

生殖腺に対するモノクローナル抗体の作製とその性状解析

横山 智哉子*

Generation and characterization of antibodies against gonad

Chikako YOKOYAMA*

ABSTRACT : In a mouse, the genital ridge develops around embryonic day (E) 9.5 on the ventral surface of the mesonephros. The genital ridge is identified morphologically around E10.5. At E11.5 to E12.5, the adrenogonadal primordium on the genital ridge separates into the adrenal cortex and the gonad cell populations. However, the precise mechanism of the development is largely unknown. In this study, we report on the production and characterization of a series of monoclonal antibodies (MAbs) against gonad. The antibody, designated as MAb 5B5, yielded the strong signal on germ cells in immunofluorescence staining using the mouse embryo gonad section. Moreover, immunofluorescence analysis using E12.5 mouse various tissue sections revealed that MAb 5B5 also recognizes the cells in neural tube, ventricular zone of cerebral cortex, a part of the epithelial cells, in which tissue-specific stem cells are present abundantly. Furthermore, MAb 5B5 recognized the mouse and human ES and iPS cells. From these findings, it was concluded that MAb 5B5 recognizes stem cells-associated antigen. On the other hand, we found that this antigen expresses cancer cell lines and human tumor tissue. These results suggest that MAb 5B5 may recognize cancer stem cells.

Keywords : monoclonal antibody, stem cells, cancer

(Received September 20, 2013)

1. はじめに

将来、精子や卵子になる生殖細胞や組織のもとになる幹細胞に関する研究は、生命現象を理解する上で重要であるばかりでなく、再生医療やがんなど様々な研究分野で幹細胞に関する研究が活発に行われており、様々な疾患の原因解明や治療法の開発につながると期待される。しかし、分化能維持機構など、幹細胞の機能については不明な点が数多く残されている。

複雑な細胞機能メカニズムを解き明かすためには、個々の細胞特異的に発現する分子の探索が重要な鍵を握る。これらの解析のため、各生体分子に特異的に結合するモノクローナル抗体の利用は、その生体分子の時空間的な発現を追跡できるなど、多くの利点がある。さらにモノクローナル抗体は細胞性疾患の臨床検査や抗体医療

への応用が可能である。

マウスにおいて、生殖隆起は胎生 9.5 日目(E9.5)頃に腹腔に面した一層の体腔上皮細胞が増殖の後に生殖隆起内部への陥入により発生する。形態的にはE10.5 頃にはじめて確認される。E11.5 からE12.5 にかけて、生殖隆起内の副腎-生殖腺原基は2つの細胞集団に分かれる。1つの集団は副腎皮質になり、もう一方は生殖腺になる。これ以降、生殖腺では雌雄で異なった構造的な性分化が起こる。ほとんどの哺乳類の雌雄の性はSryにより決定される¹⁻³⁾。Sry遺伝子はY染色体上に存在し、雄のみに発現する。この時期、雄ではSryの働きにより、精巢化が開始される。精巢化ではセルトリ細胞が生殖細胞の周りに局在し、生殖細胞をその中に集める。ライディッヒ細胞はE12.5 から精巢に現れる。セルトリ細胞、ライディッヒ細胞とも、機能的に生殖細胞を支える細胞である。E12.5 の生殖腺において、Ad4BP/SF-1 は雄ではセルトリ細胞とライディッヒ細胞に、雌では濾胞細胞、卵胞膜細胞、黄体ホルモ

* : 物質生命理工学科助教(4koyama@st.seikei.ac.jp)

ン産生細胞や間質細胞刺激ホルモン産生細胞に発現している^{4,5)}。

本研究では、生殖腺の発生・成熟機構の解明や、生殖細胞や多能性幹細胞などの幹細胞研究に貢献し将来的には細胞性疾患の治療に役立つツールの開発を目的として、生殖細胞が成熟する場である生殖腺をターゲットにモノクローナル抗体を作製した。そして、生殖腺、生殖細胞、神経幹細胞、多能性幹細胞、がん細胞など各種細胞を用いて抗体の性状解析を行った。

