

シアリル Tn 抗原糖鎖に結合する一本鎖抗体の調製と機能解析

(鹿児島大・院理工) ○橋口 允紀・吉松 幸美・松林 由真・橋口 海斗・増永 成菜・新地 浩之・若尾 雅広・伊東 祐二・隅田 泰生

Preparation and functional analysis of single chain antibodies bound to sialyl Tn antigen sugar chains (*Grad. School. Sci. and Eng., Kagoshima Univ.*) ○Mitsuki Hashiguchi, Komi Yoshimatsu, Yumi Matsubayashi, Kaito Hashiguchi, Nana Masunaga, Hiroyuki Shinchi, Masahiro Wakao, Yuji Ito, Yasuo Suda

Cancer cells express aberrant levels and/or types of sugar chains named as tumor-associated carbohydrate antigens (TACAs) on their cell surface. *N*-Glycolylneuraminic acid-containing Tn (Neu5Gc-Tn) antigen is one of the TACAs and is an ideal target for developing novel anticancer agents. In the previous study, we established a sugar chain binding single chain variable fragment antibody (scFv) as a novel molecularly targeted agent for adult T-cell leukemia using fiber type Sugar Chip (fiSC) and a phage display method. In this study, we applied the technology to prepare scFvs binding to Neu5Gc-Tn sugar chain and analysed their binding potency to various cancer cell membrane proteins.

Keywords : *Tumor-associated carbohydrate antigens; Phage display method;*

細胞のがん化に伴い、がん関連糖鎖抗原と呼ばれる異常型糖鎖が発現する。*N*-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc) を有するシアリル Tn 抗原は、腫瘍特異性の高い糖鎖抗原であり、新たな腫瘍マーカーとして期待されている。我々はこれまでに、独自のファイバー型シュガーチップ (fiSC)¹⁾とファージディスプレイ法を用いて、がん細胞表層の糖鎖に結合する一本鎖抗体 (scFv) を得る手法を確立している²⁾。本研究では、有機化学的手法で合成した Neu5Gc-Tn 抗原糖鎖を固定化した fiSC (Neu5Gc-Tn-chip) を用いて、Neu5Gc-Tn 抗原糖鎖に優先的に結合する一本鎖抗体 (scFv) を調製し、得られた scFv のがん細胞由来膜タンパク質への結合性を解析した。

Neu5Gc-Tn-chip を用いて、scFv 提示ファージをスクリーニングし、計 23 個のファージクローンを得た。これらのファージミドの scFv 発現遺伝子を pET-26b(+) vector に組換え、大腸菌 Lemo21(DE3)株を用いて可溶性の scFv の発現を誘導した。アミノ酸配列の異なる 17 個の可溶性の scFv が得られた。これらの scFv の糖鎖結合性を、種々のシアル酸糖鎖を固定化した fiSC を用いて評価したところ、3 個の scFv がシアリル Tn 抗原糖鎖に結合性を示した。次いで、HepG2 細胞や CaSki 細胞から調製した細胞膜タンパク質画分をプラスチックプレートに固定化し、上記 3 個の scFv の結合性を ELISA 法によって評価した。その結果、いずれの scFv も細胞に依存しかつ scFv の濃度依存的な結合活性が観測され、さらに膜タンパク質画分を種々のグリコシダーゼで処理すると、scFv の結合活性は減少した。以上から、得られた 3 つの scFv は細胞膜タンパク質のシアル酸糖鎖に結合することが示唆された。

1) Wakao, M., *et al.*, *Anal. Chem.* **2017**, *17*, 1086-1091.

2) Muchima, K., *et al.*, *J. Biochem.* **2018**, *163*(4), 281-291.