

# 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

論文提出者	小松 隆俊
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 永山 元彦 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 村松 泰徳 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 河野 哲
論文題目	舌粘膜腫瘍性病変のレクチンマイクロアレイ解析
<p><b>【目 的】</b></p> <p>タンパク質は成熟した機能をもつようになるまで、リン酸化、メチル化、硫酸化、糖鎖付加などの翻訳後修飾を受けるが、その中でも糖鎖修飾は最も複雑な過程である。近年、微量解析技術の進歩によって糖鎖合成技術、糖鎖構造解析技術の開発が可能となり、バイオマーカーとしての糖鎖解析が再び注目されている。中でも、レクチンマイクロアレイは高感度かつ簡便に解析できるため、特に再生医療、癌バイオマーカーに有用な技術として癌、免疫、再生医療、生殖医療に対する糖鎖構造のもつ種特異性、細胞特異性、細胞の分化段階特異性の解析が可能である。そこで、口腔粘膜腫瘍性病変の発症、進展に関連する糖鎖構造を明らかにするためにレクチンマイクロアレイ解析を用いて糖鎖構造プロファイルを行った。</p> <p><b>【材料および方法】</b></p> <p>朝日大学歯学部医科歯科医療センター病理診断科において舌に発症した上皮性異形成 (OED)、上皮内癌 (CIS)、扁平上皮癌 (SCC)と診断した合計 16 症例を解析対象とした。また各病変の断端に含まれる正常部粘膜上皮(Nor) 4 症例を対照群とした。各症例のパラフィン切片を作製し、顕微鏡下で病変部をマクロダイゼクションにより解析試料を得た。レクチンマイクロアレイ解析は、エバネッセント波励起型蛍光検出法をもとにしたスキャナー (GlycoStation™ Reader1200) とレクチンをアレイ化したスライドガラス (LecChip™) による糖鎖プロファイリング解析を受託解析した。解析したレクチンは 45 種類 (LTL, PSA, LCA, UEA I, AOL, AAL, MAL I, SNA, SSA, TJA-I, PHA-L, ECA, RCA120, PHA-E, DSA, GSL-II, NPA, ConA, GNA, HHL, ACG, TxLC-I, BPL, TJA-II, EEL, ABA, LEL, STL, UDA, PWM, Jacalin, PNA, WFA, ACA, MPA, HPA, VVA, DBA, SBA, Calsepa, PTL I, MAH, WGA, GSL-IA4, GSL-IB4) を用いた。解析結果は the Glycan Kernel Tool in RINGS (Resource for Informatics of Glycomes at Soka)によるインフォマティクス解析から、正常部よりも腫瘍性病変部で多く含まれている糖鎖構造の中で、特に腫瘍性病変の発生および癌化に関与すると考えられた糖転移酵素の <math>\beta</math>-1,4-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase (MGAT3) と <math>\beta</math>-1,4-galactosyltransferase 1 (B4GALT1) について組織における発現を解析した。</p> <p>本研究は朝日大学歯学部倫理審査委員会による審査および承認を得て実施した (承認番号: 26172 号)。</p>	

## 【結 果】

レクチンマイクロアレイ解析では正常から SCC へ移行するに従って高値あるいは低値を示すレクチン群や、発現強度の差はあるものの、ほぼ変化を示さないレクチン群に分かれていた。レクチンマイクロアレイからインフォマティクス解析を行った結果、OED の組織では、Nor に比べて 4 分岐した N 型糖鎖構造が強く出現し、CIS および SCC では、N 型糖鎖にコアフコースおよびバイセクティング GlcNAc が強く出現していた。

MGAT3 免疫染色において、OED では Nor の陰性に対して細胞膜に強陽性、細胞質内にびまん性の陽性局在を示し、CIS では細胞質内に陽性局在を示す領域が核へと変化した。SCC では陽性局在の主体が細胞質内、核周囲で、一部で核にも陽性局在を示した。B4GALT1 免疫染色では、MGAT3 と同様に Nor では陰性、OED では細胞質にびまん性・微細顆粒状の陽性局在を示した。CIS では微細顆粒状や粗大顆粒状の陽性局在が混在し、その局在は核周囲へ移行した。SCC では細胞質の粗大～やや大型顆粒状に陽性局在がみられ、核周囲および核内へ移行した。

## 【考 察】

MGAT3 蛍光免疫染色において、Nor で陰性で OED で陽性局在を認めたことより、扁平上皮細胞が腫瘍性増殖を示す細胞へと変化することに MGAT3 が関与していることが示唆された。また MGAT3 は OED で細胞膜に陽性局在を示したが、CIS および SCC では細胞内へその局在が移動しており、癌化に伴って細胞内、核周囲および核内へ移行することにより bisecting GlcNAc 構造を付加していることが示唆された。

B4GALT1 は末端の  $\beta$ 1-4 結合した Gal を切断することにより糖鎖構造を改変する酵素で、肺線維症の発症や急性骨髄性白血病の予後予測、腫瘍細胞の増殖および免疫回避に関連していることが報告されている。本研究では B4GALT1 は Nor で陰性であったが OED では細胞内で陽性局在を示し、さらに CIS および SCC では発現が強くなるとともに、核周囲や核内へ移行していたことは、B4GALT1 が発現することにより、免疫応答を回避する機構に関連していることが窺われた。口腔粘膜腫瘍性病変において B4GALT1 がどのような機序で関係しているかを詳細に解明することにより、口腔粘膜腫瘍性病変における免疫チェックポイント阻害薬への応用が期待できる。

## 【結 論】

本研究では、レクチンマイクロアレイ解析およびグライコインフォマティクス解析により、舌粘膜の腫瘍性病変における糖鎖改変現象について以下の結論を得た。

1. 口腔粘膜腫瘍性病変の発症、進展においてレクチン結合性が変化することが明らかとなった。
2. 口腔粘膜に発症した腫瘍性病変では、4 分岐した N 型糖鎖構造、N 型糖鎖に bisecting GlcNAc やコアフコースが付加した構造が多くみられることが明らかとなった。
3. 糖転移酵素の MGAT3 および B4GALT1 が深く関与していることが明らかとなった。

以上から、MGAT3 および B4GALT1 の活性化を調節することで口腔粘膜腫瘍性病変の発症抑制や治療薬への応用が期待される。

以上の内容から審査委員は、本論文を博士（歯学）の学位を授与するに値すると判定した。