

学位論文題名

N-acetylglucosaminyltransferase V expression is
implicated in malignant phenotype of
human tongue squamous cell carcinoma

(ヒト舌扁平上皮癌における N-アセチルグルコサミン転移酵素 V の
発現と悪性形質との関連)

学位論文内容の要旨

【目的】

細胞表面の糖鎖構造は細胞ががん化すると、正常な細胞由来の糖鎖構造とは全く異なることが知られている。その糖鎖を合成する糖転移酵素の一つである N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) は、細胞のゴルジ装置に局在し、741 アミノ酸からなる II 型の膜貫通型糖タンパクであり、UDP-N アセチルグルコサミンを基質としてアスパラギン結合型糖鎖の α 1-6 マンノース基に β 1-6 鎖を転移し、三本鎖の高分岐糖鎖を合成する酵素である。 β 1-6 分岐糖鎖と腫瘍の転移との関連は、以前より報告されているが、合成酵素である GnT-V に関する分子レベルでの詳細な機構は不明な点が多く、その発現も腫瘍の種類や組織型によって異なるといわれている。これまでに、大腸がんや乳がんなどにおいて GnT-V の発現と腫瘍の浸潤・転移に関与し、予後不良に関連する報告がなされたが、mRNA 発現について検索したものはなく、頭頸部領域での報告はみられない。

今回、ヒト舌扁平上皮がんにおける GnT-V の発現意義を明らかにする目的で、北海道大学病院歯科診療センターにおいて治療を行った舌扁平上皮がん症例および、前癌病変である舌白板症のうち上皮異型を伴う症例において、GnT-V の発現を検索し、臨床病理学的所見との関連性について検討した。

【対象】

1995年1月から2004年7月までに北海道大学病院歯科診療センターを受診し、臨床的・病理組織学的に舌扁平上皮がんと診断された一次癌症例40例および上皮異型を伴う白板症と診断された4例を対象とし、外科的に切除した生検組織を検体とした。また、コントロールとして、健常成人ボランティア7名の同意を得て採取した舌粘膜を用いた。

【方法】

免疫染色による GnT-V タンパクの発現：ホルマリン固定パラフィン包埋された生検組織試料より、4 μ mの薄切標本を作製した。大阪大学生化学教室より供与された抗 GnT-V モノクローナル抗体を用い、通法に従い免疫組織化学染色を行い、GnT-V タンパクの発現を検索した。染色の評価は、全上皮細胞のうち、核周囲の細胞質にドット状に染色性を示した細胞の割合で評価し、その割合が10%未満のものを GnT-V タンパク陰性、10%以上のものを GnT-V タンパク陽性とした。

Real-time PCR assay による GnT-V mRNA 発現の検討：対象症例のうち新鮮材料が得られた症例において、GnT-V mRNA 発現検索を行った。サンプルは RNA later に浸漬し、液体窒素で急速冷凍後、RNA 抽出までの間、-80℃で保存した。これらの検体から TRI Reagent を用いて total RNA を抽出し、Bioanalyzer 2100 により RNA の分解がないことを確認した。抽出した total RNA 1 μ g から、RT 反応により cDNA を合成し、OpticonTM2 を用いた real-time PCR を行い GnT-V mRNA の発現を定量的に測定した。GnT-V 遺伝子に対する特異的プライマーによる増幅と同時に、 β -actin を増幅し、これを内部標準とした。

【結果】

① 扁平上皮がん 40 症例の臨床病理学的解析

性別は男性 27 例、女性 13 例で、初診時の平均年齢は 59.13 歳であった。腫瘍の臨床病期分類は UICC 分類に、組織学的悪性度は WHO 分類に従った。T 分類では Tis 1 例、T1 11 例、T2 17 例、T3 5 例、T4 6 例であった。N 分類では、N1 3 例、N2 8 例、N3 1 例で、初診時 N0 であった 28 例中 8 例は、経過観察中に頸部リンパ節後発転移を認め、40 例中 20 例が転移症例であった。遠隔転移は 1 例で

のみ認めた。組織学的悪性度では、Grade I 19 例、Grade II 19 例、Grade III 2 例であった。腫瘍の浸潤様式は Totsuka らの分類に従い、膨張型 13 例、浸潤型 27 例であった。

