

原 著

Gb3 検出に利用する抗 Gb3 抗体 (1A4) の有用性の検討

菅原 栄紀,^{a*} 鷹觜 祥子,^a 本田 捷太,^a 立田 岳生,^a 伊藤 淳,^b
佐藤 信,^b 大山 力,^c 細野 雅祐^a

Examination of the Usability of Anti-Gb3 Antibody (1A4) for Detection of Gb3

Shigeki SUGAWARA,^{a*} Shoko TAKANOHASHI,^a Shota HONDA,^a Takeo TATSUTA,^a Jun ITO,^b
Makoto SATO,^b Chikara OHYAMA,^c and Masahiro HOSONO^a

^aDivision of Cell Recognition Study, Institute of Molecular Biomembrane and Glycobiology, Faculty of
Pharmaceutical Sciences, Tohoku medical and Pharmaceutical University; ^bDepartment of Urology,
Faculty of Medicine, Tohoku medical and Pharmaceutical University;
^cDepartment of Urology, Hirosaki University Graduate School of Medicine.

(Received November 20, 2018)

Globotriaosylceramide (Gb3) is the most important cell surface ligand of the rhamnose-binding lectins such as *Sirulus asotus* lectin (SAL). SAL recognizes and binds to Gb3 expressing tumor cells such as Burkitt's lymphoma Raji cells and induces them to the G0/G1 phase growth arrest. Thus, a fine detecting probe, or monoclonal antibody (mAb) of Gb3, is important for operating immunocytochemical analyses of SAL. In this experiments, we established simple and convenience preparation method to obtain the mAb, 1A4 (isotype: IgM), from the culture medium of the provided hybridoma cell line (originally from Ishigami F., and Hakomori S., method unpublished), and compared its reactivity and stability with BGR23 (isotype: IgG) which is commonly used and commercially available mAb against Gb3. mAb 1A4 was simply purified by using Rapid SPiN L column within an hour and showed higher reactivity than BGR23 on the flow cytometric analyses against Gb3 expressing tumor cells. The optimum concentration of 1A4 was 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the adequate detection while four and ten times higher concentrations were needed to obtain equal reactivity on Raji and TOS-1 cells, respectively, by using BGR23. Although purified 1A4 was stable in the 0.1 M Tris-Glycine after one-month storage at 4°C or -80°C, its reactivity was slightly decreased when the buffer was changed to 10 mM PBS. These results suggest that mAb 1A4 possesses relatively higher binding capacity to cell surface Gb3 than BGR23 and highly concentrated buffer could also suitable for its storage condition.

Key words — globotriaosylceramide; monoclonal antibody; flowcytometry

緒 論

分子生物学研究に用いられている免疫組織染色法, 免疫沈降法, ウエスタンブロッティング法, フローサイトメトリー法などにおいて, 必須の材料は「抗体」である. これらの研究に利用される抗体には, 様々なエピトープを認識する抗体が含まれているポリクローナル抗体と, 1つのエピトープのみを認識するモノクローナル抗体 (mAb) が存在し, 研究の目的に応じて使い分けられている. mAb の作製方法は, 1975年にケーラーおよびミルステインにより確立され (1984年「免疫制御

機構に関する確立とモノクローナル抗体の作製法の開発」によりノーベル医学・生理学賞を受賞),¹⁾ この方法により, mAb の大量作製が可能になった. がん細胞膜表面の分子組成は, 正常細胞と比べ異なる点が多く, 特定の分子の消長に注目すれば, それはがん特異抗原として理解される. mAb という優れたプローブの出現は, 腫瘍病理の分野における腫瘍マーカー研究を急速に発展させることに大きく貢献した.²⁾ 診断への応用のみならず, 1990年代後半からは, 非ホジキンリンパ腫治療薬であるリツキサン (リツキシマブ, 抗 CD20 抗体) に代表されるように, がんの治療に利用可能な mAb が開発され,³⁾ 現在もその特異性の観点からがんに対して治療効果の高い抗体医薬品の開発が進行している. 本年 (2018年) のノーベル医学・生理学賞は, 活性化した T 細胞の表面に発現する

^a 東北医科薬科大学薬学部分子生体膜研究所分子認識学教室, ^b 東北医科薬科大学医学部泌尿器科学教室, ^c 弘前大学大学院医学研究科泌尿器科学講座
*e-mail: ssuga@tohoku-mpu.ac.jp

受容体である Programmed cell death 1 (PD-1) を標的とした抗体医薬であるニボルマブ (商品名オプジーボ) を開発した, 京都大学の本庶佑博士らに授与されたことは記憶に新しい。⁴⁾

