

審査結果の要旨

論文題目「Anti-Tn-antigen MLS128 monoclonal antibody: Its effects on colon cancer cells and characterization and identification of its receptor」

(抗 Tn-抗原 MLS128 抗体: 大腸がんに対するその効果とその受容体に関する研究)

学位申請者 Normaiza Binti Zamri

ムチン型糖鎖である O-結合型糖鎖は、コア構造の Ser/Thr 残基に N アセチルガラクトサミン(GalNAc) が結合した Tn 抗原(GalNAca-Ser/Thr)にオリゴ糖が伸長したものである。がん化により Tn 抗原はむき出しになることからがん特異的のマーカーとして有名である。Tn 抗原結合性 MLS128 モノクローナル抗体は 20 年以上前に LS180 大腸がん細胞のムチンで免疫したマウスから単離された。先行研究から MLS128 処理でがん細胞増殖阻害が起こること、その阻害にはインスリン様増殖因子 I 受容体(IGF-IR) のダウンレギュレーションが関与している可能性が示唆されていた。本研究の初めに立てた作業仮説である MLS128 による大腸がん細胞増殖阻害は IGF-IR のダウンレギュレーションが関与しているかは不定的結果を得た。しかし、3 種の樹立株において、大腸がん細胞増殖が IGF-I に依存すること、抗 IGF-IR 抗体処理で IGF-IR がダウンレギュレーションを介して大腸がん細胞の増殖阻害をすることを明らかにし、さらに、MLS128 の認識する糖タンパク質 110 kDa glycoprotein(GP)の同定に向けての新規の情報を得たことから、本研究が今後の MLS128 による大腸がん細胞増殖阻害機構の解明に寄与すると考えられる。

本論文は、大腸がん細胞の増殖とその阻害の解明に貢献したのみでなく、新規の大腸がん由来糖タンパク質の同定に繋がる発見をしたことから、高く評価できる。

第一章は緒論であり、本研究の背景となるがん関連糖鎖 Tn 抗原とその抗体および IGF-I 受容体を解するシグナル伝達とがん細胞に対する抗体医薬の開発の可能性について概説するとともに目的について記述している。

第二章では、先行研究から MLS128 処理でがん細胞増殖阻害が起こること、その阻害にはインスリン様増殖因子 I 受容体(IGF-IR)のダウンレギュレーションが関与している可能性が示唆されていた。そこで本章では、3 種の大腸がん細胞株を使い、IGF-IR に対するモノクローナル抗体 1H7 と MLS128 のがん細胞増殖への影響を調べている。その結果、両方の抗体で細胞増殖阻害が見られたが、1H7 による阻害効果が MLS128 より大きかったこと、3 種の大腸がん細胞株の増殖が IGF-I 依存性であること、1H7 による細胞増殖阻害は IGF-IR のダウンレギュレーションによることを明らかにした。しかし、MLS128 処理で IGF-IR のダウンレギュレーションは観察されなかったことから、先に立てた仮説は、ほぼ否定された。

第三章では、先行研究から MLS128 が大腸がん細胞膜上の 110 kDa GP を認識することが示唆されたので、3 種の大腸がん細胞で 110 kDa GP の解析と同定を試みている。MLS128 処理した細胞から 110 kDa GP が有意に消失ことを見出した。この効果が最も顕著に見られる HT29 細胞で、免疫沈降・イムノブロット(IP/IB)実験を行ったところ、110 kDa GP と IGF-IR の直接の結合は見られなかった。しかし、

110 kDa GP と IGF-IR が、マイクロドメインに局在すること、MLS128 で処理した HT29 と LS180 細胞では、両分子が Src ファミリーキナーゼとともに減少することを見出した。これは MLS128 がマイクロドメインに変化を与えることで細胞増殖に影響を及ぼす可能性を示唆した。

110 kDa GP の同定に向けて、2次元電気泳動と最新技術によるトリプシンペプチドのマス解析から得られたアミノ酸配列をデータベースサーチしたが、110 kDa GP の正体を決めるまでには至らなかった。

しかしながら、これらの研究中に予想していなかった現象を見出した。

第四章では、新規の発見すなわち「凍結保存中にマイクロドメインに局在している 110 kDa GP の限定分解が起こった」現象について検討し、今後の研究への発展の可能性に言及している。この現象は、3-4年間の凍結保存と融解により、110 kDa GP の高次構造が変化し共雑している細胞由来のタンパク質分解酵素により分解されコア部分が残ったと考えられる。HT29 細胞と LS180 細胞由来の 110 kDa GP に分解後の断片サイズに違いがあること、予想されるタンパク質分解酵素のアミノ酸配列特異性から、今後 110 kDa GP の同定にこの情報を有効に活用できると考えられる。

以上の結果、本論文は学位論文として十分な内容を有するものと審査委員全員の一致で判定された。したがって、申請者 Normaiza Binti Zamri は東海大学博士（工学）の学位を授与されるに値すると判断した。

論文審査委員

主査	薬学博士	松下 操	工学部教授	(総合理工学研究科総合理工学専攻)
委員	農学博士	山口陽子	工学部教授	(総合理工学研究科総合理工学専攻)
委員	博士(農学)	笹川 昇	工学部准教授	(総合理工学研究科総合理工学専攻)
委員	医学博士	鈴木明身	東海大学糖鎖科学研究所所長	
委員	薬学博士	山口芳樹	独立行政法人理化学研究所チームリーダー	