

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300356

研究課題名(和文) 白血病細胞表面糖鎖抗原に対する一本鎖抗体の開発とオーダーメイド治療への応用

研究課題名(英文) Development of single chain antibodies against sugar chain tumor antigen on the surface of leukemia cells and their application for order-made medicine

研究代表者

隅田 泰生 (Suda, Yasuo)

鹿児島大学・理工学研究科・教授

研究者番号：70179282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,300,000円、(間接経費) 5,190,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病(ATL)細胞表面に特異的に発現している糖鎖を腫瘍マーカーおよび抗体(免疫)療法のターゲット抗原としてとらえ、腫瘍細胞から抽出・分画する微量糖鎖を直径50マイクロメートル程度の光ファイバーの先端に固定化したシュガーチップと局在プラズモン共鳴法(LPR)を用いたスクリーニング法を用い、ファージ・ディスプレイ法によって、それら糖鎖に特異的に結合する一本鎖抗体(scFv)を発現しているファージ(ファージミドベクター)群を選別し、それらから産生させるscFvを蓄積した。また、scFvを固定化した蛍光性のナノ粒子を開発し、白血病患者の早期発見のための検査薬(候補)を創製した。

研究成果の概要(英文)：Specifically expressed sugar chains on adult T-cell leukemia(ATL) cells should be tumor markers, which can be appropriate antigen molecules in the targeted therapy using antibodies. Trace amount of sugar chains extracted and fractionated from tumor ATL cells were immobilized on the top of the optical fiber (50) chemically modified with gold nanoparticles to prepare fiber-type sugar chip. Using the chip and localized surface Plasmon resonance method, the screening of phage display was performed to obtain phages expressing single chain antibody(scFv) which bound to sugar chain from ATL cells. then, several scFv were isolated from the selected phages. One scFv was then immobilized to fluorescent nanoparticles(FNP) with an optimal conditions to prepare scFv-FNP. By the FACS analysis and fluorescent microscopy, the scFv-FNP was found to bind specifically to cultured ATL cell(S1T), but not to non ATL leukemia cells(CEM), indicating the easy detection tool for ATL cells.

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：腫瘍マーカー オーダーメイド治療

1. 研究開始当初の背景

(1)「糖鎖」は「核酸」および「蛋白質」に次ぐ「第3の生命鎖」と呼ばれ、生体内においては蛋白質や脂質と結合して糖蛋白質や糖脂質を形成している。これらは細胞内外の情報伝達や免疫システムに深く関与し、細胞の癌化や転移、ウイルス感染に重要な役割を果たしている。しかし、糖鎖は核酸や蛋白質よりも遙かに構造が複雑であり、またその生合成は複数の糖転移酵素により制御されているため、量的な確保も困難であり、依然として、研究は途上であり、機能解明から実用化への展開がようやく開始されたところである。これらの基礎研究となる糖鎖の基盤技術に関しては、近年、糖鎖ライブラリーが徐々に整備されるとともに、糖鎖解析ツールとしての「レクチンチップ」や「糖鎖チップ」も開発され、糖鎖研究の基盤が整いつつある。特に、「糖鎖チップ」に関しては、我々は「シュガーチップ」として既にその開発と実用化に成功している。