細胞の表面は, 稠密な複合糖質に覆われている (糖衣) ため, 細胞表面抗原は糖鎖に由来するものが多く, 特に腫瘍関連抗原としての膜糖脂質に対する mAb は豊富に準備されている。しかし, 糖脂質はそれ自身低分子であることに加え, 分子構造として疎水性尾部は膜に埋め込まれ, また, 細胞外に表出する糖鎖部分はそれほど長く (大きく) ないため, いわゆる “潜在性” が抗体作製の際に問題となる。⁵⁾ 例えば, ガンクリオシド GM3 に対する mAb である M2950 は, 細胞表面の GM3 の密度によって反応性が変わることが知られている。^{6,7)} また, 極性頭部 (糖鎖部分) の配向や他の糖脂質との相互作用によっても抗体の反応性は変化する。⁸⁾ 当研究室では, 中性糖脂質であるグロボトリアオシルセラミド (Gb3, Gal α 1-4Gal β 1-4Glc-Cer) に結合するナマズ卵レクチン (*Silurus asotus* lectin, SAL) に関する研究を行っており, これまでに, Gb3 を高発現しているバーキットリンパ腫細胞株 Raji に対し, SAL が細胞縮小, ヨウ化プロピジウム (PI) の取り込み増加, ホスファチジルセリン (PS) の細胞膜外層側への移行および細胞増殖抑制を引き起こすことを報告している。⁹⁻¹¹⁾ Gb3 の検出には, 一般に特異抗体として市販されているマウス mAb (Isotype: IgG, Clone: BGR23) およびラット mAb (Isotype: IgM, Clone: 38-13) が利用されている。¹²⁻¹⁴⁾ Raji 細胞膜において Gb3 は, 脂質ラフトと呼ばれるマイクロドメイン (glycolipid enriched microdomain, GEM と呼ばれる) に存在するが, フローサイトメトリーで調べるとその反応性 (感度) は若干異なる。一方, 抗 Gb3 mAb は, これら以外にも研究室レベルで樹立されたハイブリドーマから得られるものがいくつか存在するが, 今回我々は, 米国ワシントン大学名誉教授である箱守仙一郎博士らのグループによりテラトカルシノーマを抗原として作製されたマウス mAb (Isotype: IgM, Clone: 1A4) を産生するハイブリドーマを入手した。本論文では, SAL の細胞膜リガンドとして機能する Gb3 の高感度で安定した検出法の確立を目的とし, 1A4 の簡便な精製方法および精製した抗体の反応性と貯法について検討した結果について述べる。

実験材料および実験方法

1. 実験材料

バーキットリンパ腫細胞株 Raji およびヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 は, 東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより, また, ヒト腎がん細胞株 TOS1 は, 東北医科薬科大学医学部泌尿器科学教室から供与されたものを用いた。この細胞を, 10% 非働化ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地 (日水製薬社製, 東京) またはダルベッコ改変イーグル培地 (和光純薬工業社製, 大阪) 中で, 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。抗 Gb3 抗体 (BGR23) は, 東京化成工業 (東京) より購入した。

2. 抗 Gb3 抗体 (1A4) 産生ハイブリドーマの培養

1A4 産生ハイブリドーマは, 弘前大学大学院医学研究科泌尿器科学講座から供与されたものを用いた。ハイブリドーマは, 25 cm² のフラスコ (Nunc 社製, Roskilde, Denmark) を用いて, 5 mL の培養液中に 7×10^5 細胞を播種して 37°C で 2 日間培養した。培養後, 細胞を除去した培養上清 (5 ml \times 2 で Total 10 mL) を回収した。

3. Rapid SPiN L カラムを用いた 1A4 の精製

イムノグロブリン軽鎖を構成する κ 鎖を含む抗体を精製することができるプロテイン L 固定化アフィニティーゲルが充填されている Rapid SPiN L カラム (プロテノバ社製, 東かがわ) に培養上清 (500 μ L) を加え, 1 回転あたり 30 sec の速度で 4 分間攪拌した後, 2,000 \times g で 5 秒間遠心分離を行い, 素通り画分を回収する操作を培養上清がなくなるまで繰り返した。中和バッファーとして 1 M Tris (5 μ L) を添加した回収用マイクロチューブにカラムを付け替え, 溶出液として 0.1 M グリシン塩酸塩 (pH 2.5, 200 μ L) を加えて 1 分間放置した。その後, 2,000 \times g, 5 分間遠心分離して 1A4 (Gly) を溶出した。

4. 保存溶液の置換

上記で溶出した 1A4 (Gly) の一部をウルトラフリー遠心フィルターユニット (分画分子量 10,000, Millipore 社製, Bedford, MA) に加え, 12,000 \times g, 15 分間遠心分離を行った。溶出液を廃棄した後, フィルター内の残液にダルベッコリン酸緩衝液 (D-PBS, pH 7.2) を 500 μ L 加え, 12,000 \times g, 15 分間遠心分離を行った。フィルター内の溶液を回収し, 全量 200 μ L になるように D-PBS を加え, さら

に、保存剤として終濃度 0.2% になるようにアジ化ナトリウム (Sigma 社製, St. Louis, MO, USA) を添加し、保存溶液を PBS に置換した 1A4 (PBS) を作製した。

5. タンパク質の定量

精製した抗体の定量は、Bicinchoninic Acid (BCA) protein assay kit (Pierce 社製, Rockford, IL, USA) を用いて行った。検量線作成用にはウシ血清アルブミン (BSA) を用い、得られた検量線からそれぞれの抗体の濃度を算出した。

6. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は Laemmli の方法により行った。¹⁵⁾ 抗体の分子量の確認は、BGR23 と 1A4 (PBS) を 2-メルカプトエタノール存在下または非存在下で処理して試料を作製した。SDS-PAGE では 7.0% ゲルを用い、1 レーンあたり 1 μ g になるように添加して分離後、Silver Stain MS kit (和光純薬工業社製) で染色した。

