

C209

オープンサンドイッチ免疫測定法によるがん細胞特異的糖鎖の検出

(東大工・化生) ○ (学) 大森 健太・(東大院工・化生) (正) 董 金華・
(信州大農) 伊原 正喜・(東大院工・化生) (正) 上田 宏*

1. 緒言

乳がん, 小腸がん, 膵臓がんなど多くの上皮がん細胞表面には、健常細胞と異なる糖鎖結合タンパク質 TAG-72 が存在する。近年, これらのがんの診断治療において TAG-72 認識抗体が注目されている。さらに TAG-72 特異的糖鎖であるシアリル Tn (sTn)は, 血中ガンマーカークとして有用であることが知られている。以上より, 今回我々は sTn を特異的に認識することが知られるヒト化抗体 hCC49 を用い, 低分子抗原の高感度検出に適したオープンサンドイッチ酵素免疫測定法(OS-ELISA)¹⁾が実施できるかどうか検討したので報告する。

2. 実験方法と結果

hCC49 の V_H/V_L 遺伝子は文献²⁾より設計して合成した。これを, 一般的なファージ提示ベクター pIT2 (挿入により V_H-V_L が Diabody として提示される), および最近我々が開発した抗原結合能検討と OS-IA の両方に使える Fab 提示ファージ提示用ファージミドベクター pDong1³⁾(Fig. 1)に挿入し, 大腸菌 TG-1 を形質転換, ヘルパーファージ KM13 を感染させ Diabody および Fab 提示ファージを調製した。

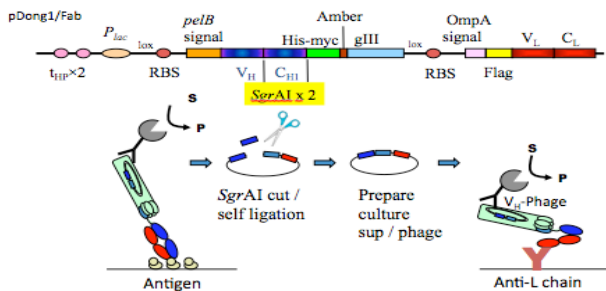


Fig. 1 Schematic structure of pDong1 and displayed antibody fragments for selection and OS-ELISA

次に, sTn を持つ蛋白質 muc1 をプレートに固定化し, phage ELISA を行った。この結果, hCC49Diabody および Fab のファージ上での提示(α -myc で検出)と, これらの断片の抗原 muc1 結合能を確認できた(Fig. 2)。

次に, muc1 の有無における抗体 V_H/V_L 間相互作用を CH1 ドメイン遺伝子除去処理後の pDong1 を用いたファージ OS-ELISA によって検討した (Fig. 3)。この結果, 抗原の有無により若干の信号変化が認められたが抗原非存在時の相互作用がやや強い傾向が認められた。

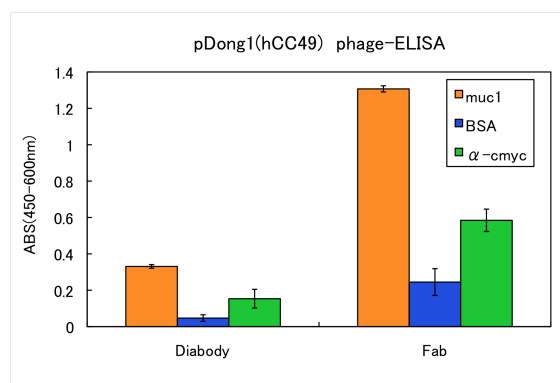


Fig. 2 Result of phage ELISA

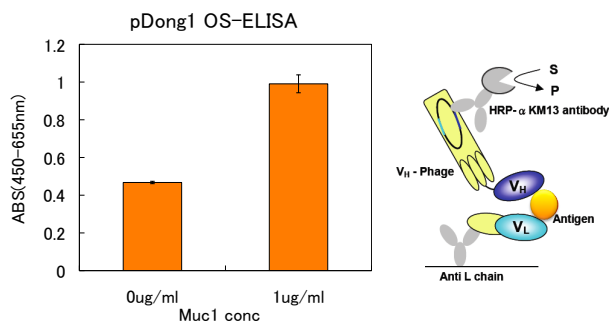


Fig. 3 OS phage ELISA による muc1 の検出

3. 考察

ファージ ELISA で固定化 BSA に対してやや結合が認められたが, 混入する血清蛋白質の影響とも考えられる。今後糖鎖除去処理などを更に検討したい。既往の研究より, V_H の V_L 相互作用残基(H39)への変異導入により両者の相互作用を下げられる事が知られている⁴⁾。現在, これらの変異体を作製し, OS-ELISA による検討を行っている。

4. 結言

TAG-72 特異的抗体のファージ提示に成功し, OS-ELISA における若干の信号変化を得ることができた。

参考文献

- 1) Ueda, H et al., *Nat. Biotechnol.* **14**, 1714-1719 (1996)
- 2) Yoon, SO et al. *J. Biol. Chem.* **281**, 6985-6992 (2006)
- 3) Dong, JH et al., *Anal. Biochem.* **386**, 36-44 (2009)
- 4) Masuda, K et al., *FEBS J.* **273**, 2184-2194 (2006)

*Email: hueda@chembio.t.u-tokyo.ac.jp