

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501303

研究課題名(和文)新規癌特異的糖鎖抗原の腫瘍マーカーとしての応用

研究課題名(英文)Application of novel tumor associated carbohydrate antigen as tumor marker

研究代表者

宮本 泰豪(Miyamoto, Yasuhide)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：90322742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ルイス型血液型が陰性の人の癌に発現する癌特異的糖鎖抗原Sialyl Type1H(ST1H)を特異的に認識する単クローン抗体の作成を目指した。合成した糖脂質ST1H、あるいはST1H陽性の大腸癌細胞をマウス免疫した。ハイブリドーマの抗体はELISA法を用いてスクリーニングした。ST1Hを特異的に認識するが、他の異性体ST2H, Sialyl Lex, Sialyl Leaをほとんど認識しない単クローン抗体を得た。

研究成果の概要(英文)：We aimed to generate monoclonal antibodies specifically recognize tumor associated carbohydrate antigen, Sialyl Type 1H (ST1H), which are expressed in cancers of Lewis-negative individuals. Synthesized ST1H glycosphingolipid or colon cancer cells expressing ST1H were immunized to mice. The antibodies produced by the hybridoma were screened by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Monoclonal antibodies that specifically recognize ST1H, but not isomers of ST1H such as ST2H, Sialyl Lewis A and Sialyl Lewis X, were obtained.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：糖鎖 腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

細胞は癌化に伴い細胞表面の糖鎖構造が変化する。変化した糖鎖の一部は、癌で発現するが、正常細胞では発現が認められず、癌特異的糖鎖抗原に分類される。また一連の機能解析から、癌特異的糖鎖抗原には癌の転移や浸潤などに深く関与するものがあることが判明した。そのほかに、多くの癌特異的糖鎖抗原は腫瘍マーカーとしても広く用いられている。例をあげると、CA19-9、CA125などが挙げられる。そのため、新たな癌特異的糖鎖抗原の発見は、癌での糖鎖の役割のより深い理解と、新規の腫瘍マーカーの開拓が期待される。

2. 研究の目的

我々は、糖脂質の構造を高精度、高感度に解析する技術を確立し、癌の詳細な糖鎖構造解析を行うことで、新規の癌特異的糖鎖抗原の発見、新規の腫瘍マーカーの開拓を目指した。その結果、ルイス型血液型が陰性の患者の癌に特異的に発現する新規の癌特異的糖鎖抗原 Sialyl Type1H (ST1H)を発見した。ルイス型陰性の人には Sialyl Le^a (CA19-9)などのルイス型糖鎖が合成できないため血清 CA19-9 は 0 で、マーカーとしての意味を持たない。しかし、Sialyl Le^a (CA19-9)の前駆体である Sialyl Le^x (DU-PAN-2)が、ルイス陰性の人々の CA19-9 に代わる腫瘍マーカーとされている。我々が発見した ST1H は CA19-9 とは異なる経路で合成され、かつルイス陰性の人々の癌にのみ発現する可能性が極めて高く、DU-PAN-2 と相乗的にルイス陰性の人に対する腫瘍マーカーとなる可能性が大である。そこで、本研究では、これらの研究を発展させるため、ST1H を認識する単クローン抗体を作成し、腫瘍マーカーへの応用を試みた。

3. 研究の方法

今回の研究に必要な糖脂質 ST1H は受託合成を依頼した。マウスの免疫に用いる糖鎖抗原はリポソーム法を用いて作成した。マウス 1 匹あたり合成した糖脂質 ST1H を 35 μ g、ジパルミトイルホスファチジルコリン 0.5 μ mol、コレステロール 0.5 μ mol、*Salmonella Minnesota R595* の LPS 10 μ g を用いた。上記をよく混合した後、ナシ型プラスチックに入れ、ロータリーエバポレーターにて溶媒を除去した。PBS(-)を 1 匹あたり 0.15 ml 加え、底にできるフィルムをはがしやすくしてから、Vortex Mixer で十分均一にすることにより、liposome とした。この liposome を 6 週齢の BALB/c マウス (雌) 数匹の腹腔内に 0.15 ml 投与した。初回免疫後、3-4 日ごとに 2, 3 回目の追加免疫を行った。最終免疫の 2 日後にマウスを採血し、下記の ELISA 法にて糖脂質に対する抗体価を測定し、最も力価の高いマウスを選び、細胞融合に用いた。免疫以降の細胞融合、セレクションは、ペプチドに対するモノクローナル抗体の作成法と同様

である。

ミエローマは、P3-X63Ag8.653 を用いた。細胞融合の 4 ~ 7 日前に凍結保存しているミエローマを融解し、融合当日には対数増殖期にある状態で 2×10^7 個程度の細胞数 ($2-5 \times 10^5$ /ml) になるように調整した。培養していたミエローマを回収し、遠心後、無血清の RPMI に浮かべ細胞数をカウントした。

