



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                                                                                       |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | Study on Anti-MUC1 Monoclonal Antibody for Precise Recognition of Glycopeptidic Neoantigen: Approach from Epitope Defined Strategy [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s)           | 涌井, 初                                                                                                                                                                                                 |
| Description         | 担当：理学研究院図書室                                                                                                                                                                                           |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                                                                                 |
| Degree Name         | 博士(生命科学)                                                                                                                                                                                              |
| Dissertation Number | 甲第14393号                                                                                                                                                                                              |
| Issue Date          | 2021-03-25                                                                                                                                                                                            |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/82019">https://hdl.handle.net/2115/82019</a>                                                                                                                     |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>                                                                                               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                                                       |
| File Information    | Hajime_Wakui_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                                                                                                                    |



# 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士 (生命科学) 氏 名 涌井 初

## 学 位 論 文 題 名

Study on Anti-MUC1 Monoclonal Antibody for Precise Recognition of Glycopeptidic  
Neoantigen: Approach from Epitope Defined Strategy  
(エピトープ規定戦略を用いた、糖ペプチドネオ抗原の正確な認識のための抗 MUC1 モ  
ノクローナル抗体の研究)

糖鎖修飾はタンパク質に広く見られる翻訳後修飾の 1 つである。タンパク質は DNA の遺  
伝情報に基づいて翻訳・発現される一方で、糖鎖修飾はゴルジ体や小胞体において DNA 非  
依存的にランダムな過程で生じる。それゆえ糖鎖修飾は多様性に富み、種や環境、疾患の有  
無など、様々な要因によってダイナミックにその構造が変化する。例えば、ムチン型 O 結  
合型糖鎖修飾は、ガン細胞において不完全で短いものとなる。これらの糖鎖修飾の変化はバ  
イオマーカーとして疾患の診断にも利用され、治療への応用も期待されている。

分子を簡便に認識・検出する一般的なプローブとして抗体がある。抗体は脊椎動物の液性  
免疫に関わるタンパク質であり、人工的に任意の分子に結合する抗体を作成することが可  
能である。膵臓がんのバイオマーカーである CA 19-9 は Sialyl lewis A という糖鎖であり、  
間質性肺炎のバイオマーカーである KL-6 は MUC1 というムチン糖タンパク質に存在する  
シアリル T 構造を含む糖ペプチドである。いずれもそれぞれに特異的な抗体によって検出  
され、診断薬として使用されている。また、糖ペプチドを認識する抗 MUC1 抗体を用いた  
抗がん剤の研究も、近年盛んに行われている。このように糖鎖修飾を識別する抗体は疾病の  
診断・治療、双方の用途においてニーズが高い。さらに生命科学研究を行う上でも、部位特  
異的な特定の糖鎖修飾を検出する用途として非常に重要である。以上の背景から、これまで  
糖鎖/糖タンパク質を認識する抗体の作成が試みられてきた。一方で、その数は限られてお  
り、実用に足りうる特異性やアフィニティが十分に高いものは希少であるという課題があ  
る。この課題を克服するため、本研究室では合成糖ペプチドを用いたユニークな抗体作製  
法を考案してきた。この手法は、均一な抗原を免疫することができるため、特定の糖ペプ  
チド構造に対して高い選択性を持つ抗体の取得を期待できる。本学位論文では上記のストラ  
テジを用いて作製された抗体について、構造・機能を解析することで、新規抗体の評価およ  
び、当研究室の抗体作製手法の有効性を証明することを目的とする。

学位論文 2 章では糖ペプチドを認識する抗 MUC1 抗体のエピトープ・機能解析、及び構  
造解析を報告する。抗体の標的である MUC1 は乳がん、卵巣がんなど多くの上皮細胞ガン  
で過剰発現しており、抗体医薬品と有望なターゲットである。新規抗体 SN-10X シリーズ  
は、MUC1 糖ペプチド抗原をキャリアタンパク質とともに免疫し、「糖ペプチドに結合」、  
「裸のペプチドには結合しない」、というセレクションを行い得られた抗体である。言い換  
えれば糖ペプチドのみを認識するようエピトープを事前に設計した抗体 (Epitope Defined  
antibody) であり、研究室独自の手法で得られた抗体である。

