

◎原 著

## 糖タンパク質糖鎖に対するモノクローナル抗体作製のための基礎的研究

大山 邦夫<sup>1)</sup>, 渡来 仁, 保田 立二

岡山大学医学部附属環境病態研究施設基礎環境病態学分野

<sup>1)</sup>現旭化成工業株式会社医療科学研究所

**要旨:** 糖タンパク質糖鎖に対するモノクローナル抗体を効率よくとるための免疫方法の検討をおこなった。抗原としては糖鎖のがん性変化のひとつであるbisecting N-acetylglucosamine構造をもつオボムコイド (OVM) をとりあげた。OVM全分子を通常のフロインド完全アジュバントでくりかえし感作する方法では糖鎖を認識するモノクローナル抗体をとることはできなかった。またOVMをリボソーム二重膜に挿入する方法でも同様であった。これに対してOVMからプロナーゼ消化により糖ペプチドを調製し、アジュバント活性をもつリピドAを共存させたリボソームに共有結合した抗原を感作したマウスからは高率に糖鎖と反応するモノクローナル抗体をとることができた。しかしながらこれらの抗体はいずれもサブタイプはIgMであった。

**索引用語:** モノクローナル抗体, 糖タンパク質, オボムコイド, 酵素免疫測定法, リボソーム  
**Key words:** Monoclonal antibody, glycoprotein, ovmucoide, enzyme immunoassay, liposome, lipid A

### はじめに

がん化にともなう糖タンパク質, 糖脂質の構造の変化がいろいろと明らかにされてきている。とくにがん化細胞に対するモノクローナル抗体の認識するエピトープが細胞表面の糖鎖構造であるものが多数みつき、これが実用的な診断試薬となる可能性がでてきた。しかしながら従来のモノクローナル抗体はがん化細胞を免疫して、その細胞またはがん化組織に特異的に反応することを指標に作製されてきた。これに対して糖タンパク質糖鎖の構造解析を進めてきた木幡らはヒト絨毛性ゴナドトロピンや $\alpha$ -グルタミルトランスペプチダーゼの研究から糖鎖構造にがん性の特徴的な変化があることをあきらかにしている<sup>1~3)</sup>。

これらのがん性変化に特徴的な糖鎖構造を認識するモノクローナル抗体はすぐれたがんマーカー

となる可能性は非常に高い。しかしながら特定の糖鎖構造に対するモノクローナル抗体を作製することは現状では困難である。また糖鎖構造は抗原として認識されにくい。そのためこのようなモノクローナル抗体を作製するには糖タンパク質糖鎖に対する抗体産生を高める免疫方法を選択することが重要なポイントとなる。この点にかんする基礎的な研究はまだほとんどなされていない。

ここでは $\alpha$ -グルタミルトランスペプチダーゼの特徴的ながん性変化の一つであるbisecting N-acetylglucosamine (GlcNAc) に対するモノクローナル抗体をつくるために、bisecting GlcNAcをふくむ糖鎖構造をもつオボムコイド (OVM) をモデル抗原として使用し、免疫方法とできてくるモノクローナル抗体の認識抗原の関係を検討した。

### 材料と方法

オボムコイドの糖ペプチド (OVM-GP) の調製  
OVM300 mgを 3 ml の 0.1 M Tris-塩酸緩衝液 pH8.0に溶かし, Sephadex G-50のカラムクロマトグラフィーにかけ, void volumeに溶出される糖タンパク質分画を集め濃縮した。これをプロナーゼ (科研化学) (2 mg/mlに 0.1 M Tris-塩酸緩衝液 pH8.0で溶かしたもの) で 37°C 20時間の消化をおこなった。これを再度 Sephadex G-50でゲルろ過した。このときは 0.1Mの酢酸で溶出した。Void volumeに溶出される糖タンパク質分画を集め, 凍結乾燥した。得られた 28.2mgの糖ペプチド分画を分析すると, ゲルろ過での分子量 8,000となり, ヘキソース量が 35%アミノ酸 24残基が検出された。