マウスをエーテルにて安楽死させ、無菌的に脾臓を取り出した。シャーレに入れて、滅菌スライドのフロストの部分をごすり合わせて細胞を浮遊させた。溶血液で、赤血球を溶血させた後、無血清の RPMI に浮遊させ細胞数をカウントした。算定した細胞数より脾細胞 : ミエローマ細胞 = 5 : 1 となるように混合し、遠心にてペレットにした。このペレットに 37 °C に温めていた 50% PEG solution 1ml を徐々に加えることにより細胞融合させた。無血清 RPMI をゆっくり加えて PEG の濃度を徐々に下げ、遠心にて PEG を完全に除去した。Pellet の細胞を、脾細胞換算 1×10^6 cells/ml の細胞密度で HAT 培地 (S-Clone CM-B+ HAT) に懸濁させた。96 well microplate に 100 μ l ずつ巻き込み、37 °C、5% CO₂ にて培養した。コロニーが可視化できれば、できるだけ早急にスクリーニングを開始した。抗体のスクリーニングには ELISA 法を用いた。

glycolipid (2 μ g)、egg yolk phosphatidylcholine (20 μ g)-cholesterol (10 μ g) を 2ml ethanol で溶解した。1-2 分超音波処理し、20 μ l per well ずつ 96 穴の ELISA plate に加え、室温で 2-3 時間放置し、乾燥させて、固相化した。各 well に 5% BSA-PBS 100 μ l を入れ、2 時間反応させ、非特異吸着を抑えた。0.5% BSA-PBS で well を洗浄後、ハイブリドーマの上清を 100 μ l 加え、37 °C で 1 時間反応させた。0.5% BSA-PBS で well を洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス Immunoglobulin (1000 倍希釈) を 50 μ l 加え、37 °C で 1 時間反応させた。PBS で well を洗浄後、TMB ペルオキシダーゼ発色基質キットを用いて発色させた。反応後、1N H₂SO₄ 50 μ l を加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで波長 450nm の吸光度を測定した。陽性のクローンは限界希釈法で 2nd スクリーニングを行い、目的の抗体を産生するクローンを得た。

免疫組織法は、大腸癌、大腸正常粘膜組織からクリオスタットで 10 μ m の切片を作成し、アセトンあるいは 4% パラフォルムで固定し、ABC 法を用いて発色した。

4. 研究成果

3000 以上のクローンを ELISA にてスクリーニングし、11 種類の陽性クローンが得られた。2 種類が IgM で 9 種類が IgG であった。抗体の特異性を ELISA にて検討した。その結果、これらのクローンは、ELISA においては ST1H の異性体である ST2H、SLe^x、SLe^a は認識しなかった (図 1)。

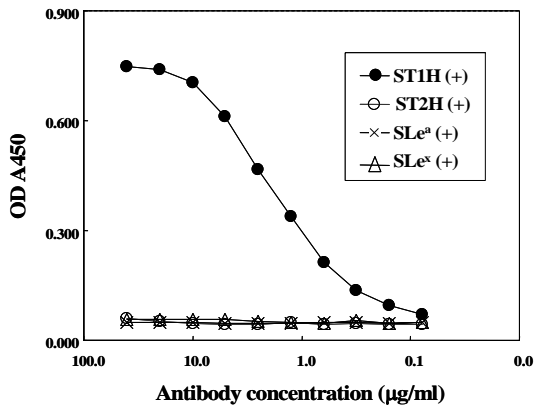


図 1、ELISA を用いた ST1H 抗体の特異性の検討

ELISA のほかに免疫組織化学を用いて、これらのクローンをさらに検討した。サンプルには、ST1H の発現が確認されているルイス型陰性の大腸癌組織、正常大腸組織を用いた。これらの凍結切片を作成し、11 種類のハイブリドマの上清と反応させ、通常の ABC 法にて発色させた。その結果、どのクローンからも陽性シグナルを得ることができなかった。そこで、さらに免疫原として、大腸がん組織から単離した ST1H 陽性細胞を用いて、単クローン抗体の作成に取り組んだ。大腸癌組織を collagenase で処理した後、上皮性マーカーである CD326 の抗体を用いて大腸癌細胞を高純度で単離した。糖脂質の構造解析を行い、これらの大腸癌細胞での ST1H の発現は確認した。これらの ST1H 陽性の大腸癌細胞をマウスに免疫した。最終免疫後、マウスより脾臓を取り出し、PEG 法でミエローマ細胞と細胞融合させた。その後、HAT 培地でハイブリドマを selection し、約 1000 種類のクローンを得た。ELISA にてスクリーニングを行ったところ、ST1H は認識するものの、その異性体である ST2H をほとんど認識しないクローンを 2 種類得た。(図 2) 今後はこれらのクローンの性状をさらに検討し、血清の ELISA に用いるようにすることが重要である。

