

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590698

研究課題名(和文) 癌性膵液特異的抗体の認識抗原の機能解析と高感度検出法の確立

研究課題名(英文) Research of established monoclonal antibodies against tumor related molecules in a pancreatic juice

研究代表者

中島 学 (NAKASHIMA, manabu)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：50198074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵腺房細胞癌や膵癌膵液に反応性が強く膵癌診断に有用性が期待される単クローン抗体の認識抗原の同定を行った。2P-1-17-1, 6P-3-2-4は糖鎖抗原認識の可能性が示唆され、合成糖鎖抗原に対する反応性試験にて、それぞれシアリル化ルイスa抗原、Tn抗原を認識していた。2P-1-2-1認識抗原は、抗原陽性細胞株培養液、抗体とprotein G 磁気ビーズを用いた免疫沈降法にて精製し、LC-MS/MS解析でスコア828にてa bile salt-dependent lipase oncofetal isoformが検出された。

研究成果の概要(英文)：We have established mouse monoclonal antibodies (2P-1-2-1, 2P-1-17-1, 6P-3-2-4) against malignant tumor related molecules in a pancreatic juice. The molecules recognized by these monoclonal antibodies were studied. Because 2P-1-17-1 and 6P-3-2-4 have shown immune-reactivity against glycol-antigen resulted by western-blotting analysis, synthetic glycol-peptides were used as antigens for ELISA and Westernblotting assay. As a consequence of these assay, 2P-1-17-1 and 6P-3-2-4 reacted with sialyl lewis a and Tn antigen, respectively. 2P-1-2-1 recognized the molecule which was 100-130 kDa in molecular size with a fine band on westernblotting. The molecule was purified by immune-precipitation method using protein G coated magnetic beads and isolated by SDS-PAGE gel electrophoresis. Isolated molecule in SDS-PAGE gel was analysed by LC-MS/MS, resulting that molecule was a bile salt-dependent lipase oncofetal isoform, which was specifically produced in pancreas acinal cell, with score 828.

研究分野：がん免疫

キーワード：免疫学 癌マーカー 単クローナル抗体 膵癌 膵液 Tn 抗原 シアリル化ルイス a 抗原

1. 研究開始当初の背景

膵癌はその解剖学的位置などの要因により、癌の病期進行が早く、その5年生存率は4%、切除可能症例においても35%と非常に低い(ref.1,2)。このため早期診断・早期治療および治療効果判定法の確立が急務である。事実、膵癌に対する血清中のがんマーカーとしてCA19-9やCEA測定の有用性が指摘されているが、未だに膵癌特異的癌マーカーは同定されておらず、近年のプロテオミクスによる膵癌の指標となる血清蛋白の同定においても的確な候補分子が同定されていないのが現状である(ref.3)。われわれは、H21~22年度挑戦的萌芽研究(2165151)で慢性膵炎膵液と癌性膵液を用いた subtractive immunization 法にて、多くのマウス単クローン抗体を作製し、膵癌特異的癌関連分子認識抗体の確立を目的とした研究を開始した。久留米大学・病理学教室(矢野、安元ら)の協力により、病理組織染色法にて膵腺房細胞癌の診断や膵癌膵液に反応性が強く膵癌診断に有用性が期待される膵癌膵液特異的単クローン抗体(2P-1-2-1,2P-1-17-1,6P-3-2-4など)を樹立した(発表論文)。

2. 研究の目的

研究の背景で紹介した樹立単クローン抗体の臨床応用の1つに、臨床試料(血液、尿、ERCP試料など)中の癌抗原の高感度検出系の確立がある。この検出系の1つとしてサンドイッチ法によるELISA検出系がある。この系の確立のためには、認識分子上の他のエピトープに対する新規抗体の樹立が必須である。この目的のために認識抗原の同定と新規抗体の作製が必須である。まず、認識抗原の同定

