

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07297

研究課題名(和文) 赤血球膜結合IgG抗体の検出による大腸癌スクリーニング法の確立

研究課題名(英文) Screening of colorectal cancer through the detection of erythrocyte membrane bound IgG

研究代表者

川本 晋一郎 (Kawamoto, Shinichiro)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00579104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌で見られる貧血は出血によるものと一般的には考えられるが、実際には便潜血陰性の症例でも貧血が観察され、その機序については不明であった。本研究では大腸癌細胞が赤血球膜に多いバンド3蛋白を異所性に発現することによりバンド3に対する自己抗体の産生を刺激し、増加したこの自己抗体が赤血球膜に結合することで寿命が短縮するという出血とは異なる免疫反応による貧血が起こることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌の診断は便潜血検査が簡便であるが偽陰性が多い。一方、大腸内視鏡検査は前処置を含めて侵襲性が高く、出血によって見られる高度の小球性貧血がある症例や便潜血が陽性の症例にのみ実施されることが多い。本研究により大腸癌患者において出血以外の原因でおこる貧血が多く存在することが明らかとなり、日常診療あるいは健康診断等の際に便潜血が陰性であっても、また、正球性～大球性であっても貧血があれば大腸内視鏡検査を実施する根拠となり、大腸癌の早期発見と治療成績の改善、さらには高騰する医療費の削減につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：In general, the cause of anemia observed in colorectal cancer is thought to be bleeding from the tumor. However, anemia frequently occurs in the cases without bleeding and the mechanism has not been clearly determined. In the current study, we confirmed that erythrocyte membrane protein band 3 was ectopically expressed in colorectal cancer and stimulated the production of anti-band 3 autoantibody. The increased autoantibody bound to erythrocyte membrane and was thought to shorten the life span through the extravascular hemolysis. These results indicate that immunological mechanism causes secondary anemia in colorectal cancer patients either with or without bleeding.

研究分野：血液内科学

キーワード：大腸癌 性貧血 バンド3蛋白 赤血球 IgG 自己抗体 フローサイトメトリー 大球性貧血 自己免疫性溶血

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸がんは全世界で罹患率、死亡率の上位を占め、日本人でもがん罹患数および死亡数のそれぞれ1位、2位を占めさらに増加傾向にある。その原因として喫煙以外に肥満など食生活の変化が指摘されており、さらに高齢化とともに増加すると予測される。

分子標的薬や免疫チェックポイント薬などの開発により抗がん剤治療の成績は向上しているが、治癒率を改善するには早期発見が不可欠である。

大腸がんのスクリーニング法としては大腸内視鏡検査がもっとも確実であるが、検査前の大量の下剤の内服による前処置や検査の侵襲性などから健康診断に導入することは困難であり、また人間ドックでも施行されることは多くない。免疫学的反応を用いた便潜血検査が健康診断で用いられているが、その感度は大腸がんが61-91%、進行期の腺腫で27-67%とされている。便中のDNAを検出する方法も確立されているがその有用性は不明でコストも高いという問題がある。さらにこれらの便を用いた検査の場合検体の採取が血液検査と比較して煩雑であり、健康診断での受検者が便潜血検査を選択しない理由となっている可能性がある。

われわれは便潜血陰性の進行大腸がん自己免疫性溶血性貧血を合併した症例を経験し、大腸がん組織に赤血球膜タンパクであるバンド3を異所性に発現していることを見出した。

このことより大腸がん患者においてバンド3の異所性の発現が刺激となり、抗赤血球膜IgG抗体が健常者と比較して増加している可能性があることと仮説をたて、フローサイトメトリーでこれを検出し、大腸がんのスクリーニングテストとして用いることが可能か検討を開始した。

申請時点で大腸がん患者50名、健常者10名を対象とした解析が進行中であった。

2. 研究の目的

本研究ではさらに症例を追加して評価してフローサイトメトリーの有用性を評価し、大腸がんにおけるバンド3の発現のメカニズムを解明することにより、大腸がんの早期発見による予後の改善を目的とする。バンド3に対する自己抗体は老化した赤血球のクリアランスのために健常者でも保有する自然抗体であり、他の現在開発中の検査法と比較して特異度は高くないと予想されるが、本解析法が便潜血検査の代用法として有用である場合、検診での大腸がんスクリーニング受検者数を確実に増やすことが可能であり、比較的安価にまた迅速に結果が出る。その結果として大腸がん患者の早期発見、早期治療につながり、超高額な新規薬剤による国の医療費への負担を大幅に削減することが可能と考えられる。