2. ラット腸骨リンパ節法によるモノクローナル抗体の作製

Ad4BP/SF-1(Ad4 binding protein/steroidogenic factor-1)は生殖や内分泌制御に重要な役割を果たす核内受容体であり、内分泌組織の発生に必須の因子である^{4,6)}。生殖は生物の根幹をなす機能であり、その生殖組織の発生メカニズムの解明は生物のしくみを理解する上で非常に重要である。またそのメカニズムの解明により不妊症など生殖関連疾患の病因解明や治療法の開発が期待できる。生殖腺の発生ではAd4BP/SF-1が運命決定因子であるが、この分子がどのように発現誘導され、各細胞の分化を導くかは不明な点が多い。Ad4BP/SF-1作用機構を分子レベルで明らかにするためには、Ad4BP/SF-1を特異的に認識するツールが必要不可欠である。

Ad4BP/SF-1の機能解析のためのツールとして、Ad4BP/SF-1に対するモノクローナル抗体をラット腸骨リンパ節法を用いて作製した^{7,9)}。作製した抗Ad4BP/SF-1モノクローナル抗体の性状解析のため、E12.5マウス胎仔生殖腺切片を用いた免疫組織染色を試みた。切片に一次抗体として抗Ad4BP/SF-1ラットモノクローナル抗体(MAb 1B1)と抗Ad4BP/SF-1ラビットポリクローナル抗体を反応させた。蛍光色素を結合させた二次抗体を用いて

可視化したところ、MAb 1B1はラビットポリクローナル抗体^{6,10)}と同様に、生殖腺内のセルトリ細胞とライディッヒ細胞の細胞核を認識した(Figure 1)。免疫組織染色は通常難しいと考えられており、市販の抗体でも免疫組織染色に適した抗体は多くないが、MAb 1B1は組織切片においても内在性Ad4BP/SF-1を検出できることがわかった。

本研究では、生殖腺運命決定因子Ad4BP/SF-1に特異的に結合するモノクローナル抗体を樹立し、その性状解析を行った。樹立した抗体はELISA、ウェスタンブロッティング、免疫細胞染色、免疫組織染色など様々な実験に用いることができる優れた特性を示した。このように新しく樹立した抗体はAd4BP/SF-1を発現する組織の発生や機能の分子メカニズム研究の進展に大きく貢献するであろう。

3. モノクローナル抗体ショットガンアプローチを用いたマウス生殖細胞を認識する抗体の作製と性状解析

モノクローナル抗体はリンパ球とミエローマ細胞間の細胞融合により樹立され、生化学・分子生物学的実験手法に欠かせない有用なツールである。これまで多くの生物学者が“モノクローナル抗体ショットガンアプローチ”と呼ばれる、組織抽出液などの無作為な抗原に対するモノクローナル抗体作製法を用いて、新規分子の同定に成功している。この方法では、事前に抗原に関する分子情報がなくとも抗体の樹立が可能である。例えば、本アプローチ法でカドヘリンやイムノグロブリンスーパーファミリーなどの重要な因子が同定された^{11,12)}。