過ヨウ素酸処理 OVM-GP (D-OVM-GP) の調製

糖タンパク質糖鎖を修飾する方法として過ヨウ素酸処理を以下のようにおこなった。OVM-GP 5 mgを 0.9mlの水に溶かし, これに 0.18Mの過ヨウ素酸を 0.1ml加えて室温 2時間反応させた。1 N NaOH 5  $\mu$ lと 45 mg/mlの NaBH<sub>4</sub> 100  $\mu$ lを加え 30°Cで 2時間反応させた。1 N 酢酸 50  $\mu$ lを加えて Sephadex G-25のゲルろ過のあとで窒素ガスで乾燥して 4 mgの D-OVM-GPをえた。

OVM-GP結合リボソームの調製

リボソームは dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) 0.5  $\mu$  mol, コレステロール 0.5  $\mu$  mol, dithiopyridylphosphatidylethanolamine 0.02  $\mu$  mol, サルモネラ菌リポド A 0.026  $\mu$  molで作製し, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 0.5mlの懸濁液とした。OVM-GP 2 mgを二官能性試薬 SPDP 1.8  $\mu$  molで処理した。Sephadex G-25で未反応のものを除いて, dithithreitol 5mgで室温 30分間還元し, 再び Sephadex G-25でゲルろ過して活性化した OVM-GPを作製した。これをリボソームとゆっくり攪拌しながら 10時間室温で反応させた。これを 20,000 x g 15分間の遠心沈澱をおこなって OVM-GP結合リボソームを集めた。これを PBS 0.5mlに懸濁して抗原とした。OVM-

GPはリボソームに 44  $\mu$  g 結合していた。

細胞融合

マウスミエローマ P3-U1 株は 10%ウシ胎児血清をふくむ RPMI1640 培地で継代した。細胞融合は 33%ポリエチレングリコール 1000 (Sigma社) により遠心沈澱法でおこなった。クローニングは BALB/cマウス腹腔浸出細胞をフィーダーレーヤーとして限界希釈法によりおこなった。

腹水の調製

プリスタン (和光薬品) 0.5mlを BALB/cマウスに 1週間前に投与し, 10<sup>7</sup>の抗体産生細胞を移入して採取した。

エンザイムイムノアッセイ (EIA)

抗体のスクリーニングと活性の測定には EIA法をもちいた。OVMの場合には 20  $\mu$  g/ml, OVM-GPの場合には 2  $\mu$  g/mlの濃度で PBSにとかしたものを 200  $\mu$  l ずつ住友ベークライト社製の EIA用マイクロタイタープレートにいれ, 5°Cで 16から 24時間インキュベートした。抗原液をすてて bovine serum albumin でブロッキングし, これを洗浄したものを抗原吸着固相化プレートとした。培養上清または腹水の希釈液 100  $\mu$  l を 37°Cで 2時間インキュベートしたのち, プレートを洗浄, それに  $\beta$ ガラクトシダーゼをラベルしたウサギ抗マウス免疫グロブリン血清をくわえさらに 37°Cで 2時間インキュベートした。これを洗浄後, 基質となる o-nitrophenyl- $\beta$ -galactopyranoside とともに 37°C 1時間インキュベートし, グリシン NaOH 緩衝液で反応を停止し吸光度を 415nm で測定した。

補体依存性リボソーム膜損傷反応 (liposome immune lysis assay: LILA)<sup>4, 5)</sup>

OVM-GPのリボソームを免疫のときと同じように作製する。免疫のときの PBSに代わって 0.2M carboxyfluorescein (CF) で懸濁した。これを 0.1% gelatin veronal buffered saline で遠心洗浄し, 最終的に 1mlとして CF 封入りリボソームを作製する。マイクロタイタープレートにこのリボソームの 100倍希釈液 5  $\mu$  l, 抗体希釈液 25  $\mu$  l, 補体としてモルモットの血清 25  $\mu$  l を加え 37°Cで 1時間インキュベートした。これに 10

mM EDTAをふくむ veronal buffered saline 100  $\mu$ lを加えて反応を停止させ、マイクロタイター蛍光光度計で蛍光強度を励起波長490nm, 蛍光波長530nmで測定した。Triton X-100でこわしたりリポソームのCF蛍光強度を100%として、相対的なmarker release%を求めた。

