

氏 名	北田 昇平
論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)	
<p>Polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 3 independently predicts high-grade tumours and poor prognosis in patients with renal cell carcinomas (糖転移酵素 GalNAc-T3 の腎細胞癌における発現は、高異型度および予後不良の独立した因子となり得る)</p>	
論文要旨	
<p>[背景] 腎細胞癌(RCC)は腎臓の悪性疾患の中で早期診断、手術にて予後改善を得られる疾患であるが、再発、転移時には有効な治療法が乏しいのが現状である。このような状況において予後を推測しうる生物学的マーカーを発見することは術後補助療法、再発・転移時の治療において非常に有用であるといえる。癌の転移には癌細胞の接着性及び浸潤能が重要であり、癌細胞表面における糖鎖修飾による発現変化が関与していることが知られている。中でも O 結合型糖鎖を付加触媒する <i>N</i>-アセチルガラクトサミン転移酵素 (GalNAc-Ts) にはヒトで約 20 種類程のアイソザイムがクローニングされており、哺乳類において最も一般的、かつ一大 family を形成している。特に、GalNAc-T3 と-T6 は配列が極めて類似しており、ほぼ同様の基質特異性と触媒作用を有している。GalNAc-T3 と-T6 の発現に関しては、様々な腫瘍の進展・転移と予後との相関において重要な臨床意義を持っていることが報告されているが、RCC については判明していない。今回、RCC における GalNAc-T3、-T6 の発現の有無、予後との関連性等について検討した。</p>	
<p>[目的] 腎細胞癌における GalNAc-T3、-T6 の発現と、予後を含めた臨床病理学的特性等との相互関係を評価する。</p>	
<p>[方法] 1) GalNAc-T3/T6 特異的抗体の作成: GalNAc-T3、T6 の各々のアミノ酸配列において、親水性及び抗原性に富む配列をコンピューター解析し、ペプチドを合成後、ウサギへの免疫により特異的なポリクローナル抗体を得た。培養 RCC 株(KPK1) に対して蛍光免疫染色を施行し GalNAc-T3、-T6 の細胞質、特に Golgi 体への発現を確認した。また、培養肺癌株 (PC9) に対して GalNAc-T3、T6 を knockdown したのち Western blot を施行し GalNAc-T3、T6 の特異性を確認した。さらに GalNAc-Ts は Golgi 体に発現していたことから、非特異的な Golgi enzyme の発現との相違を確認するために、RCC 症例の腫瘍部と非腫瘍部の凍結切片に対して、GalNAc-T3、T6 および Golgi enzyme (<i>N</i>-アセチルグルコサミン転移酵素; GnT-II, GnT-III, GnT-V, α-マンノシダーゼ II; MAN2A1) を用いて蛍光免疫染色を施行した。GalNAc-T3 の強発現、-T6 の弱発現を認めたが、Golgi enzyme の発現は明らかでなく、GalNAc-T3、T6 の特異性が confirm された。</p>	
<p>2) 症例検討: 産業医科大学院及び協力施設において、1999 年から 2011 年まで RCC に対して根治的腎摘除術または部分切除術を施行され、予後追跡が可能な患者 254 例(男 181 例 女 73 例)を対象とした。</p>	
<p>3) 免疫組織染色と評価方法: デキストランポリマー法を用いた。RCC の全面積中、<10%の染色率は 0、10-30%は 1+、31-80%は 2+、>80%は 3+と判断した。cut-off 値は以下 4) を各々の条件で試行し、有意差を得た条件にて決定した。本研究では 0 を陰性、1+~3+を陽性とした。</p>	