生殖細胞特有の機能維持に働く分子は、生殖細胞特異的に発現しているはずである。その分子が同定できれば、多分化能など生殖細胞機能の解明に貢献できる。そこで

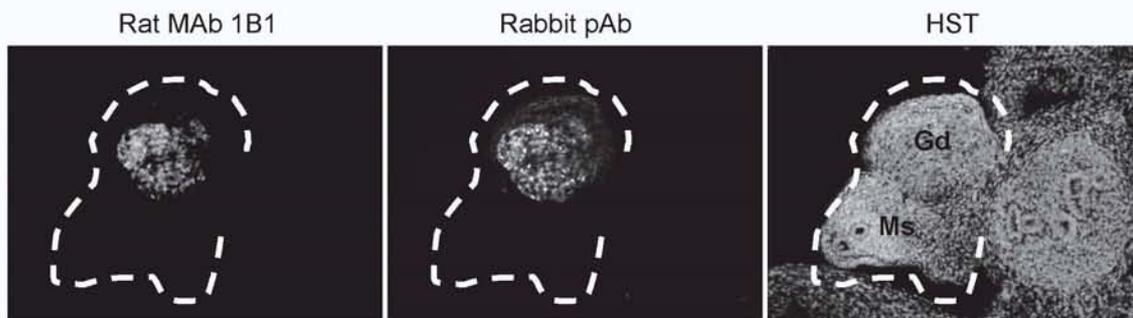


Figure 1. Indirect immunofluorescence of E12.5 mouse gonad section using MAb 1B1. The section was double stained with MAb 1B1 and rabbit anti-Ad4BP/SF-1 polyclonal antibody (pAb) and stained with Hoechst dye (HST). MAb 1B1 and rabbit anti-Ad4BP/SF-1 pAb were detected with goat Alexa 546-conjugated anti-rat IgG and goat Alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG, respectively. Gd, gonad; Ms, mesonephros.

本研究では、生殖細胞に発現する分子を探索するため、マウス生殖腺組織を抗原として、モノクローナル抗体ショットガンアプローチを行った。そして、マウス始原生殖細胞を認識する複数のモノクローナル抗体の樹立に成功した。さらにこの中の1つが、始原生殖細胞のみならず、神経幹細胞を認識することを明らかにした¹³⁾。この抗体は分化能を持つ細胞、すなわち幹細胞で機能する分子を認識すると考えられた。

3. 1 モノクローナル抗体ショットガンアプローチ

マウス胎仔生殖腺に対するモノクローナル抗体をラット腸骨リンパ節法を用いて作製した。生殖腺組織をE12.5マウス胎仔から取り出し、その懸濁液を抗原としてラットの両後足肉球に一回免疫した。2週間後、ラットより肥大したリンパ節を取り出し、リンパ球を回収した。リンパ球とマウスミエローマSP2細胞を融合させ、約4000クローンの融合細胞(ハイブリドーマ)を得た。これらハイブリドーマの培養上清について、E12.5マウス胎仔生殖腺切片を用いた免疫組織染色により、スクリーニングを行った。この中で、5クローンが生殖細胞と思われる細胞群を認識したが、それぞれの染色パターンの違いが明らかとなった。その中で、MAb 5B5と名付けたクローンは免疫組織染色で最も強いシグナルが観察された(Figure 2)。よって、この後の解析にはMAb 5B5を用いた。抗体のクラス決定をラットisotyping kitを用いて行ったところ、MAb 5B5はIgM(κ)であった。

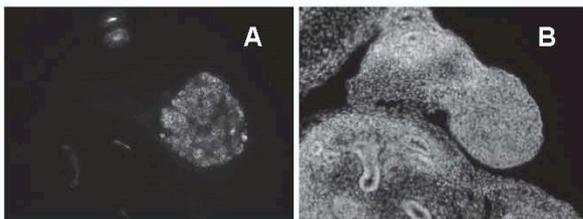


Figure 2. Indirect immunofluorescence of E12.5 mouse gonad section using MAb 5B5. MAb was detected with Alexa 488-conjugated anti-rat IgG (A) and stained with DAPI (B).

3. 2 マウス生殖細胞を認識する抗体の性状解析

始原生殖細胞は強いアルカリフォスファターゼ活性を有すると知られている。MAb 5B5が認識する細胞群が始原生殖細胞であると確認するため、E10.5マウス胎仔生殖隆起切片について、MAb 5B5を用いた免疫染色をすると同時にアルカリフォスファターゼ活性染色を試みたところ、MAb 5B5の染色シグナルはアルカリフォスファターゼ活性染色のシグナルと一致した¹³⁾。よってMAb 5B5が生殖腺で認識する細胞群が始原生殖細胞であると確認

できた。

次に、MAb 5B5を用いた免疫組織染色によってE12.5マウス胎仔の様々な組織でMAb 5B5がどのような細胞を認識するかを解析したところ、神経管や一部の上皮で陽性細胞が存在した。そこでマウス胎仔神経系組織での免疫染色の詳細な解析を行った。大脳皮質切片をMAb 5B5とPan-cadに対するラビットポリクローナル抗体で二重染色した。抗Pan-cad抗体は神経上皮細胞の側部および基底面(basolateral面)を可視化するために用いた。Figure 3に示すように、MAb 5B5は大脳皮質脳室帯の頂端部(apical面)側を非常に強く染色した。大脳皮質の神経幹細胞はこの部分に豊富に存在していると知られている。よって、MAb 5B5は神経幹細胞に発現する分子を認識すると推測された。また、組織染色パターンより、MAb 5B5抗原は細胞膜に局在していると考えられた。