### 結果と考察

#### 1) OVM全体を免疫源としたモノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体は原理的には選択方法さえよければ、OVM全体を免疫したマウスの脾臓細胞からも糖鎖部分に反応するクローンがとれるはずである。まず最初の試みとして通常の免疫方法として最も一般的なフロイド完全アジュバントを用いる方法をおこなった。

免疫方法はOVM 50  $\mu$ gを0.1mlのPBSに溶解し、フロイド完全アジュバントとよく混和し、エマルジョンとし、BALB/cマウスの皮下に数カ所に分けて免疫した。初回免疫後、14日、28日、42日、56日、66日目に追加免疫し、69日目に細胞融合をおこなった。

オボムコイド全体を通常のフロイド完全アジュバントで免疫した7匹のマウス脾臓細胞の融合からえられたEIAで反応するモノクローナル抗体として20株がえられた。それらの抗体のサブクラスはIgMが17株、IgG<sub>1</sub>が2株、IgG<sub>3</sub>が1株であった。これらの腹水をOVMのEIAとOVM-GPのEIAで測定し、その結果をくらべるといづれの株もOVMでは明かな抗体価が認められるにもかかわらず、糖鎖の濃縮されたはずのOVM-GPでは大幅に抗体価が低下するか、またはまったく反応しなかった。代表的な例を図1に示す。

このことは、OVM全体を最も一般的な免疫方法であるフロイド完全アジュバントでの免疫では、抗原性の高いペプチド鎖に対する抗体ができやすいことを示すと考えられる。糖タンパク質糖鎖に対するモノクローナル抗体をとるためには(a)抗原性の強いとおもわれるペプチド部分のない抗原を作成するか、ブロックすること、

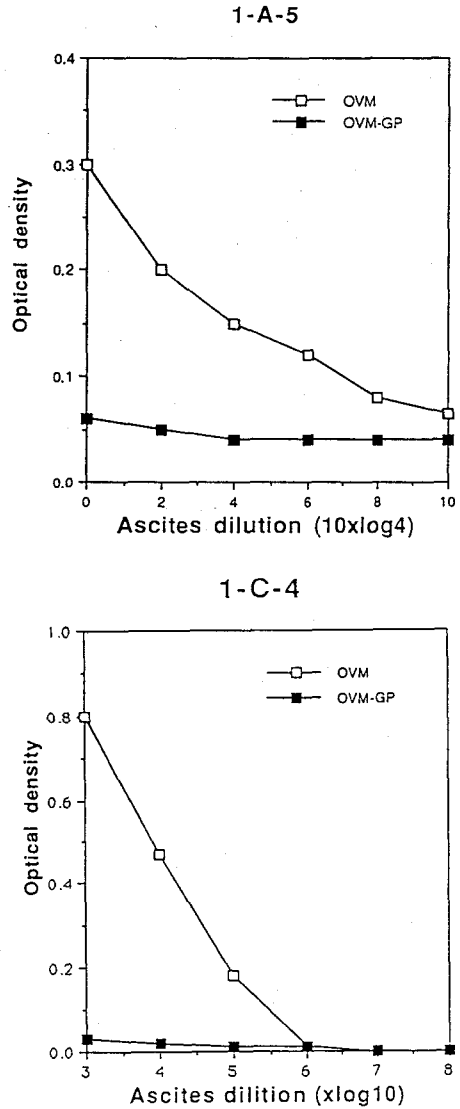


図1 OVM分子全体で免疫する方法でえられたモノクローナル抗体のEIA抗体価  
横軸は腹水を10倍したものを4倍階段希釈(1-A-5)、10倍階段希釈(1-C-5)した希釈倍数の対数。

