

学位論文要約
Extended Summary in Lieu of the Full Text of a Doctoral Thesis

氏 名 :
Full Name 田中 秀治

学位論文題目 :
Thesis Title Human colorectal cancer-associated carbohydrate antigen on annexin A2 protein (大腸癌細胞の Annexin A2 上に発現する腫瘍特異性糖鎖関連抗原)

学位論文要約 :
Summary of Thesis

【目的、緒言】

糖鎖は細胞間情報伝達や免疫反応など、幅広い生体现象に関与し、翻訳後修飾である糖鎖修飾により、複雑な構造多様性が生み出される。大腸癌を含む様々な癌腫で、腫瘍関連抗原を形成する異常糖鎖発現が報告され、同部位を標的とした分子標的療法の研究が行われている。腫瘍特異性糖鎖抗原の中で、Annexin A2 関連糖鎖抗原は、上皮細胞増殖因子受容体シグナル伝達調節や免疫抑制性応答など重要な機能を有することが報告されているが、大腸癌に対しては未だ十分に解明されていない。大腸癌の治療成績は近年向上しているが、日本での癌罹患数第 1 位、癌死亡数第 2 位と依然多い。さらなる予後改善のためには、大腸癌における同関連抗原の機能解明と新規分子標的療法の開発は急務である。今回、大腸癌細胞の Annexin A2 上に発現する腫瘍特異性糖鎖関連抗原に着目し、同抗原を標的とする抗体 (12G5A) を作成し、抗原の病理生物学的特性および構造を解明し、新たな治療戦略として分子標的療法開発の可能性を検討するために、本研究を実施した。

【対象と方法】

1. 大腸癌細胞の腫瘍特異性糖鎖関連抗原に対する抗体作成

大腸癌に関する過去研究では、ヒト腸管細胞株 HT-29 を用いた実験で、酪酸ナトリウム負荷により誘導された分化型 HT-29 は N-結合型糖鎖抗原を形成するが、25mM ブドウ糖+10%血清で誘導された未分化型 HT-29 では異常糖鎖を形成することが報告されている。この分化型/未分化型 HT-29 での糖鎖形成の違いより着想を得て、分化型 HT-29 細胞に対する抗体と未分化型 HT-29 細胞溶解液をマウスに感作させ、採取した B 細胞とミエローマよりハイブリドーマを作成した。スクリーニング後に、12G5A 産生ハイブリドーマを選択的に BALB/c マウスに投与し、硫酸沈殿法、ゲル濾過クロマトグラフィーにより、IgM 型 12G5A モノクローナル抗体の作成を行った。

2. 同抗原の病理生物学的特性の解明

2009 年-2010 年の間に岐阜大学医学部附属病院で、原発巣切除を行った大腸癌患者 73 例を対象とした。12G5A 抗体を用いた免疫組織化学染色法で、12G5A に高い免疫反応性を示す群 (12G5A high : 大腸癌細胞 50%以上が染色) と 12G5A に低い免疫反応性を示す群 (12G5A low : 50%未満) に分け、両群間で臨床病理学的検討、生存解析を行った。

3. 同抗原の構造の解明

イムノアフィニティー法で 12G5A 抗体に結合する抗原を抽出し、同抗原の解析を、タンパク質量分析、si-RNA silencing、酵素による脱グリコシル化、tunicamycin 負荷試験を用いて行った。

【結果】

- HT-29 脱分化型での異常糖鎖形成を利用し、12G5A モノクローナル抗体を作成した。12G5A 抗体を用いた免疫組織化学染色法で、癌部位で特異的な免疫反応性を示すことを確認した。一方、正常大腸組織マイクロアレイを用いた免疫組織化学染色法では、12G5A 免疫反応性が認められないことを確認した。
- 12G5A high は、12G5A low よりも全生存期間 ($p=0.0196$)、無増悪生存期間 ($p=0.0418$) が有意に短く、12G5A

high は生物学的悪性度が高まることを解明した。全生存期間に関する多変量解析では、12G5A high は有意差までは認められなかった($p=0.67$)。

3. イムノアフィニティー法で 12G5A 抗体に対する抗原を抽出した。同抗原に対する 12G5A 抗体を用いた Immunoblotting では、約 40kDa に蛋白 Band を同定した。同 Band の、Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) assay での蛋白質質量解析では、構成蛋白は Annexin A2 (38.58kDa) であり、12G5A 抗体は Annexin A2 関連抗原を認識することを解明した。Annexin A2 の RNA silencing では、mRNA とタンパクレベルで Annexin A2 発現低下を認めた。Glycopeptidase F による脱グリコシル化では、Annexin A2 バンド消失を認め、Tunicamycin 負荷により 12G5A 免疫反応性の消失を認めた。以上より、12G5A 抗体は Annexin A2 上の N-結合型糖鎖を認識することを同定した。

【考察】

Annexin は Ca 結合タンパク質ファミリーで、12 種類の Annexin 遺伝子が明らかにされている (A1-A11, A13)。本研究で着目した 12G5A に対する抗原は、Annexin A2 関連糖鎖抗原で、同関連抗原に関するこれまでの研究報告により、増殖因子受容体シグナル伝達調整や自己免疫抑制性作用を介して、AnnexinA2 関連抗原は腫瘍増殖に関与していると考えられている。大腸癌に関しては、AnnexinA2 関連抗原の高発現と大腸癌 TNM stage の間に有意な相関関係が報告されており、本研究でも、12G5A high は予後と関連し、生物学的悪性度が高まることを解明した。本研究では、糖鎖修飾が様々な病理生物学的特性を与えることを示しており、さらなる研究により、様々な癌腫で、Annexin A2 関連糖鎖抗原の重要な役割が解明される可能性がある。

【結論】

12G5A は、Annexin A2 上の N-結合型糖鎖抗原を認識することを同定した。12G5A に対する高い免疫反応性 (12G5A high) は、生物学的悪性度が高まり、予後不良と密接に関連する。