

非小細胞肺癌における α 1,6-fucosyltransferase と GDP-mannose-4,6-dehydratase の発現の意義に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】肺癌は世界中で癌死の主な原因のひとつである。非小細胞肺癌の治療は改善しているが、生存率を画期的に上昇させるような治療の発展は、まだ乏しく、5年生存率はいまだ 15%前後のままである。肺癌の発病とその腫瘍生物学をより良く理解することは、組織学的診断や予後予測、個別化治療や分子標的治療を促進する可能性がある。

アスパラギン結合型オリゴ糖は、腫瘍化した細胞の糖タンパク質の活性をコントロールすることによって、しばしば腫瘍の生物学的特徴の制御に役割を果たしている。各オリゴ糖は、グリコシル化を通して糖タンパク質の機能に影響を及ぼす、特異的な糖転移酵素によって合成される。 α 1,6-fucosyltransferase (α 1,6-FT) は GDP-フコースからアスパラギン結合オリゴ糖の混成複合体である GlcNAc 残基の一番内側の 6 位へのフコース残基の転写を触媒し、結果的にコア α 1,6 フコシル化する。 α 1,6-FT の基質である GDP-フコースは、GDP-mannose-4,6-dehydratase (GMD) によって GDP-フコースから生成される。 α 1,6-FT および GMD の発現はヒト肺癌ではまだ検討されていない。

本研究では、 α 1,6-FT および GMD の発現を、外科的に切除された非小細胞肺癌において免疫組織学的に解析し、その生物学的、臨床的な意義を解析した。

【材料と方法】本研究では、1981 年から 1994 年までに北海道大学病院で外科手術を施行し連続的に得られた 156 検体の非小細胞癌の原発腫瘍検体を用い、扁平上皮癌 64 検体、腺癌 82 検体、腺扁平上皮癌 7 検体、大細胞癌 2 検体であった。

α 1,6-FT、GMD の発現は、それぞれに対する特異抗体を用いて、免疫組織化学的に解析された。標識化ビオチン-ストレプトアビジン法が 4 μ m 厚のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片で使用された。 α 1,6-FT および GMD の発現は、腫瘍細胞の陽性染色割合に基づいて分類された(高発現は 50%以上、中等度発現は 10%以上 50%未満、低発現は 10%未満)。

コア α 1,6 フコシル化アスパラギン結合型オリゴ糖の合成は、*Pholiota squarrosa* lectin (PhoSL) 組織化学染色で解析し、PhoSL 結合反応度は腫瘍細胞の陽性染色割合に基づいて分類された(高発現は 50%以上、中等度発現は 10%以上 50%未満、低発現は 10%未満)。

【結果】正常気管支線毛円柱上皮細胞、気管支腺細胞において、 α 1,6-FT 発現は細胞質の顆粒状染色(ゴルジ装置パターン)を認めた。非小細胞肺癌における α 1,6-FT の発現は、高発現 25 腫瘍 (16.0%)、中等度発現 35 腫瘍 (22.4%)、低発現 96 腫瘍 (61.6%) であった。 α 1,6-FT 発現と χ^2 検定で有意な関係を示した因子について、多変量ロジスティック回帰分析の結果、 α 1,6-FT 低発現は組織型と有意な関係があり、扁平上皮癌では、非扁平上皮癌に比し有意に発現が低下していた(低発現 vs. 中等度発現、 $p = 0.0005$; 低発現 vs. 高発現、 $p = 0.005$)。この非小細胞肺癌コホートで、以前に解析された腫瘍の生物学的因子のうち、Ki-67 labeling index (LI) は、 α 1,6-FT 低発現腫瘍において、中等度発現および高発現腫瘍に比し有意に高かった(低発現 vs. 中等度発現、 $p = 0.01$; 低発現 vs. 高発現、 $p = 0.001$)。Cyclin E LI は、 α 1,6-FT 低発現腫瘍において、中等度発現腫瘍に比し有意に高かった(低発現 vs. 中等度発現、 $p = 0.04$)。