(b) 糖鎖部分を抗原認識に関係する細胞とよく反応できるようなかたちで提示することを考えなくてはならないことを示している。

2) OVMをリポソームの脂質二重膜に挿入したものを免疫源として用いたモノクローナル抗体

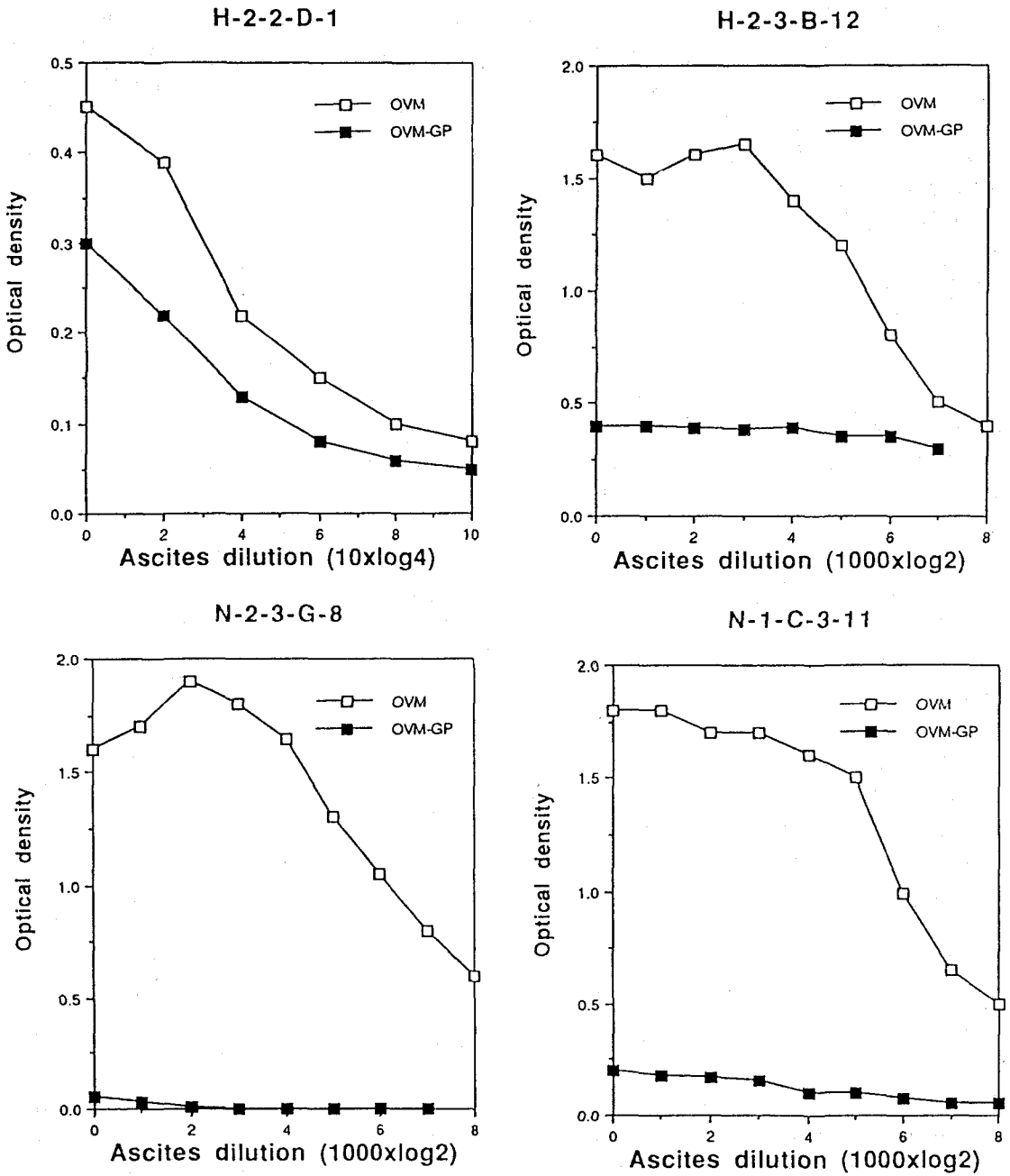


図2 OVMリポソームで免疫する方法でえられたモノクローナル抗体のEIA抗体価  
 横軸は腹水を10倍したものを4倍階段希釈 (H-2-2-D-1), 1,000倍したものを2倍階段希釈 (H-2-3-B-12, N-2-3-G-8, N-1-C-3-11)した希釈倍数の対数。

