

博士(医学) 柴田俊章

## 論文題目

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

(卵巣癌を免疫抗原として作製されたヒト型モノクローナル抗体 HMOCC-1 により特異的に認識されるモノまたはジ硫酸化 *N*-アセチルラクトサミンオリゴ糖構造の同定)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

我々は以前、ヒト卵巣明細胞癌細胞株の RMG-1 細胞を抗原として HMOCC-1 と呼ばれるヒト型モノクローナル抗体を作製した。以前の研究は、HMOCC-1 は卵巣組織において癌細胞を特異的に認識する性質を持ち、その抗原は N 結合型糖鎖を主とする糖蛋白質の糖鎖であることを示している。今回我々は、HMOCC-1 の抗原決定基構造を糖転移酵素に関連した遺伝子技術を利用することにより同定した。

[材料ならびに方法]

HMOCC-1 抗原を発現していない HEK293T 細胞に、各種の糖転移酵素と硫酸転移酵素遺伝子を遺伝子導入し HMOCC-1 抗原を強制発現させることにより、HMOCC-1 抗原の生合成に必要な糖及び硫酸転移酵素を免疫細胞染色により同定した。使用された酵素遺伝子は、FUT1、FUT2、B3GALT5、GCNT1、GCNT3、B3GNT4、B3GNT6、B3GNT7、GAL3ST3、CHST1、CHST2、CHST4、CHST5、CHST6 の計 14 種類であった。次に、同定された糖転移酵素より推定される糖鎖構造を有機化学的に合成し、その構造が HMOCC-1 に対し抗原性を持つか、抗原抗体反応の阻害試験により確かめた。さらに、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用い、同定された酵素遺伝子が実際に RMG-1 細胞で発現している事を確認した。また、目的の糖鎖構造が実際の卵巣癌組織に含まれているかを確認するため、ヒト卵巣癌組織検体より硫酸化糖鎖画分を精製し、質量分析法を用いてそれを調べた。

[結果]

- 1) 各種糖及び硫酸転移酵素遺伝子を用いて HMOCC-1 抗原の生合成を比較することにより、その生合成に必要な二つの転移酵素 (GAL3ST3 と B3GNT7) を同定した。さらに CHST1 が HMOCC-1 抗原生合成の調節的役割をしている可能性が示唆された。
- 2) HMOCC-1 抗原には、シアル酸が含まれないことを示した。
- 3) 上記の結果より、HMOCC-1 抗原決定基を  $\text{SO}_3 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 (\pm \text{SO}_3 \rightarrow 6)\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow$  と推定した。
- 4) 推定された HMOCC-1 抗原構造をもつオリゴ糖を化学合成し、抗原抗体反応をそのオリゴ糖で阻害することにより、推定された構造が HMOCC-1 の抗原決定基であると確かめられた。

- 5) HMOCC-1 抗原を発現している RMG-1 細胞を用いた RT-PCR を行うことにより、RMG-1 細胞において同定した糖及び硫酸転移酵素遺伝子が発現している事を確認した。
- 6) 実際の卵巣癌組織中に、同定された糖鎖構造が含まれているか質量分析法にて検討した結果、硫酸基を持つラクトサミン構造は同定することはできたが、本研究により同定された糖鎖構造を見出すことはできなかった。

#### [考察]

我々は、ヒト型モノクローナル抗体である HMOCC-1 によって特異的に認識される構造は、 $\text{SO}_3 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3(\pm \text{SO}_3 \rightarrow 6)\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow$  であることを明らかにした。その方法として、各種の糖及び硫酸転移酵素遺伝子を用いる遺伝工学的方法を利用して、抗原決定基となる構造の同定を行った。報告されている従来の方法は、既知の糖鎖もしくは糖脂質をプレートに並べ、それらを抗体と反応させることにより網羅的に調べる方法、もしくは、抗体と抗原抗体反応によって結合した糖鎖抗原を試料より抽出し、質量分析法にてその構造を同定していく方法が挙げられる。前者は未知の構造を同定できない、糖蛋白質が抗原の場合は上手く利用できない問題点がある。また、後者は目的に合った高純度の試料抽出が難しいという問題点がある。実際我々も、卵巣癌試料から本糖鎖構造を質量分析法により同定することはできなかった。それらに比して本方法では、糖及び硫酸転移酵素遺伝子導入により、抗原糖鎖は細胞自体で生合成されるので糖蛋白質にも適用でき、何より大掛かりな分析機器を必要とせず、どの研究室でも適用できる有益性を持っている。我々は本研究で示した遺伝子技術を利用した方法は、将来広く適用できるであろうと考えている。