非小細胞肺癌における GMD の発現は、高発現 32 腫瘍(20.5%)、中等度発現 32 腫瘍(20.5%)、低発現 92 腫瘍 (59.0%) であった。GMD 発現と χ^2 検定で有意な関係を示した臨床的因子について、多変量ロジスティック回帰分析の結果、 GMD 低発現は組織型と有意な関係があり、扁平上皮癌では、非扁平上皮癌に比し有意に発現が低下していた (low vs. moderate, $p = 0.005$; low vs. high, $p = 0.02$)。この非小細胞肺癌コホートで、以前に解析された腫瘍の生物学的因子のうち、Ki-67 LI は、GMD 低発現腫瘍において、高発現腫瘍に比し有意に高かった (low vs. high, $p = 0.003$)。Cyclin E LI は、GMD 低発現腫瘍において、高度発現腫瘍に比し有意に高かった (low vs. high, $p = 0.03$)。α1,6-FT の低発現は、GMD 低発現腫瘍において、中等度発現および高発現腫瘍に比し有意に高頻度に認めた($p = 0.002$)。α1,6-FT、GMD の発現の程度により、患者の術後生存期間に有意差を認めなかった。

α1,6-FT および GMD の発現とコア α1,6 フコシル化アスパラギン結合型オリゴ糖合成の関係を PhoSL 組織化学染色で解析した。α1,6-FT と GMD の両方とも高発現の 8 腫瘍では、6 腫瘍が高発現 PhoSL 染色、2 腫瘍が中等度 PhoSL 染色であった。α1,6-FT と GMD の両方とも低発現の 9 腫瘍では、6 腫瘍が低発現 PhoSL 染色、1 腫瘍が中等度 PhoSL 染色、2 腫瘍が高発現 PhoSL 染色であった ($p = 0.02$)。

【考察】本研究で α1,6-FT と GMD の発現は、気管支線毛円柱上皮細胞や気管支腺細胞が発現しているにもかかわらず、非小細胞肺癌腫瘍検体の半数以上において調和して減少・消失していることが明らかになった。α1,6-FT と GMD の発現は、有意に組織型と関係があり、α1,6-FT と GMD の低発現は、非扁平上皮癌に比し扁平上皮癌で高頻度だった。さらに、コア α1,6 フコシル化アスパラギン結合型オリゴ糖と特異的に結合する PhoSL 組織化学によって、α1,6-FT と GMD がともに高発現の腫瘍において、コア α1,6 フコシル化アスパラギン結合型オリゴ糖が合成されていることが示された。

非小細胞肺癌は、α1,6-FT を発現する気管支線毛円柱上皮細胞と肺胞上皮細胞に由来し、α1,6-FT の発現はそれらの正常細胞の生理機能にとって重要である。α1,6-FT 遺伝子 (*Fut8*) ノックアウトマウスでは、TGF-β1R のコア α1,6 フコシル化欠損によって、発育遅延と肺の肺気腫様変化を示し α1,6-FT が正常肺の発達と維持にとって重要であることが示されている。癌の発生や進展における α1,6-FT 発現の有無の生物学的重要性は、生理機能維持の場合同様、コア α1,6 フコシル化の標的タンパク質に依存する。α1,6-FT の発現低下は、標的糖タンパク質におけるコア α1,6 フコシル化オリゴ糖の合成を減少させることにより、扁平上皮癌の組織型や Ki-67・cyclinE の高発現を含む、非小細胞肺癌の生物学的特性を変化させることに貢献している可能性もある。TGF-β1R、EGFR、E-カドヘリン、インテグリンは α1,6-FT によるコア α1,6 フコシル化の標的タンパク質であることが知られているが、非小細胞肺癌において標的糖タンパク質は、まだ明らかにされておらず、今後、同定する必要がある。

今後の研究課題として、非小細胞肺癌（特に扁平上皮癌）の生物学において、α1,6-FT および GMD の発現低下の実際的な関与と重要性を明らかにすること、α1,6-FT および GMD のグリカン産物（コア α1,6 フコース）の減少・消失の関与と重要性を明らかにすることが挙げられる。さらに、α1,6-FT と GMD の発現が非小細胞肺癌の組織型マーカーとなるかどうかを検討することも必要である。

