian cancer. *J. Biol Chem.*, 査読有り; 287 (9), 2012: 6592-6602
- (2) Toyama A, Suzuki A, Shimada T, Aoki C, Aoki Y, Umino Y, Nakamura Y, Aoki D, Sato T. Identification of ANXA4, PSAT1, CRABP2 and SPB5 as histology-specific biomarker candidates for ovarian cancer by proteomic characterization. *Cancer Sci.*, 査読有り; 103 (4), 2012: 747-55
- (3) Suzuki-Anekoji M, Suzuki M, Kobayashi T, Sato Y, Nakayama J, Suzuki A, Bao X, Angata K, Fukuda M. HNK-1 glycan functions as a tumor suppressor for astrocytic tumor. *J. Biol Chem.*, 査読有り; 286 (37) 2011: 32824-33
- (4) Kataoka F, Tsuda H, Nomura H, Chiyoda T, Tominaga E, Suzuki A, Susumu N, Aoki D. The chemosensitivity of nodal metastases in recurrent epithelial ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*, 査読有り; 32 (2), 2011: 160-3
- (5) Chiyoda T, Tsuda H, Nomura H, Kataoka F, Tominaga E, Suzuki A, Susumu N, Aoki D. Effects of third-line chemotherapy for women with recurrent ovarian cancer who received platinum/taxane regimens as first-line chemotherapy. *Eur J Gynaecol Oncol*. 査読有り; 31(4), 2010: 364-8.
- (6) Nomura H, Tsuda H, Susumu N, Fujii T, Banno K, Kataoka F, Tominaga E, Suzuki A, Chiyoda T, Aoki D. Lymph node metastasis in grossly apparent stages I and II epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 査読有り; (3), 2010:341-5.
- (7) Nishimura S, Ito YM, Tsuda H, Ohnishi Y, Kataoka F, Nomura H, Chiyoda T, Suzuki A,

Susumu N, Aoki D, Hatae M. The sensitivity and specificity of a new formula to distinguish endometrioid type endometrial carcinoma from ovarian endometrial carcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 査読有り; 148(1), 2010:67-72.

(8) Tominaga E, Tsuda H, Arao T, Nishimura S, Takano M, Kataoka F, Nomura H, Hirasawa A, Aoki D, Nishio K. Amplification of GNAS may be an independent, qualitative and reproducible biomarker to predict progression-free survival in epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol*. 査読有り; 118 (2), ;2010: 160-6

[学会発表](計 14 件)

- (1) Suzuki-Anekoji M (共同演者: 鈴木淳): Novel function of HNK-1 sulfotransferase as a hormone regulator. Annual Meeting for the Society for Glycobiology, 平成 23 年 11 月 10 日、Seattle, WA, USA
- (2) Suzuki-Anekoji M (共同演者: 鈴木淳): HNK-1 glycan functions as a tumor suppressor for astrocytic tumor. Annual Meeting for the Society for Glycobiology, 平成 23 年 11 月 10 日、Seattle, WA, USA
- (3) 遠山敦彦 (共同演者: 鈴木淳): 卵巣癌の各組織型における ANXA4, SPB5, CRABP2, PST1 分子発現とバイオマーカーとしての有用性。第 70 回日本癌学会、平成 23 年 10 月 3 日、国際会議場、名古屋
- (4) 片岡史夫 (共同演者: 鈴木淳): 卵巣癌間質の遺伝子解析を用いた新規バイオマーカーの検索—癌間質の EGR-1 発現は上皮性卵巣癌の予後と相関する。第 63 回日本産婦人科学会総会学術講演会、平成 23 年 8 月 30 日、国際会議場、大阪
- (5) 野村弘行 (共同演者: 鈴木淳): シアリダーゼ発現低下は卵巣癌腹膜播種を抑制する。第 63 回日本産婦人科学会総会学術講演会、平成 23 年 8 月 30 日、国際会議場、大阪
- (6) 笈川文子 (共同演者: 鈴木淳): ヒトモノクローナル抗体 HMMC-1 は癌の増殖に対して抑制的に作用する。第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学学会、平成 22 年 12 月 7 日、神戸ポートアイランド、神戸
- (7) 進伸幸 (共同演者: 鈴木淳): Fertility-preserving high-dose medroxyprogesterone acetate (MPA) therapy for 4 young

patients with grade 2 endometrioid adenocarcinoma. 13th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society、平成 22 年 10 月 24 日、Prague, Czech Republic

(8)遠山敦彦(共同演者:鈴木淳): Expression of ANXA4, SPB5, CRABP2, and PSAT1 in ovarian cancer histological subtypes used for diagnostic purposes. 第 69 回日本癌学会学術総会、平成 22 年 9 月 23 日、国際会議場、大阪

(9)富永英一郎: 標準治療を施行した上皮性卵巣癌を規定する遺伝子の探索。第 9 回日本婦人科がん分子標的研究会、平成 22 年 9 月 10 日、大津プリンスホテル、滋賀

(10)富永英一郎: GNAS 遺伝子の増幅は標準治療を施行した上皮性卵巣癌の独立した予後因子である。第 62 回日本産婦人科学会学術講演会、平成 22 年 4 月 23 日、東京国際フォーラム、東京

(11)笈川文子(共同演者:鈴木淳): 子宮体癌細胞が発現している糖タンパク質と転移性の関連。Glyco Tokyo 2009 シンポジウム、平成 21 年 11 月 14 日、お茶の水大学、東京

(12)野村弘行(共同演者:鈴木淳): Lymph node metastasis in grossly stage I and II epithelial ovarian cancer. 16th International Meeting of the European Society of Gynecologic Oncology、平成 21 年 11 月 12 日、Belgrade, Serbia

(13)遠山敦彦(共同演者:鈴木淳): 卵巣癌の組織型特異的なバイオマーカーの開発と血清診断の可能性。第 68 回日本癌学会学術総会、平成 21 年 10 月 1 日 パシフィコ、横浜

(14)富永英一郎: 標準治療を受けた表層上皮性卵巣癌の再発リスクを規定する遺伝子の検索。第 61 回日本産科婦人科学術集会、平成 21 年 4 月 4 日、国際会議場、京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 淳 (SUZUKI ATSUSHI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 0025514

(2)研究分担者

富永 英一郎 (TOMINAGA EIICHIRO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 80276328

鈴木 雅美 (SUZUKI MASAMI)
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号: 10276321

(3)連携研究者

なし