今回の糖及び硫酸転移酵素遺伝子導入実験より、B3GNT7 と GAL3ST3 の両転移酵素が HMOCC-1 抗原の生合成に欠かせないものであることが示された。さらに、この二つの転移酵素に CHST1 を加え、連続的に遺伝子導入することによりそれらの関係性を調べた結果、GAL3ST3 と CHST1 は同時に遺伝子導入すると競合するが、時期をずらして遺伝子導入すると相乗効果が得られることが分かった。このことより、生体内において HMOCC-1 抗原の発現レベルは、CHST1 による末端ガラクトース 6 位の硫酸化と GAL3ST3 による末端ガラクトース 3 位の硫酸化のバランスにより調節されていることが示唆された。

HMOCC-1 抗原として我々が同定した構造は、硫酸化糖鎖であった。硫酸化糖鎖についてはこれまで、発生や分化・恒常性の維持など、多くの生体機能に関わっていると報告されている。従って硫酸化グリカンの特異的に認識する本抗糖鎖モノクローナル抗体が、今後こうした生体機能を研究していく上で有用な手段になりうることが期待される。

#### [結論]

ヒト型モノクローナル抗体である HMOCC-1 の抗原決定基を、糖及び硫酸転移酵素に関連した遺伝子技術を利用することにより同定し、その構造がモノまたはジ硫酸化 *N*-アセチルラクトサミンオリゴ糖構造であることを明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

ヒト型抗体はそれに対する抗体が生成されないため、良い抗体医薬と期待される。申請者らの研究グループでは既に、ヒト卵巣明細胞癌細胞株の RMG-1 細胞を抗原として HMOCC-1 と名付けたヒト型モノクローナル抗体を有していたが、それが卵巣癌細胞を認識し、抗原が N 結合型糖鎖を主とする糖蛋白質の糖鎖であることまでしか明らかにしていなかった。そこで、申請者は HMOCC-1 の抗原決定基構造を明らかにするために本研究を行った。

HMOCC-1 抗原を発現しない HEK293T 細胞に、各種の糖転移酵素と硫酸転移酵素遺伝子を遺伝子導入し HMOCC-1 抗原を生成するのに必要な転移酵素を調べたところ、三つの転移酵素 (B3GNT7, GAL3ST3, CHST1) の関与が推測された。これらの酵素遺伝子を siRNA でノックダウンすると、目的抗原の生成が低下していたので、これらの酵素の関与が必要であると考えた。そこで、これらの酵素によって合成されるべき糖鎖構造を  $\text{SO}_3 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3(\pm\text{SO}_3 \rightarrow 6)\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1$  と推定した。硫酸転移酵素が2種含まれているが、硫酸基の結合場所が異なり、酵素添加の順番によって抗原生成量が違ったため、また、HMOCC-1 抗体との結合親和性から、最終的には2個の硫酸基が結合した抗原と考えた。さらに、卵巣癌組織中に、同定された糖鎖構造が含まれているかについて質量分析法にて検討した結果、硫酸基を持つラクトサミン構造を同定した。

審査員は、糖及び硫酸転移酵素の遺伝子導入により、HMOCC-1 の抗原決定基を同定するに至ったこと、同定した糖鎖抗原がユニークな硫酸基を有するラクトサミン構造であり研究の進展が興味深いことを高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 前川 真人  
副査 瀬藤 光利 副査 丹伊田 浩行