3. 研究の方法

患者および検診受検者検体を用いた解析

手術標本の免疫染色により大腸がん組織におけるバンド3の発現率を評価し、免疫を介した貧血が一般的に起こり得る現象かを検討する。手術を予定している大腸がん患者と健常ボランティアにおける血液検査値の比較を行い、血液検体を用いて赤血球膜上に結合した免疫グロブリンIgGをフローサイトメトリーで測定し、(FITC結合抗IgG抗体の蛍光強度)-(FITC結合Isotype controlの蛍光強度)をmean fluorescence intensity (MFI)としてMFIと貧血の関連を解析する。また、感度が高いカラム法により直接抗グロブリン試験を行い、大腸がん患者での直接抗グロブリン試験陽性率を評価する。これまでの解析では健常者の年齢が30~40代と患者の年齢層と比較して若かったため、よりがん患者に近い年齢層の健常者でのMFIの解析を行うため30~50名程度を対象とする。

マウスを用いた解析

Balb/cマウスに同系の大腸がん細胞株 colon-26 を移植し、赤血球膜結合IgG量をフローサイトメトリーで測定する。

ウエスタンブロットによる血清中抗バンド3抗体の評価

患者、検診受検者およびマウスの血清中より回収したIgGを用いて赤血球膜蛋白を免疫沈降し、ウエスタンブロットでバンド3蛋白を検出することにより抗バンド3抗体が増加しているかを確認する。

バンド3異所性発現のメカニズム解析

ヒト大腸がん細胞株を用いてがん細胞がおかれる低酸素状態を模倣する塩化コバルト刺激によるバンド3発現の変化をリアルタイムPCRとウエスタンブロット法にて解析する。

4 . 研究成果

患者および検診受検者検体を用いた解析

大腸がん組織の免疫染色では 90%以上の症例にバンド 3 の発現が認められた。また、in situ hybridization により mRNA レベルでの発現も確認した。

大腸がん患者では健常者と比較して貧血傾向となっていたが、通常想定される慢性消化管出血の際に見られる小球性貧血ではなく、正球性貧血であった。また、直接抗グロブリン試験は健常者では 1 万に 1 人程度が陽性とされ今回の検診受検者では検出されなかったのに対し、大腸がん患者では 10 例 (20%) が陽性であった (表 1)。

便潜血陽性と陰性の大腸がん患者の比較較では、貧血は便潜血陰性の患者で強い傾向にあり、直接抗グロブリン試験は便潜血の結果にかかわらず陽性となっており、免疫を介したメカニズムにより貧血が起こっている可能性が示唆された。(表 2)。

表 1

Table 1: Characteristics of participants

	CRC patients (N = 50)	CRC patients under 65 years (N = 12)	Healthy controls (N = 26)	P value
Age, years, median (range)	72 (38–85)	57.5 (38–62)	44.5 (30–62)	
Gender, F/M	22/28	5/7	14/12	
CRC clinical stage, n (%)				
1	10 (20)	0 (0)	N/A	
2	15 (30)	4 (33)	N/A	
3	18 (36)	6 (50)	N/A	
4	8 (16)	2 (17)	N/A	
*Received neo-adjuvant chemotherapy n (%)	5 (10)	2 (17)	N/A	
Hb (g/dL)				
(ref: 13.5-17) Mean ± SD	12±1.82	12.2±1.83	13.4±1.59	.01 ^b
Mean corpuscular volume (MCV) (fl)				
(ref: 84-99) Mean ± SD	88.3±7.0	89.1±6.2	92.6±6.1	.01 ^b
Reticulocytes (/μL)				
(ref: 36,000-114,000) Mean ± SD	80,382±82,333	57,333±16,816	48,165±12,944	.05 ^b
Haptoglobin (mg/dL)				
(ref: 83-209) Mean ± SD	131.4±75.5	143.2±99.9	89.5±44.1	.01 ^b
IgG (mg/dL)				
(ref: 870-1700) Mean ± SD	1205±281.3	1217±312.5	1168±232.5	.57 ^b
Direct antiglobulin test positive, n (%)	10 (20)	4 (33)	0	.01 ^c
Clinically AIHA	0	0	0	