【結論】非小細胞肺癌において、糖転移酵素 α1,6-FT およびフコース合成酵素 GMD の発現は正の相関を示し、コア α1,6 フコース合成において協働的に機能している可能性が示唆される。また両酵素の発現は、組織型と有意な関係があり、扁平上皮癌では非扁平上皮癌に比し発現が有意に低下しており、この両酵素は組織型に特異的な発現を示す分子であることが示唆される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	松野吉宏
副査	教授	岩永敏彦
副査	教授	秋田弘俊
副査	教授	西村正治

学位論文題名

非小細胞肺癌における α 1,6-fucosyltransferase と GDP-mannose-4,6-dehydratase の発現の意義に関する研究

アスパラギン結合型オリゴ糖は、腫瘍化した細胞の糖タンパク質の活性をコントロールすることによって、しばしば腫瘍の生物学的特徴の制御に役割を果たしている。各オリゴ糖は、グリコシル化を通して糖タンパク質の機能に影響を及ぼす、特異的な糖転移酵素によって合成される。 α 1,6-fucosyltransferase (α 1,6-FT) は GDP-フコースからアスパラギン結合オリゴ糖の混成複合体である GlcNAc 残基の一番内側の 6 位へのフコース残基の転写を触媒し、結果的にコア α 1,6 フコシル化する。 α 1,6-FT の基質である GDP-フコースは、GDP-mannose-4,6-dehydratase (GMD) によって GDP-マンノースから生成される。 α 1,6-FT および GMD の発現はヒト肺癌ではまだ検討されていない。本研究では、 α 1,6-FT および GMD の発現を、外科的に切除された非小細胞肺癌において免疫組織化学的に解析し、その生物学的、臨床的な意義を検討した。1981 年から 1994 年までに北海道大学病院で外科手術を施行し連続的に得られた 156 検体の非小細胞癌の原発腫瘍検体を用い、 α 1,6-FT、GMD の発現は、それぞれに対する特異抗体を用いて、免疫組織化学的に解析された。 α 1,6-FT および GMD の発現は、腫瘍細胞の陽性染色割合に基づいて分類された（高発現は 50%以上、中等度発現は 10%以上 50%未満、低発現は 10%未満）。コア α 1,6 フコシル化アスパラギン結合型オリゴ糖の合成は、*Pholiota squarrosa* lectin (PhoSL) 組織化学染色で解析し、PhoSL 結合反応度は腫瘍細胞の陽性染色割合に基づいて分類された（高発現は 50%以上、中等度発現は 10%以上 50%未満、低発現は 10%未満）。正常気管支線毛円柱上皮細胞、気管支腺細胞において、 α 1,6-FT 発現は細胞質の顆粒状染色（ゴルジ装置パターン）を認めた。非小細胞肺癌における α 1,6-FT の発現は、高発現 25 腫瘍（16.0%）、中等度発現 35 腫瘍（22.4%）、低発現 96 腫瘍（61.6%）であった。 α 1,6-FT 発現と χ^2 検定で有意な関係を示した因子について、多変量ロジスティック回帰分析の結果、 α 1,6-FT 低発現は組織型と有意な関係があり、扁平上皮癌では、非扁平上皮癌に比し有意に発現が低下し