7. フローサイトメトリー法による細胞膜 Gb3 の検出

Raji, K562 および TOS1 (2×10^5 cells) を回収し、PBS で洗浄後、一次抗体として PBS で希釈した BGR23 または 1A4 を加え、水中で 30 分間処理した。次いで、PBS で洗浄後、PBS で希釈した FITC 標識抗マウス IgG/IgM 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories 社製, West Grove, PA, USA) または Alexa488 標識マウス IgG 抗体 (Thermo Scientific 社製, Rockford, IL, USA) を加え混和し、水中で 30 分間処理した。処理後、FACScalibur (Becton Dickinson 社製, San Jose, CA, USA) を用いて細胞膜上の Gb3 発現量を測定した。

8. 免疫染色法による細胞膜 Gb3 の検出

Raji (1×10^6 cells) を回収し、4% パラホルムアルデヒド (和光純薬工業社製) を加え、室温で 15 分間処理した。PBS で洗浄後、一次抗体として PBS で希釈した BGR23 または 1A4 を加え、水中で 30 分間処理した。次いで、PBS で洗浄後、PBS で希釈した FITC 標識抗マウス IgG/IgM 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories 社製) または Alexa488 標識マウス IgG 抗体 (Thermo Scientific 社製) を加え混和し、水中で 30 分間処理した。さらに、DRAQ5 (Biostatus 社製, Leicestershire, UK) を終濃度 0.5 μ M になるように加え、核染色し

た後、fluoromount (DiagnosticBioSystems 社製, Pleasanton, CA) を用いてスライドガラスにマウントし、FV1000 共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus 社製, 東京) により細胞膜上の Gb3 発現量を測定した。

結 果

1. SDS-PAGE による精製した 1A4 アイソタイプの確認

供与されたハイブリドーマの抗体産生能および Rapid SPiN L を利用して 1A4 のアイソタイプである IgM が簡便に精製可能か否か調べる目的で、1A4 およびアイソタイプが IgG である BGR23 を試料とし、還元および非還元条件下での SDS-PAGE を行った。還元条件で行った結果より、BGR23 ではマウス IgG の H 鎖を示す約 55 kDa のバンドが認められ、1A4 ではマウス IgM の H 鎖を示す約 80 kDa のバンドが検出された。また、非還元条件において、BGR23 は約 252 kDa 付近にバンドが見られるのに対して、1A4 は同じ条件で分離用ゲルに入らない、すなわち多量体であることを確認した (Fig. 1)。このことから、このハイブリドーマは IgM を産生しており、Rapid SPiN L を利

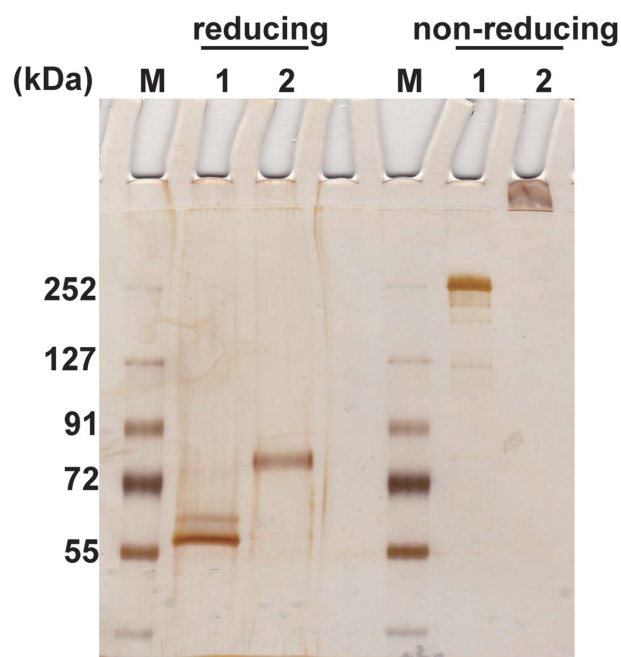


Fig. 1. SDS-PAGE pattern of purified 1A4 from hybridoma supernatants.

SDS-PAGE was performed using homogeneous 7.0% gel under reducing and non-reducing condition. Lane 1: BGR23, Lane 2: 1A4, M: protein ladder maker.

用することにより簡便な抗体精製が可能であることが示された。

2. ハイブリドーマが産生した抗体の Gb3 に対する反応性および検出する際の適切な条件の決定

ハイブリドーマの産生した IgM が Gb3 を特異的に認識する 1A4 であるか否かを, Gb3 を高発現していることが知られている Raji および Gb3 の陰性コントロールとして用いられている K562 を利用して検討した。Raji では, IgM の濃度が高くなるにつれてピークの蛍光強度が強い方にシフトし, IgM を処理した K562 では, 一次抗体未処理のコントロールと大きな差が認められないことから, この IgM は Gb3 を認識する 1A4 であることが示された。一方, 1A4 を処理した K562 では, 濃度によって大きな変化は見られないが, わずかに蛍光強度のポジティブ側へのシフトが認められた (Fig. 2A)。Gb3 が発現していない K562 で若干の反応性が見られるという結果から, この実験に用いた 1A4 の処理条件は適切ではないと考えられたため, より適切な条件を検討した。Gb3 の高感度な検出という目的から, 1A4 の濃度が低すぎると検出感度自体が低下することを考慮して, Fig. 2A の結果から使用濃度を $0.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ に設定した。また, 蛍光標識二次抗体の濃度については, 500 および 2000 倍希釈の 2 種類の濃度に関して検討を行った。その結果, K562 では, どちらの濃度でも 1A4 で処

