Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-01-09

Band 3 ectopic expression in colorectal cancer induces an increase in erythrocyte membrane-bound IgG and may cause immune-related anemia

Kitao, Akihito

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2020-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第7810号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007810

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Band 3 ectopic expression in colorectal cancer induces an increase in erythrocyte membrane-bound IgG and may cause immune-related anemia

大腸癌におけるバンド3異所性発現は赤血球膜結合IgGの増加を誘発し、免疫関連貧血の原因となる可能性がある

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
腫瘍・血液内科学
（指導教員：南　博信教授）

北尾　章人

背景と目的：癌関連貧血は悪性腫瘍患者の生活の質に影響するものであり、その原因は多岐にわたる。大腸癌では消化管出血が原因となることが多いが、しばしば便潜血陰性であっても貧血を認める症例がある。バンド3は赤血球膜に最も豊富に存在する蛋白で、自己免疫性溶血性貧血では抗バンド3抗体が増加する事で赤血球膜結合IgG量が増加し、網内系での破壊が亢進する事で血管外溶血が起こる。我々は過去に、大腸癌で腫瘍組織にバンド3蛋白を発現し、自己免疫性溶血性貧血を合併した症例を経験した。この症例から、大腸癌では一般的にバンド3蛋白が異所性に発現して抗バンド3抗体産生を誘導する事で赤血球膜結合IgGが増加しているのではないかと仮説を立てた。すなわち、大腸癌に自己免疫性溶血性貧血を合併する例は稀であるが、臨床的溶血をきたさないまでも赤血球膜結合IgGが増加する事で、網内系において赤血球が破壊される事で寿命が短縮して、大腸癌で便潜血陰性のような症例についてはこの機序で貧血が生じている可能性があり、癌関連貧血の新たなメカニズムの一つとなりうる。この仮説を検証するため、大腸癌患者を前向きに登録し患者検体を使用してバンド3異所性発現と赤血球膜結合IgG量を健常人と比較した。また、大腸癌細胞株移植マウスを用いて赤血球結合IgG量と抗バンド3抗体産生量増加を調査した。さらに大腸癌細胞においてバンド3の異所性発現を制御している因子を調査するため大腸癌細胞株を用いて実験を行った。

方法：神戸大学病院　食道・胃腸外科で2016年9月から2018年8月に大腸癌手術を実施され、同意の得られた50名の患者を対象として前向き研究を行った。患者術前の血液を採取し、直接クームス試験を実施した。引き続き、患者赤血球の1%浮遊液を作成し、抗ヒトIgG抗体を用いて、赤血球膜に付着しているIgG量の測定をフローサイトメトリー法で行った。患者データとの比較のため26名の健常ボランティアの参加を得て、同様の解析を行った。

また、患者手術検体を用いて免疫組織化学染色を行い、バンド3異所性発現を確認した。さらにバンド3をコードするSLC4A1遺伝子のmRNA in situ hybridizationを実施し、大腸癌組織でのSLC4A1 mRNA発現を確認した。

続いて、血清に含まれているIgG中の抗バンド3抗体量上昇を確認するため、赤血球からヘモグロビンを除去した蛋白と血清から単離したIgGを反応させ免疫沈降を行い、血清IgGに結合する蛋白の解析を行った。得られた蛋白でwestern blotting法を実施し、抗バンド3抗体を用いてIgGに結合して沈降されるバンド3蛋白量を大腸癌患者と健常ボランティアで比較した。

動物実験で再現性を確認するため、マウス大腸癌細胞株Colon-26をBALB/cマウスに移植し、赤血球膜結合IgG量の測定を行った。また、バンド3を発現しているマウス骨髄腫細胞株WEHI-3を移植して血清IgGと赤血球膜蛋白を使用し免疫沈降を行った。

大腸癌組織でバンド3が異所性発現する機序を明らかにするため、低酸素刺激に対する応答性が異なるヒト大腸癌細胞株HCT-116とSW480を用いて実験を行った。通常環境下

と塩化コバルトを添加し低酸素環境を模倣した状態下とで培養し、それぞれにおいてSLC4A1の遺伝子発現をreal time PCR法で、バンド3蛋白発現をwestern blotting法で確認した。また、バンド3を認識するヒトIgG type抗Diego-b抗体を用いてこれらの培養細胞株の表面にバンド3蛋白が発現しているかをフローサイトメトリー法で確認した。