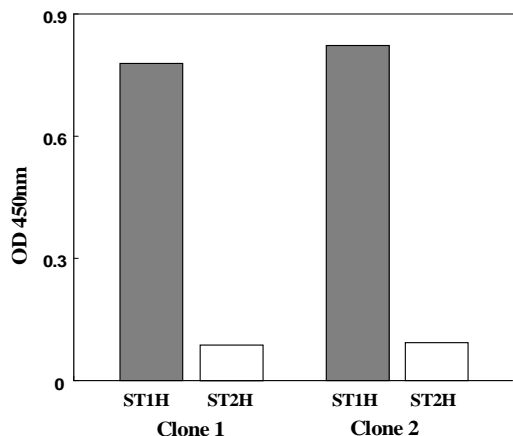


図 2、ST1H を認識する 2 種類の単クローン抗体

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Yabu, M., Korekane, H., Takahashi, H., Ohigashi, H., Ishikawa, O., Miyamoto, Y.: Accumulation of free Neu5Ac-containing complex-type N-glycans in human pancreatic cancers. *Glycoconj J* 30(3), 247-256 (2013). doi:10.1007/s10719-012-9435-9 査読あり
2. Yabu, M., Korekane, H., Hatano, K., Kaneda, Y., Nonomura, N., Sato, C., Kitajima, K., Miyamoto, Y.: Occurrence of free deaminoneuraminic acid (KDN)-containing complex-type N-glycans in human prostate cancers. *Glycobiology* 23(6), 634-642 (2013). doi:cws132 [pii] 10.1093/glycob/cws132 査読あり
3. Nomura, M., Shimbo, T., Miyamoto, Y., Fukuzawa, M., Kaneda, Y.: 13-Cis retinoic acid can enhance the antitumor activity of non-replicating Sendai virus particle against neuroblastoma. *Cancer Sci* 104(2), 238-244 (2013). doi:10.1111/cas.12063 査読あり
4. Korekane, H., Park, J.Y., Matsumoto, A., Nakajima, K., Takamatsu, S., Ohtsubo, K., Miyamoto, Y., Hanashima, S., Kanekiyo, K., Kitazume, S., Yamaguchi, Y., Matsuo, I., Taniguchi, N.: Identification of Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 3 (ENPP3) as a Regulator of N-Acetylglucosaminyltransferase GnT-IX (GnT-Vb). *J Biol Chem* 288(39), 27912-27926 (2013). doi:M113.474304 [pii] 10.1074/jbc.M113.474304 査読あり
5. Narumi, R., Murakami, T., Kuga, T., Adachi, J., Shiromizu, T., Muraoka, S., Kume, H., Kodera, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K., Miyamoto, Y., Ishitobi, M., Inaji, H., Kato, K., Tomonaga, T.: A strategy for large-scale phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples. *J Proteome Res* 11(11), 5311-5322 (2012). doi:10.1021/pr3005474 査読あり
6. Nakagawa, T., Moriwaki, K., Terao, N., Miyamoto, Y., Kamada, Y., Miyoshi, E.: Analysis of polarized secretion of fucosylated alpha-fetoprotein in HepG2 cells. *J Proteome Res* 11(5), 2798-2806 (2012). doi:10.1021/pr201154k 査読あり
7. Muraoka, S., Kume, H., Watanabe, S., Adachi, J., Kuwano, M., Sato, M., Kawasaki, N., Kodera, Y., Ishitobi, M., Inaji, H., Miyamoto, Y., Kato, K., Tomonaga, T.: Strategy for SRM-based Verification of Biomarker Candidates Discovered by iTRAQ Method in Limited Breast Cancer Tissue Samples. *J Proteome Res* 11(8), 4201-4210

(2012). doi:10.1021/pr300322q 査読あり
8. Hatano, K., Miyamoto, Y., Mori, M.,
Nimura, K., Nakai, Y., Nonomura, N.,
Kaneda, Y.: Androgen-regulated
transcriptional control of
sialyltransferases in prostate cancer
cells. PLoS One 7(2), e31234 (2012).
doi:10.1371/journal.pone.0031234
PONE-D-11-15419 [pii] 査読あり
9. Korekane, H., Korekane, A., Yamaguchi,
Y., Kato, M., Miyamoto, Y., Matsumoto, A.,
Hasegawa, T., Suzuki, K., Taniguchi, N.,
Ookawara, T.: N-Glycosylation profiling
of recombinant mouse extracellular
superoxide dismutase produced in Chinese
hamster ovary cells. Glycoconj J 28(3-4),
183-196(2011).
doi:10.1007/s10719-011-9333-6 査読あり
10. Hatano, K., Miyamoto, Y., Nonomura, N.,
Kaneda, Y.: Expression of gangliosides,
GD1a and sialyl paragloboside, is
regulated by NF-kappaB-dependent
transcriptional control of
alpha2,3-sialyltransferase I, II and VI in
human castration-resistant prostate
cancer cells. Int J Cancer 129(8),
1838-1847 (2011). doi:10.1002/ijc.25860
査読あり

〔学会発表〕(計2件)

1. 藪政彦・是金宏昭・佐藤ちひろ・北島健・
宮本泰豪 ヒト癌組織でのシアル酸付加され
た複合型のN型遊離糖鎖の蓄積福岡市(第8
5回日本生化学大会)2012年12月16日
2. 宮本泰豪 病態解明にむけたグライコミ
クス解析 大阪市(第32回日本糖質学会)
2013年8月6日

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮本 泰豪 (Miyamoto Yasuhide)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪
府立成人病センター(研究所)・その他の
部局・研究員
研究者番号: 90322742

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし