

氏名（本籍）	田中秀治	（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第1182号	
学位授与日付	令和4年2月16日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Human colorectal cancer-associated carbohydrate antigen on annexin A2 protein	
審査委員	（主査）教授	清水 雅仁
	（副査）教授	國貞 隆弘 教授 松尾 政之

論文内容の要旨

【目的、緒言】

大腸癌は、本邦の癌罹患数第1位、癌死亡数第2位を占める悪性疾患である。大腸癌の治療成績は近年向上しているが、さらなる予後改善のためには、新規分子標的療法の開発が急務となる。糖鎖は細胞間情報伝達や免疫反応など、幅広い生体現象に関与しており、翻訳後修飾に関与する糖鎖修飾は、細胞活動において複雑な構造多様性を生み出す。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の発現が報告されており、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一つである 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の調節や、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、大腸癌の増殖・進展における同抗原の役割に関しては、未だ十分に解明されていない。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)を精製した。本研究の目的は、Annexin A2 関連糖鎖抗原の病理学的特性および構造を解明し、同抗原を標的分子とする新たな治療戦略の可能性を明らかにすることである。

【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にて、酪酸ナトリウムにて分化誘導したヒト大腸癌細胞株 HT-29（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 における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. 12G5A の病理生物学的特性に関する検討

2009 年から 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、12G5A 抗体を用いた免疫組織化学染色を施行した。症例を 12G5A に高い免疫反応性を示す群 (12G5A high 群：大腸癌細胞 50%以上が染色) と、低い免疫反応性を示す群 (12G5A low 群：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. 12G5A の構造解析

大腸癌細胞株 SW480 細胞を用いて、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、タンパク質量分析、si-RNA silencing、酵素による脱グリコシル化、tunicamycin 負荷試験を行い、同抗原の構造解析を行った。

【結果】

1. HT-29 脱分化型における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、同抗体は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 の免疫反応性は認められなかった。
2. 12G5A high 群は、12G5A low 群よりも全生存期間 ($p=0.0196$)、無増悪生存期間 ($p=0.0418$) が有意に短く、12G5A の発現が上昇すると生物学的悪性度が高まることが示唆された。全生存期間に関する多変量解析では、12G5A の発現に関し有意差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、約 40kDa の蛋白 Band を同定した。同 Band の Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) assay による蛋白質量解析を行ったところ、構成蛋白は Annexin A2 (38.58kDa) であったため、12G5A 抗体は Annexin A2 関連抗原を認識することが明らかになった。Annexin A2 の RNA silencing では、mRNA とタンパクレベルで Annexin A2 の発現低下を認めた。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 関連糖鎖抗原であるが、同抗原は、増殖因子受容体シグナル伝達の調整や自己免疫抑制性作用を介して、腫瘍増殖に関与していることが報告されている。大腸癌に関しては、AnnexinA2 関連抗原の発現上昇と TNM stage の間に有意な相関関係が報告されているが、本研究でも 12G5A の発現は予後と関連していたため、12G5A によって生物学的悪性度が高まる可能性が示唆された。本研究結果は、糖鎖修飾が様々な病理生物学的特性を与えることを示すものであり、研究を進展させることで、様々な癌腫における Annexin A2 関連糖鎖抗原の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は、生物学的悪性度および予後不良と密接に関連する。12G5A/Annexin A2 関連糖鎖抗原は、大腸癌治療の新規標的分子や予後予測の biomarker となる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

申請者 田中 秀治は、大腸癌細胞を用いて腫瘍特異性糖鎖関連抗原に対する新規抗体 (12G5A) を作製し、同抗体が Annexin A2 上の N-結合型糖鎖を認識すること、また同抗体に対する高い免疫反応性が生物学的悪性度および予後不良と密接に関連することを証明した。本研究成果は、大腸癌の新規分子標的療法の開発に資するものであり、消化器外科学の発展に少なからず寄与すると認める。

[主論文公表誌]

Hideharu Tanaka, Chiemi Saigo, Yoshinori Iwata, Itaru Yasufuku, Yusuke Kito, Kazuhiro Yoshida, Tamotsu Takeuchi: Human colorectal cancer-associated carbohydrate antigen on annexin A2 protein

J Mol Med 99, 1115–1123 (2021). doi: 10.1007/s00109-021-02077-z (2021).