理後に見られる蛍光強度は, 1A4 未処理のネガティブコントロールと同程度であった (Fig. 2B)。一方, Raji においては, 二次抗体の希釈倍率が高くなるにつれて, 蛍光強度のピークがネガティブコントロールに近づいた。これらの結果から, Gb3 に対する検出感度が保たれ, Gb3 陰性細胞には反応しない条件として 1A4 の濃度を $0.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ および二次抗体を 500 倍希釈で行うと設定して以降の実験を行うことにした。

3. Gb3 発現細胞に対する BGR23 および 1A4 (Gly) の反応性

Raji に発現している Gb3 に対する 1A4 および BGR23 の反応性の違いを, それぞれの濃度を変えて比較検討した。1A4 のサブタイプは IgM であり, BGR23 のそれは IgG であるため, それぞれの検出に用いる標識二次抗体が異なる。したがって, 二種類の抗体の比較検討の際には, それぞれの標識二次抗体のみで処理された細胞で見られる蛍光強度 (negative control) の値をできるだけ揃えて実施した。Raji に対し, 1A4 を $0.6 \mu\text{g}/\text{mL}$, BGR23 を $2.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ で反応させた場合, フローサイトメトリー法で検出されるピークの蛍光強度はほぼ同程度であったが (Fig. 3A), BGR23 を $0.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ とした場合には 1A4 の蛍光強度よりも明らかに低下し (Fig. 3A), この条件で共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析を行っても, フローサイトメトリー

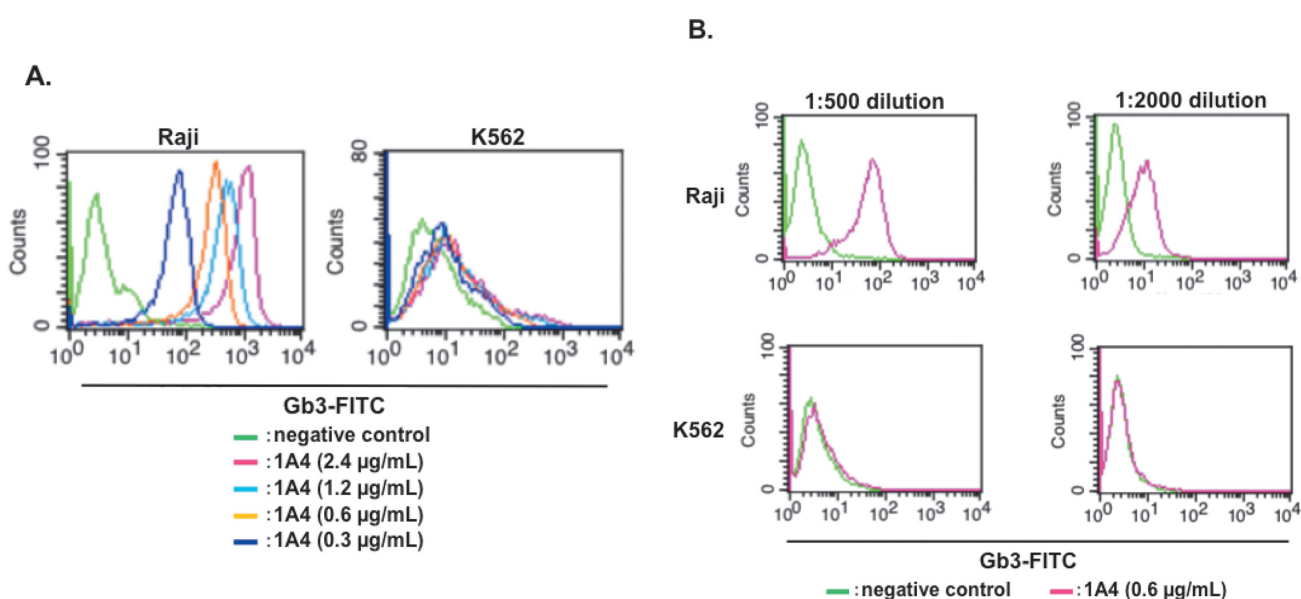


Fig. 2. Reactivity of 1A4 (Gly) against Raji and K562 cells.

(A) Raji and K562 cells were treated with 1A4 (0.3, 0.6, 1.2, and $2.4 \mu\text{g}/\text{mL}$), and then with FITC-conjugated goat anti-mouse IgM Ab (diluted 1 : 200). (B) Cells were stained with 1A4 ($0.6 \mu\text{g}/\text{mL}$) and FITC-conjugated goat anti-mouse IgM Ab (diluted 1 : 500 or 1 : 2000) (red line). Flow cytometric analysis was performed by use of FACScalibur. Green line: fluorescence intensity of control cells.