② 免疫染色による GnT-V タンパク発現と臨床病理学的所見との関連

正常舌粘膜および舌白板症における GnT-V タンパク発現を検索したところ、全例で、GnT-V タンパク発現は認められなかった。一方、扁平上皮がんでは、40 例中 26 例(65%)で、がん細胞の細胞質に GnT-V タンパク発現を認め、舌扁平上皮がんにおける GnT-V タンパクの発現率は、正常舌粘膜や白板症に対し、有意に高かった($p=0.006$)。臨床病理学的所見との関連を検討したところ、GnT-V タンパク発現が認められた 26 例中 17 例(65.4%)は初診時および経過観察中に頸部リンパ節転移を認めたのに対し、GnT-V タンパク発現が認められなかった 14 例では 3 例(21.4%)にのみリンパ節転移が認められた($p=0.019$)。さらに、臨床病期 stage II までの早期症例 24 例を対象として検索したところ、リンパ節後発転移を認めた 7 例中 6 例で GnT-V タンパク発現を認めた($p=0.06$)。腫瘍の浸潤様式との関連については、GnT-V タンパク発現が認められた 26 例中 22 例(84.6%)は浸潤型増殖をしめし、GnT-V タンパク発現が認められなかった 14 例中 5 例(34.7%)にくらべ、浸潤型増殖を示す症例が有意に多かった($p=0.004$)。

③ Real-time PCR assay による GnT-V mRNA 発現

舌扁平上皮がんにおける GnT-V の発現レベルを検討するために、正常舌粘膜における mRNA の定量を行い、その発現量の平均 $\pm 1SD$ をカットオフ値とし、その範囲内のものを低発現、それ以上のものを高発現と設定した。舌白板症では GnT-V mRNA 発現亢進は認められなかったのに対し、舌扁平上皮がんでは、19 例中 15 例(78.9%)で GnT-V mRNA が高発現し($p=0.002$)、免疫染色との相関性も認められた。

【考察】

舌扁平上皮がんにおいて、前癌病変である白板症に比べ、GnT-V mRNA、タンパクともに有意に多く発現が認められたことから、がん化に伴って GnT-V が発現

亢進することが明らかになった。さらに、GnT-V 発現と腫瘍の浸潤様式および頸部リンパ節転移とは有意な相関関係が認められたことから、腫瘍の悪性形質発現との関連が示唆された。腫瘍浸潤・転移の過程には、成長因子、接着因子、プロテアーゼ、細胞内シグナル伝達因子のような種々の分子が関与するが、これらのいくつかは糖鎖修飾されることによって機能する糖タンパク質である。実験腫瘍において、GnT-V の合成する β 1-6 鎖により糖鎖修飾をうけたインテグリン α 5 β 1 は細胞外基質への接着が減弱することや、カドヘリン-カテニン複合体を不活性化すること、さらに近年、GnT-V の標的タンパクとして同定されたマトリプターゼによるフィブロネクチンの直接分解作用や、HGF、u-PA の活性化による細胞運動性の亢進が示され、GnT-V の発現は腫瘍の浸潤や転移と密接な関連があるものと考えられている。今回、ヒト舌扁平上皮がんにおいて、発現亢進した GnT-V がこれらの分子に対し糖鎖修飾をすることで腫瘍の生物学的特性を変化させ、浸潤やリンパ節転移といった腫瘍の悪性形質に関与した可能性が考えられた。

【結論】

ヒト舌扁平上皮癌がんにおいて、GnT-V の発現は、舌がんの発症および浸潤や転移といった腫瘍細胞の悪性形質に関与し、その発現検索が口腔扁平上皮がんの悪性度の評価因子の一つとなりうる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 川 善 政

副 査 教 授 進 藤 正 信

副 査 教 授 戸 塚 靖 則

学 位 論 文 題 名

N-acetylglucosaminyltransferase V expression is implicated in malignant phenotype of human tongue squamous cell carcinoma

(ヒト舌扁平上皮癌における N-アセチルグルコサミン転移酵素 V の
発現と悪性形質との関連)

審査は、審査委員全員の出席の下に口頭試問の形式により行われた。申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について試問を行った。審査論文の概要は以下の通りである。

本研究は、がん細胞の機能的特性の一つとして、細胞表面の糖鎖構造は細胞ががん化すると正常な細胞由来の糖鎖構造とは異なる点に注目し、ヒト舌扁平上皮がんにおいて、糖鎖の合成酵素の一つである N-アセチルグルコサミン転移酵素 V(GnT-V)の発現と腫瘍の悪性形質との関連性について検討したものである。