### の作製

赤血球の代表的な膜タンパク質であるグリコフォリンは細胞外部分、膜貫通部分、細胞内の部分にわけられ、糖鎖はすべて細胞外のペプチドに結合していることが判明している。またグリコフォリンはリポソームを作製する脂質と有機溶媒中で混合しておき、徐々に有機溶媒を留去する方法でうまく脂質二重膜中に挿入、再構成できることも報告されている。OVMでも糖鎖の部分は親水性が高いため、グリコフォリンとおなじようにリポソームに再構成することで糖鎖を表面に露出した抗原を作製できることが期待できる。またこの同じリポソーム膜にアジュバント活性のあるグラム陰性菌の細胞壁成分のリピドAを共存させることで10倍以上の抗体産生の上昇を観察している<sup>6,7)</sup>。これらの事実をもとにリポソームの脂質二重膜にOVMとリピドAを挿入した抗原でのモノクローナル抗体の作製を試みた。

OVM挿入リポソームの作製は次のようにしておこなった。OVM 10mg/mlの水溶液50 $\mu$ l, メタノール45 $\mu$ l, DPPC 5 mMのクロロホルム溶液50 $\mu$ l, コレステロール10mMのクロロホルム溶液25 $\mu$ l, サルモネラ菌リピドA1.3mMのクロロホルム溶液20 $\mu$ lを10mlのナン型フラスコにとり、エバポレータで溶媒を留去して、ガラス面に薄膜をつくる。これにPBSをいれボルテックスミキサーで攪拌してリポソームを作製した。

免疫はリポソーム0.25mlをBALB/cマウスの腹腔に注射した。初回免疫後、14日、28日、42日に追加免疫し、46日目に細胞融合をおこなった。融合、クローニング、腹水の作製はOVM免疫のときと同様におこなった。

OVMリポソームで免疫した4匹のマウスから9株のモノクローナル抗体をえた。これらのサブクラスはIgMが4株、IgG<sub>1</sub>が5株であった。OVMのEIAとOVM-GPでのEIAの結果の比較は、OVMをフロイド完全アジュバントで免疫した場合とまったく同様に、OVM-GPでのEIAではほとんどのクローンが大幅な抗体活性の低下するか、または消失した。代表的な例を図2に示す。

この免疫方法では意図したように糖鎖が免疫担当細胞にうまく認識されるという結果はえられなかった。OVMはグリコフォリンとはことなり本来膜タンパク質ではないことから糖鎖を適切に提示することができなかったと考えられる。

3) OVM-GPをリポソームの表面に共有結合させたものを免疫源として用いたモノクローナル抗体の作製。

これまでの実験からペプチド鎖がOVMの強い抗原性をもつことがあきらかになり、OVM全体を抗原とする限りなかなか糖鎖を認識するモノクローナル抗体がとれないことが判明した。そこでO-glycoside, N-glycoside型の両方の糖鎖をなるべく抗原性が変化しないように調製する方法としてOVMをプロテアーゼで消化して、ペプチド部分をできるかぎり切断し、糖鎖部分が主要成分である分画をとり、それを免疫源とすることを試みた。また得られた糖ペプチドをリポソーム表面に共有結合でつけ、免疫担当細胞に認識されやすいかたちで提示されるように考えた。

材料と方法の項のやりかたで作製したOVM-GP結合リポソーム0.25mlをBALB/cマウスの腹腔に注射した。初回免疫後、14日目、28日目に追加免疫し、32日目に細胞融合をおこなった。融合、クローニング、腹水の作製はOVM免疫のときと同様におこなった。

