



Establishment and Characterization of a Mouse Monoclonal Anti-Fucosylceramide Antibody , PC47H

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 石原, 英幹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1390

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 1 1 3 号	学位授与年月日	平成 3 年 1 2 月 6 日
氏 名	石 原 英 幹		
論文題目	Establishment and Characterization of a Mouse Monoclonal Anti-Fucosylceramide Antibody, PC47H (マウス単クローン性抗フコシルセラミド抗体、PC47H の樹立と解析)		

医学博士 石原英幹

論文題目

Establishment and Characterization of a Mouse Monoclonal Anti-Fucosylceramide Antibody, PC47H

(マウス単クローン性抗フコシルセラミド抗体、PC47H, の樹立と解析)

論文の内容の要旨

フコシルセラミドは、1976年に箱守により大腸癌組織から単離され、癌関連抗原としての可能性を持つ中性糖脂質として、初めて報告された。しかし、フコシルセラミドを特異的に認識する抗体は、これまでにまだ樹立されておらず、フコシルセラミドが果たして癌関連抗原であるか否かを同定する研究を厳密に行なうことは不可能であった。

本研究において、われわれは、マウス単クローン性抗体、PC47H が、フコシルセラミドを特異的に認識することを明かにし、本抗原が癌関連抗原であることを PC47H を用いた実験により初めて証明した。

ヒト膀胱癌組織より抽出された中性糖脂質画分は、リポゾーム中にLipidA と共に組み込まれ、マウスの皮下及び腹腔に免疫された。得られたマウス単クローン性抗体は、ELISA法及びTLC-免疫染色法を用いてスクリーニングされた。TLC-免疫染色法の結果から、マウス単クローン性抗体、PC47H は、免疫原として用いた膀胱癌中性糖脂質中のセラミド・モノ・グリコシド画分に特異的に反応する抗体として選択された。

哺乳動物におけるセラミド・モノ・グリコシド画分に含まれる中性糖脂質には、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、フコシルセラミドの3種が知られている。そこで、PC47H の認識する抗原を同定するために以下の2つの実験を試みた。

単糖を用いた競合阻害実験においては、フコースのみがPC47H の抗原への結合能を競合的に阻害し、ガラクトース、グルコースは阻害しなかった。

また、精製されたガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、フコシルセラミドを用いたELISA法による抗原結合実験において、PC47H は、フコシルセラミドにのみ反応し、他の2つのセラミド・モノ・グリコシドには反応しなかった。以上の結果より、PC47H の認識する抗原が、フコシルセラミドである事が判った。

次に、フコシルセラミドの癌関連抗原としての可能性を検索するためにPC47H を用いて以下の2種の実験を行なった。

種々のヒト組織より抽出した中性糖脂質を用いたTLC-免疫染色法において、PC47H は、ヒト大腸癌及び胃癌組織より抽出した中性糖脂質中のセラミド・モノ・グリコシド画分を強く染色した。この事実より、フコシルセラミドが、ヒト大腸癌及び胃癌に強く発現されている事が示唆された。

生細胞を標的とするELISA法(CELISA)において、PC47H は、胃癌、大腸癌、膀胱癌、肺癌を起源とする腺癌細胞株に対して反応性を示し、白血病、肝癌、乳癌、神経芽細胞腫を起源とする細胞株に対しては、反応性を示さなかった。また、正常末梢血リンパ球、正常赤血球、正常繊維芽細胞に対しては、全く反応性を示さなかった。以上の結果より、フコシルセラミドがヒト腺癌に強く発現される抗原である事が明らかとなった。

今回、われわれの樹立したマウス単クローン性抗体、PC47H がフコシルセラミドを特異的に認識する事は、単糖を用いた競合阻害実験及び精製された3種のセラミド・モノ・グリコシドを用いた抗原結合実験から明らかであり、PC47H は、本抗原を認識する世界最初の単クローン性抗体である。またPC47H を用いたTLC-免疫染色法及びCELISAの結果は、箱守が指摘したように、フコシルセラミドが、癌化に強く関連している抗原であることを裏付けた。今後、われわれは、PC47H 抗体を用いてフコシルセラミドの生物学的重要性を検索すると共に、本抗体の癌診断への応用を試みていくつもりである。