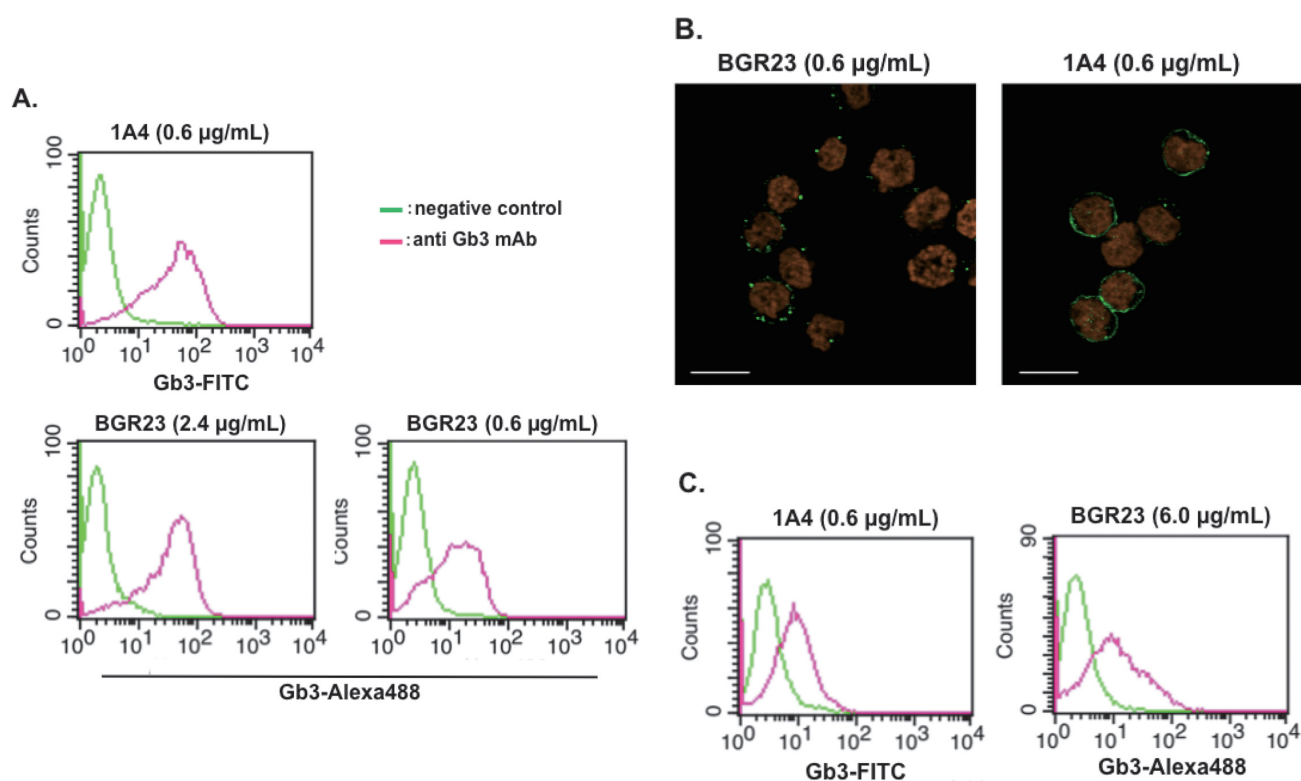


Fig. 3. Comparison of reactivities between BGR23 and 1A4 (Gly) antibodies with Gb3-expressing Raji and TOS1 cells.

(A) Raji cells were treated with 1A4 (0.6 µg/ml) or BGR23 (0.6 and 2.4 µg/ml), and then with FITC-conjugated goat anti-mouse IgM Ab or Alexa488-conjugated goat anti-mouse IgG Ab (red line). (B) Raji cells were stained as described above (green). Nuclei were counterstained with DRAQ5 (orange). Photographs were made by use of a 60X objective lens (scale: 10 µm). (C) TOS1 cells were treated with 1A4 (0.6 µg/ml) or BGR23 (0.6 µg/ml). Flow cytometric analysis was performed by use of FACScalibur.

法と同様に 1A4 において Gb3 を示す強い蛍光が観察された (Fig. 3B). TOS1 は、Gb3 の発現量が Raji よりも低いことが知られている。この細胞に対しては、BGR23 を 6.0 µg/mL にすることで 1A4 (0.6 µg/mL) と同程度のピークの蛍光強度が得られた (Fig. 3C).

4. 1A4 (Gly) の保存状態による反応性の変化

1A4 (Gly) の保存期間における Gb3 に対する反応性の変化を検討したところ、1 カ月間凍結保存を行っても Gb3 に対する反応性に変化は見られなかった (Fig. 4). 1A4 (Gly) は、中和されているものの一般的な抗体の保存に利用されるリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) とは異なるため、バッファー交換により PBS 置換した 1A4 (PBS) を作製して、保存バッファーが Gb3 に対する反応性に影響を与えるか否かを検討した。抗体を精製した直後、4°C で 1 週間および 1 カ月間保存したときの反応性の変化を調べた結果、精製した直後の 1A4 は保存溶液による反応性に違いは見られないが、1 週間および 1 カ月間保存すると 1A4 (PBS) において反応性が低下するという結果が得られた

