

Title	Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer : A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation
Author(s)	井出, 義人
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46268
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 井 出 義 人

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 20078 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当
医学系研究科生体制御医学専攻

学 位 論 文 名 Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer :
A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible
mechanism for fucosylation
(新しい膵癌の腫瘍マーカーとしてのフコシル化ハプトグロビン (その
糖鎖構造解析とフコシル化のメカニズムの検討))

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 谷 口 直 之
(副査)
教 授 木 下 タ ロ ウ 教 授 中 村 敏 一

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

膵癌は難治性癌の 1 つであり、膵癌克服のためには早期発見が重要であるが、今日腫瘍マーカーとして用いられている CA19-9 や CEA では早期診断は困難であり、新しい腫瘍マーカーの開発は社会的急務である。また、癌において血清蛋白質の糖鎖構造が変化することは古くから知られており、多くの腫瘍マーカーが癌に伴う異常糖鎖を認識するモノクロー抗体である。今回我々は、膵癌における糖鎖構造の変化を用いた新しい腫瘍マーカーの開発を目的として研究を行った。

[方法ならびに成績]

膵癌における新しい腫瘍マーカーの開発にあたり、膵癌で特異的に糖鎖修飾を受ける血清タンパク質を同定し、腫瘍マーカーとしての有用性を検討した。複数の膵癌細胞株の培養上清に対し、種々のレクチンを用いてレクチンブロットを行った。その結果、他の癌種の細胞株培養上清と比べて、フコースを特異的に認識する AAL レクチンとの親和性が高いタンパクが多く認められた。そこで、健常人と膵癌症例の血清に対し、AAL レクチンブロットを行ったところ、約 40 kD のタンパク質において、CBB ではほぼ同じタンパク量なのに対し、膵癌例では AAL との親和性が非常に高いことが認められ、PVDF 膜に転写後、N 末端アミノ酸配列分析を行った。それにより、このタンパク質はハプトグロビンβ鎖であることがわかった。

フコシル化ハプトグロビンが膵癌の腫瘍マーカーとなりうるかを検討するため、健常人 30 例、膵癌症例 49 例、肝癌 23 例、肝硬変 12 例、胃癌 10 例、大腸癌 17 例の血清に対しフコシル化ハプトグロビンの有無を調べた。健常人では 1/30 例 (3%) と非常に低い陽性率であったのに対し、膵癌では 29/49 例 (59%)、肝癌では 5/23 (22%)、肝硬変では 3/12 (25%)、胃癌では 2/10 (20%)、大腸癌では 7/17 (41%) と種々の病態で陽性例を認めたものの、膵癌において非常に高い陽性率を認めた。次に、膵癌症例において、病期による陽性率に差があるかを検討するため、病期が確定している 34 例に対し、Stage I、II と Stage III、IV の 2 群に分けて比較検討したところ、Stage I、II 群は

4/12例(33%)、Stage III、IV群は15/22(68%)と、進行した群においてより陽性率が高いことが示された。また、比較的早期の群においても陽性率が存在することが示された。

膵癌症例に認められるフコシル化ハプトグロビンの糖鎖構造を検討するため、膵癌症例、健常人の血清より、抗体カラムを用いて、ハプトグロビン β 鎖を精製した。フコースを認識するAALレクチン、コアフコースを認識するAOLレクチンを使用し、レクチンブロットを施行した。膵癌症例では両方のレクチンとの親和性を認めたが、健常人では認めなかった。より詳細な糖鎖構造を検討するため、同様の方法で精製した膵癌症例、健常人のハプトグロビン β 鎖からN-グリコシダーゼFにて糖鎖を切り出し、蛍光標識(ピリジルアミノ化)後、LC-ESI-MSを施行した。膵癌例では2本鎖、3本鎖のN型糖鎖に α 1-6/1-3/1-4結合のフコースが1つついた構造が認められたが、健常人ではフコースのついた構造は認められなかった。もっとも主要な構造である2つのシアル酸を持つ2本鎖N型糖鎖を比較すると、膵癌例ではN型糖鎖の基部に α 1-6結合のフコースを持つ構造が多く認められた。

ハプトグロビンは血清中の主要なタンパク質であり、主に肝臓で作られる。しかし、肝臓にはコアフコース構造を作るフコース転移酵素(FUT8)の発現がほとんどなく、主要な要素と考えられるコアフコース構造を持ったフコシル化ハプトグロビンは産生されにくい。そこで、膵癌におけるフコシル化ハプトグロビン増加のメカニズムを検討するため、膵癌細胞株6種類を用いRT-PCRにてハプトグロビンの発現を確認したところ、PSN-1のみに認められた。PSN-1の培養上清からハプトグロビンを精製しその糖鎖構造をレクチンブロット、LC-ESI-MSで確認したところ、膵癌例の血清と同様の構造が得られた。以上より、膵癌細胞培養上清中に膵癌自身でもフコシル化ハプトグロビンを産生しうる事がわかった。一方、ターミナル(非還元末端に存在する)フコースは、肝臓においても産生される可能性がある。もし、肝臓でフコシル化ハプトグロビンが産生されるのであれば、それを誘導する何らかの因子が膵癌から産生されているかもしれない。それを確認するため、膵癌細胞を2日間培養した無血清培養上清で肝癌細胞(Hep3B)を2日間培養したところ、コントロールと比較して、ハプトグロビンの分泌が上昇することを見出した。このことは、膵癌培養細胞上清中に、フコシル化ハプトグロビン誘導因子が存在している可能性を示唆する。

[総 括]

膵癌における新しい腫瘍マーカーの開発にあたり、膵癌特異的に糖鎖修飾を受ける血清蛋白質として、フコシル化ハプトグロビンを同定した。フコシル化ハプトグロビンは肝硬変、肝癌、大腸癌など種々の病態においても血清中に認められるが、正常例ではほとんど認められず、膵癌症例において非常に高い陽性率を示した。また、膵癌において病期の進行とともに陽性率も上昇した。膵癌症例の血清からハプトグロビンを精製し、その糖鎖構造を確認したところ、 α 1-6を中心として、 α 1-3、 α 1-4結合のフコースがついた2本鎖ないし3本鎖のN型糖鎖であることがわかった。膵癌におけるフコシル化ハプトグロビン上昇のメカニズムとして、膵癌自身の産生の可能性と膵癌が誘導因子を産生し、肝臓で作られる可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

膵癌は初診時に進行例が多く、早期診断法の確立は社会的急務である。申請者は、膵癌における糖鎖構造の変化を用いた新しい腫瘍マーカーの開発を目的として研究を行った。膵癌特異的に糖鎖修飾を受ける血清蛋白質として、フコシル化ハプトグロビンを同定した。フコシル化ハプトグロビンは肝硬変、肝癌、大腸癌など種々の病態においても血清中に認められるが、正常例ではほとんど認められず、膵癌症例において非常に高い陽性率を示した。また、膵癌において病期の進行とともに陽性率も上昇したが、比較的早期の群においても陽性率が存在した。膵癌症例の血清からハプトグロビンを精製し、その糖鎖構造をLC-ESI MSを用い明らかにした。膵癌におけるフコシル化ハプトグロビン上昇のメカニズムとして、膵癌自身の産生の可能性と膵癌が誘導因子を産生し、間質・肝臓などで異所性産生される可能性を示した。臨床応用が期待され、本研究は学位に値するものとする。