

学位論文題名

# 腫瘍産生シアリル唾液型アミラーゼに関する研究

## 学位論文内容の要旨

### 【背景と目的】

これまで、新たに加えられた多発性骨髄腫を含む数多くの腫瘍産生アミラーゼが報告されている。このなかで腫瘍産生アミラーゼの表現型は、唾液型アミラーゼが一般的である。これに対して、我々はIgA型骨髄腫患者の血清中に酸性化した速い移動度を示す異常なアイソアミラーゼを発見した。そこで、我々はこの異常アミラーゼをシアリル唾液型アミラーゼと命名し、同アミラーゼの生化学的特性と臨床的意義について研究してきた。本学位論文においては、著者の主要論文および参考論文を引用し、これまでの研究成果をまとめ考察する。

### 【対象と方法】

患者血清およびその他の患者生体試料は、旭川医大病院、兵庫医大病院および北海道大学病院検査部に提出された検査用材料より得られた。これらの試料は、インフォームドコンセントと各機関の倫理委員会の承諾を経て入手された。速い移動度の異常アイソアミラーゼは、ブルースターチ染色を施したアミラーゼアイソザイム電気泳動により検出された。ノイラミニダーゼ処理および抗ヒト唾液型アミラーゼモノクローナル抗体との反応性の解析は、アイソザイム電気泳動を用い実施した。異常アミラーゼは、Superose 12 ゲル濾過HPLCにより分離し、分子量の検討はSDS-PAGE後のイムノブロッティングにより実施した。骨髄腫細胞は密度勾配法により分離し細胞培養を実施し、肺腺癌細胞は患者の胸水より同様の方法で分離しセルラインを樹立した。これら2つの細胞培養上清中のアミラーゼについては、ノイラミニダーゼ処理および抗ヒト唾液型アミラーゼモノクローナル抗体との反応性の解析を実施し、またゲル濾過HPLCにて分析した。骨髄腫細胞およびセルライン化した肺癌細胞には、アミラーゼ免疫染色を実施した。

### 【結果】

まず、はじめに我々はアミラーゼアイソザイム電気泳動において、奇異な酸性移動度を示す異常なアイソアミラーゼを2名のIgA型骨髄腫患者の血清中に見出した。その異常アイソアミラーゼは、Superose 12 HPLCにおいて正常血清アミラーゼよりやや高分子側に溶出され、残余アミラーゼとの分離が可能であった。しかしながら同異常アミラーゼの分子量は、イムノブロッティングの結果より正常唾液アミラーゼと同様な約60,000と推定された。HPLCによって分取された異常アミラーゼは、ノイラミニダーゼ処理に感受性を示したことからシアル酸残基を持つことが示され、抗ヒト唾液型モノクローナル抗体の反応

性の解析から唾液型であることが判明した。そこで我々は、電気泳動で検出された異常アミラーゼはシアル酸を含む唾液型アミラーゼであり、患者の骨髓腫細胞より異所性産生されたものと考察した。次に我々は、比較的稀なタイプである IgD 型多発性骨髓腫の患者血清にも共通の性質を示すアミラーゼを発見した。これらの骨髓腫患者は、いずれも予後不良な経過を示し、我々はこの異常アミラーゼを「シアルル唾液型アミラーゼ」と命名した。引き続き、我々は進行した IgG 型多発性骨髓腫例においても経験し、骨髓腫細胞の培養上清中に唾液型アミラーゼとともに速い移動のシアルル唾液型アミラーゼの存在を確認した。また、骨髓腫細胞はアミラーゼ免疫染色で陽性を示した。ここに初めてシアルル唾液型アミラーゼのオリジンが骨髓腫細胞であることを明らかにした。そこで我々は、11 例の多発性骨髓腫患者を対象に、シアルル唾液型アミラーゼの出現頻度を検討すべく調査した。その結果、予想に反して 11 例中 7 例の高率に患者血清中にシアルル唾液型アミラーゼが検出された。また、血清中のシアルル唾液型アミラーゼ活性の推移は、IgG レベルがほとんど変化しないのに対して臨床経過を反映した変動を示した。