表 2

Table 2: Characteristics of CRC patients according to FOB

	FOB positive N = 24	FOB negative N = 26
Age, median (range)	69.5 (54–84)	76.5 (56–84)
Gender, F/M	7/17	15/11
CRC clinical stage 1/2/3/4	4/7/6/7	6/8/12/0
Hb (g/dL) Mean ± SD	12.4±2.1	11.5±1.25
MCV (fl) Mean ± SD	89.26±6.48	87.25±7.41
Reticulocytes (/μL) Mean ± SD	93,853±102,833	65,789±47,508
Direct antiglobulin test positive	4	6

Abbreviations: FOB, fecal occult blood; Hb, hemoglobin; SD, standard deviation; MCV, mean corpuscular volume; CRC, colorectal carcinoma

赤血球膜上の IgG の MFI は大腸がん患者で優位に増加しており、この MFI は便潜血陽性と陰性で差はなかった(図 1 A,C)。また、大腸がんの stage の違いや、年齢 65 歳以上と 65 歳未満では差は見られなかった。

マウスを用いた解析

大腸がん細胞株 colon-26 を皮下へ移植したマウスにおいても赤血球上の IgG は正常より増加していた。

免疫沈降実験では大腸がん患者の IgG がより多くのバンド 3 を結合し、抗バンド 3 抗体が増加していることが確認できた(図 1 B)。

また、分子サイズの小さいバンド 3 のみを発現している細胞株 WEHI3 をマウスに移植すると、分子サイズの小さいバンド 3 を認識する IgG が増加しており、大きいサイズのバンド 3 と抗原性が違う可能性が示唆された(図 1 D,E)。

臨床応用への検討

MFI の結果から ROC 解析を行った。

全体で AUC=0.7, 65 歳以下では AUC=0.767 と中等度の診断正確性が得られた(図 2 b,e)。

また、ロジスティック回帰解析を用いて MFI とヘモグロビン値による ROC 解析を行ったところ全体でやや改善が得られたが、高度の診断正確性は得られなかった(図 2 c,f)。

バンド 3 異所性発現のメカニズム解析

大腸がん細胞株 HCT116 と SW480 を塩化コバルトで刺激したところ、HCT116 では刺激前からバンド 3 mRNA の発現があり、塩化コバルトを増量しても変化はなかったのに対し、SW480 では高濃度の塩化コバルトで mRNA の極めて高い増加が見られた(図 3 A,D)。

ウエスタンブロットでは HCT116 において大きいサイズの赤血球型バンド 3 には変化がなかったが、小さいサイズの腎尿細管型バンド 3 の減少が見られた(図 3 B)。一方、SW480 では塩化コバルトの刺激により赤血球型のバンド 3 が増加し、腎尿細管型には変化が見られなかった(図 3 E)。図 3 B,E のバンド 3 のデンストメトリーによる解析では全体として、HCT116 では不変～やや減少したのに対し、SW480 では増加し(図 3 C,F)、この反応は細胞膜表面上のバンド 3 上にある Diego 抗原を検出するフローサイトメトリーでも同様の結果となった(図 3 G)。

尚、T 細胞欠損免疫不全マウスなどを用いた免疫チェックポイントへのバンド 3 発現の影響解析や exosome の解析、ELISA 法による抗バンド 3 抗体検出系の確立は、バンド 3 ノックダウン細胞株や過剰発現細胞株の樹立ができず、本研究では達成できなかった。

