

学 位 論 文 題 名

Expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V
in the development of human esophageal cancers:
immunohistochemical data from carcinomas
and nearby non-cancerous lesions

(食道癌の発生における

N-acetylglucosaminyltransferase V [GnT-V] 発現の意義)

学位論文内容の要旨

【背景】 癌の発生・浸潤・転移の過程には種々の分子が関与する。*N*-acetylglucosaminyltransferase V (以下, GnT-V)はアスパラギン結合型糖鎖の分岐鎖構造の決定に関与し, β 1,6GlcNAc鎖 (以下, β 1,6鎖) という特徴的な糖鎖構造をつくる。大腸癌や乳癌では, GnT-Vは癌の転移に関連が深い糖転移酵素で, 臨床的には術後再発や予後不良に関与することが報告されている。一方, 肝細胞癌では, 癌化の過程の初期段階に関わっていることが示されている。食道の正常粘膜においては, β 1,6鎖は基底細胞層では発現がみられるが表層では発現がないこと, また浸潤癌では発現していることが示されている。しかし, 食道癌およびその前癌病変におけるGnT-Vの発現の報告はない。

【目的】 食道癌およびその前癌病変においてGnT-Vの発現を免疫組織化学的に解析し, その臨床的, 臨床病理学的意義を検討し, 食道癌の発生におけるGnT-V発現の意義を明らかにした。

【材料】 材料として, 1989年から1999年に北大病院第二外科, 手稲溪仁会病院, および北海道消化器科病院で切除された食道癌121腫瘍を用いた。

【方法】 手術摘出食道癌のホルマリン固定パラフィン包埋病理組織を4 μ m厚に薄切し, 免疫組織化学的解析を行った。一次抗体は, リコンビナント・ヒトGnT-Vに対するマウスモノクローナル抗体 (Murata et al. Clin. Cancer Res., 2000) を用いた。同一病変内の10%以上の細胞が染色された場合を陽性, 10%未満を陰性と判定した。

癌の部分については, 細胞増殖能マーカーKi-67の発現も連続切片を用いて免疫組織化学的に解析した。一次抗体は, MIB-1 (Immunotech, Marseilles, France) を用いた。Videomicrometer (Model VM-30; Olympus, Tokyo, Japan)を用いて, 1000個の腫瘍細胞について陽性細胞率を算出した。

北大病院第二外科の49腫瘍については, β 1,6鎖を特異的に認識するL4-PHAレクチンを用いて, β 1,6鎖の発現を連続切片で免疫組織化学的に解析した。

北大病院第二外科の5腫瘍については, レクチンプロットを行い, 正常食道組織と β 1,6鎖の発現を比較した。レクチン反応には, ピオチン化L4-PHAレクチン (Seikagaku Corp., Tokyo, Japan) を用いた。

【結果】 GnT-Vの陽性率は, 食道癌周囲の正常粘膜で0% (0/19検体), 過形成で2% (1/43

検体), 軽度異形成で54% (30/56検体), 中等度異形成で63% (27/43検体), 上皮内癌で44% (21/48検体), 浸潤癌で26% (29/110検体)であった($p < 0.005$). GnT-Vの発現は, 軽度～中等度異形成において, 正常粘膜～過形成と比較し有意に頻度が高く($p < 0.005$), また上皮内癌～浸潤癌と比較して有意に頻度が高かった($p < 0.005$). 食道癌では, GnT-V陽性腫瘍は陰性腫瘍に比べて, 有意に腫瘍径が小さく($p = 0.03$), 遠隔転移の頻度が低かった($p = 0.045$). また, リンパ節転移の頻度が低い傾向にあった($p = 0.09$). しかし食道癌におけるGnT-Vの発現と術後生存期間や予後との関連はみられなかった.