統計解析はPrism software v8.0.0を用いて行った。

結果：大腸癌患者50名のHb値は12±1.82（平均±標準偏差：以下同様）であり、健常ボランティアのHb値13.4±1.56よりも有意に低値であった(p=0.01)。大腸癌患者では平均赤血球容積（MCV）値は88.3±7.0と正球性であり、慢性的な出血で見られる鉄欠乏性貧血パターンを示す小球性とは異なっていた。網状赤血球数も健常成人より有意に増加しており（p=0.05）赤血球のターンオーバー亢進を示唆する結果であった。また大腸癌患者では直接クームス試験が10例陽性であったのに対し、健常人では0名であった（p=0.01）が、臨床的に溶血性貧血の診断基準を満たす症例はなかった。大腸癌患者50名のうち、便潜血陽性例24名、便潜血陰性例26名であり、Hb値はそれぞれ12.4±2.1と11.5±1.25で便潜血陰性例の方が低い傾向にあった。また便潜血陽性例4名、陰性例6名で直接クームス試験が陽性の結果であり差は認めなかった。

免疫組織化学染色の結果は大腸癌患者手術検体の97%にバンド3蛋白の異所性発現を認めた。同一組織でSLC4A1 mRNAの発現を認め、免疫染色が特異的であることを確認した。これらの結果はコントロールで用いた正常大腸組織では認めなかった。

赤血球膜結合IgG量をフローサイトメトリーで測定した結果は、大腸癌患者で平均蛍光強度（MFI）値38.8±14.7であり、健常人はMFI値29.9±15.6と有意に大腸癌患者で増加していた(p=0.02)。大腸癌患者で増加している赤血球膜結合IgG量については、大腸癌の臨床病期、年齢、便潜血の有無で差は見られなかった。さらに、大腸癌患者と健常人の血清からIgGを単離し免疫沈降を実施したところ、大腸患者の血清中にはIgG分画中の抗バンド3抗体量が健常人に比較して有意に増加していた。

マウスモデルで実験をした結果、大腸癌細胞株を移植したマウスにおいて、コントロールと比較し有意に赤血球膜結合IgG量が増加していた。また、免疫沈降を実施したところ、バンド3を発現している細胞株を移植したマウス血清中では、コントロールと比較してIgG分画中の抗バンド3抗体量が増加していた。

細胞株を用いた実験では、HCT116細胞株では塩化コバルト添加でHIF-1α蛋白が増加し、低酸素刺激がトリガーとなって上昇する事が知られ、糖・脂質代謝などを調整するセリン・スレオニンキナーゼのAMP-activated protein kinase (AMPK)のリン酸化蛋白が増加していた。バンド3についてはmRNAの発現量は塩化コバルトの添加濃度によっては差が認められず、蛋白発現は100kDaのバンド3は変化がなく75kDaのバンド3が減少していた。一方で、SW480細胞株では塩化コバルト添加でHIF-αは増加するものの、AMPKリン酸化蛋白の増加は認めなかった。バンド3については塩化コバルト200nmol/LでSLC4A1 mRNAは50倍に発現上昇を認め、蛋白発現は100kDaのバンド3が増加し75kDaのバンド3は変化がなかった。これらの細胞株の実験結果から、低酸素刺激下ではAMPKのリン酸化蛋白の増加が75kDaのバンド3発現を抑制し、HIF-1αが増加する一方でAMPKリン酸化蛋白の増加がない場合に100kDaのバンド3発現が増加する事が分かった。バンド3発現の総量ではHCT116がSW480よりも少なく、ヒト型抗Diego-b抗体を用いたフローサイトメトリーでも同様の結果が得られた。

考察：今回の研究で、大腸癌患者の97%で腫瘍組織にバンド3異所性発現をしている事が明らかになった。また、大腸癌患者では赤血球膜結合IgG量が増加しており、血清IgG分画中にも抗バンド3抗体が増加していた。マウス実験でも同様の結果であり、異所性発現しているバンド3が刺激となって抗バンド3抗体産生が増加している結果と考える。生理的状態において、赤血球は老化すると自然に血漿中に存在する抗バンド3IgG抗体が赤血球膜に結合する事によって網内系で処理される事が知られている。臨床的に溶血所見を示すには赤血球膜結合IgG分子量に一定数以上が必要であるが、大腸癌患者ではその閾値以下のレベルで赤血球膜結合IgG量が増加しており、溶血を呈さないまでも同様の機序により貧血が起こっている事が示唆された。

