

## 学位論文題名

Insight into the Epitope Structure of  
Anti MUC1/KL-6 Monoclonal Antibody

(抗 MUC1/KL-6 モノクローナル抗体のエピトープ構造の解明)

## 学位論文内容の要旨

タンパク質は、糖鎖付加、リン酸化、メチル化、硫酸化などの翻訳後修飾を受けて成熟した機能を持つことが多い。ゲノム情報からアミノ酸配列情報をもとにして、タンパク質の機能解明を目指したプロテオーム解析が隆盛を極めている。しかしながら、アミノ酸配列に依存するタンパク質の機能解明のみでは不十分であることから、近年では翻訳後修飾におけるタンパク質の機能解析が注目されている。翻訳後修飾の中でも、最も複雑な過程である糖鎖修飾に関しては未だ不明な点が多いが、最近の質量分析機器の進歩とともにグリコーム研究が盛んに行われおり、糖鎖の生物機能解析が徐々に進みつつある。糖鎖研究には、1) 糖鎖遺伝子解析、2) 糖鎖合成技術、3) 糖鎖解析技術の開発が必須であるが、これらの研究からバイオマーカーとして糖鎖と疾患との関連性が注目されるようになってきた。糖鎖機能の特徴は、種特異的であり細胞特異的である場合が多く、また細胞の分化段階特異的である。これらの特徴を反映して、癌、免疫、感染症、再生医療、生殖医療などに対する研究が精力的に行われている。一方で、80年代にモノクローナル抗体技術の発達とともに、盛んに癌細胞に対する特異的抗体の作製が行われてきたが、獲得された特異的抗体の多くは、癌化に伴う糖鎖変化を認識するものである。これらの中には、CEA、CA19-9や Sialyl Tn 抗原などの糖鎖構造の変化に基づいた腫瘍マーカーとして臨床応用されているが、臨床の場だけでなく抗原糖鎖と疾患の関連性の解明を目指して糖鎖の解析や組織分布を行うツールとしても用いられている。これらの診断マーカーとして使用される抗体は、ムチンなどの O 結合型糖鎖をもつ糖タンパク質を抗原として認識する場合が多い。一般的に O 結合型糖鎖の分析は困難とされ、疾患に関連する糖鎖変化の解析が盛んに行われているが、疾患に関連する糖鎖構造の変化を化学構造レベルで解明された例は少ない。この原因として、O 結合型の糖鎖は複雑な糖鎖の組み合わせに加えて、結合様式も多岐にわたることや N 結合型糖鎖の分析に用いられる糖鎖とタンパク質を切断する汎用性の高い方法がないことが挙げられる。著者が所属する西村研究室では化学反応と酵素反応を組み合わせた効率的な糖ペプチド合成技術を確立していることから、今回、その技術を応用して糖鎖構造やその置換位置の規定された 200 種以上の糖ペプチドライブラリーを合成・評価して、疾患特異的な MUC1 抗体のエピトープ構造解析を行った。ターゲットの抗体は診断薬 KL-6 エイテスト<sup>®</sup>として間質性肺炎の診断マーカーとして臨床の場で使用されている。最近でも、種々の癌に対する診断マーカーとしての応用や治療や予後マーカーなどの可能性を示唆する興味ある知見が数多く報告されている。本抗体の認識するエピトープの化学構造レベルでの詳細については不明であった。まず、ムチンの基本構造である