論文審査の結果の要旨

これまでに見出されているヒトの癌関連抗原(tumor associated antigen ; TAA)の多くは、糖脂質や糖蛋白である。長糖鎖をもった多くの癌関連糖鎖抗原が腫瘍マーカーとして臨床で用いられており、癌性変化に伴って起こる最も共通の現象は glycoconjugate の成分の変化であると考えられている。

このような TAA の一つとして、1976年に箱守らによって中性糖脂質であるフコシルセラミドが大腸癌組織から単離され、その有用性が示唆された。しかし、ヒトの腫瘍由来のフコシルセラミドを特異的に認識する抗体の作成は成功しておらず、その開発が待たれていた。そこで、本申請者はハイブリドーマ法を用いヒト脾癌組織から抽出した中性糖脂質画分を免疫原としてマウス単クロン抗体を作成する試みをおこない、癌組織由来のフコシルセラミドを特異的に認識する単クロン抗体、PC47H を作成することに成功した。

審査委員会において、申請者によりなされた口頭発表と論文内容について審査した結果、本論文の特徴として次の点が評価された。

1. ヒト脾癌組織より抽出された中性糖脂質を免疫原として得られたマウス単クロン抗体、PC47H(IgM) は、脾癌中性糖脂質中のセラミド・モノ・グリコシド画分と反応する抗体であることを、ELISA 法及び TLC-免疫染色法によって証明した。
2. ついで、単糖を用いた競合阻害実験と精製糖脂質成分を用いた ELISA 法とにより PC47H の認識する糖脂質の成分がフコシルセラミドであることを明らかにした。
3. PC47H が胃癌や大腸癌など各種の癌組織由来の中性糖脂質中のフコシルセラミドを認識することを TLC-免疫染色法で示し、さらに、各種の腫瘍細胞株との反応性を検索し、本抗体が、消化器系腫瘍細胞株を特異的に認識することを明らかにした。

以上の結果は、PC47H 抗体がヒト腫瘍由来のフコシルセラミドを特異的に認識する抗体であり、同時にフコシルセラミドが癌性変化に密接に関連する糖脂質であることを明らかにするものであり、今後、本抗体を用いてフコシルセラミドの生物学的意義の解明と TAA 検出を行なう上に、きわめて有用であるとして、全審査委員から高い評価が与えられた。

また、審査の過程において、申請者の発表と関連して、次の点に対して質疑がなされた。

1. PC47H 抗体が IgM であり、かつ腹水型抗体が得られにくい理由について
2. PC47H 抗体が合成型と天然型のフコシルセラミドを共に認識できる理由
3. PC47H 以外にどのような腫瘍関連抗原反応性単クロン抗体産生クローンが見い出されたか
4. PC47H 抗体が認める抗原のエピトープはフコシルセラミドのどの部分に存在するか、また、この抗原の脂質部分は、どのような構成か
5. PC47H 抗原の細胞膜及び細胞質内局在性と、代謝回転について
6. PC47H 抗原の胎生期組織における発現性と胎児性抗原としての可能性について
7. 自己免疫疾患や癌患者の血中や便中における PC47H 抗原及び抗体の検出の可能性について
8. これまでに開発された腫瘍マーカーと比べ PC47H はどのような利点があるか
9. PC47H 抗原の細胞分化・増殖活性の有無について
10. 癌性変化における oncogene 発現とフコシルセラミド量との関連について

以上の質問に対する申請者の回答は、ほぼ適切であり、博士(医学)の学位授与に値する論文であると全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	山下	昭			
	副査	教授	瀧川	雅浩	副査	教授	馬場正三
	副査	教授	吉田	孝人	副査	助教授	梶村春彦