大腸癌での直接クームス試験が20%の症例で陽性であったが、通常スクリーニングで陽性になるのは約0.01%であり、大腸癌で抗バンド3抗体産生が増加している結果を反映している。これらの結果は大腸癌の臨床病期や年齢、便潜血の有無にかかわらず同様の結果であった。つまり、進行癌であり便潜血陽性例といった大腸癌病変からの持続的出血が原因と考えらえる以外の症例による貧血は、前述の免疫学的機序が一因となっている可能性を示唆する。

細胞株を用いた実験では低酸素刺激下で、バンド3蛋白発現はHIF-1αとAMPKのリン酸化蛋白の発現バランスよって制御されている事が明らかになった。これは赤血球細胞の成熟過程においてバンド3発現がAMPKリン酸化蛋白によって制御されている事と一致する。この実験系で観察された75kDaのバンド3は通常サイズより小さく、腎尿細管で発現しているものと同一のアイソフォームである。腎尿細管で発現するバンド3は独自の転写開始部位を持っており、AMPKリン酸化蛋白が作用するプロモーター部位とHIF-1αが作用するプロモーター部位が異なっている事が、低酸素環境下で発現するバンド3分子量に差がある原因と考える。

結語：大腸癌において赤血球膜結合IgG量が増加している事は癌関連貧血症の一因である事が示唆された。この結果は免疫チェックポイント阻害薬などを含む、がん免疫治療によって引き起こされる貧血の病態解明に寄与すると考える。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 2957 号	氏 名	北尾 章人
論文題目 Title of Dissertation	大腸癌におけるバンド3異所性発現は赤血球膜結合IgGの増加を誘発し、免疫関連貧血の原因となる可能性がある Band 3 ectopic expression in colorectal cancer induces an increase in erythrocyte membrane-bound IgG and may cause immune-related anemia		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 児玉裕三 副 査 Vice-examiner 吉岡尚 副 査 Vice-examiner 森信睦雄		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

要旨

背景と目的：癌関連貧血は悪性腫瘍患者の生活の質に影響するものであり、その原因は多岐にわたる。大腸癌で腫瘍組織にバンド3蛋白を発現し、自己免疫性溶血性貧血を合併した症例の症例から、大腸癌では一般的にバンド3蛋白が異所性に発現して抗バンド3抗体産生を誘導する事で赤血球膜結合IgGが増加しているのではないかと仮説を立てた。この仮説を検証するため、大腸癌患者を前向きに登録し患者検体を使用してバンド3異所性発現と赤血球膜結合IgG量を健常人と比較した。また、大腸癌細胞株移植マウスを用いて赤血球結合IgG量と抗バンド3抗体産生量増加を調査した。さらに大腸癌細胞においてバンド3の異所性発現を制御している因子を調査するため大腸癌細胞株を用いて実験を行った。

方法：神戸大学病院　食道・胃腸外科で2016年9月から2018年8月に大腸癌手術を実施され、同意の得られた50名の患者を対象として前向き研究を行った。患者術前の血液を採取し、直接クームス試験を実施した。引き続き、抗ヒトIgG抗体を用いて、赤血球膜に付着しているIgG量の測定をフローサイトメトリー法で行った。また、患者手術検体を用いて免疫組織化学染色を行い、バンド3異所性発現を確認した。さらにバンド3をコードするSLC4A1遺伝子のmRNA in situ hybridizationを実施し、大腸癌組織でのSLC4A1 mRNA発現を確認した。マウス大腸癌細胞株Colon-26をBALB/cマウスに移植し、赤血球膜結合IgG量の測定を行った。また、バンド3を発現しているマウス骨髄腫細胞株WEHI-3を移植して血清IgGと赤血球膜蛋白を使用し免疫沈降を行った。大腸癌組織でバンド3が異所性発現する機序を明らかにするため、低酸素刺激に対する応答性が異なるヒト大腸癌細胞株HCT-116とSW480を用いて実験を行った。通常環境下と塩化コバルトを添加し低酸素環境を模倣した状態下とで培養し、それぞれにおいてSLC4A1の遺伝子発現をreal time PCR法で、バンド3蛋白発現をWestern blotting法で確認した。また、バンド3を認識するヒトIgG type抗Diego-b抗体を用いてこれらの培養細胞株の表面にバンド3蛋白が発現しているかをフローサイトメトリー法で確認した。統計解析はPrism software v8.0.0を用いて行った。