(2) ヒトレトロウイルスである human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) が原因である成人T細胞白血病(ATL)は、熱帯・亜熱帯地域を中心に感染者が分布している。ATL は一旦発症すると非常に予後の悪い白血病で、決定的な治療法は確立されていない。強力な化学療法が試みられているが、治療開始後の50%生存率は1年を少し超えた程度で、十分な結果にはほど遠い。また、骨髄移植や造血幹細胞移植も試みられているが、一部の症例にしか効果が期待できず、有効なワクチンも存在しない。海外では抗体医療の有効性が示唆されているが、抗体の標的分子について決定的なものはない。わが国においては、特に鹿児島などの南九州を中心として、約120万人もの感染者が存在し、毎年1000人以上のATL患者が死亡している。本研究はこのような背景に立脚して平成18年から開始され、ATLに対し、「糖鎖」という新たな分子に標的を定め、「シュガーチップ」や「ファージ・ディスプレイ法」など、最新のナノテクノロジーを駆使してATLの抗体療法や早期発症診断に向けたアプローチを行い、以下の5つを明らかにした。即ち、(i) ライン化したATL細胞を直接抗原としたファージ・ディスプレイ法では、親和性の弱い「糖鎖」に対するscFvを得ることは困難である。(ii) ATL細胞に発現量が多い蛋白質を標的としたscFvは健常T細胞にも毒性をもつ。(iii) ライン化したATL細胞と非ATL T細胞間では、発現しているN-およびO-型糖鎖にはそれぞれ違いがある。(iv) 新しい蛍光性のリンカー化合物と光ファイバーの先端をシュガーチップ化した局在プラズモン共鳴(LPR)測定システムを開発し、細胞由来の微量の糖鎖を固定化して解析できるシステムを確立した。(v) ライン化ATL細胞由来N-型糖鎖を固定化したシステムと合成ファージライブラリーを用いて、ライン化した

ATL細胞に特異性の高いscFvを3クローン得、そのうちの1つは細胞障害活性も有し、ATLの抗体療法に使用できる可能性を持っていた。本研究は、以上の成果に基づき計画した。

2. 研究の目的

癌細胞表面の糖鎖を標的とした抗体を調整し、検査薬や治療薬として使用することを目的とする。即ち、白血病細胞表面に特異的に発現している糖鎖を腫瘍マーカーおよび抗体(免疫)療法のターゲット抗原としてとらえ、腫瘍細胞から抽出・分画する微量糖鎖を直径50マイクロメートル程度の光ファイバーの先端に固定化したシュガーチップと局在プラズモン共鳴法(LPR)を用いたスクリーニング法を用い、ファージ・ディスプレイ法によって、それら糖鎖に特異的に結合する1本鎖抗体(scFv)を発現しているファージ(ファージドベクター)群を選別する。同時にそれらから産生させるscFvを蓄積する。対象とする白血病細胞としては、成人T細胞白血病(ATL)細胞から開始し、他の白血病細胞へ展開する。また、scFvを固定化した蛍光性のナノ粒子を開発し、白血病患者の早期発見のための検査薬を創製する。

3. 研究の方法

(1) scFvの調製: 実験の流れを図1に示した。ATL細胞株S1T細胞から膜画分を分画し、酵素処理によってN-型糖鎖を切り出し、分離した後、ヒドラジン分解を行い、BlotGlyco法でO-型糖鎖の分離とf-monoリンカーでラベル化した後、ファイバー型シュガーチップを調製した。そのチップを用いてM13由来ヒトscFv合成ライブラリーまたはナイブライブラリーのバイオパニングを行った。パニングにより、チップ上の糖鎖に結合するファージを得た。次いで、得られた結合ファージを大腸菌TG1に形質転換し、定法によりファージ溶液を調製した。PCRで確認したところ、800~900bp付近に目的のバンドが観測された。

続いて、scFvの調製と結合解析を行った。得られたモノクローンファージを大腸菌HB2151株に感染させ、一本鎖抗体scFv

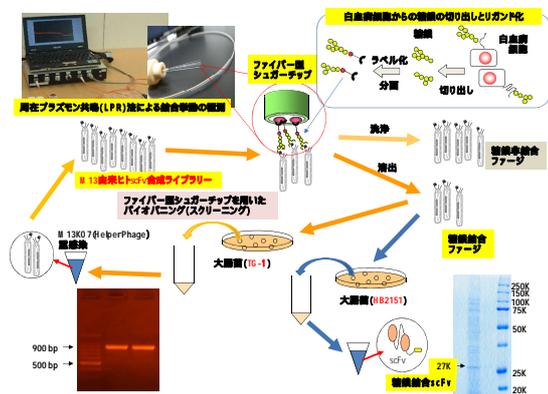


図1 scFvの調製法(実験の流れ)

を産生させた。そのペリプラズム画分から scFv を抽出し、SDS-PAGE (CBB 染色と Western blotting) により scFv 蛋白質(27 kDa)を確認した。そして、Ni カラムを用いて scFv 蛋白質を精製した後、透析を行い、FACS 解析に供試した。