我々はその後、アミラーゼ産生肺癌症例に遭遇し、患者胸水より分離した肺癌細胞のセルラインを樹立した。本セルラインからもシアルル唾液型アミラーゼの産生能を確認した。最後に、アミラーゼアイソザイム電気泳動結果の過去に遡った厳密な検討を実施したところ、新たに 3 例の速い移動度を示す異常アミラーゼを見出した。これらは全てシアルル唾液型アミラーゼと同定され、いずれも卵巣癌患者であった。ここに我々は、様々なタイプの多発性骨髓腫、肺癌そして卵巣癌においてシアルル唾液型アミラーゼを検出した。このことからアミラーゼ産生腫瘍において、シアルル唾液型アミラーゼは、普遍的に唾液型アミラーゼと随伴して産生されるものと理解された。

#### 【考察】

我々は、ゲル濾過溶出パターンの特性、ノイラミニダーゼ感受性と抗ヒト唾液型モノクローナル抗体との反応性を根拠にシアルル唾液型アミラーゼ同定した。唾液アミラーゼはアスパラギン結合糖鎖を持つ糖蛋白である。シアル酸残基は糖鎖の非還元末端に結合し、シアル酸を含む糖鎖の合成は細胞質のゴルジ装置で実施されると考えられている。アミラーゼに対するシアル酸の付加については、癌化に伴うシアルルトランスフェラーゼ活性の亢進の結果と理解される。多発性骨髓腫、肺癌および卵巣癌などにおけるアミラーゼ産生については、癌化によるアミラーゼ産生能の亢進もしくは、癌化によるアミラーゼ遺伝子の活性化が考えられる。多発性骨髓腫においては、さらにアミラーゼ遺伝子が局在する 1 番染色体短腕の構造変化も報告されている。我々の一連の研究成果により、アミラーゼ産生腫瘍において癌細胞が直接シアルル唾液型アミラーゼを産生し、また予後不良例に血中に出現するという知見が新たに加えられた。

#### 【結語】

我々は、多発性骨髓腫患者の血清中にシアル化した唾液型アミラーゼを発見し、シアルル唾液型アミラーゼと命名した。同アミラーゼは、アイソザイム電気泳動およびゲル濾過溶出特性より容易に確認された。シアル化した唾液型アミラーゼは、多発性骨髓腫、肺癌および卵巣癌において確認されたことから、アミラーゼ産生腫瘍において普遍的に認めら

れ同アミラーゼを検出する臨床的意義は大きいと考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

## 腫瘍産生シアリル唾液型アミラーゼに関する研究

多発性骨髄腫患者の血清中に速い移動度を示す異常アミラーゼを発見し、シアリル唾液型アミラーゼと命名した。シアリル唾液型アミラーゼは非シアリル化アミラーゼとともに腫瘍細胞より直接産生されることを証明し、多発性骨髄腫だけではなく、肺癌および卵巣癌においてもその産生を確認した。アミラーゼ産生腫瘍において普遍的に認められることから、同アミラーゼを検出する臨床的意義は大きいと考えられた。