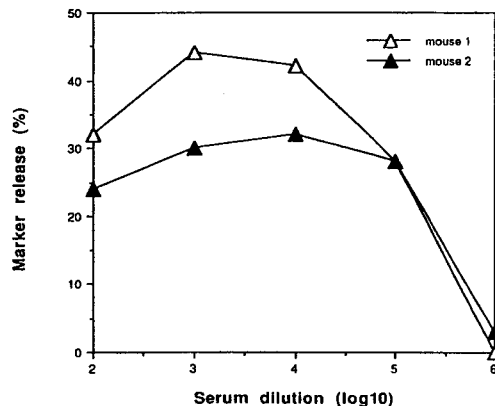


図3 OVM-GP結合リポソームで免疫する方法でえられた免疫血清のLILA抗体価

横軸は腹水を10倍階段希釈した希釈倍数の対数

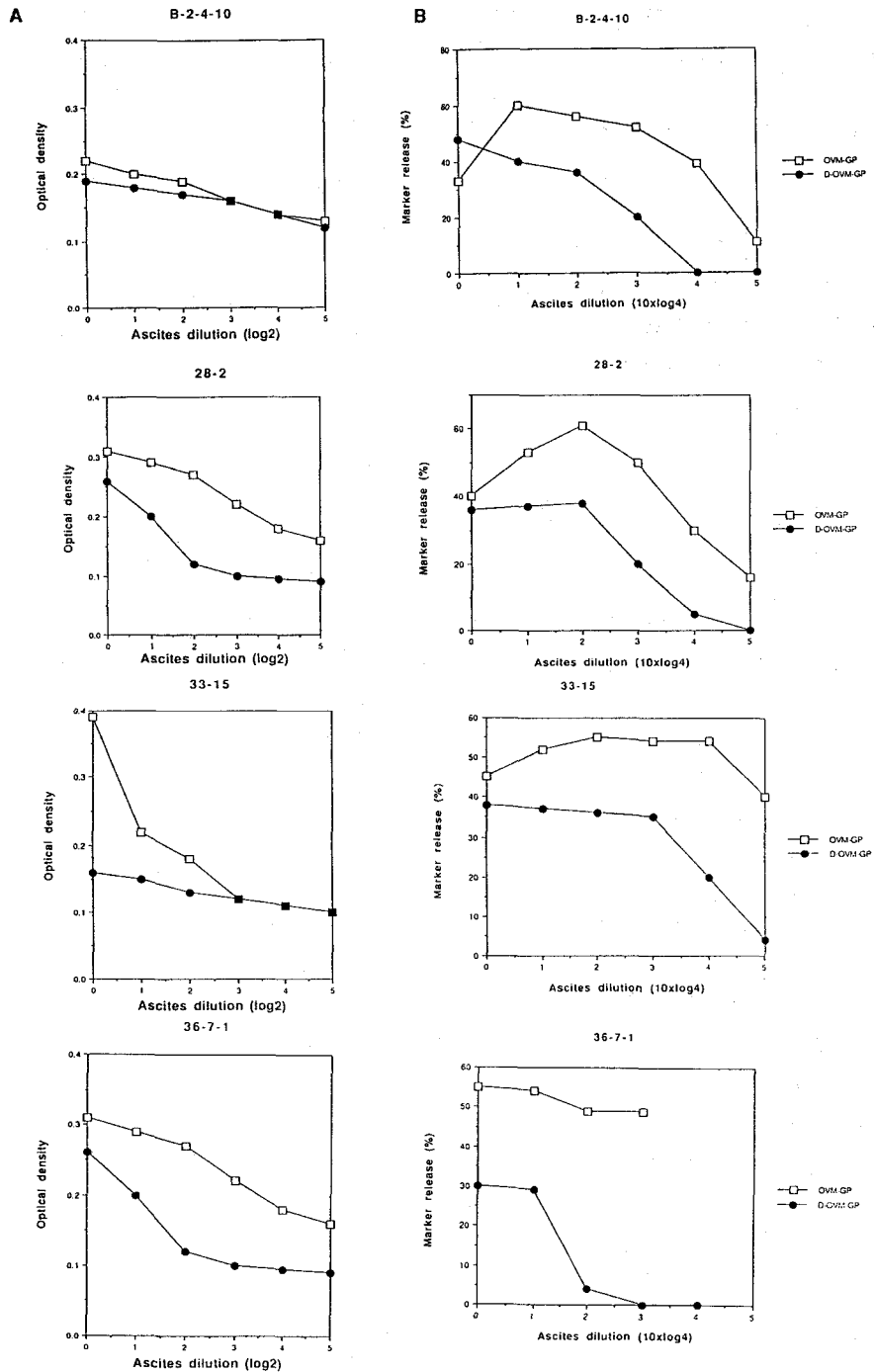


図4 OVM-GP結合リポソームで免疫する方法でえられたモノクローナル抗体のEIA抗体価とLILA抗体価

(A)はEIAの測定結果で、横軸は腹水を2倍階段希釈した希釈倍数の対数。

(B)はLILAの測定結果で、横軸は腹水を10倍したものをも4倍階段希釈した希釈倍数の対数。

この方法で免疫したマウスの血清の抗体価を、OVM-GPを結合したCF封入リポソームを用いるLILAで測定するとこれまでの免疫方法では得られなかった高い抗体活性がみられた。図3にみられるように $10^5$ 希釈まであきらかな活性が観察された。