(2) scFv-FNP: FNP のコア成分には CdTe/CdS を使用した。FNP のコーティング剤には、TEG-OH **1** と TEG-NTA **2** を用いた。TEG-NTA **2** は、当研究室で合成された TEG-COOH **3** に対し、縮合剤を反応させた後、N-(5-アミノ-1-カルボキシペンチル)イミノジ酢酸 (AB-NTA) を加えて合成した。FNP は、還元条件下、図 2 下部に示した割合でコーティング剤を作用させて調製し、FNP **4**、**5**、ならびに **6** を合成した。

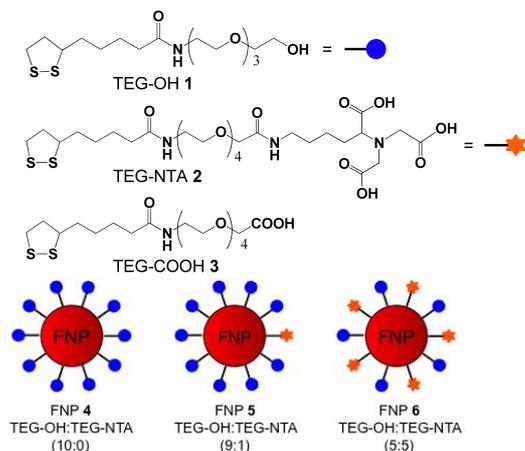


図 2 . FNP の調製

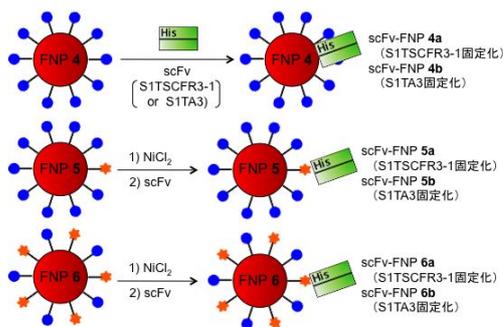


図 3 . scFv-FNP の調製

scFv として、(1) で見いだした ATL 細胞株 S1T 細胞に高い結合性を示す S1TSCFR3-1 と陽性コントロールとして S1TA3 (S. Muraoka, *et al. J. Biochem.* 2009, 145(6), 799-810) を用いた。

FNP への scFv の固定化は、FNP に **5** または **6** を用い、塩化ニッケルで処理後、それぞれの scFv を加え、S1TSCFR3-1 を固定化した scFv-FNP **5a**、**6a** と S1TA3 を固定化した scFv-FNP **5b**、**6b** を得た (図 3)。

ATL 細胞への scFv-FNP の結合性はフロー

サイトメトリー (FACS) と共焦点顕微鏡による細胞の蛍光観察により解析した。細胞は ATL 細胞株である S1T 細胞および非 ATL 細胞株である CEM 細胞を使用した。遠心分離で細胞画分を回収し懸濁した後、scFv-FNP を加えて 4 °C で 30 分インキュベートした。遠心分離後、PBS で洗浄して FACS または蛍光観察により解析を行った。

4 . 研究成果

(1) 図 4 に示すように、得られた scFv は、S1T 細胞には S1TA3 と同程度の結合親和性を示したが、MOLT4 には結合しなかった。さらに 6 種類の ATL 細胞及び非 ATL 細胞を用いて FACS 解析を行うことで、ATL 細胞に特異的に結合する scFv であるかを解析した。FACS 解析の結果、図 5 に示すように、ATL 細胞株には結合性が高く、非 ATL 細胞では結合性が低かったことから、得られた scFv が ATL 細胞を特異的に認識する scFv であることが分かった。