審査にあたり、副査畠山鎮次教授から4点の質問があった。1) アミラーゼを産生しやすい腫瘍またはシアリル唾液型アミラーゼを産生しやすい腫瘍に傾向はあるか。2) シアリル化することによってアミラーゼの酵素活性に変化があるか。3) シアリル唾液型アミラーゼの分離精製において、シアリル化により電荷が変化することからイオン交換クロマトグラフィを利用した方が適切ではないか。4) アミラーゼは $\alpha$ 1-4 グルコシッド結合水解酵素であるが、腫瘍におけるシアリル唾液型アミラーゼ産生の生物学的意義をどのように考えるか。これらに対して、申請者は以下に示す回答を述べた。1) アミラーゼ産生腫瘍は臨床的には肺癌次いで卵巣癌に多く報告がみられる。シアリル化アミラーゼについては我々の検討では骨髄腫に多い。2) 酵素活性に変化はないものと推定される。ミカエリス定数 (Km 値) を検討した範囲では正常アミラーゼとの相違はみられなかった。3) シアリル唾液型アミラーゼのゲル濾過溶出特性は、アミラーゼ分子のコンフォメーションの変化によりゲルマトリックスとの親和性に変化が生じたものと理解している。そのため分離精製にはイオン交換法よりゲル濾過法が適しているものと考えている。4) 蛋白質がシアリル化されると一般に異化が遅延することがことから、糖質分解能の保持が腫瘍の増殖に有利に働くものと推定している。

次いで副査今村雅寛教授より4点の質問があった。1) 骨髄腫における出現頻度の検討において、M蛋白のタイプはIgG型が多いようであるが、病期でみると様々であった。このことから考察すると、骨髄腫においては、疾患活動性の亢進がシアリル唾液型アミラーゼの検出と関連するとは言えないのではないか。2) 肺癌症例では、化学療法の治療効果と血清アミラーゼレベルが相関していたが骨髄腫例ではどうであったか。3) 骨髄腫における出現頻度の検討において、対照に膠原病患者を用いていたが、MGUS (monoclonal gammopathy of unknown origin) との比較をすればより骨髄腫における疾患活動性や予後との関連性についてより考察できたと思われるがどうか。4) MGUS 症例でシアリル唾液型アミラーゼもしくはアミラーゼ産生を検討した報告はあるか。これらに対して、申請者は以下に示す回答を述べた。1) 我々の初期の報告例ではいずれも進行例であったが、出現頻度の検討結果を踏まえると明確には言えない。実際、血清アミラーゼ活性およびアイソアミラーゼパターンが共に正常であった例からもシアリル唾液型アミラーゼが検出されており今後慎重に検討していきたい。2) 骨髄腫例においても同様に化学療法との関連性があった。3) 御指摘のと

おりであり今後の課題として是非 MGUS 例においても検討してみたい。4) 我々の知る限り MGUS において検討した報告は今のところない。

最後に主査西村正治教授より3点の質問があった。1) アミラーゼのシアル化は悪性腫瘍に特異的で良性疾患にはみられないのか。2) 胸水中にもシアリル唾液型アミラーゼを検出していたが、肺癌の鑑別診断の観点から胸水中のシアリル唾液型アミラーゼの検出意義はあるか。3) 卵巣癌症例におけるシアリル唾液型アミラーゼを検出は何例の中から3例が検出されたのか、またそれらの被検査対象の中の悪性腫瘍の割合についてはどうであったか。これらに対して、申請者は以下に示す回答を述べた。1) 悪性腫瘍において細胞表面蛋白質のシアル化が悪性度と密接に関連することから、特異的な現象として理解している。ただし、良性疾患においても同様なシアル化がみられる知見もあることから今後慎重に検討していきたい。2) 検出法は電気泳動もしくは HPLC であることから容易にスクリーニングは可能である。これまで胸水中のアミラーゼの電気泳動的解析を実施した報告や、特定はされていないものの速い移動度のアミラーゼを検出した事例がある。胸水中のシアリル唾液型アミラーゼに関する診断的意義の検討は興味深いことと思われる。3) 様々な理由で実施したアミラーゼ電気泳動 2,850 例を対象とした。疾患背景としては、何らかの理由で高アミラーゼ血症を示したケースが多いが、残念ながら悪性腫瘍の割合については不明である。

この論文は、腫瘍産生アミラーゼの領域において新たにシアリル唾液型アミラーゼの存在が普遍的に認められること、かつその検出法を明らかにしたことが高く評価され、今後の臨床的応用が大いに期待される。

審査員一同は、これらを高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。