

学 位 論 文 要 旨

氏名 中嶋 健太郎

論 文 題 目

Establishment of new predictive markers for distant recurrence of colorectal cancer using lectin
microarray analysis

(レクチンマイクロアレイ解析を用いた新しい大腸癌遠隔再発予測マーカーの確立)

要 旨

[緒言] 癌化した細胞では、細胞表面の糖鎖が変化を生じることが明らかになっている。糖鎖に特異的に結合するレクチンを用いることで、従来は困難であった糖鎖の網羅的解析が可能となった。現在、実地臨床で大腸癌再発高リスク群を予測する有用なバイオマーカーはないため、今回我々は大腸癌のバイオマーカーとしてのレクチンに注目した。本研究の目的はレクチンマイクロアレイ法を用いて、大腸癌遠隔再発の予測に有用な新規バイオマーカーを同定することである。

[研究対象及び方法] 1997年から2010年までに当科で根治切除術を施行した大腸癌 Stage I～III 53例(以下、実験群)、および実験群とは異なるコホートとして Stage II 55例(以下、検証群)を対象とした。ホルマリン固定切除標本の癌組織・正常組織からサンプルを採取してレクチンマイクロアレイ法を行い、45種のレクチンと糖鎖の反応の強さをレクチンシグナルとして数値化した。検証項目は以下のとおりである。① 45種類のレクチンシグナルの癌組織/正常組織比(= T/N 比)を算出した。② 臨床病理学的因子お

よびレクチンシグナルの T/N 比の単変量・多変量解析を行い、遠隔再発の有無と関連のある因子を同定した。なお、単変量・多変量解析において、各々のレクチンシグナルの T/N 比のカットオフ値は ROC 曲線を用いて設定し、高値群と低値群の 2 群に分類した。

③ Kaplan-Meier 法を用いて無再発生存曲線を作成し、log-rank 検定を行った。④ 同定された因子 (=レクチン HHL、ABA) が実際に遠隔再発の予測マーカーとなり得るか確認するため、検証群を対象に妥当性確認試験を行った。⑤ 妥当性確認試験で同定された遠隔再発予測因子 (=レクチン ABA) による免疫化学組織法にて、組織内での発現を検討した。

[結果] ① 癌組織では正常組織と比較して、12 種のレクチンシグナルの T/N 比が有意に上昇し、11 種において低下を認めた。② 単変量解析にて、直腸癌、リンパ節転移 (N2 以上)、レクチン HHL、ABA が遠隔再発の有無と有意に関連のある因子であった。多変量解析の結果、レクチン HHL ($p=0.001$)、ABA ($p=0.011$) のみが遠隔再発の有無と有意に関連する因子であった。③ レクチン HHL 高値群又は ABA 高値群は、各々低値群と比較し無再発生存率が有意に低かった ($p=0.001$)。④ レクチン HHL、ABA のうち、妥当性確認試験の結果、ABA のみが遠隔再発の有無と有意に関連する因子であった ($p=0.029$)。レクチン ABA 高値群は低値群に比べ無再発生存率が有意に低かった ($p=0.003$)。⑤ レクチン ABA は、癌組織では細胞質と apical surface に発現し、正常組織では supranuclear region に発現を認めた。




[考察] 今回同定されたレクチン ABA は、Thomsen-Friedreich 抗原と N-acetylgalactosamine という 2 つの結合部位を有する。特に Thomsen-Friedreich 抗原の高発現は種々の癌で悪性度との関連が報告されており、癌部におけるレクチン ABA の高発現は大腸癌における悪性度を反映していると考えられた。レクチン ABA は、Stage II 症例において独立した予後不良因子であったため、術後補助化学療法の適応決定に有用であることが示唆された。

[結語] レクチンマイクロアレイ法を用いて、大腸癌遠隔再発予測因子としてレクチン ABA を同定した。バイオマーカーとしての妥当性が示されたため、今後の臨床応用に有望である。