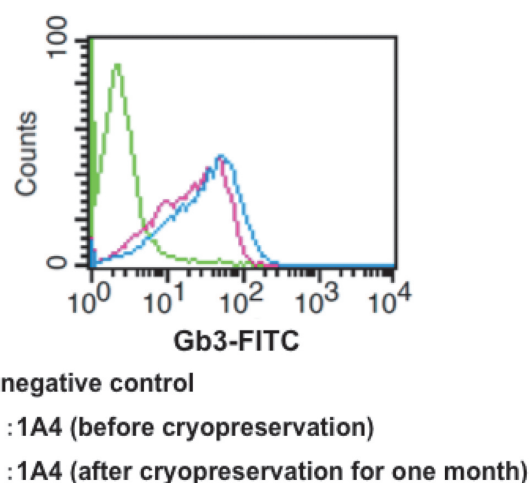


Fig. 4. Storage effect after cryopreservation on a 1A4 reactivity.

Raji cells were treated with 1A4 (0.6 µg/ml), and then with FITC-conjugated goat anti-mouse IgM Ab (diluted 1:500). Flow cytometric analysis was performed as described above.

(Fig. 5A). さらに、保存温度により Gb3 に対する反応性が変化するか否かについても検討したところ、精製してから 4°C で保存した抗体と -80°C 凍結保存した抗体では、どちらの保存温度でも 1A4

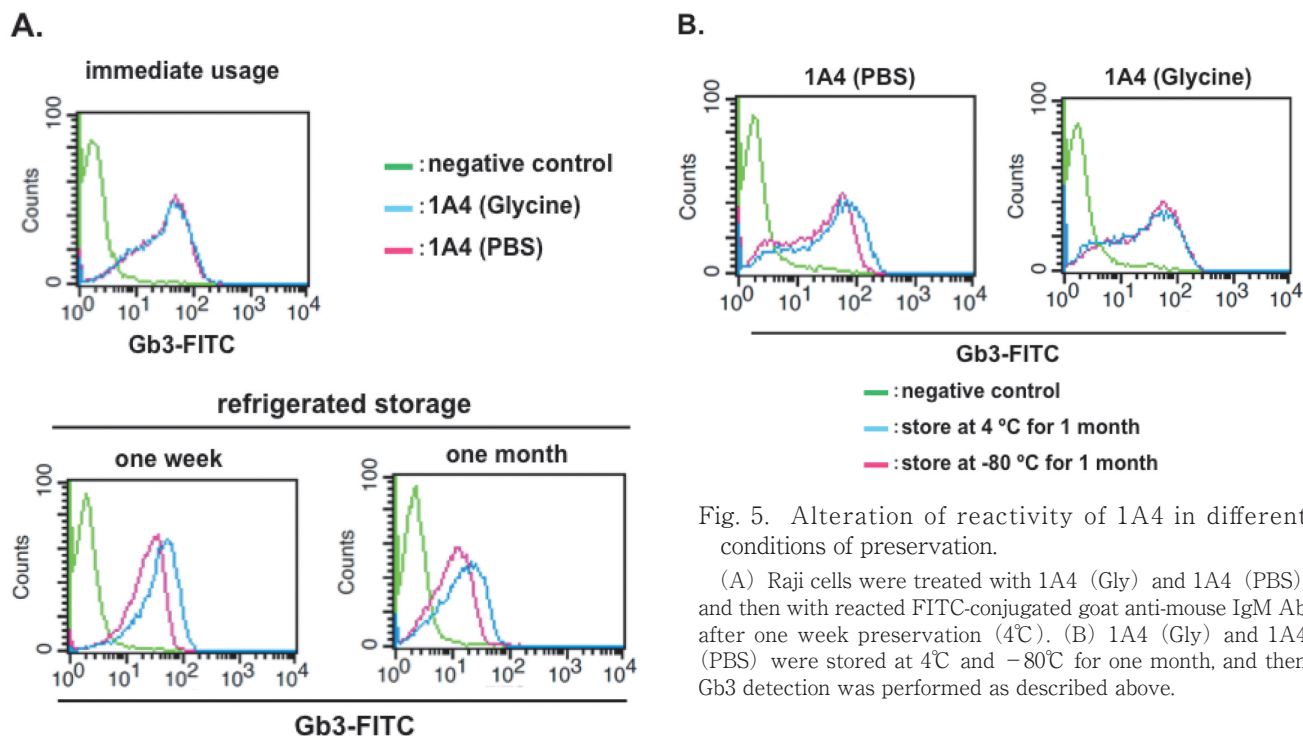


Fig. 5. Alteration of reactivity of 1A4 in different conditions of preservation.

(A) Raji cells were treated with 1A4 (Gly) and 1A4 (PBS), and then with reacted FITC-conjugated goat anti-mouse IgM Ab after one week preservation (4°C). (B) 1A4 (Gly) and 1A4 (PBS) were stored at 4°C and -80°C for one month, and then Gb3 detection was performed as described above.

(Gly) および 1A4 (PBS) において反応性に大きな変化は見られなかった (Fig. 5B).