方法としては、

候補抗体の抗原陽性細胞株由来 cDNA ライブラリーの作製による expression cloning 法。

抗原の免疫沈降法による精製と LC-MS/MS 解析による認識分子の同定と解析。を試みた。

3. 研究の方法

(1) 抗原陽性細胞の total RNA より oligo dT を用いて mRNA を精製した。次に、逆転写酵素を用いて mRNA から cDNA を作製し、哺乳類発現用ベクターに挿入して cDNA ライブラリーを構築する。抗原陰性のヒト細胞株に cDNA ライブラリーを電気穿孔法にて導入後、各抗体にて細胞表面を染色する。蛍光色素標識抗マウス抗体を2次抗体として反応させ、FACSにて抗原陽性細胞(蛍光陽性)を回収する。回収した抗原陽性細胞中のベクターを回収し、大腸菌に感染させて増殖させる。この操作を繰り返すことで、抗原陽性細胞頻度の上昇を目安として、目的の cDNA を含むベクターを濃縮し、最終的に単離する。単離された cDNA より抗原をコードする全長 cDNA を同定し、遺伝子配列より抗原分子の構造と機能を特定する。

(2) ウエスタンブロッティングによる各抗体の認識抗原の性状(分子量など)や抗体の反応性やエピトープを類推する。とくに、癌抗原として糖鎖が抗原エピトープとなる場合があるため、合成糖鎖を標的とした検討を行う。

(3) 抗原の免疫沈降法(protein G magnetic beads)による精製と LC/MS/MS での解析に

よる抗原分子の同定と確認。

(3)- 各抗体の精製。

各抗体の産生ハイブリドーマ細胞株の培養液より抗体を精製する際、protein G を用いた場合、酸性溶媒による溶出による抗体の抗原結合活性への影響と protein G 結合性分子の混入を避けるため、ゲル濾過法とイオン交換カラムによる精製を行う。

(3)- 抗原の免疫沈降と LC-MS/MS 解析。

抗原陽性細胞株培養液より抗原分子以外の分子を排除し、抗原分子の濃縮を行った。培養上清をビバフロー-50 (50kDa 限外濾過) を用いて 25 ~ 40 倍まで濃縮後、FPLC (HiLood Superdex S-200 16/600) にて分画し、各画分を ELISA 法にて抗原含有画分を回収した。回収した抗原画分を集めて濃縮し、さらに FPLC にて同様に分画・濃縮した。

この抗原画分濃縮液と精製抗体と反応させた protein G magnetic beads を混和することで抗原を免疫複合体として回収した。

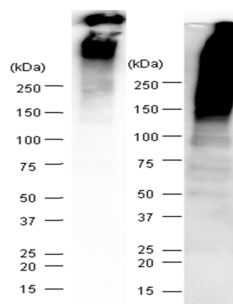
回収した抗原・抗体複合体を還元状態にて、SDS-PAGE で展開させた。展開後、目的の抗原バンドを切り出して LC/MS/MS での解析による解析試料とした。

4. 研究成果

(1) 2P-1-17-1 および 6P-3-2-4 抗体認識抗原解析

ウエスタンブロッティングによる 2P-1-17-1 および 6P-3-2-4 抗体認識抗原の解析にて、双方の抗体とも認識分子の分子量が広く分布し、スメア状に検出されることより、糖鎖認識が強く示唆された (図-1)。

図-1



そこで、膵癌関連の糖鎖が関連する癌マーカーとして Tn 抗原、ルイス抗原およびそのシアル化抗原に注目した (ref 4~6)。これらの合成抗原を用いたウエスタンブロッティングによる検討の結果、2P-1-17-1 抗体は Sialyl lews a に対する反応性を、6P-3-2-4 抗体は Tn 抗原を認識していることが確認された。