結果：大腸癌患者50名のHb値は12±1.82（平均±標準偏差：以下同様）であり、健常ボランティアのHb値13.4±1.56よりも有意に低値であった(p=0.01)。大腸癌患者では平均赤血球容積（MCV）値は88.3±7.0と正球性であり、慢性的な出血で見られる鉄欠乏性貧血パターンを示す小球性とは異なっていた。網状赤血球数も健常成人より有意に増加しており（p=0.05）赤血球のターンオーバー亢進を示唆する結果であった。また大腸癌患者では直接クームス試験が10例陽性であったのに対し、健常人では0名であった（p=0.01）が、臨床的に溶血性貧血の診断基準を満たす症例はなかった。大腸癌患者50名のうち、便潜血陽性例24名、便潜血陰性例26名であり、Hb値はそれぞれ12.4±2.1と11.5±1.25で便潜血陰性例の方が低い傾向にあった。また便潜血陽性例4名、陰性例6名で直接クームス試験が陽性の結果であり差は認めなかった。

免疫組織化学染色の結果は大腸癌患者手術検体の97%にバンド3蛋白の異所性発現を認めた。同一組織でSLC4A1 mRNAの発現を認め、免疫染色が特異的であることを確認した。これらの結果はコントロールで用いた正常大腸組織では認めなかった。

赤血球膜結合 IgG 量をフローサイトメトリーで測定した結果は、大腸癌患者で平均蛍光強度（MFI）値 38.8±14.7 であり、健常人は MFI 値 29.9±15.6 と有意に大腸癌患者で増加していた(p=0.02)。さらに、大腸癌患者と健常人の血清から IgG を単離し免疫沈降を実施したところ、大腸患者の血清中には IgG 分画中の抗バンド 3 抗体量が健常人に比較して有意に増加していた。マウスモデルで実験をした結果、大腸癌細胞株を移植したマウスにおいて、コントロールと比較し有意に赤血球膜結合 IgG 量が増加していた。また、免疫沈降を実施したところ、バンド 3 を発現している細胞株を移植したマウス血清中では、コントロールと比較して IgG 分画中の抗バンド 3 抗体量が増加していた。細胞株を用いた実験結果から、低酸素刺激下では AMPK のリン酸化蛋白の増加が 75kDa のバンド 3 発現を抑制し、HIF-1α が増加する一方で AMPK リン酸化蛋白の増加がない場合に 100kDa のバンド 3 発現が増加する事が分かった。バンド 3 発現の総量では HCT116 が SW480 よりも少なく、ヒト型抗 Diego-b 抗体を用いたフローサイトメトリーでも同様の結果が得られた。

考察および結語：今回の研究で、大腸癌患者の 97%で腫瘍組織にバンド 3 異所性発現をしている事が明らかになった。また、大腸癌患者では赤血球膜結合 IgG 量が増加しており、血清 IgG 分画中にも抗バンド 3 抗体が増加していた。マウス実験でも同様の結果であり、異所性発現しているバンド 3 が刺激となって抗バンド 3 抗体産生が増加している結果と考えられた。生理的状態において、赤血球は老化すると自然に血漿中に存在する抗バンド 3 IgG 抗体が赤血球膜に結合する事によって網内系で処理される事が知られている。臨床的に溶血所見を示すには赤血球膜結合 IgG 分子量に一定数以上が必要であるが、大腸癌患者ではその閾値以下のレベルで赤血球膜結合 IgG 量が増加しており、溶血を呈さないまでも同様の機序により貧血が起こっている事が示唆された。大腸癌での直接クームス試験が 20%の症例で陽性であったが、通常スクリーニングで陽性になるのは約 0.01%であり、大腸癌で抗バンド 3 抗体産生が増加している結果を反映している。細胞株を用いた実験では低酸素刺激下で、バンド 3 蛋白発現は HIF-1α と AMPK のリン酸化蛋白の発現バランスよって制御されている事が明らかになった。これは赤血球細胞の成熟過程においてバンド 3 発現が AMPK リン酸化蛋白によって制御されている事と一致する。

以上より、大腸癌において赤血球膜結合 IgG 量が増加している事は癌関連貧血症の一因である事が示唆された。この結果は免疫チェックポイント阻害薬などを含む、がん免疫治療によって引き起こされる貧血の病態解明に寄与すると考える。

本研究は、大腸癌における自己免疫性溶血生貧血の機序について研究したものであるが、従来行われなかったバンド 3 の異所性発現による赤血球膜結合 IgG 量の増加機構について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。