考 察

タンパク質にはエピトープとなる部位が複数存在し, そのため 1 つのタンパク質に対して複数の抗体が作製される. 同時に, 単一のエピトープに着目した場合でも, それに対して作られる抗体は 1 種類とは限らない. これを抗体の不均一性という. 糖脂質を抗原とする場合, 脂質部分は膜の脂質二重層に埋め込まれていることからエピトープとなることは稀であり, ほぼ糖鎖部分が抗体によって認識されることになる. この場合でも, 同じエピトープを認識する抗体でありながら, 例えば TLC 上での発色 (結合) 様態と免疫沈降させたときに見られる結果が異なるケースが報告されている.¹⁶⁾ 抗体は, 抗原と単に結合するだけでなく, 結合することによって細胞に様々な変化を及ぼすが, もちろんこの変化も抗体の種類によって変わる. さらに, 糖脂質の細胞膜上における局在密度 (一定面積に存在する分子の数) や糖鎖の配向 (膜面に対して直立しているか平行しているか) などによっても抗体の反応性が異なることが報告されている.¹⁷⁾

Gb3 は B 細胞の分化抗原 CD77 として, また,

ヒト赤血球の血液型 Pk 抗原として知られるグロボ系スフィンゴ糖脂質であり, 同時に病原性大腸菌が産生するシガ毒素 (Stx) の受容体として機能していることが知られている. 一方で Gb3 は, 主に海洋生物に多く存在するラムノース結合性レクチン (RBL) の細胞膜レセプターであることが明らかになっているが, 我々が研究している SAL も RBL の一つである. SAL はバーキットリンパ腫 (Raji, Ramos など) に対して細胞増殖抑制効果を示すが, これはアポトーシス誘導のような細胞に対する不可逆的毒性ではなく, G₀G₁ arrest による細胞周期の停滞によるものであることが分かっている.¹¹⁾ がん細胞に対する SAL の効果を検討する上で, 細胞膜 Gb3 の有無や存在形態は決定的なファクターとなる. 事実, Gb3 の発現が認められない K562 は, SAL に対する反応がまったく見られないことから, 良いネガティブコントロール細胞として利用可能である. Table 1 で示されるように Gb3 に対する mAb は, BGR23 および 38-13 の 2 種類のクローンが市販されており, 前者は, *Salmonella minnesota* を抗原として作製され, 後者は Gb3 発現細胞を抗原として作製された抗体であり,^{12,13)} この 2 種はそれぞれ反応性が異なることが実験的に分かっている. Kim らは, ヒト急性単球性白血病細胞株 THP-1 について, BGR23, 38-13 お

Table 1. Characteristics of antibody against Gb3.

Clone name	Isotype	Host species	Immno-gen	Optimized storage buffer	Optimized storage temperature (°C)
BGR23	IgG2b	mouse	Purified Gb3 adsorbed to <i>Salmonella Minnesota</i>	PBS	-80
38-13	IgM	rat	Burkitt's lymphoma cell line Daudi	PBS	-80
1A4	IgM	mouse	Teratocarcinoma	unknown	unknown

よび市販されていない 5B5 を用いて Gb3 の検出に最適な濃度を検討し, BGR23 は 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 38-13 は 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり, 5B5 は最も低い 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であると報告している.¹⁸⁾ この報告と今回我々が精製した 1A4 (Gly) を比較すると, 細胞は異なるもの 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で Gb3 を検出できることから (Fig. 2B), 利用することができる抗体の中では 1A4 が最も有用な抗体ではないかと考えた. 1A4 は IgM クラスの抗体であることから, BGR23 (IgG) と比較し 5 倍の結合価数をもっているが, Gb3 の三糖構造に対する結合を考えた場合, その空間配置や立体障害の関係で全てが結合に関わるとは考えにくい. さらに, 分子量からのモル比を考慮すると, 1A4 の反応性が有意に高いことは明らかである.

マウス IgM は, ヒト IgM と比較すると protein A に対する結合能が低く, その抗体精製には protein L が利用され, 一般的に protein L と IgM 結合させるためには, 4°C で 2~4 時間あるいは一夜処理する必要があるとされている. しかし, 今回利用した Rapid SPiN L カラムは, 高結合改変 protein L 固定化アフィニティーゲルが充填されたカラムであり, 結合に要する時間は 4 分間とかなり短く, 抗体溶出までの所要時間は約 10 分である. このカラムの IgM 精製に対する適性は, Fig. 1 で示した通りであり, 迅速かつ簡便に純度の高い抗体を得る方法を確立できたものと考えている.

今回, 我々は Gb3 に対する反応性がより高い抗体の取得を目的とし, 市販されていない 1A4 と BGR23 と直接比較した. その結果 1A4 は, Gb3 に対する反応性が BGR23 より高い抗体である可能性が示された (Fig. 3A, B). しかしながら, 今回の実験では結合解離定数などの速度論解析は行っておらず, 抗体の反応性を定量化するには至っていない. 今後, 分子間相互作用解析装置等を用いて比較検討することにより, 1A4 の Gb3 に対する反