ていた。この非小細胞肺癌コホートで、以前に解析された腫瘍の生物学的因子のうち、Ki-67 labeling index (LI) は、 $\alpha 1,6$ -FT 低発現腫瘍において、中等度発現および高発現腫瘍に比し有意に高かった。Cyclin E LI は、 $\alpha 1,6$ -FT 低発現腫瘍において、中等度発現腫瘍に比し有意に高かった。非小細胞肺癌における GMD の発現は、高発現 32 腫瘍(20.5%)、中等度発現 32 腫瘍 (20.5%)、低発現 92 腫瘍 (59.0%) であった。GMD 発現と χ^2 検定で有意な関係を示した臨床的因子について、多変量ロジスティック回帰分析の結果、GMD 低発現は組織型と有意な関係があり、扁平上皮癌では、非扁平上皮癌に比し有意に発現が低下していた。この非小細胞肺癌コホートで、以前に解析された腫瘍の生物学的因子のうち、Ki-67 LI は、GMD 低発現腫瘍において、高発現腫瘍に比し有意に高かった。Cyclin E LI は、GMD 低発現腫瘍において、高度発現腫瘍に比し有意に高かった。 $\alpha 1,6$ -FT の低発現は、GMD 低発現腫瘍において、中等度発現および高発現腫瘍に比し有意に高頻度に認めた。 $\alpha 1,6$ -FT、GMD の発現の程度により、患者の術後生存期間に有意差を認めなかった。 $\alpha 1,6$ -FT および GMD の発現とコア $\alpha 1,6$ フコシル化アスパラギン結合型オリゴ糖合成の関係を PhoSL 組織化学染色で解析した。 $\alpha 1,6$ -FT と GMD の両方とも高発現の 8 腫瘍では、6 腫瘍が高発現 PhoSL 染色、2 腫瘍が中等度 PhoSL 染色であった。 $\alpha 1,6$ -FT と GMD の両方とも低発現の 9 腫瘍では、6 腫瘍が低発現 PhoSL 染色、1 腫瘍が中等度 PhoSL 染色、2 腫瘍が高発現 PhoSL 染色であった ($p = 0.02$)。 $\alpha 1,6$ -FT と GMD の発現は、気管支線毛円柱上皮細胞や気管支腺細胞では発現しているにもかかわらず、非小細胞肺癌腫瘍検体の半数以上において調和して減少・消失していることが明らかになった。 $\alpha 1,6$ -FT と GMD の発現は、有意に組織型と関係があり、 $\alpha 1,6$ -FT と GMD の低発現は、非扁平上皮癌に比し扁平上皮癌で高頻度だった。さらに、コア $\alpha 1,6$ フコシル化アスパラギン結合型オリゴ糖と特異的に結合する PhoSL 組織化学によって、 $\alpha 1,6$ -FT と GMD がともに高発現の腫瘍において、コア $\alpha 1,6$ フコシル化アスパラギン結合型オリゴ糖が合成されていることが示された。非小細胞肺癌は、 $\alpha 1,6$ -FT を発現する気管支線毛円柱上皮細胞と肺胞上皮細胞に由来し、 $\alpha 1,6$ -FT の発現はそれらの正常細胞の生理機能にとって重要である。癌の発生や進展における $\alpha 1,6$ -FT 発現の有無の生物学的重要性は、生理機能維持の場合同様、コア $\alpha 1,6$ フコシル化の標的タンパク質に依存する。 $\alpha 1,6$ -FT の発現低下は、標的糖タンパク質におけるコア $\alpha 1,6$ フコシル化オリゴ糖の合成を減少させることにより、扁平上皮癌の組織型や Ki-67・cyclinE の高発現を含む非小細胞肺癌の生物学的特性に関与している可能性が示された。

スライドを用いた口頭発表後、副査の岩永敏彦教授より $\alpha 1,6$ -FT 染色パターンの判定方法について、および他臓器癌における $\alpha 1,6$ -FT と予後に関係する報告について、副査の西村正治教授より発現評価のカットオフレベルの設定について、および研究の予後因子としての仮説について、副査の秋田弘俊教授より $\alpha 1,6$ フコシル化の標的タンパク質について、主査の松野吉宏教授より発癌のどの時期に $\alpha 1,6$ -FT および GMD 発現が関与しているか、および前癌病変での発現の有無について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者はその主旨をよく理解し、自らの研究内容と文献的考察を交えて適切に回答した。

この論文は、糖鎖修飾に関わる $\alpha 1,6$ -FT、GMD の発現と非小細胞肺癌組織型の関係を明らかにした点で高く評価され、今後、その分子メカニズムの解明が期待される。

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や取得単位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。