以上の結果から大腸がん患者における下血以外の免疫を介した貧血をきたすメカニズムを考察した(図 4)。

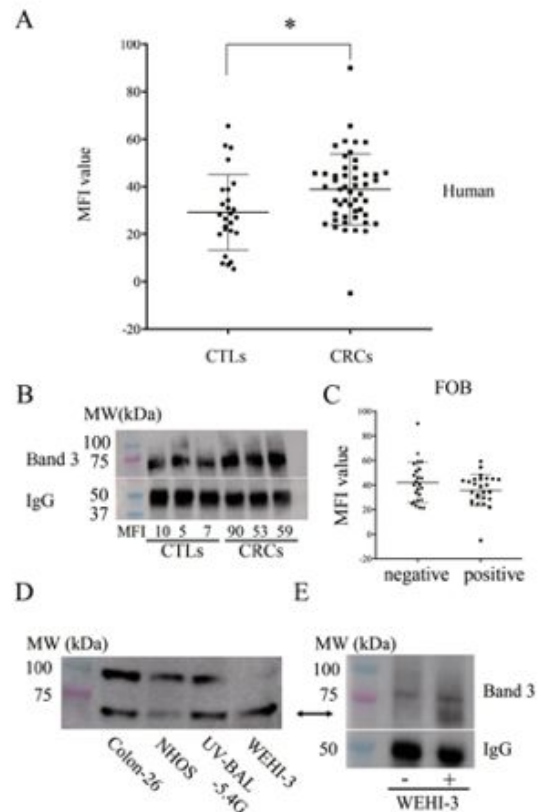


図 1

MFIによるROC解析

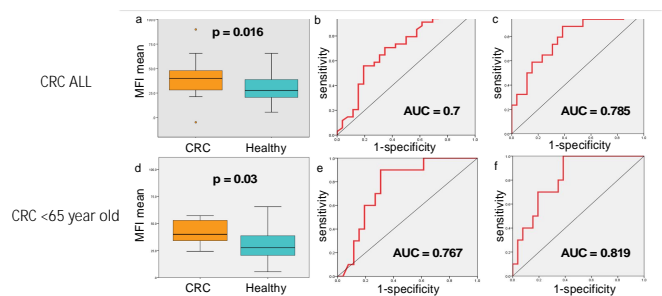


図 2

大腸がん細胞では赤血球型と腎尿細管型のバンド3を異所性に発現し、これをマクロファージが貪食しT細胞へ抗原提示をする。ここからIL-10などを介してB細胞を刺激し、自然抗体として存在する抗バンド3抗体の産生が増加する。この抗バンド3抗体が赤血球に結合し、自己免疫性溶血性貧血と同様の機序で脾臓の赤脾髄でマクロファージに貪食されることにより血管外溶血をきたすと考えられる。脾臓ではT細胞は白脾髄に存在するためこの際抗原提示されることはない。

これまでがんにおける貧血は、消化管などからの出血が原因で起こる小球性貧血が主な機序とされてきたが、正球性から大球性の貧血の原因は不明であった。

本研究からバンド3の異所性発現による免疫を介した血管外溶血により非小球性貧血が起こるメカニズムが明らかとなった。

上部消化管内視鏡検査で異常がない場合、小球性貧血や便潜血陽性の場合を除いて、大腸内視鏡検査はその侵襲性から実施が見送られることが多かったと考えられる。フローサイトメトリーによる赤血球膜上のIgG増加を検査することが望ましいが、血液検査値の結果のみから原因不明の非小球性貧血が見られた場合に大腸内視鏡検査を実施することにより、大腸がんの早期発見につながる事が本研究から期待される。

