

主論文の要約

Immunization of A4galt-deficient mice with glycosphingolipids from renal cell cancers resulted in the generation of anti-sulfoglycolipid monoclonal antibodies

腎細胞癌抽出スフィンゴ糖脂質の $\alpha 1, 4$ -ガラクトース転移酵素遺伝子
ノックアウトマウスに対する免疫により抗硫酸化糖脂質
モノクローナル抗体が産生された

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
生物化学講座 分子細胞化学分野
(指導：岡島 徹也 教授)
安藤 玲子

【緒言】

モノクローナル抗体作製技術の発展は著しく、分子標的治療など医学分野において広く利用されている。我々は、これまでにクローニングした糖脂質糖鎖合成酵素遺伝子について相同性組換えによる遺伝子ノックアウトを行い、糖鎖欠損マウスを樹立・解析してきた。癌細胞から抽出した糖脂質を用いて、糖脂質糖鎖欠損マウスを免疫することで、癌関連糖鎖と反応するモノクローナル抗体を効果的に作製できると考えた。

本研究では、腎細胞癌細胞株から抽出したスフィンゴ糖脂質を用いて α 1,4-ガラクトース転移酵素遺伝子ノックアウトマウスを免疫して、正常腎細胞や正常腎組織に反応せず、腎細胞癌特異的に反応するモノクローナル抗体の作製を試みた。

【対象および方法】

グロボ系糖脂質が豊富に発現している腎細胞癌細胞株（SK-RC-29, SK-RC-99, TUHR14TKB）より糖脂質を抽出して TLC を行い、スフィンゴ糖脂質の発現を解析した。その後、抽出した糖脂質をリポソームに包埋して免疫原を調製し、当研究室で確立した α 1,4-ガラクトース転移酵素遺伝子ノックアウトマウス 2 匹に対して免疫した。腎細胞癌細胞株をターゲットにした間接蛍光抗体法（IF）で免疫マウス血清の抗体活性上昇を確認した後、脾細胞と NS-1 によるハイブリドーマを作製し、サブクローニングを経てモノクローナル抗体を樹立した。樹立したハイブリドーマの培養上清を用いて IF や TLC-immunostaining (TLC-IS)、質量分析を行い、モノクローナル抗体の腎細胞癌細胞株に対する反応パターン解析及びモノクローナル抗体の認識抗原の同定を行った。また、腎癌組織や正常腎組織を用いた免疫組織染色により、腫瘍特異的反応の検討を行った。

【結果】

腎細胞癌細胞株より抽出したスフィンゴ糖脂質の TLC の結果は、腎細胞癌細胞株における糖脂質の酸性分画の中で、GM3 の上方に硫酸化糖脂質と思われるバンドが検出された。ヒト近位尿細管上皮細胞における糖脂質の酸性分画では、比較的強いガングリオシドのバンドとともに SM4 のバンドが検出された。中性分画では、腎細胞癌細胞株とヒト近位尿細管上皮細胞ともにグロボ系糖脂質と思われるバンドが検出された。

得られたハイブリドーマは 82 クローンで、その免疫グロブリンクラスを決定したところ、大多数は IgM class (66/82) で、他は IgG1 (2/82)、IgG2a (9/82)、IgA (5/82) であった。腎細胞癌細胞株とヒト近位尿細管上皮細胞をターゲットにした IF の結果、腎細胞癌細胞株に特異的に反応を示す 22 クローンを選択した。TLC-IS の結果から、酸性分画において GM3 の上方にバンドが検出された 19 クローンに絞った後、最終的に安定度の高い 11 クローンに関してさらに分析を行った。TLC、TLC-IS、質量分析の結果、GM3 上方のバンドの構成成分が硫酸化糖脂質であり、多くの抗体が SM2 に特異的に、一部の抗体が SM3、SM4 にも広く反応することが判明した。抗硫酸化糖脂質

モノクローナル抗体の反応性を正常腎組織と腎細胞癌組織を用いた免疫組織染色で検討した結果、抗硫酸化糖脂質モノクローナル抗体が腎細胞癌組織と特異的に反応することが示された。

【考察】

グロボ系糖脂質を欠損している α 1,4-ガラクトース転移酵素遺伝子ノックアウトマウスにグロボ系糖脂質が多く発現している腎細胞癌細胞株から抽出した糖脂質で免疫することにより、Gb4/Gb3より複雑なグロボ系糖脂質と反応するモノクローナル抗体が得られることを期待したものの、得られた抗グロボ系糖脂質モノクローナル抗体はGb4/Gb3を認識し、腎細胞癌細胞株にもヒト近位尿細管上皮細胞にも反応を示すものであった。

モノクローナル抗体の免疫グロブリンクラスを検討した結果、ほとんどがIgMかIgAクラスであり、IgGクラスではなかった。しかし、IgAモノクローナル抗体は、IFにおいてliving cellではなく、特にfixed cellに陽性反応を示していた。この点は抗体結合依存性の抗原修飾を考える上で、非常に興味深い。

腫瘍特異的で、正常腎組織とヒト近位尿細管上皮細胞に反応しないモノクローナル抗体は硫酸化糖脂質を認識し、中でもSM2に強く反応した。スルファチドや硫酸化糖脂質は、肺腺癌、胃癌、大腸癌、子宮内膜癌、腎癌において多く発現し、分化能や転移に関連すると報告されている。正常腎からの抽出物に硫酸化糖脂質が存在する報告もあるが、我々が行った腎細胞癌組織への免疫染色の結果では、作製した抗硫酸化糖脂質モノクローナル抗体は、反応の強弱はみられるものの癌特異的に反応することが示された。我々が確認したヒト近位尿細管上皮細胞内のSM4レベルは非常に低く癌細胞に著明なSM2は検出されなかった。これが、本研究で作製したモノクローナル抗体がヒト近位尿細管上皮細胞のような正常腎細胞や正常腎組織に結合しない主な理由と思われる。このことから、硫酸化糖脂質は癌関連糖鎖抗原と考えられ、分子標的治療のターゲット候補の一つとなり得ると考えられた。

【結語】

腎細胞癌抽出糖脂質を用いて α 1,4-ガラクトース転移酵素遺伝子ノックアウトマウスを免疫した結果、抗硫酸化糖脂質モノクローナル抗体が得られた。腎細胞癌における硫酸化糖脂質の悪性形質における役割について更に検討することにより、腎細胞癌治療における新たな分子標的治療の樹立に繋がる重要な情報基盤となると考えられる。