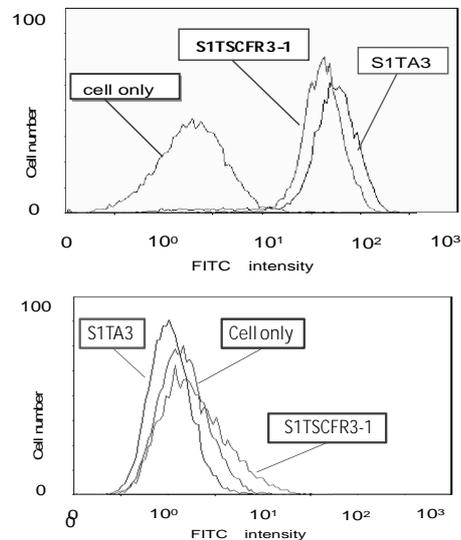


図 4 . S1T 細胞 (上段) MOLT4 細胞 (下段) を用いた FACS 解析

(2) scFv-FNP **5a**、**5b** では、FACS 解析と共焦点顕微鏡による蛍光観察により、再現性よく、S1T 細胞に結合性を示し (図 6 B、E)、非 ATL 細胞である CEM 細胞には結合性を示さなかった (図 6 C、G)。このことから、NTA-ニッケル-His タグ結合を介することによって、強固に FNP 上に固定化されており、また、scFv の方向性も規定されて抗原を認識できていると考えられる。

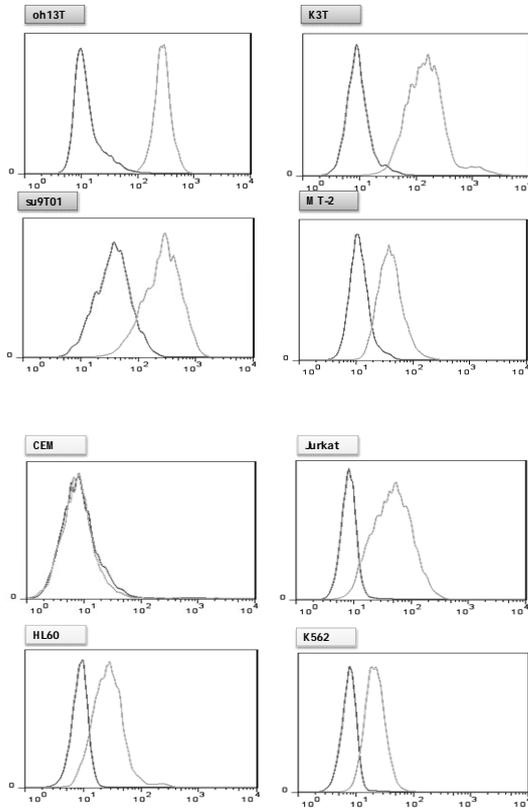


図5 .ATL 細胞 (MT2、K3T、su9T01) 及び非 ATL 細胞 (HL60、CEM、Jurkat) を用いた FACS 解析

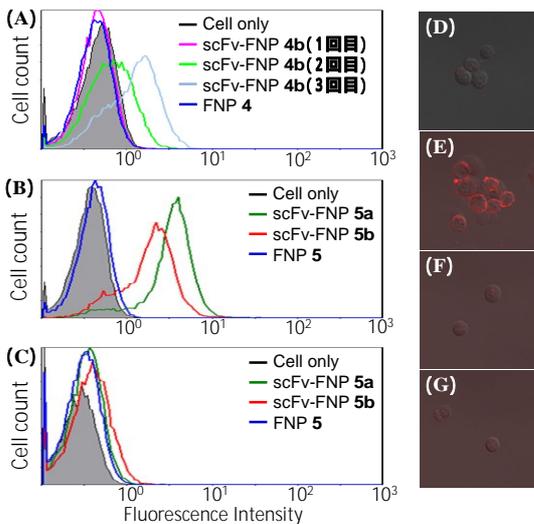


図6 . FACS 解析 . (A) S1T 細胞に対する scFv-FNP 4b の結合性、(B) S1T 細胞に対する scFv-FNP 5a、5b の結合性、(C) CEM 細胞に対する scFv-FNP 5a、5b の結合性 . 共焦点顕微鏡解析による細胞観察 (オーバーレイ画像) . Ex. 488 nm; 20.0 %, DBS1 : 574 nm . (D) S1T 細胞、(E) scFv-FNP 5b を加えた S1T 細胞、(F) CEM 細胞、(G) scFv-FNP 5b を加えた CEM 細胞 .