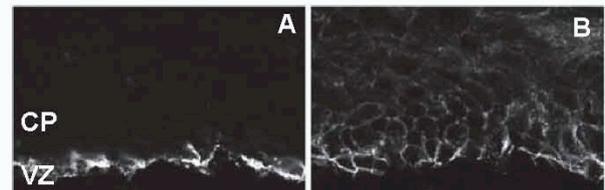


Figure 3. Expression and localization of MAb 5B5 antigen in E14.5 mouse cerebral cortex. Coronal section of E14.5 mouse cerebral cortex including the cortical plate was stained with MAb 5B5 (A) and the antibody for Pan cadherin (Pan-cad) (B). Pan-cad was used to visualize the basolateral cell membranes of neuroepithelial cells. MAb 5B5 and the anti-Pan-cad antibody were detected with goat Alexa 488-conjugated anti-rat IgG and goat Alexa 546-conjugated anti-rabbit IgG, respectively. CP, cortical plate; VZ, ventricular zone.

4. 幹細胞特異的モノクローナル抗体の性状解析

4. 1 MAb 5B5はマウスまたはヒトES細胞およびiPS細胞を認識する

前項において、生殖腺組織を抗原として作製したMAb 5B5は、生殖細胞や神経系などの組織幹細胞を認識する抗体であると示した。そこでMAb 5B5が他の幹細胞も認識するか調べるため、多能性幹細胞であるマウス胚性幹細胞(ES: Embryonic Stem cells)と人工多能性幹細胞(iPS: induced Pluripotent Stem cells)を用いた免疫染色を試みた。iPS細胞は人為的に樹立できる多能性幹細胞で、ES細胞と同等の性質を持つことから大変注目を集め、世界中で活発に研究されている¹⁴⁾。

LIFを含んだ培地で培養したマウスES細胞と、培地からLIFを抜き4日間培養し分化誘導したES細胞を免疫染色に用いた。LIFはマウスES細胞の未分化状態を維持するサイトカインである。ES細胞の未分化状態は未分化マーカーOct-4の発現で評価した。その結果、MAb 5B5は未分化状態のES細胞を強く認識した(横山ら, 未発表データ)。マウスiPS細胞はMEF(マウス胎仔線維芽細胞)にOct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4の4因子を強制発現させて樹立し、MEFをフィーダー細胞として用いて継代維持した。iPS細胞が増殖するとコンパクトにまとまってES細胞に似たコロニーを形成するが、MAb 5B5はこのコロニーに存在する細胞だけを染色し、まわりのMEF細胞は全く染色されなかった(Figure 4)。また、ピント面を変化させて観察すると、MAb 5B5はiPS細胞の細胞膜表面をドット状に強く染色することがわかった。さらに、多能性幹細胞マーカーであるNanogおよびOct-4に対する抗体と二重染色を行ったところ、MAb 5B5は確かにこれらマーカーが発現している細胞、つまりiPS細胞だけを認識すると確認された。以上より、MAb 5B5は、ES細胞と同様に人工多能性幹細胞であるiPS細胞も認識することが明らかとなった。

MAb 5B5はマウス生殖腺を抗原として作製した抗体であり、これまで抗体の性状解析はすべてマウス組織およびマウス由来細胞を用いて行った。この抗体がヒト細胞の解析にも利用可能であるか調べるため、ヒト神経幹細胞を用いた免疫染色を行った。ヒト神経幹細胞はヒトES細胞から分化誘導して作製した。ES細胞から神経分化誘導して形成させた細胞塊の内部には、脳に似た構造を取る部分が生じ、多様な神経細胞とともに神経幹細胞の存在が知られている。この細胞塊を固定後、包埋し、凍結切片を作製した。この切片を免疫染色したところ、MAb 5B5は内部の空洞に接する一層の細胞群のみを認識した。この細胞群の染色パターンは、MAb 5B5が示したマウス大脳皮質脳室帯における神経幹細胞の局在に酷似していた。そこで神経幹細胞マーカーCD133の染色像