応性の有意性がさらに明確になると思われる. また, 抗体貯法に関して, 保存温度および一般に mAb の保存溶媒として使用されている PBS と, Rapid SPiN L カラム溶出後の Tris-Glycine 塩酸塩のどちらが適しているかについて検討した結果, どちらの保存溶液でも 4°C あるいは -80°C 保存で反応性に変化は見られなかったことから, 温度そのものは 1A4 の反応性に影響を及ぼさないことが示された (Fig. 5B). 一方, 4°C で 1 週間から 1 カ月保存した場合, PBS に溶解したものが Tris-Gly 塩酸塩よりも反応性が低下した (Fig. 5A). 抗体に限らず, 酵素や増殖因子などの生物活性をもつタンパク質を溶液中で保存する場合は, 比較的高濃度の緩衝液に溶解する方がタンパク質の活性な立体構造を保つ上で都合が良いとされている. 今回得られたデータからも, 凍結保存しない場合, 1 カ月程度であれば, スピナカラム精製・中和後, バッファー交換せずにそのまま保存した方が反応性が低下しないことが分かった. 本研究により, Gb3 の検出に用いる mAb として 1A4 は, ハイブリドーマから迅速簡便に精製可能であり, また, 既存の市販抗体と比較して抗原検出感度の点で優れていること, さらに貯法として, 高塩濃度緩衝液を利用することで, 溶液状態での保存が可能であることが明らかとなり, SAL に関する今後の実験プロトコールに資する結果が得られた.

近年, 抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) を利用して mAb を直接がんの治療に応用しようという試みが数多く検討されている.¹⁹⁾ Gb3 を標的とした研究でも, パーキットリンパ腫細胞に対してアポトーシスを誘導する活性 (1A4) が報告され,²⁰⁾ また Desselle らは, 新たな抗 Gb3 mAb である 3E2 が, *in vitro* および *in vivo* において腫瘍血管新生とがんの成長に抑制的に作用することを報告している.²¹⁾ これらの情報を踏まえ, SAL の抗腫瘍効

果を検討することと並行して、膜糖脂質としての Gb3 にも着目し、その機能についても視野を広げていく必要があると考えている。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Köhler G., Milstein C., *Nature*, **256**, 495–497 (1975).
- 2) Zhang X., Soori G., Dobleman T. J., Xiao G. G., *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **14**, 97–106 (2014).
- 3) Salles G., Barrett M., For R., Maurer J., O'Brien S., Wenger M., Maloney D. G., *Adv. Ther.*, **34**, 2232–2273 (2017).
- 4) Ishida Y., Agata Y., Shibahara K., Honjo T., *EMBO J.*, **11**, 3887–3895 (1992).
- 5) Kasahara K., *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **26**, 79–87 (2014).
- 6) Nores G. A., Dohi T., Taniguchi M., Hakomori S., *J. Immunol.*, **139**, 3171–3176 (1987).
- 7) Tatewaki K., Yamaki T., Maeda Y., Tobioka H., Piao H., Ibayashi Y., Sawada N., Hashi K., *Exp. Cell Res.*, **233**, 145–154 (1997).
- 8) Greenshields K. N., Halstead S. K., Zitman F. M., Rinaldi S., Brennan K. M., O'Leary C., Chamberlain L. H., Easton A., Roxburgh J., Pediani J., Furukawa K., Goodyear C. S., Plomp J. J., Willison H. J., *J. Clin. Invest.*, **119**, 595–610 (2009).
- 9) Sugawara S., Hosono M., Ogawa Y., Takayanagi M., Nitta K., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 424–441 (2005).
- 10) Kawano T., Sugawara S., Hosono M., Tatsuta T., Ogawa Y., Fujimura T., Taka H., Murayama K., Nitta K., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 345–353 (2009).
- 11) Sugawara S., Im C., Kawano T., Tatsuta T., Koide Y., Yamamoto D., Ozeki Y., Nitta K., Hosono M., *Glycoconj. J.*, **34**, 127–138 (2017).
- 12) Kotani M., Kawashima I., Ozawa H., Ogura K., Ariga T., Tai T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **310**, 89–96 (1994).
- 13) Wiels J., Fellous M., Turz T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6485–6488 (1981).
- 14) Nudelman E., Kannagi R., Hakomori S., Parsons M., Lipinski M., Wiels J., Fellous M., Tursz T., *Science*, **220**, 509–511 (1983).
- 15) Laemmli U.K., *Nature*, **227**, 680–685 (1970).
- 16) Iwabuchi K., Nakayama H., *Seikagaku*, **89**, 62–72 (2017).
- 17) Hanashima T., Miyake M., Yahiro K., Iwamura Y., Ando A., Morinaga N., Noda M., *Microb. Pathog.*, **45**, 124–133 (2008).
- 18) Kim M., Binnington B., Sakac D., Fernandes K. R., Shi S.P., Lingwood C. A., Branch D. R., *J. Immunol. Methods*, **371**, 48–60 (2011).
- 19) Ochoa M. C., Minute L., Rodriguez I., Garasa S., Perez-Ruiz E., Inogés S., Melero I., Berraondo P., *Immunol. Cell. Biol.*, **95**, 347–355 (2017).
- 20) Tétaud C., Falguières T., Carlier K., Lécluse Y., Garibal J., Coulaud D., Busson P., Steffensen R., Clausen H., Johannes L., Wiels J., *J. Biol. Chem.*, **278**, 45200–45208 (2003).
- 21) Desselle A., Chaumette T., Gaugler M. H., Cochonneau D., Fleurence J., Dubois N., Hulin P., Aubry J., Birklé S., Paris F., *PLoS One*, **7**, e45423 (2012).