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

1. Shinchi H, Wakao M, Nagata N, Sakamoto M, Mochizuki E, Uematsu T, Kuwabata S, Suda Y. Cadmium-free sugar-chain immobilized fluorescent nanoparticles containing low-toxicity ZnS-AgInS2 cores for probing lectin and cells. *Bioconjug Chem.* 査読の有無(有), 2014, 25(2): 286-95.
2. Shinchi H, Wakao M, Nakagawa S, Mochizuki E, Kuwabata S, Suda Y, Stable sugar-chain-immobilized fluorescent nanoparticles for probing lectine and cells. *Chem. Asian J.* 査読の有無(有), 2012, 7(1) 2678-2682,
3. Zang X, Nakamura-Tsuruta S, Haruyama M, Yokoyama R, Nagatomo M, Wakao M, Nakajima K, Aoyama K, Okuno T, Morikawa S, Hiroi S, Kase T, Nose H, Nishi J, Okamoto M, Baba M, Suda Y, Super high sensitive detection of viruses using sugar-chain immobilized gold nanoparticles (SGNPs), *Polymer Preprints*, 査読の有無(有)2012, 53, 671-672.

〔学会発表〕(計 2 0 件)

1. Kakitsubata Y, Wakao M, Suda Y, Synthesis of dermatan sulfate partial structures and their binding interaction analyses, 27th International Carbohydrate Symposium, January 12-17, 2014, Indian Institute of Science Bangalore, India
2. 新地浩之、石田秀治、若尾雅広、隅田泰生、糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子を用いたガングリオシド結合性蛋白質の相互作用解析、第 86 回日本生化学会大会、横浜、2013.9.13
3. 新地浩之、結城伸泰、石田秀治、平田幸一、若尾雅弘、隅田泰生、ガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子を用いたギラン・バレー症候群簡易診断法、P-074、8月6日発表、ポスター発表、第32回日本糖質学会年会、2013年8月5日(月)~7日(水)、大阪国際交流センター
4. 若尾雅広、松山奈央、齊藤彰寛、隅田泰生、GlcNAc-GlcA 配列を含むヘパラン硫酸部分二糖構造に関する合成研究、P-040、8月6日発表、ポスター発表、第32回日本糖質学会年会、2013年8月5日(月)~7日(水)、大阪国際交流センター
5. 杜若祐平、若尾雅広、隅田泰生、デルマタン硫酸部分構造の合成と蛋白質相互作用解析、P-008、8月6日発表、ポスター発表1、第32回日本糖質学会年会、2013年8月5日(月)~7日(水)、大