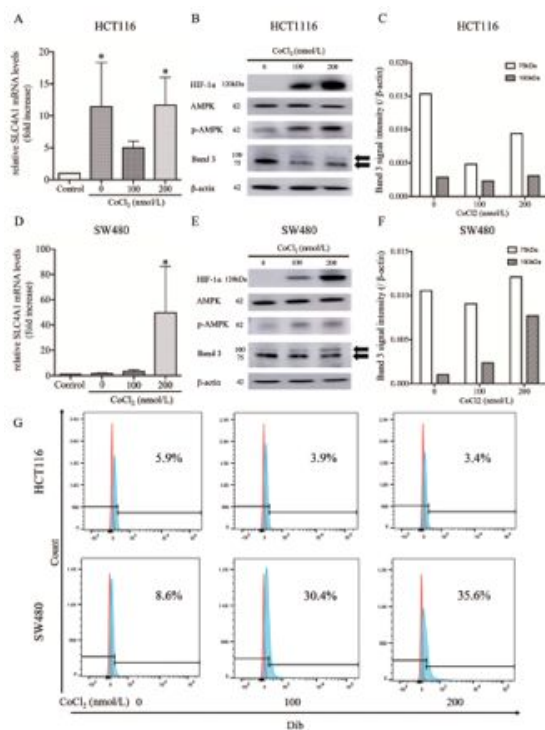


図 3

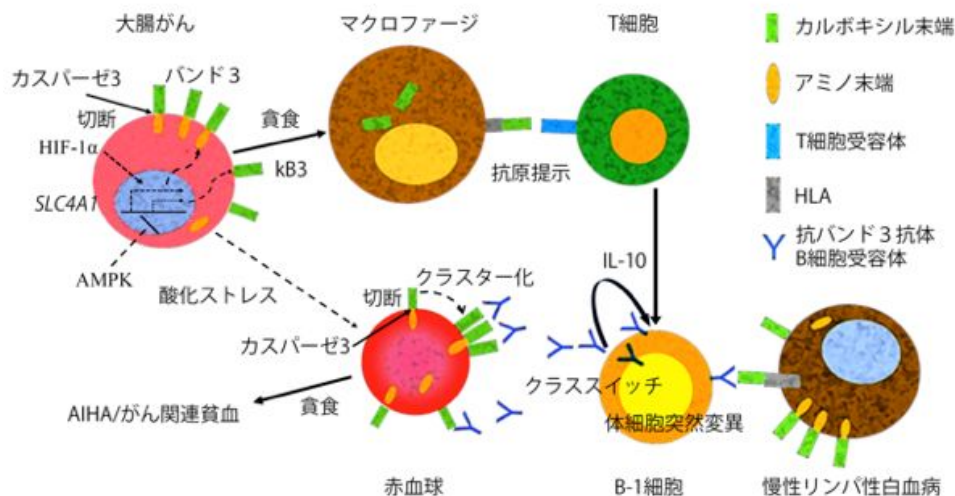


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawamoto S, Kamesaki T, Masutani R, Kitao A, Hatanaka K, Imakita M, Tamaki T, Takubo T.	4. 巻 83
2. 論文標題 Ectopic Expression of Band 3 Anion Transport Protein in Colorectal Cancer Revealed in an Autoimmune Hemolytic Anemia Patient	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Pathology	6. 最初と最後の頁 193~198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.humpath.2018.07.020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitao A, Kawamoto S, Kurata K, Hayakawa I, Yamasaki T, Matsuoka H, Sumi Y, Kakeji Y, Kamesaki T, Minami H.	4. 巻 111
2. 論文標題 Band 3 Ectopic Expression in Colorectal Cancer Induces an Increase in Erythrocyte Membrane-Bound IgG and May Cause Immune-Related Anemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 657~666
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-020-02831-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 川本 晋一郎	4. 巻 61
2. 論文標題 続発性自己免疫性溶血性貧血における自己抗体の標的分子の同定	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 491~501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.61.491	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 川本 晋一郎	4. 巻 61
2. 論文標題 自己免疫性溶血性貧血の診断と治療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1089~1097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.61.1089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 川本 晋一郎	4. 巻 71
2. 論文標題 自己免疫性溶血性貧血	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 458-459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 川本 晋一郎
2. 発表標題 自己免疫性溶血性貧血の診断と治療 -続発性について考える-
3. 学会等名 日本血液学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihito Kitao, Shinichiro Kawamoto, Keiji Kurata, Ikuyo Hayakawa, Hiroshi Matsuoka, Yasuo Sumi, Yoshihiro Kakeji, Toyomi Kamesaki, Hironobu Minami
2. 発表標題 Flow cytometric measurement of increased erythrocyte-bound IgG: A potential screening method for colorectal cancer (CRC)
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北尾 章人, 川本 晋一郎, 倉田 啓史, 早川 郁代, 山崎 隆, 松岡 広, 角 泰雄, 掛地 吉弘, 亀崎 豊実, 南 博信
2. 発表標題 Ectopic band 3 expression stimulates autoantibody production causing colorectal cancer-related anemia [演]
3. 学会等名 日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 大腸癌の検出方法	発明者 川本 晋一郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/037040	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------