さらに, 49 腫瘍の食道癌および周囲の正常粘膜の解析では, L4-PHA レクチン染色でみた $\beta 1,6$ 鎖の発現は, 正常食道粘膜の表層では発現はなく基底細胞層で発現がみられ, 一方, 癌では陽性であり, 必ずしも GnT-V の発現パターンとは一致しなかった. レクチンプロットでの5 腫瘍の解析では, 5 腫瘍すべてにおいて周囲の正常組織に比べ癌で発現が高くなっており, レクチン染色の結果と一致するものであった.

また, Ki-67 labeling index (以下, Ki-67 LI)は, T1 腫瘍に比べ T2-4 腫瘍で($p = 0.03$), N0 に比べ N1 で($p = 0.002$), v 陰性に比べ v 陽性で($p = 0.03$), 重複癌ありに比べなしで($p = 0.03$) 有意に高値であった. また, 高分化に比べ中～低分化で($p = 0.06$), ly 陰性に比べ ly 陽性で($p = 0.08$), 高値の傾向があった. 食道癌における Ki-67 LI と術後生存期間および予後との関係はみられなかったが, 悪性度の指標となることが示唆された.

【考察】 食道のGnT-Vの発現は, 正常粘膜では全くみられず, 中等度異形成で最も陽性率が高く, また, 腫瘍径が小さいことや遠隔転移がないこと, リンパ節転移がないことと関連があり, 以上より, 癌化の過程の初期段階に関わっている可能性が示唆された.

これまでの報告では, 乳癌と大腸癌において悪性化とともに $\beta 1,6$ 鎖が増加すること, また, GnT-Vの発現が術後生存率に影響することが示されている. 一方, 肝細胞癌では, 癌化の過程の初期段階に関わっていることが示されており, 食道癌における本研究の結果と類似している. 肝においてはGnT-V陽性率は, 正常肝組織0%, 慢性肝炎60%, 肝硬変71%, 腺腫様過形成100%, 肝細胞癌75%. 肝細胞癌ではGnT-Vの発現は, 腫瘍径が小さいこと, 中・高分化であること, 門脈浸潤がないことと有意に関連し, GnT-Vが低発現あるいは発現していない腫瘍では再発が多かった, と報告されている. また非小細胞肺癌では, 病理病期I期の患者においてGnT-V低発現が有意に術後生存期間が短く予後不良因子であったと報告されている. このように臓器によってGnT-V発現の意義が異なることから, 臓器によってGnT-Vによって糖鎖修飾を受ける標的タンパク質が異なっている可能性が考えられる.

本研究では, GnT-Vの発現とL-PHA染色による $\beta 1,6$ 鎖の発現は必ずしも一致しなかった. $\beta 1,6$ 鎖の形成のメカニズムには, GnT-Vの発現だけでなく, 基質のレベル, 競合する他の糖転移酵素の発現レベルやGnT-V以外の $\beta 1,6$ 鎖を形成する糖転移酵素(GnT-IX)などが複雑に関与すると考えられており, 食道では, $\beta 1,6$ 鎖形成はGnT-Vのみによって制御されていないことが示唆された.

【結論】 GnT-V は, 食道癌の発生過程の異形成においてもっとも高頻度に発現を認め, 発生・浸潤・転移過程のうちの発生過程に関与することが示唆された.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 近 藤 哲
副 査 教 授 西 村 正 治
副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学 位 論 文 題 名

Expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V
in the development of human esophageal cancers:
immunohistochemical data from carcinomas
and nearby non-cancerous lesions

(食道癌の発生における

N-acetylglucosaminyltransferase V〔GnT-V〕発現の意義)