<p>4) 統計学的検討: χ^2 検定を行い、GalNAc-Ts の発現と RCC の臨床病理組織学的な parameters(転移巣の有無、異型度、脈管侵襲、etc.)との相関を検討した。Kaplan-Meier 法で生存曲線を描き、Log-rank 検定を施行した。さらに COX 比例ハザードモデルによる単変量、多変量解析を行い、GalNAc-T3、T6 が RCC の予後規定因子に成り得るか検討した。</p>	
<p>[結果] 免疫組織染色では、GalNAc-T3 は核周囲の細胞質に強発現、GalNAc-T6 は細胞質に弱発現を認めた。254 例中 GalNAc-T3 陽性例は 138 例(54%)、GalNAc-T6 陽性例は 62 例(24%)認められた。GalNAc-T3、-T6 陽性症例は、各々の陰性症例に比べて、術前 performance status は有意に不良であり、組織学的な腫瘍壊死及び脈管侵襲を有意に認め、有意に高異型度(high Fuhrman's grade)であり、低分化傾向にあった。特に RCC の脈管侵襲部において GalNAc-T3 の発現が強く認められ、反対に細胞接着因子である β-catenin の発現が明らかに低下していた。Kaplan-Meier 生存曲線において、GalNAc-T3、-T6 陽性症例は陰性症例に比べ、術後生存期間に対して有意に短縮が認められた。さらに、-T3(+)/-T6(-)症例、-T3(-)/-T6(+)症例、-T3(-)/-T6(-)症例について検討したところ、-T3(+)/-T6(-)症例、-T3(-)/-T6(+)症例は-T3(-)/-T6(-)症例に比べ、術後生存期間に対して有意に短縮が認められ、-T3、-T6 は相補的に作用する可能性が示唆された。COX 比例ハザードモデルによる単変量・多変量解析を行った結果、GalNAc-T3、-T6 では-T3 のみ有意差が認められ、GalNAc-T3 の発現は、performance status、脈管侵襲、Fuhrman's grade と同様に、RCC の独立した予後規定因子であることが示された。</p>	
<p>[考察および結論] RCC において、GalNAc-T3 および-T6 陽性症例では、陰性症例に比べ有意に腫瘍壊死、脈管侵襲、低分化傾向を認め、術後生存曲線も有意に短縮を認めた。脈管侵襲部において、特に GalNAc-T3 陽性例では β-catenin の発現低下も伴っており、腫瘍細胞の細胞接着性の消失、浸潤能の亢進が病理組織学的に強く示唆された。GalNAc-T3、-T6 は塩基配列、分子量が近似していることはよく知られており、このことから-T3、-T6 間の染色性に正の相関性が見られただけでなく、-T3、-T6 が相補的に作用していたのは納得いく結果と言えよう。現時点では RCC に対して、手術以外に有効な治療法はなく、再発、転移後では分子標的薬などいくつかの治療法が挙げられるものの、有効な結果は得られていない。また有用な腫瘍マーカーも存在しない。GalNAc-T3 の発現は RCC の核異型、腫瘍壊死、脈管侵襲に対して正に相関しており、予後規定因子に成り得ることから、GalNAc-T3 の免疫染色を手術検体に施行し、術後のリスク分類の一つとして評価することにより、GalNAc-T3 は RCC に対する腫瘍マーカーとしての可能性を十分に有していると言えよう。本研究では GalNAc-T3 は定性的に評価されたのみであり、定量化には至っていない。今後、GalNAc-T3 の定量化が簡便になれば、術前術後に測定を行うことで RCC の腫瘍マーカーや、リスク分類、予後に関して重要な項目に成り得ることが期待され、さらに GalNAc-T3 の発現をコントロール(knockdown)することで RCC に対し、有用な治療薬になる可能性もある。</p>	

学位論文審査結果要旨

氏 名	北田 昇平							
論文審査委員	主査	所属	障害機構	系	病態機構	部門	久岡 正典	(印)
	副査	所属	環境・産業生態	系	保健・疫学	部門	松田 晋哉	(印)
			障害機構	系	災害医学	部門	中村 元信	(印)
				系		部門		(印)
				系		部門		(印)