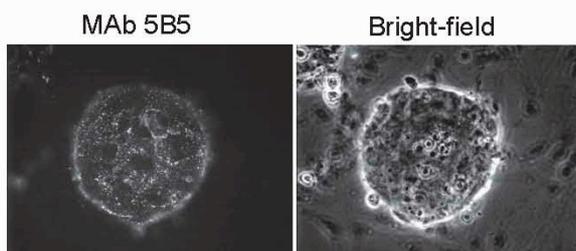


Figure 4. MAb 5B5 recognizes mouse iPS cells. iPS cells were generated from MEF and were stained with MAb 5B5 detected with Alexa 488-conjugated anti-rat IgG

と比較したところ、MAb 5B5とCD133の局在は完全に一致した(横山ら, 未発表データ)。よって、MAb 5B5はヒト神経幹細胞を認識することが明らかとなった。今回ES細胞から形成させた細胞塊には多数の神経細胞が存在するが、それらは全く認識しなかったことから、MAb 5B5が分化能の高い幹細胞だけを認識すると強く示唆された。また、MAb 5B5はマウス細胞のみならず、ヒト細胞の解析にも利用できることがわかった。

4.2 MAb 5B5はヒトがん細胞株と乳がん組織において特定の細胞のみを認識する

これまでの免疫染色の結果より、マウス組織に加え、ES細胞やiPS細胞においてもMAb 5B5の染色シグナルが確認された。次に他の動物種や様々な組織由来の株化培養細胞を用いた免疫染色を行った。MAb 5B5によって染色される細胞株の染色像を詳しく観察すると、その染色は均一ではなく、ほとんどの細胞株でMAb 5B5染色シグナルの陽性細胞と陰性細胞が混在するという結果が得られた。例えば、HepG2細胞ではすべての細胞が陽性細胞であったが、MCF-7細胞では約50%が陽性であった(Figure 5)。また、陽性細胞でもシグナルの強いものと弱いものが存在した。また各細胞のMAb 5B5染色パターンは2種類に大別され、HepG2細胞、MCF-7細胞のように主に細胞膜が染色されるものと、HARA-B細胞、MDA-MB 231細胞のように細胞質の小器官膜が染色されるものがあつた。

これまでの解析から、MCF-7細胞をはじめ複数のヒト乳がん株化細胞において、MAb 5B5陽性細胞が存在するとわかった。そこで、実際の乳がんにおいてもMAb 5B5陽性細胞が存在するかどうかを調べるため、ヒト乳がん組織を用いた免疫組織染色を行った。その結果、MAb 5B5により乳がん組織内の一部の細胞が強く染色された(横山ら, 未発表データ)。染色した組織切片はすべてが乳がん組

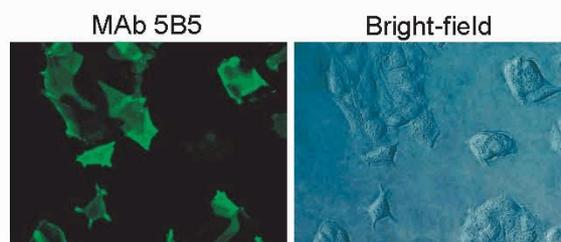


Figure 5. MAb 5B5 recognizes human cancer cells. Breast cancer cell line, MCF-7 cell, was stained with MAb 5B5 detected with Alexa 488-conjugated anti-rat IgG. MAb 5B5 recognized a particular population of MCF-7 cells.