N-acetylglucosaminyltransferase V (以下, GnT-V)はアスパラギン結合型糖鎖の分岐鎖構造の決定に関与し, β 1,6GlcNAc 鎖 (以下, β 1,6 鎖) という特徴的な糖鎖構造をつくる。大腸癌や乳癌では, GnT-V は癌の転移に関連が深い糖転移酵素で, 臨床的には術後再発や予後不良に関与することが報告されている。一方, 肝細胞癌では, 癌化の過程の初期段階に関わっていることが示されている。食道の正常粘膜においては, β 1,6 鎖は基底細胞層では発現がみられるが表層では発現がないこと, また浸潤癌では発現していることが示されている。しかし, 食道癌およびその前癌病変における GnT-V の発現の報告はない。そこで手術摘出食道癌およびその前癌病変において GnT-V の発現を免疫組織化学的に解析し, その臨床的, 臨床病理学的意義を検討し, 食道癌の発生における GnT-V 発現の意義を明らかにした。GnT-V の陽性率は, 食道癌周囲の正常粘膜で 0% (0/19 検体), 過形成で 2% (1/43 検体), 軽度異形成で 54% (30/56 検体), 中等度異形成で 63% (27/43 検体), 上皮内癌で 44% (21/48 検体), 浸潤癌で 26% (29/110 検体)であった($p < 0.005$)。GnT-V の発現は, 軽度~中等度異形成において, 正常粘膜~過形成と比較し有意に頻度が高く($p < 0.005$), また上皮内癌~浸潤癌と比較して有意に頻度が

高かった($p < 0.005$). 食道癌では, GnT-V 陽性腫瘍は陰性腫瘍に比べて, 有意に腫瘍径が小さく($p = 0.03$), 遠隔転移の頻度が低かった($p = 0.045$). また, リンパ節転移の頻度が低い傾向にあった($p = 0.09$). しかし食道癌における GnT-V の発現と術後生存期間や予後との関連はみられなかった. さらに, 49 腫瘍の食道癌および周囲の正常粘膜の解析では, L-PHA レクチン染色でみた $\beta 1,6$ 鎖の発現は, 正常食道粘膜の表層では発現はなく基底細胞層で発現がみられ, 一方, 癌では陽性であり, 必ずしも GnT-V の発現パターンとは一致しなかった. L-PHA レクチンプロットによる 5 腫瘍の解析では, 5 腫瘍すべてにおいて周囲の正常組織に比べ癌で発現が高くなっており, レクチン染色の結果と一致するものであった. 以上より, 食道の GnT-V の発現は, 正常粘膜では全くみられず, 中等度異形成で最も陽性率が高く, また, 腫瘍径が小さいことや遠隔転移がないこと, リンパ節転移がないことと関連があることから, 発生・浸潤・転移過程の発生過程に関わっている可能性が示唆された. また本研究では, GnT-V の発現と L-PHA 染色による $\beta 1,6$ 鎖の発現は必ずしも一致しなかった. $\beta 1,6$ 鎖の形成のメカニズムには, GnT-V の発現だけでなく, 基質のレベル, 競合する他の糖転移酵素の発現レベルや GnT-V 以外の $\beta 1,6$ 鎖を形成する糖転移酵素 (GnT-IX) などが複雑に関与すると考えられており, 食道では, $\beta 1,6$ 鎖形成は GnT-V のみによって制御されていないことが示唆された.

審査にあたり, 副査近藤教授から 1) 浸潤癌における GnT-V 発現低下の機序について, 2) 臨床応用の可能性について, 副査西村教授から 1) 免疫染色と酵素活性の一致性について, 2) 癌種による GnT-V の機能の違いについて, 3) 細胞外における GnT-V について, 副査秋田教授から 1) 食道癌における GnT-V の標的タンパク質の同定方法について, 2) 予防や診断への応用の可能性についての質問があった. 次いで主査今村教授から 1) 炎症での GnT-V の発現について, 2) GnT-V を遺伝子導入した際の細胞の形質変化について, 3) GnT-V による悪性化の抑制の可能性についての質問があった. 申請者はこれらの質問に対して自験データと文献を引用して概ね適切に解答した.

この論文は, GnT-V の食道における癌の発生への関連を示した点, また癌の進展との関連の可能性を示した点で高く評価され, 今後広く応用されることが期待される.

審査員一同は, これらの成果を高く評価し, 大学院課程における研鑽と単位取得なども併せ, 申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した.