このように高い抗体活性をもつマウスの脾臓細胞との融合で22株のモノクローナル抗を作製した。いずれもサブクラスはIgMであった。

これらの抗体中で特徴的なもののアッセイ結果を図4に示す。また28-2, 36-7-1, 33-15は過ヨウ素酸で修飾した糖鎖に対する反応が著しく低下または消失していた。このことはこれらの抗体の主要な認識抗原が糖タンパク質糖鎖であることを強く示唆している。

以上のような実験結果は、糖タンパク質糖鎖に対するモノクローナル抗体をとるためには免疫の方法が大きな影響をもつことをものがたっている。通常の抗原タンパク質をフロインド完全アジュバントで感作する方法にくらべ、糖ペプチドを調製しそれをリピドAの共存するリポソーム表面に共有結合して免疫する方法が効率のよいことが示された。またこの免疫方法は期間も短くてよいので実用的には大変有利であろう。しかしながらできてくるモノクローナル抗体のサブタイプはIgMが圧倒的におおくなっていた。この点はモノクローナル抗体の応用ではIgGタイプのものが使いよい事実には反する結果である。この点を解決する手段として、IgMからIgGへの突然変異株をとる手段を現在検討中である。

## 文 献

1. 木幡陽：癌細胞の糖蛋白質をめぐって—アスパラギン結合糖鎖に起こる変化を中心に—。代謝, 20: 773—782, 1983.
2. 木幡陽：糖鎖の癌性変化—腫瘍マーカーに焦点を合わせて—。代謝, 22: 789—798, 1985.
3. 木幡陽：糖タンパク質糖鎖の癌性変化とその臨床への応用。バイオサイエンスの進展に基づくがんの重点研究(別冊): 201—208, 1987.
4. Yasuda, T., Dancey, G. F. and Kinsky, S. C.: Immunogenicity of liposomal model membranes in mice: Dependence on phospholipid composition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 1234—1236, 1977.
5. Yasuda, T., Naito, Y., Tsumita, T. and Tadakuma, T.: A simple method to measure anti-glycolipid antibody by using complement-mediated immune lysis of fluorescent dye-trapped liposomes. J. Immunol. Methods, 44: 153—158, 1981.
6. Tadakuma, T., Yasuda, T., Tamura, A., Saito, S., Tsumita, T. and Saito, K.: Analysis of the mode of antigen presentation required for triggering of T cell proliferation by using various azobenzene arsonate-tyrosine derivatives. J. Immunol., 134: 122—128, 1985.
7. Kaise, S., Yasuda, T., Kasukawa, R., Nishimaki, T., Watarai, S. and Tsumita, T.: Antiglycolipid antibodies in normal and pathogenic sera and synovial fluids. Vox Sang., 49: 292—300, 1985.

**New immunization procedure for production of monoclonal antibodies which recognize carbohydrate of glycoprotein.**

Kunio Ooyama<sup>1)</sup>, Shinobu Watarai and  
Tatsuji Yasuda

Institute for Environmental Medicine,  
Okayama University Medical School

<sup>1)</sup>Present address : Medical Science Laboratory,  
Asahi Chemical Industry Co. Ltd.

New immunization method for production  
of monoclonal antibodies which recognize

oligosaccharide portion of glycoprotein was developed. Conventional immunization method in which glycoprotein was emulsified with Freund's complete adjuvant could not produce anti-carbohydrate monoclonal antibody. Glycopeptide which was prepared by pronase digestion of glycoprotein conjugated liposomes containing lipid A of Salmonella minnesota were revealed good antigen for production of anti-carbohydrate monoclonal antibodies. By this new immunization method several monoclonal antibodies which recognize mainly carbohydrate portion of ovomucoid were established.