

氏名	小澤 佑介		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 9182 号		
学位授与年月	平成 31年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	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		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	佐藤 豊実
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	工藤 崇
副査	筑波大学講師	博士（医学）	福田 邦明
副査	筑波大学助教	博士（医学）	柴 綾

論文の内容の要旨

小澤佑介氏の博士学位論文は、膵癌における特徴的な糖鎖発現を認識するレクチンを探索したものである。その要旨は以下のとおりである。

著者は研究の背景として、まず、膵癌は早期診断が困難なことから診断時の半数以上が進行癌であり、その予後が不良であることを挙げている。著者は、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おり、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としている。その様ななか、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、著者らの研究室では、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とのことである。また、膵癌は組織特異性として癌周囲に豊富な間質を認め、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を明らかにしている。そして、これまで複数のレクチンによる横断的な糖鎖発現解析が報告されていなかったことから、著者は、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した研究を行ったものである。

著者は、対象を5大癌、及び著者が治療対象とする消化器癌とし、検体は筑波大学附属病院で行われた手術症例から得ている。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、IPMN24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例であったと述べている。著者は各症例より、癌部、非癌部を確認し、5mm大の部位を設定、組織アレイブロックを作成している。染色に用いたレクチンは、著者ら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としている。HRPを結合さ

せたレクチンを用いて染色を行っている。膵癌における CNL レクチン染色結果に基づき、著者は陽性、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ている。

著者は 24 例の膵癌患者検体におけるレクチン染色結果として、O 型糖鎖短縮認識レクチンでは WFA22/24、CNL15/24、BPL22/24、SSA24/24、PNA15/24 の結果を得ている。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%以下とのことであった。WFA、CNL、BPL、PNA については、間質と癌組織にコントラストを示す結果を得ている。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)で、変化率はいずれも低値であることを示している。フコース修飾認識レクチン結果は、BC2LCN 23/24、TJAI 24/24、UEAI19/24、AAL25/25 と多くの症例で陽性を示し、変化率はほとんど認めないとのことであった。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ことを示している。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い、主に腺癌での染色率が高いこと、さらには正常組織と癌でのレクチン反応性を比較すると、膵癌、IPMN での変化率が高いことを明らかにした。また、膵癌 68 例に対して CNL の染色を行い、陽性は 39 例、陰性は 28 例で、術後生存期間が CNL 陽性症例で短縮していたことも明らかにした(p=0.0448)。

著者は、考察の中で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こと、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 抗原と呼ばれること、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こと、フコース、シアル酸は糖鎖末端を修飾すること、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こと、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ことを取り上げ著者の研究結果との比較検討を行っている。著者の研究における各糖鎖認識レクチン結果は、既報に相応する結果であったと考察している。

CNL は、O 型糖鎖の短縮した Tn 抗原、 α GalNAc に結合性を持つハイロシメジ(*Clitocybe nebularis*)由来レクチンであるが、T 細胞や toll like receptor への関与が報告されているのみで、これまで癌研究において報告例はなかったが、著者は正常組織との比較で、CNL が高い変化率を示すことを始めて明らかにし、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を示す結果を得たとしている。Tn 抗原は 1980 年代より癌との関連が報告されており、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おり、著者の研究結果も同様で、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と考察している。さらに、IPMN でも CNL は陽性率が高く、IPMN が膵癌の前癌病変であることを考慮すると、癌分化における糖鎖発現においても CNL 認識糖鎖が関与している可能性を示すことが出来たと考察している。

著者の研究目標は、浸潤性膵管癌に特徴的な糖鎖発現を認識するレクチンの探索であった。著者はレクチン染色により膵組織内の糖鎖発現の局在を示せることを明らかにした。正常膵管との染色結果の比較により、 α 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も明らかにした。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と結論づけている。

審査の結果の要旨

(批評)

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ず、著者の研究は独創的である。複数のレクチンの染色を行い正常組織、及び癌組織での糖鎖発現を評価し、対照疾患を自らが専門とする消化器癌に留めず、5 大癌すべての染色結果と比較し、CNL が浸潤性膵管癌に特徴的な糖鎖発現を認識することを明らかにした本研究は、膨大なエネルギーと繊細な科学的思考によって成り立ったものである。

平成 30 年 12 月 27 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。