

# 論文概要

## 論文題目

レクチン染色による膵癌を中心とした網羅的糖鎖発現解析

## 指導教員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 千葉滋教授

筑波大学大学院 人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

小澤佑介

#### 目的：

膵癌は、早期診断の困難なことから診断時の半数以上が進行癌であり、その予後は不良である。診断において既に臨床利用されている腫瘍マーカーは、糖鎖を認識しているものが多く知られている。蛋白質を修飾する糖鎖は、細胞表面を覆うように存在するが、その構造の多様さにより解析が困難であった。その中で、産業総合研究所にて開発されたレクチンマイクロアレイは、特有の糖鎖構造を認識、結合する蛋白質であるレクチンを用いた糖鎖解析法である。我々の研究室では、レクチンアレイを用いた膵癌における糖鎖解析を行い、さらにはレクチンをドラッグキャリアとして利用したマウス腹膜播種モデルにおける治療報告をした。また、膵癌は組織特異性として癌周囲の豊富な間質を認める。報告内で、レクチンを用いた染色が、組織内の糖鎖発現の局在を把握するのに非常に有効であることが明らかとなった。これまで、複数のレクチンによる横断的な糖鎖発現解析は報告されていなかった。本研究は、浸潤性膵管癌を対象とし、複数のレクチンを利用した染色により正常組織、及び癌組織での糖鎖発現を評価し、さらには5大癌、消化器領域の他臓器癌の染色結果と比較することで、特徴的な糖鎖を認識するレクチンを求めることを目的とする

#### 対象と方法：

対象検体となる臨床検体は、筑波大学附属病院で行われた手術症例を対象とした。5大癌、及び我々が治療対象とする消化器癌を中心に臓器を選択した。各症例数は食道癌 24 例、胃癌 24 例、結腸癌 12 例、直腸癌 12 例、膵癌 68 例、IPMN 24 例、膵内分泌腫瘍 24 例、胆管癌 24 例、乳癌 24 例、肺腺癌 12 例、肺扁平上皮癌 12 例とした。各症例より、癌部、非癌部を確認し、5 mm 大の部位を設定、組織アレイブロックを作成した。染色に用いたレクチンは、我々の研究室で行った膵癌細胞株に対するレクチンアレイ結果、また既報により癌に発現が多いとされる糖鎖認識レクチンを用いた。HRP を結合させたレクチンを用いて染色を行った。膵癌における CNL レクチン染色結果に基づき、陽性、陰性の 2 群間で術後の生存期間について統計解析を行った。

#### 結果：

24 例膵癌におけるレクチン染色結果では、O 型糖鎖短縮認識レクチンでは WFA 22/24、CNL 15/24、BPL 22/24、SSA 24/24、PNA 15/24 であった。正常組織の陽性率と比較した変化率では、CNL が 50% と高く、他レクチンについては 20% 以下であった。WFA、CNL、BPL、PNA については、間質と癌組織にコントラストを示した。シアル酸修飾認識レクチン染色結果は癌部陽性率 ACG (7/24)、SNA (16/24)、ADA (19/24)、PSL1a (9/24)、変化率はいずれも低値であった。フコース修飾認識レクチン結果は、BC2LCN 23/24、TJAH 24/24、UEAH19/24、

AAL25/25 と多くの症例で陽性を示した。変化率は、ほとんど認めなかった。N型糖鎖の分岐異常認識レクチン PHA-L の染色では、癌は全例染色されたが、正常との変化率は認めなかった。正常との変化率が高かった CNL について、各臓器癌検体で染色を行うと、主に腺癌での染色率が高かった。さらに、正常組織と癌でのレクチン反応性を比較すると、膵癌、IPMN での変化率が高かった。膵癌 68 例に対して染色を行い、CNL 陽性は 39 例、陰性は 28 例であった。術後生存期間において、CNL 陽性症例でその短縮が認められた( $p=0.0448$ )。

#### 考察：

膵癌における糖鎖発現はこれまで多くが報告されている。O-結合型糖鎖において、癌における糖鎖構造変化として短縮がおきた場合、GalNAc のみの構造をとり、Tn 抗原と呼ばれる。シアル酸が修飾した sTn と共にその発現が報告されている。フコース、シアル酸は糖鎖末端を修飾する。膵癌腫瘍マーカーである CA19-9、DUPAN-2 も、シアル酸、フコース修飾がされた糖鎖構造を利用していることが知られている。また、N型糖鎖の分岐異常は、糖転移酵素発現が変化することで糖鎖延長を来す。本研究結果において、各糖鎖認識レクチン結果は、既報に相応する結果となった。正常組織との比較では、CNL が高い変化率を示した。CNL は、ハイイロシメジ (*Clitocybe nebularis*)由来レクチンであり、O型糖鎖の短縮した Tn 抗原、 $\alpha\beta$ GalNAc に結合性を持つ。CNL は、これまで癌研究において報告例は無く、T細胞や toll like receptor への関与が報告されているのみである。膵癌研究において、他の Tn 認識レクチンと比較し優位性をもつことが示唆される結果となった。Tn 抗原は 1980 年代より癌との関連が報告されている。各種癌の報告において、O型糖鎖はムチンに多く含まれるとされ、短縮による細胞接着性の低下や、癌転移、浸潤能に寄与し、悪性度との関連性が指摘されている。我々の結果からも、同様の結果が得られており、レクチン染色による反応性の違いからも同様な糖鎖発現の評価が可能であることが示された。IPMN でも CNL は陽性率が高い。前癌病変と考慮すると、癌分化における糖鎖発現においても CNL 認識糖鎖の関与が示唆された。

#### 結論：

本研究は、浸潤性膵管癌に特徴的な糖鎖発現を認識するレクチン探索を目標とした。レクチン染色により膵組織内の糖鎖発現の局在を示すことが可能であった。正常膵管との染色結果の比較により、 $\alpha\beta$ GalNAc を認識する CNL が、膵癌に特徴的な糖鎖発現を認識することが示唆された。しかしながら、CNL が他臓器を含めた正常組織内への反応性、血液凝集性を強く持つことから、血清内糖鎖を認識する腫瘍マーカーやドラッグキャリアとしての応用利用は、現時点では困難である。