織領域であるにもかかわらず, MAb 5B5 抗原はその中の一部の細胞だけに発現していると示された。本研究では, MAb 5B5 が未分化度の高い細胞を特異的に認識するという性質から, MAb 5B5 陽性細胞はがん幹細胞の性質を持つと示唆された。

5. まとめ

本研究では生殖腺に対する抗体を数クローン樹立し, それらが生殖腺の発達や生殖細胞の成熟のメカニズムの解明に貢献できる可能性を示した。またショットガンアプローチを用いて樹立した抗体MAb 5B5 は, 生殖細胞や神経幹細胞を認識することを示した。

最近, がん研究分野でも幹細胞が注目を集めている。これまで, がん組織は1つの変異細胞が異常増殖することで形成される, 均一な性質を持つ細胞集団であると考えられてきた。しかし, 最近の研究から, がん組織の細胞集団には階層性があり, がん組織の中のわずか数%の細胞ががん組織形成の供給源であるという報告が相次いでなされている。このがん細胞の供給源となる細胞は, 幹細胞の性質を持つことから, がん幹細胞と呼ばれる¹⁵⁾。がん幹細胞は増殖速度が遅く, 薬物排出能が高く, 放射線に抵抗性を持つなど, 従来考えられてきたがん細胞のイメージとは大きく異なる性質を持つことが示唆されている。そこでがん幹細胞をターゲットにする新しい治療法の開発が望まれている。そのためには, がん組織の中でがん幹細胞を特定することが必須である。しかし, がん幹細胞に特異的に発現しその機能維持に働く分子についてはほとんど明らかになっていない。新しいがん治療法に向けたがん幹細胞研究のためには, これらの分子の同定は非常に重要である。本研究は, 株化がん細胞やがん組織においてMAb 5B5 が認識する細胞はがん幹細胞である可能性を示唆した。MAb 5B5 は, 今後のがん幹細胞研究に重要な知見を与えると期待できる。

本研究で作製したモノクローナル抗体群は, 生殖細胞や多能性幹細胞など分化能の高い細胞, すなわち幹細胞の研究を進める上で強力なツールとなると示した。本研究の成果は, 再生医療, がんや細胞性疾患の治療法の開発に大いに貢献するであろう。

参考文献

1) Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R: A gene mapping to the sex-determining region of the

mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 1990; 346: 245-250.

- 2) Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R: Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 1991; 351: 117-121.
- 3) Lovell-Badge R, Robertson E: XY female mice resulting from a heritable mutation in the primary testis-determining gene, Tdy. *Development* 1990; 109: 635-646.
- 4) Morohashi K, Honda S, Inomata Y, Handa H, Omura T: A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. *J Biol Chem* 1992; 267: 17913-17919.
- 5) Hatano O, Takayama K, Imai T, Waterman MR, Takakusu A, Omura T, Morohashi K: Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. *Development* 1994; 120: 2787-2797.
- 6) Lala DS, Rice DA, Parker KL: Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1249-1258.
- 7) Yokoyama C, Komatsu T, Ogawa H, Morohashi K, Azuma M, Tachibana T: Generation of rat monoclonal antibodies specific for Ad4BP/SF-1. *Hybridoma* 2009; 28: 113-119.
- 8) Shima Y, Zubair M, Komatsu T, Oka S, Yokoyama C, Tachibana T, Hjalte T A, Drouin J, Morohashi K: Pituitary homeobox 2 regulates adrenal4 binding protein/steroidogenic factor-1 gene transcription in the pituitary gonadotrope through interaction with the intronic enhancer. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 1633-1646.
- 9) Kishiro Y, Kagawa M, Naito I, Sado Y: A novel method of preparing rat-monoclonal antibody-producing hybridomas by using rat medial iliac lymph node cells. *Cell Struct Funct* 1995; 20: 151-156.
- 10) Nomura M, Kawabe K, Matsushita S, Oka S, Hatano O, Harada N, Nawata H, Morohashi K: Adrenocortical and gonadal expression of the mammalian Ftz-F1 gene encoding Ad4BP/SF-1 is independent of pituitary control. *J Biochem* 1998; 124: 217-224.
- 11) Kotrla KJ, Goodman CS: Transient expression of a surface antigen on a small subset of neurons during embryonic development. *Nature* 1984; 311: 151-153.

- 12) Hatta K, Okada TS, Takeichi M: A monoclonal antibody disrupting calcium-dependent cell-cell adhesion of brain tissues: possible role of its target antigen in animal pattern formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 2789-2793.
- 13) Yokoyama C, Katoh-Fukui Y, Morohashi K, Konno D, Azuma M, Tachibana T: Production and characterization of monoclonal antibodies to mouse germ cells. *Hybridoma* 2010; 29: 53-57.
- 14) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676.
- 15) Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111.