- 阪国際交流センター
6. 隅田泰生、西順一郎、村上直樹、中嶋一彦、青山和枝、横山理沙、大園まみ、永友真実、糖鎖固定化金ナノ粒子を用いた唾液中インフルエンザの高感度診断、6月29日発表、第27回インフルエンザ研究者交流の会 2013年6月28日(金)~30日(日) 北海道大学 大学院獣医学研究科 講堂
 7. H Shinchi, N Yuki, H Ishida, K Hirata, M Wakao, Y Suda, Quick and convenient diagnostic method for Guillain-Barré syndrome using sugar-chain immobilized fluorescent nano-particles, 22nd International Symposium on Glycoconjugates (Glyco22) Dalian, China, June 23-28, 2013
 8. 若尾雅広、新地浩之、永田野々香、坂本雅弥、望月衛子、上松太郎、桑畑進、隅田泰生、糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子を用いた相互作用解析、0-29 10:45~11:00、6月21日発表、日本ケミカルバイオロジー研究会 第8回年会 2013年6月19日(水)~21日(金)、東京医科歯科大学
 9. Yasuo Suda "Sugar-chain immobilized nano-particles for clinical diagnosis of HIV/Flu" June 4, FBPS 2013 Tenth International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, Vancouver, Canada, June 3-6, 2013
 10. 新地浩之、結城伸泰、石田秀治、若尾雅広、隅田泰生「糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子を用いたギラン・バレー症候群の簡易診断法」B06、発表、5/18 14:00、佐賀大学本庄キャンパス 農学部、平成25年度日本生化学会九州支部会例会、2013年5月18日-19日
 11. 新地浩之、結城伸泰、石田秀二、平田幸一、若尾雅広、隅田泰生、「糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子を用いたギラン・バレー症候群の迅速簡易な検査診断法の開発」3D5 - 37、3/24、日本化学会第93春季年会(2013) 2013年3月22日-25日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス
 12. 佐藤綾香、田添安里紗、榎元友里恵、中森百恵、若尾雅広、伊東祐二、有馬直道、隅田泰生、「ファイバー型シュガーチップを用いた成人T細胞白血病(ATL)細胞表面糖鎖に対する一本鎖抗体 scFv の選別と活性評価」3P-828、ポスター、12/16 17:00 - 18:00、マリンメッセ福岡、第85回日本生化学会大会、2012年12月14日-16日
 13. 新地浩之、永田野乃香、坂本雅弥、若尾雅広、上松太郎、望月衛子、桑畑進、隅田泰生、「糖鎖固定化金ナノ粒子の結合特異性と毒性」3P-829、ポスター、12/16 16:00 - 17:00、マリンメッセ福岡、第85回日本生化学会大会、2012年12月14日-16日
 14. 佐藤綾香、田添安里紗、中森百恵、木地山真実、前原千恵里、岩切健二、若尾雅広、伊東祐二、有馬直道、隅田泰生、「抗体治療を目的とした成人T細胞白血病(ATL)細胞表面の糖鎖に結合する一本鎖抗体(scFv)の開発」第31回日本糖質学会学年会、2012年9月17-20日、(ポスター発表P 151) 鹿児島市民文化ホール
 15. 木地山真実、佐藤綾香、前原千恵里、岩切健二、若尾雅広、伊東祐二、有馬直道、隅田泰生、「ファイバー型シュガーチップによるATL細胞表面糖鎖に対するscFvの探索」平成24年度日本生化学会九州支部例会、福岡、2012年5月26日~5月27日
 16. Zang X, Nakamura-Tsuruta S, Haruyama M, Yokoyama R, Nagatomo M, Wakao M, Nakajima K, Aoyama K, Okuno T, Morikawa S, Hiroi S, Kase T, Nose H, Nishi J, Okamoto M, Baba M, Suda Y, Super high sensitive detection of viruses using sugar-chain immobilized gold nanoparticles(SGNPs)243rd American Chemical Society National Meeting & Exposition, San Diego, California 2012, March 27
 17. 仮屋博敬、張旭、横山理沙、永友真未、若尾雅広、橋本雅仁、隅田泰生、Application of sugar-chain immobilized nano-particles for developing viral vaccine(ウイルスワクチン開発への糖鎖固定化ナノ粒子の応用) 第84回日本生化学会大会、2011年9月21日 - 24日、国立京都国際会館、京都府京都市
 18. 佐藤綾香、岩切健二、仮屋博敬、木地山真実、前原千恵里、岡田摩耶、戎義子、若尾雅広、有馬直道、伊東祐二、隅田泰生、成人T細胞白血病(ATL)細胞表面の糖鎖に結合する一本鎖抗体(scFv)の開発、第84回日本生化学会大会、2011年9月21日 - 24日、国立京都国際会館、京都府京都市
 19. 新地浩之、中川奨、望月衛子、桑畑進、若尾雅広、隅田泰生、CdTe/CdS コア/シェル QD を用いた糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子の合成と応用、第30回日本糖質学会学年会、2011年7月11 - 13日、長岡リリックホール、ハイブ長岡、新潟県長岡市
 20. 隅田泰生、糖鎖とナノバイオテクノロジーに基づくウイルス高感度検出法の開発(Development of high sensitive diagnostic method of viruses based on nano-glycobiotechnology) 第30回日本糖質学会学年会、シンポジウム2:糖鎖機能解明のブレークスルーを求めて、2011

年7月11 - 13日、長岡リリックホール、
ハイブ長岡、新潟県長岡市

〔図書〕(計6件)