core1,core2,core3,core6 などの糖鎖構造を有する糖アミノ酸によるペプチド合成と種々の糖転移酵素によるケモエンザイマティックな糖鎖伸長反応を組み合わせることにより多様性の高い糖ペプチドライブラリーを構築した。最初にピオチン化 MUC1 糖ペプチドライブラリーを用いて抗 MUC1/KL-6 抗体との反応性を ELISA により評価した。MUC1 配列上の Asp-Thr-Arg の Thr に 2,3-Sialyl T や di sialyl T の糖鎖を置換した糖ペプチドに強い抗体反応が確認された。一方、Asp-Thr-Arg 以外の位置の 2,3-Sialyl T 置換体には抗体反応性が認められなかったことから、抗 MUC1/KL-6 抗体との認識には糖鎖とペプチド部分の両方が重要であることが示唆された。次に正常部位と腫瘍部位との違いを識別する鍵となる Ser/Thr に結合している GalNAc 6 位への糖鎖付加について検証した。競合的 ELISA により 2,3-Sialyl T 体と core2 から誘導可能な GalNAc の 6 位へ GlcNAc、LacNAc、Sialyl LacNAc を付加した糖ペプチドと KL-6 抗体との親和性を比較した。結果、いずれの糖鎖構造も同等の親和性が認められたので、本抗体は正常と癌を識別する鍵と考える GalNAc の 6 位からの分岐構造を認識しないことが明らかになった。また、抗 KL-6 抗体の最小エピトープ構造を明らかにするために、糖ペプチドスクランニングを適応して、Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro の Thr 残基に 2,3-Sialyl T の導入された構造が最小エピトープ構造であることを明らかにした。一方、エピトープ構造を含む高密度に糖鎖が付加した MUC1 糖ペプチドの抗体との親和性を評価した。立体的に嵩高い 6 糖構造の 5ヶ所に付加したペプチドは、大幅に親和性が低下したことから、エピトープ近傍の糖鎖置換の環境が抗体との認識にも影響することが示唆された。以上、糖ペプチドライブラリーを利用することにより、抗 KL-6 抗体の認識するエピトープ構造を解明できたので、本ライブラリーは O 結合型糖鎖を解析する強力なツールであることを実証することが出来た。さらに MUC1 の機能解析を進めるために、血清中に存在する糖タンパクのモデルとしてタンデムリピート MUC1 糖ペプチド合成法を検討した。一般的に分子量の大きな糖ペプチドを合成するペプチド連結方法はチオエステル法や native chemical ligation 法が知られている。様々な糖鎖を有するペプチドライブラリー構築には不向きであることから、これを解決する合成法としてペプチドフラグメントを固相合成する方法を選定した。糖鎖の置換する Ser/Thr 以外のアミノ酸配列を 3 つの分けたフラグメントと糖アミノ酸を組み合わせたタンデムリピート糖ペプチドの構築を目指した。HBTU 等を縮合剤として用いるペプチド固相合成の一般的な反応条件においては、ペプチドフラグメントを縮合させる際に C 末端側のアミノ酸の顕著な異性化が確認された。種々の反応条件を検討した結果、反応溶媒に CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を用いて縮合剤に DIC、反応活性剤として HOObt による条件で異性化がほぼ低減できることを見出した。続いて、本合成法の有用性を実証することと KL-6 抗体の反応性を確認するために、エピトープ構造を 2 箇所を設定して、それ以外の位置は任意の糖鎖で置換した 77 残基タンデムリピート体の合成を行った。その結果、高分解能質量分析で目的の糖ペプチドの生成を確認すると共に、HPLC 分析でシングルピークの目的物を得た。さらには Marfey 法によるアミノ酸のラセミ化検定で異性化が殆ど認められないことから、本合成法の有用性を示すことが出来た。次に KL-6 抗体の反応性を確認するために、合成した 77 残基糖ペプチドに糖転移酵素で処理してシアル酸を 6 カ所伸長させ、酵素処理の前後 2 種類の糖ペプチドに対して KL-6 診断キットを用いて評価した結果、シアル酸を伸長させた糖ペプチドに診断キットの陽性検体である天然の MUC1 糖タンパクと同等の反応が確認された。血清中に存在する KL-6 抗原に近いモデル糖ペプチドとして、診断キットに検出される原理を確認できた。

最後に、本アプローチによる成果は、KL-6 抗体のエピトープ構造の解析に留まらず、糖鎖抗体の診断性を議論するうえで重要な知見を得た。これらの手法や知見は抗体医薬や癌ワ

クチンなどの医薬品創製に繋がる研究成果と考える。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎  
副 査 教 授 出 村 誠  
副 査 教 授 綾 部 時 芳  
副 査 教 授 菅 原 一 幸  
副 査 准教授 門 出 健 次

学 位 論 文 題 名

## Insight into the Epitope Structure of Anti MUC1/KL-6 Monoclonal Antibody

(抗 MUC1/KL-6 モノクローナル抗体のエピトープ構造の解明)

近年、糖鎖構造の変化と疾患との関連性に関する免疫学的な研究が盛んに行われている。しかし、その多くは、生化学的手法による糖鎖分析によるものが多く、構造変化と疾患との関連性を化学構造レベルで解明した例は少ない。糖鎖の複雑さとその合成の難易度ゆえに精密な有機合成を応用した網羅的な解析の実施が難しいためであり、現状これに適した合成法の開発が待たれている状況にある。

本論文は、このような難易度の高い糖鎖合成に関して、有機と酵素反応を組み合わせることで精密に化学構造の規定された糖ペプチドライブラリを構築した。これら化合物を用いた評価系により網羅的なスクリーニングを実施して、診断薬として臨床応用されている抗体に関する認識する構造について詳細な解析した。糖鎖構造と疾患との関連性を明らかにする有益な知見を得ることを目的としたもので、糖鎖生物学上極めて意義の大きいものである。