実験は、1995 年 1 月から 2004 年 7 月までに北海道大学病院歯科診療センターを受診し、臨床的・病理組織学的に舌扁平上皮がんと診断された一次がん症例 40 例と上皮異型を伴う舌白板症と診断された 4 例、および対照群として正常舌粘膜 7 例を対象症例とし、採取した生検組織を用いて、GnT-V のタンパク発現を免疫組織学的に検索した。正常舌粘膜および舌白板症における GnT-V タンパク発現を検索したところ、全例で、GnT-V タンパク発現は認められなかった。一方、扁平上皮がんでは、40 例中 26 例(65%)で、がん細胞の細胞質に限局して GnT-V タンパク発現を認め、舌扁平上皮がんにおける GnT-V タンパクの発現率は、正常舌粘膜や白板症に対し、有意に高かった($p=0.006$)。臨床病理学的所見との関連を検討したところ、GnT-V タンパク発現が認められた 26 例中 17 例(65.4%)では初診時および経過観察中に頸部リンパ節転移を認めたのに対し、GnT-V タンパク発現が認められなかった 14 例では 3 例(21.4%)にのみリンパ節転移を認めた($p=0.019$)。さらに、臨床病期 stage II までの早期症例 24 例を対象として検索したところ、リンパ節後発転移を認めた 7 例中 6 例で GnT-V

タンパク発現を認めた($p=0.06$)。腫瘍の浸潤様式との関連については、GnT-V タンパク発現が認められた 26 例中 22 例(84.6%)は浸潤型増殖を示し、GnT-V タンパク発現が認められなかった 14 例中 5 例(34.7%)に比べ、浸潤型増殖を示す症例が有意に多かった($p=0.004$)。さらに、対象症例のうち新鮮凍結材料の得られた 23 症例に対し、GnT-V mRNA の発現を real-time RT-PCR 法で検索した。正常舌粘膜における GnT-V mRNA 発現量の平均 ± 1 SD をカットオフ値とし、その範囲内のものを低発現群、それ以上のものを高発現群とした。舌白板症では GnT-V mRNA 発現亢進は認められなかったのに対し、舌扁平上皮がんでは、19 例中 15 例(78.9%)で GnT-V mRNA が高発現し($p=0.002$)、免疫化学染色との相関性が認められた。GnT-V mRNA 発現量と頸部リンパ節転移との関連を検討したところ、GnT-V mRNA 高発現群では低発現群に比べ、頸部リンパ節転移を認めた症例が多かった。

本研究を行い、ヒト舌扁平上皮がんにおいて、前癌病変である白板症に比べ、GnT-V mRNA、タンパクともに有意に多く発現が認められたことから、がん化したものにのみ GnT-V が発現亢進することが明らかになった。さらに、GnT-V 発現と腫瘍の浸潤様式および頸部リンパ節転移とは有意な相関関係が認められたことから、腫瘍の悪性形質発現との関連が示唆された。腫瘍浸潤・転移の過程には、成長因子、接着因子、プロテアーゼ、細胞内シグナル伝達因子のような種々の分子が関与するが、これらのいくつかは糖鎖修飾されることによって機能する糖タンパク質である。実験腫瘍において、GnT-V の合成する $\beta 1-6$ 鎖により糖鎖修飾をうけたインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ は細胞外基質への接着が減弱することや、カドヘリン-カテニン複合体を不活性化すること、さらに近年、GnT-V の標的タンパクとして同定されたマトリプターゼによるフィブロネクチンの直接分解作用や、HGF、u-PA の活性化による細胞運動性の亢進が示され、GnT-V の発現は腫瘍の浸潤や転移と密接な関連があるものと考えられている。今回、ヒト舌扁平上皮がんにおいて、発現亢進した GnT-V がこれらの分子に対し糖鎖修飾をすることで腫瘍の生物学的特性を変化させ、浸潤やリンパ節転移といった腫瘍の悪性形質に関与した可能性が考えられた。これらのことから、GnT-V の発現検索が舌扁平上皮がんの悪性度の評価因子の一つとなりうる可能性が示唆された。

論文審査にあたって、論文申請者による研究要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。主な質問事項は、1) GnT-V の腫瘍浸潤や転移に関与する機序、2) 糖鎖のもつ一般的な機能、3) がん化と浸潤増殖の違い、4) アポトーシスとの関係、等であった。これらの質問に対して申請者から適切かつ明快な回答、説明が得られ、研究の立案と遂行、結果の収集とその評価について申請者が十分な能力を有していることが確認された。本研究は、がん細胞表面に高分岐の $\beta 1-6$ 鎖を合成する GnT-V の発現検索が舌扁平上皮がんの悪性度の評価因子になる可能性を示したものであり、その内容が高く評価された。申請者は、関連分野にも幅広い学識を有していると認められ、さらに発がん、がん化過程についての研究を進めており、将来性についても評価された。本研究業績は口腔癌治療のみならず関連領域にも寄与すること大であり、博士(歯学)の学位に値するものと認められた。