- (1) 鈴木紳介、魚住公治、有馬直道 亜急性連合性脊髄変性症、日本臨床別冊 血液症候群～その他の血液疾患を含めて～、日本臨床社、2013、総ページ数(123-126)
- (2) 畠中孝彰、杉村和久、伊東祐二、ファージライブラリによるヒト抗体特異的アフィニティペプチドの探索と抗体検出、精製技術への応用 ” ペプチド医薬の最前線、監修：木曾義明・向井秀仁 ”、シーエムシー出版(東京)、78-84 (2012) 総ページ数(78-84)
- (3) 畠中孝彰、伊東祐二、ペプチド抗体 ” 新機能抗体開発ハンドブック～次世代抗体創製から産業への展開まで～、監修：浜窪隆雄、編集委員長：津本浩平 ”、シーエムシー出版(東京)、59-64 (2012) 総ページ数(59-64)
- (4) 若井純子、伊東祐二、非抗体スカフォールドプロテインバインダー ” 新機能抗体開発ハンドブック～次世代抗体創製から産業への展開まで～、監修：浜窪隆雄、編集委員長：津本浩平 ”、シーエムシー出版(東京)、184-189 (2012) 総ページ数(184-189)
- (5) 川田英明、有馬直道 多発性骨髄腫の最新治療；骨髄腫腎や分子標的薬を含めて日本腎臓学会誌、第54巻第5号、2012、総ページ数(586-592)
- (6) 有馬直道 成人T細胞白血病・リンパ腫 今日の治療指針 医学書院、2012、総ページ数(586-588)

〔産業財産権〕

出願状況(計5件)

1. 名称：免疫性末梢神経障害症由来抗体を認識する組成物とその利用
発明者：隅田泰生、若尾雅広、石田秀治、結城伸泰
権利者：鹿児島大学、株式会社スディックスパイオテック
種類：特許・特願
番号：2014 056073
出願年月日：2014年3月7日
国内外の別：PCT
2. 名称：ヒト抗A T L細胞表層O - 結合型糖鎖抗体および抗体フラグメント
発明者：隅田泰生、伊東祐二、有馬直道、若尾雅広
権利者：鹿児島大学、株式会社スディックスパイオテック
種類：特許・特願
番号：2012 255690
出願年月日：2012年11月21日
国内外の別：国内

取得状況(計4件)

1. 名称：新規糖固定化金属ナノ粒子及びこれを用いて糖-蛋白質相互作用を測定する方法、並びに糖-蛋白質相互作用体から蛋白質を回収する方法
発明者：隅田泰生、西村知晃、岸本裕子、中川裕美
権利者：独立行政法人科学技術振興機構、国立大学法人鹿児島大学、隅田泰生
種類：日本・アメリカ
番号：日本 4883640・アメリカ 8,067,393
取得年月日：日本 2011年12月16日・アメリカ 2011年11月29日
国内外の別：国内・国外
3. 名称：糖鎖リガンド複合体、およびそのリガンド複合体を用いた蛋白質の分析方法
発明者：隅田泰生
権利者：独立行政法人科学技術振興機構、国立大学法人鹿児島大学
種類：台湾特許・日本特許
番号：台湾 1356816・日本 4800771
取得年月日：2011年8月1日
国内外の別：国内・国外
4. 名称：リンカ 化合物及びリガンド複合体、並びにそれらの製造方法
発明者：隅田泰生、荒野明男、楠本正一、ソベルマイケル、若尾雅広
権利者：独立行政法人科学技術振興機構、国立大学法人鹿児島大学
種類：台湾特許
番号：1346098
取得年月日：2011年8月1日
国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-nano.eng.kagoshima-u.ac.jp/users/suda-lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

隅田 泰生 (Suda Yasuo)
鹿児島大学・理工学研究科・教授
研究者番号：70179282

(2) 研究分担者

伊東 祐二 (Yuji Ito)
鹿児島大学・理工学研究科・教授
研究者番号：60223195

有馬 直道 (Naomichi Arima)
鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号：30175997

若尾 雅広 (Masahiro Wakao)
鹿児島大学・理工学研究科・助教
研究者番号：20404535