本論文は、診断薬として応用されている抗 MUC1/KL-6 抗体の認識構造を極めて精密に化学構造レベルでの解析を行った。その内容としては、著者が所属する西村研究室では化学反応と酵素反応を組み合わせた効率的な糖ペプチド合成技術を確認していることから、今回、その技術を応用して糖鎖構造やその置換位置の規定された 200 種以上の糖ペプチドライブラリを合成・評価して、疾患特異的な MUC1 抗体のエピトープ構造解析を行った。ターゲットの抗体は診断薬 KL-6 エイテスト®として間質性肺炎の診断マーカーとして臨床の場で使用されている。最近でも、種々の癌に対する診断マーカーとしての応用や治療や予後マーカーなどの可能性を示唆する興味ある知見が数多く報告されている。本抗体の認識するエピトープの化学構造レベルでの詳細については不明であった。まず、ムチンの基本構造である core1, core2, core3, core6 などの糖鎖構造を有する糖アミノ酸によるペプチド合成と種々の糖転移酵素によるケモエンザイマティックな糖鎖伸長反応を組み合わせることにより多様性の高い糖ペプチドライブラリを構築した。最初にビオチン化 MUC1 糖ペプチドライブラリを用いて抗 MUC1/KL-6 抗体との反応性を ELISA により評価した。MUC1 配列上の Asp-Thr-Arg の Thr に 2,3-Sialyl T や di sialyl T の糖鎖を置換した糖ペプチドに強い抗体反応が確認された。一方、Asp-Thr-Arg 以外の位置の 2,3-Sialyl T 置換体には抗体反応性

が認められなかったことから、抗 MUC1/KL-6 抗体との認識には糖鎖とペプチド部分の両方が重要であることが示唆された。次に正常部位と腫瘍部位との違いを識別する鍵となる Ser/Thr に結合している GalNAc6 位への糖鎖付加について検証した。競合的 ELISA により 2,3-Sialyl T 体と core2 から誘導可能な GalNAc の 6 位へ GlcNAc, LacNAc, Sialyl LacNAc を付加した糖ペプチドと KL-6 抗体との親和性を比較した。結果、いずれの糖鎖構造も同等の親和性が認められたので、本抗体は正常と癌を識別する鍵と考える GalNAc の 6 位からの分岐構造を認識しないことが明らかになった。また、抗 KL-6 抗体の最小エピトープ構造を明らかにするために、糖ペプチドスクランニングを適応して、Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro の Thr 残基に 2,3-Sialyl T の導入された構造が最小エピトープ構造であることを明らかにした。一方、エピトープ構造を含む高密度に糖鎖が付加した MUC1 糖ペプチドの抗体との親和性を評価した。立体的に嵩高い 6 糖構造の 5 ヶ所に付加したペプチドは、大幅に親和性が低下したことから、エピトープ近傍の糖鎖置換の環境が抗体との認識にも影響することが示唆された。以上、糖ペプチドライブラリーを利用することにより、抗 KL-6 抗体の認識するエピトープ構造を解明できたので、本ライブラリーは O 結合型糖鎖を解析する強力なツールであることを実証することが出来た。さらに MUC1 の機能解析を進めるために、血清中に存在する糖タンパクのモデルとしてタンデムリピート MUC1 糖ペプチド合成法を検討した。一般的に分子量の大きな糖ペプチドを合成するペプチド連結方法はチオエステル法や native chemical ligation 法が知られている。様々な糖鎖を有するペプチドライブラリー構築には不向きであることから、これを解決する合成法としてペプチドフラグメントを固相合成する方法を選定した。糖鎖の置換する Ser/Thr 以外のアミノ酸配列を 3 つの分けたフラグメントと糖アミノ酸を組み合わせたタンデムリピート糖ペプチドの構築を目指した。HBTU 等を縮合剤として用いるペプチド固相合成の一般的な反応条件においては、ペプチドフラグメントを縮合させる際に C 末端側のアミノ酸の顕著な異性化が確認された。種々の反応条件を検討した結果、反応溶媒に CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を用いて縮合剤に DIC、反応活性剤として HOOBt による条件で異性化がほぼ低減できることを見出した。続いて、本合成法の有用性を実証することと KL-6 抗体の反応性を確認するために、エピトープ構造を 2 箇所を設定して、それ以外の位置は任意の糖鎖で置換した 77 残基タンデムリピート体の合成を行った。その結果、高分解能質量分析で目的の糖ペプチドの生成を確認すると共に、HPLC 分析でシングルピークの目的物を得た。さらには Marfey 法によるアミノ酸のラセミ化検定で異性化が殆ど認められないことから、本合成法の有用性を示すことが出来た。次に KL-6 抗体の反応性を確認するために、合成した 77 残基糖ペプチドに糖転移酵素で処理してシアル酸を 6 カ所伸長させ、酵素処理の前後 2 種類の糖ペプチドに対して KL-6 診断キットを用いて評価した結果、シアル酸を伸長させた糖ペプチドに診断キットの陽性検体である天然の MUC1 糖タンパクと同等の反応が確認された。血清中に存在する KL-6 抗原に近いモデル糖ペプチドとして、診断キットに検出される原理を確認できた。

これを要するに、著者は、臨床の場で応用されている診断性の抗体について、認識構造を詳細に解析した手法は糖鎖生物学においても貢献の大きいところであり、疾患発症に伴う糖鎖構造の関連性を化学構造レベル明らかにした数少ない成功例の一つである。得られた知見は、疾患の診断性のみならず治療薬の創製に結びつくところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。