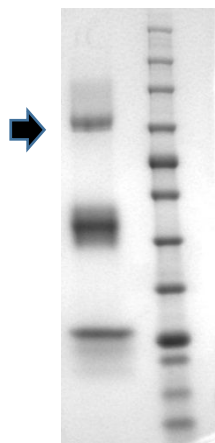
6P-3-2-4 抗体に関しては、第 70 回日本癌学会学術総会 (A novel monoclonal antibody against Tn antigen and comparison of reactivity with 22-1-1) および日本薬学会第 132 年会 (Tn 抗原に対する新規モノクローナル抗体 6P-3-2-4 と 22-1-1 との反応性の比較) にて報告した。今後、これらの糖鎖の core protein の同定が重要である。

(2) 2P-1-2-1 抗体認識抗原解析

病理組織学的検討にて膵腺房細胞特異的に発現しており、膵癌のうち膵腺房細胞癌の診断に有用な抗体である事が示された (発表論文)。またウエスタンブロッティングにて比較的明瞭なバンドとして検出され、抗原エピトープとして蛋白分子である可能性が示唆されたため、expression cloning および免疫沈降法による SDS-PAGE 分離精製後の LC-MS/MS 解析を行った (図-2 矢印)。LC-MS/MS 解析による解析結果として、スコ

ア 828 という高確率で bile salt-dependent lipase oncofetal isoform が検出された。

図-2



本分子は既に遺伝子等の報告があるが (ref. 7 ~ 9) 本 2P-1-2-1 抗体は病理組織において、その反応特異性が確認されており (発表論文) 病理診断への応用が可能である有用な抗体と思われる。さらに、cDNA の単離とエピトープの探索および新規抗体を作製することで高感度の検出システムの確立とより癌特異的の反応性抗体の作製が可能となる。

引用文献

SEER Cancer Statistics Review, 1975–2000. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2003、

Collective Review of Small Carcinomas of the Pancreas. R. TSUCHIYA et al, *Ann. Surg.* 1986; **203**: 77-81,

Progress on molecular markers of pancreatic cancer. Grote T and Logsdon CD. *Curr Opin Gastroenterol.* **23** 508-514. 2007

Regulation of Sialyl Lewis Antigen Expression in Colon Cancer Cells by Sialidase NEU4. Kazuhiro Shiozaki et al. *J. BIOLOGICAL CHEMISTRY.* 286-(24),

pp. 21052–21061, 2011

Sialyl Lewis a: a tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells Review, Maciej Ugorski and Anna Laskowska. *Acta Biochemica Polonica.* 49(2) 303–311. 2002

Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. Cazet et al. *Breast Cancer Research.* 12:204- 216. 2010,

Molecular cloning of the oncofetal isoform of the human pancreatic bile salt-dependent lipase.

J Biol Chem. 273(43), 28208-18., 1998

Human fetoacinar pancreatic protein: an oncofetal glycoform of the normally secreted pancreatic bile-salt-dependent lipase. *Biochem J.* 15:289(Pt 2), 609615. 1993

Immunodetection and molecular cloning of a bile-salt-dependent lipase isoform in HepG2 cells. *Biochem. J.* 342, pp 179-187, 1999.

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計 2 件)

The utility of a novel antibody in the pathological diagnosis of pancreatic acinar cell carcinoma. M Yasumoto. et al. *J Clin Pathol.* 65. 327-332. 2012 査読：有

Novel monoclonal antibodies against pancreatic juice from pancreatic cancer patients and their possible application in differential diagnosis. M. Hamabashiri. et al. *Int J Mol Med.* 28. 599-603. 2011 査読：有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 学 (NAKASHIMA, Manabu)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：50198074

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

矢野 博久 (YANO, Hirohisa)

久留米大学・医学部・教授

大島 孝一 (OHSHIMA, Kouichi)

久留米大学・医学部・教授

安元 真希子 (YASUMOTO, Makiko)

久留米大学・医学部・大学院

西中川拓也 (NISHINAKAGAWA, Takuya)

福岡大学・薬学部・助教

濱走 優人 (HAMABASHIRI, Masato)

福岡大学・大学院 (博士)

大長 亜矢 (DAICHO, Aya)

福岡大学・大学院 (修士)