まず、21 種類のペプチド鎖および糖鎖の異なる MUC1 糖ペプチドライブラリを作成し、

マイクロアレイを用いたエピトープマッピングを行った。その結果、SN-101 は確かに MUC1 糖ペプチドを認識しており、糖鎖またはペプチドのどちらも結合に必須であることが示された。

同時に、SN-101 抗体の糖ペプチド複合体の構造解析を試みた。抗体は Ficin プロテアーゼで Fab 化し、ProteinG カラムによって Fab のみを精製した。その際、Ficin 処理によって抗体の Fc 領域と ProteinG の親和性が低下するという現象を利用したユニークな精製手法を発見した。結晶化条件の検討の末、SN-101Fab と糖ペプチドとの複合体および non-Liganded 体の結晶を取得し、1.77Å、2.40Å の分解能で結晶構造を決定した。SN-101 は糖ペプチドの VTSAPDT (Tn) 領域をエピトープとして認識し、糖鎖を末端に位置させる特徴的な結合様式を持っていることが明らかとなった。また、SN-101 は Tn 抗原(GalNAc)の 4 位と 6 位の水酸基と強い水素結合を形成しており、当時としては初の糖とペプチドの双方を認識する抗 MUC1 抗体の構造であった。これらの結果は、先のエピトープマッピングで得られた結果とほぼ矛盾がなかった。加えて、興味深いことに、糖ペプチドの溶液中の構造と共結晶中の糖ペプチドのコンフォメーションが非常によく一致していた。したがって、SN-101 は糖ペプチドコンフォメーションをそのまま認識している抗体であることが示唆された。

最後に ITC (等温滴定型カロリメトリー) を用い、抗原の糖鎖の有無が結合に際してどのようなエネルギー的な寄与をしているかを調べた。SN-101 は抗原に糖鎖が付加することで大きなエンタルピー的な寄与を得ており、これは糖鎖の水酸基に対する強い水素結合に起因すると考えられた。一方、エントロピー面は、糖鎖付加によって結合に不利に働いていた。これは結合によるグリコシド結合角の変化や、より長い領域が結合に関わることによって抗原と抗体双方の自由度が低下していることが原因であると考えられた。

本学位論文では、合成化学的手法を用いて均一糖ペプチドを用意し、様々な視点から糖タンパク質およびそれらを認識する抗体の解析を行った。これらの一連の結果から、糖ペプチド特異的な抗体を得るストラテジーの有用性を証明することができた。今回の標的である O-結合型糖鎖修飾は、MUC1 やムチンのみならず様々なタンパク質で見られる。また O-糖鎖修飾部位はタンパク質の最も外側に位置し、二次構造を取らない柔軟な構造を有していることが多いため、合成糖ペプチドを用いた抗体作成法と相性がよいと考えられる。したがって、本研究で有効性を証明した抗体作成法は、広く一般的な O-結合型糖鎖修飾部位をターゲットとする抗体作製に有効であると言え、本研究結果が今後の創薬ならびに糖鎖修飾とタンパク質のさらなる理解に繋がることを期待する。さらに、今回明らかにした糖ペプチドを認識する抗体の構造は希少であり、今後の抗体設計やエンジニアリングの有望な分子基盤となるだろう。また、SN-101 抗体は糖ペプチドを免疫して得られた抗体として初の結晶構造である。糖ペプチド誘導体を免疫するガンワクチンの研究も盛んであり、本研究で得られた糖ペプチドの免疫から構造解析までの一連の知見が今後のガンワクチンのデザインに生かされることにも期待する。