<p>論文題目</p> <p>Polypeptide <i>N</i>-acetylgalactosaminyl transferase 3 independently predicts high-grade tumours and poor prognosis in patients with renal cell carcinomas (糖転移酵素 GalNAc-T3 の腎細胞癌における発現は、高異型度および予後不良の独立した因子となり得る)</p> <p>学位論文審査結果要旨</p> <p>腎細胞癌は腎における最も代表的な悪性腫瘍であり、今日の日本においては年間約 16,000 人の新規患者が存在し、約 7,500 人の患者が死亡している。早期に診断されて外科的治療が可能であれば患者の予後は概して良好であるが、術後に局所再発や遠隔転移を生じた場合には有効な治療法は乏しく予後は不良であり、腫瘍の生物学的態度を予測することも容易でないのが現状である。ところで癌細胞ではしばしば細胞表面の糖鎖修飾の状況が変化することで転移能や浸潤能が獲得されることに加え、O 結合型糖鎖付加に関わる <i>N</i>-アセチルガラクトサミン転移酵素(GalNAc-Ts)の過剰発現が、大腸癌や肺癌などの様々な悪性腫瘍において不良な予後と関係していることが近年報告されているが、腎細胞癌における同酵素の発現状況と予後との関係についてはこれまで検討されていない。そこで申請者らは、GalNAc-Ts のうち代表的かつ構造・機能の類似した GalNAc-T3 と GalNAc-T6 に着目し、腎細胞癌組織でのこれらの酵素の発現状況を免疫組織化学的に評価し、その結果と種々の臨床病理学的因子や患者予後との関係を統計学的に解析した。</p> <p>産業医科大学病院で切除された 254 例の腎細胞癌のホルマリン固定パラフィン包埋組織を対象とし、申請者らが以前に作成した GalNAc-T3/T6 に対するウサギポリクローナル抗体を用いて免疫染色を型の如く行い、腫瘍面積の 10%以上に染色が認められた場合を陽性例と判定した。なお、同抗体の特異性についてはウェスタンブロット法および合成ペプチドによる抗体吸収試験、培養腫瘍細胞における siRNA を用いた遺伝子ノックダウン法により確認した。免疫染色の結果と症例の臨床病理学的因子（全身状態や転移の有無、細胞の異型度、静脈浸潤の有無等）との相関性についてはカイ 2 乗法により検討し、患者予後については Kaplan-Meier 法による生存曲線を作成の後、Log-rank 検定により評価した。さらに、Cox 比例ハザードモデルを用いて単・多変量解析を行い、GalNAc-T3/T6 の過剰発現が予後因子となり得るか否かを検討した。</p> <p>検索した 254 例中 138 例(54%)に GalNAc-T3 が陽性であり、62 例(24%)に GalNAc-T6 が陽性であった。いずれも陽性例では腫瘍壊死($P<0.01$)や静脈浸潤($P<0.001$)が有意に多く認められ、組織学的により高異型度・低分化な形態($P<0.001$)を示していた。特に腫瘍の静脈浸潤部において GalNAc-3 の発現が強く認められ、細胞接着に関わる βカテニンの発現が減弱していた($P<0.001$)。予後については GalNAc-T3/T6 陽性例は陰性例よりも有意に生存率が低下しており(GalNAc-T3: $P<0.001$, GalNAc-T6: $P=0.03$)、単・多変量解析にて GalNAc-3 の発現状況は全身状態や静脈浸潤、細胞異型度と共に独立した予後因子であることが示された。以上の事から GalNAc-Ts の過剰発現が腎細胞癌の悪性度や静脈浸潤を増強させている可能性が示唆された。</p> <p>本研究は腎細胞癌の生物学的態度と GalNAc-Ts の発現状況との関係に初めて焦点を当てたものであり、単一施設における多数の症例の解析に基づいて得られた結果は信頼性が高く、その内容も論理的であると考えられる上に、今回見出された GalNAc-T3/T6 が腎細胞癌における予後の予測因子あるいは治療上の標的分子として将来臨床応用される事も十分に期待される事から、本学の学位論文として適格であると判断した。</p> <p style="text-align: right;">平成 27 年 3 月 10 日</p>								