OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Analysis of cancer-associated haptoglobin using a next generation glycan antibody
Author(s)	森下, 康一
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87943
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　森　下　康　一　）	
論文題名	Analysis of cancer-associated haptoglobin using a next generation glycan antibody （次世代型糖鎖抗体を用いたがん関連ハプトグロビンの解析）

論文内容の要旨

単糖であるフコースが結合することをフコシル化と呼び、炎症やがんにも関わる最も重要な糖鎖修飾の１つである。研究室の先行研究でフコシル化ハプトグロビン（Fuc-Hp）が膵がん患者の血中で増加しており、これを直接捉える次世代型糖鎖抗体の10-7G抗体が樹立された。10-7G抗体が捉えるHpを抗体Affinity Columnを用いて解析したところ、10-7G抗体は成熟型Fuc-Hpだけでなく、ハプトグロビン前駆体proHpも捉え、proHpもフコシル化されていることが分かった。さらに、健常人に比して膵がん患者血中ではproHpが増加していることも確認された。我々は成熟型Fuc-HpならびにproHpをがん関連ハプトグロビンと呼んでいる。本研究では次世代型糖鎖抗体の10-7G抗体を用いてがん関連ハプトグロビンのバイオマーカーとしての有用性と生物学的機能の解析を行った。

血中でのハプトグロビンの立体構造にはハプトグロビン表現型（Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2）による差が存在する。申請者らが行った先行研究により、10-7G抗体を用いたがん関連ハプトグロビンの測定（10-7G値）においてHp1-1型膵臓がん患者が測定適応外であることが示されている。一方、10-7G抗体はWestern blot (WB)により、proHpを検出することができる。細胞実験やペプチド合成ペプチドを用いた実験によって、糖鎖を持たないHpのα鎖に存在する6アミノ酸（QCKNYY）が10-7G抗体のエピトープであることがわかった。このエピトープはHp1分子にも存在するがin silicoの解析から立体構造が原因となり10-7G抗体が認識できない可能性が示された。Hp2分子ではβ鎖に存在する糖鎖のフコシル化によるハプトグロビンの立体構造の変化でα鎖が露出し、エピトープが出現すると考えられた。

続いて10-7G抗体を用い、proHp産生細胞の検討を行った。10-7G抗体を用いて21例の膵がん組織の免疫組織染色を行うと、12例では膵がん組織ではなく周囲の免疫細胞が陽性となった。さらに蛍光組織染色の結果からCD68陽性細胞が10-7G抗体染色の陽性細胞であることが示唆された。複数の血球細胞株の培養上清を用いてタンパク発現量を解析するWestern blotを行うと単球性白血病細胞株THP-1がproHpを産生していることが明らかになった。さらに THP-1細胞をマクロファージ様に分化させる、あるいは膵がん微小環境を模した共培養や刺激によってproHp分泌量が亢進することが分かった。したがって血中proHp量は膵がん微小環境を反映するマーカーになり得ることが示された。

最後にproHpの生物学的機能の解析を行った。上皮形質を有する大腸がん細胞株HCT116にproHpを発現させたところ、顕微観察レベルで形態変化が生じ、遊走能も亢進した。その原因として、上皮間葉転換と呼ばれるがん悪性化が考えられ、上皮系マーカーであるE-Cadherinの発現量減少を認めた。一方精製proHpをHCT116の培養上清に添加しても著明な形態変化を認めなかったが、薬剤によって数週間のproHp産生を誘導するとE-Cadherinの発現量が減少した。このことからproHpがE-Cadherinの発現量を減少させるには長期間が必要であることが示唆された。続いてproHpの相互作用分子を免疫沈降によって解析したところ、proHpがE-Cadherinそのものに結合する可能性が示された。すなわちproHpがE-Cadherinの膜上発現量のタンパクレベルでの調節因子であり、がん微小環境においてはマクロファージから分泌されたproHpががん細胞に長期間作用することで上皮間葉転換が誘導される可能性が示された。

以上より次世代型糖鎖抗体の10-7G抗体ががん関連ハプトグロビンを認識するメカニズムが明らかとなり、がん関連ハプトグロビンのうち、proHpの出現メカニズムとその生物学的機能が示された。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（森　下　康　一）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主査　教授	三善英知
	副査　教授	尾路祐介
	副査　教授	山本浩文

論文審査の結果の要旨

本研究は、次世代型糖鎖抗体10-7G mAbが、がん関連ハプトグロビンとして定義されるフコシル化ハプトグロビン（以下Fuc-Hp）と前駆体型ハプトグロビン（以下proHp）を認識するメカニズムの解明と、proHpの生物学的意義を検討した研究である。論文の概要は以下の通りである。

フコシル化はフコースによる糖鎖修飾を指し、がんや炎症に関与することが知られている。膵がんの新規バイオマーカーとしてFuc-Hpが同定され、Fuc-Hpに対する次世代型糖鎖抗体10-7G mAbが樹立された。10-7G mAbはFuc-HpだけでなくproHpも認識する。またHpには3種の血中表現型が存在するが、10-7G mAbの反応性は表現型で異なり特にHp1-1型で著明に低値を示すことも分かっている。このように10-7G mAbの認識機構は複雑であるが、本研究では10-7G mAbのエピトープの同定と立体構造のSimulationによってこれを解明した。またがんにおける生物学的意義がほとんど知られていないproHpについても検討を行った。

Ⅰ．10-7G mAbのエピトープを遺伝子導入による細胞実験とペプチドの合成により絞り込み、Alanine Scanningと阻害実験によって決定した。このエピトープはHp1-1型にも存在することが分かった。

Ⅱ．エピトープが存在するにも関わらず、10-7G mAbのHp1-1型への反応性が低い理由の検討を行った。Protein Data Bankに登録されているHp1分子の立体構造を描出し、エピトープを確認した。その結果、エピトープがハプトグロビンβ鎖に覆われるような構造によって10-7G mAbの反応が阻害されていることが示された。一方、Hp2分子ではβ鎖の阻害を受けにくいエピトープを有することが示された。フコシル化が様々な糖タンパクの機能に影響することはよく知られているが、Hp2分子においてはフコシル化によってその立体構造が変化し、10-7G mAbの反応性が亢進することが推察された。

Ⅲ．proHpを強制発現した大腸がん細胞HCT116では著明な形態変化が生じ、上皮細胞マーカーであるE-Cadherinの発現減少や局在の変化を認めた。またproHp強制発現株では細胞遊走能が亢進していることが分かり、さらにproHp強制発現株の上清をHCT116の野生型に添加しても遊走能が亢進した。これらの結果からproHpにはがんの悪性化を誘導する機能があることが示唆された。

Ⅳ．10-7G mAbを用いた大腸がん原発巣の免疫染色により、原発巣周囲の免疫細胞からproHpが分泌されていることが分かった。また10-7G mAbを応用した測定系（10-7G値）により大腸がん患者血中のがん関連ハプトグロビンを測定したところ、Stage Ⅳで有意に高値となった。Stage Ⅳで深達度の大きな患者では10-7G値が高く、10-7G値が高値の大腸がん患者は予後不良であった。

本研究では10-7G mAbのエピトープの決定と立体構造のSimulationにより、次世代型糖鎖抗体の認識機構を初めて詳細に解析した。またproHpにがんの悪性化をもたらす生物学的機能があり、大腸がんの予後に関与する可能性について初めて証明した。以上のように本研究の科学的価値は高く、学位授与に値する内容であると認める。