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第 552 号	氏名	中 嶋 健太郎
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	村 上 和 成	②
	副査氏名	西 園 晃	③
	副査氏名	松 浦 恵 子	④
<p>論文題目 Establishment of new predictive markers for distant recurrence of colorectal cancer using lectin microarray analysis (レクチンマイクロアレイ解析を用いた新しい大腸癌遠隔再発予測マーカーの確立)</p> <p>論文掲載雑誌名 Cancer Medicine</p> <p>論文要旨 (緒言) 癌化した細胞では、細胞表面の糖鎖が変化を生じることが明らかになっている。今回筆者らは大腸癌のバイオマーカーとしてのレクチンに注目し、レクチンマイクロアレイ法を用いて、大腸癌遠隔再発の予測に有用な新規バイオマーカーを同定を試みた。(方法) 1997年から2010年までに消化器外科で根治切除術を施行した大腸癌 Stage I～III 53例(以下、実験群)、および実験群とは異なるコホートとして Stage II 55例(以下、検証群)を対象とした。ホルマリン固定切除標本の癌組織・正常組織からレクチンマイクロアレイ法を行い、45種のレクチンと糖鎖の反応の強さをレクチンシグナルとして数値化した。検証項目は以下のとおりである。①レクチンシグナルの癌組織/正常組織比(=T/N比)を算出した。②臨床病理学的因子およびレクチンシグナルのT/N比の単変量・多変量解析を行い、遠隔再発の有無と関連のある因子を同定した。③Kaplan-Meier法を用いて無再発生存曲線を作成し、log-rank検定を行った。④同定された因子が実際に遠隔再発の予測マーカーとなり得るか確認するため、検証群を対象に妥当性確認試験を行った。⑤妥当性確認試験で同定された遠隔再発予測因子による免疫化学組織法にて組織内での発現を検討した。(結果)①癌組織では正常組織と比較して、12種のレクチンシグナルのT/N比が有意に上昇し、11種において低下を認めた。②単変量解析にて、直腸癌、リンパ節転移(N2以上)、レクチンHHL、ABAが遠隔再発の有無と有意に関連のある因子であった。多変量解析の結果、レクチンHHL(p=0.001)、ABA(p=0.011)のみが遠隔再発の有無と有意に関連する因子であった。③レクチンHHL高値群又はABA高値群は、各々低値群と比較し無再発生存率が有意に低かった(p=0.001)。④レクチンHHL、ABAのうち、妥当性確認試験の結果、ABAのみが遠隔再発の有無と有意に関連する因子であった(p=0.029)。レクチンABA高値群は低値群に比べ無再発生存率が有意に低かった(p=0.003)。⑤レクチンABAは、癌組織では細胞質とapical surfaceに発現し、正常組織ではsupranuclear regionに発現を認めた。(考察)今回同定されたレクチンABAは、Thomsen-Friedreich抗原とN-acetylgalactosamineという2つの結合部位を有する。特にThomsen-Friedreich抗原の高発現は種々の癌で悪性度との関連が報告されており、癌部におけるレクチンABAの高発現は大腸癌における悪性度を反映していると考えられた。レクチンABAは、Stage II症例において独立した予後不良因子であったため、術後補助化学療法の適応決定に有用であることが示唆された。(結語)レクチンマイクロアレイ法を用いて、大腸癌遠隔再発予測因子としてレクチンABAを同定した。バイオマーカーとしての妥当性が示されたため、今後の臨床応用に有望である。</p> <p>本研究は、Stage II大腸癌の補助化学療法の必要性に関するバイオマーカー発見にせまる検討であり、今後の臨床的発展に大いに期待が持てると思われる。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第552号	氏名	中嶋 健太郎
審査委員会委員	主査氏名	村上 和成 	
	副査氏名	西園 晃 	
	副査氏名	松浦 恵子 	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Stage 2のCKに対する補助化学療法はcontraveasialとしているが、具体的にはどういうことか。 2. レクチンは自然界から由来するものが多いか。 3. 手術検体を用いた解析だが、生検材料のような小組織からでも情報が得られ、予後予測につながるものなのか。 4. 現在知られている大腸がんの予後予測について、遺伝子変異などは何があるか 5. 他のレクチンの大腸がんにおける報告はないか、ABAは報告されているのか 6. Glycoprotein fractionはどのようにして得られたものか説明せよ。 7. Four drops の正確な量はいくらか。不正確な表現ではないか。一般的に凍結切片とFFPEと同じprofileなのか 8. サンプルングした範囲の大きさは症例間で同じだったか 9. 浸潤部位とそうでない部分など組織系の違いはあったか(低分化症例は間質もふくめてサンプルングしたのか) 10. b-actinの発現は何の目的でみたのか 11. レクチンアレイの評価のvalidationについて、進行度、悪性度が異なる癌細胞が混入した場合でも安定した結果が得られるのか? 12. レクチンシグナルのデータの再現性はどうか。一検体につき何度測定したか。 13. またがんの部位、浸潤部、ステージ別などでばらつきはなかったか。 14. リンパ節転移や遠隔転移での癌では測定を行ったか。 15. 妥当性確認試験とは何か。レクチンHHLはなぜ有意ではないのか。 16. レクチンABA染色で今後遠隔転移のバイオマーカーとなりうるか。 17. レクチンシグナルの測定とどちらが有用か。 18. 症例間でどのように発現の違いがあったか 19. Fig4は、ヘマトキシリン染色を正常と癌でそろえた方がよいのではないか。正常部では何を染めているのか。どうして発現があがるのか。転移などにどのように作用するのか 20. 血中に分泌するのはT-F抗原とは。ABA lectinT-F抗原と糖鎖であるN-acetylgalactosamineの2つをを認識する機構(結合の詳細、複合認識)について説明せよ。同じような例は他のレクチンにもあるのか。 21. ・普遍的に存在するようなN-acetylgalactosamineも認識されることについて、特異性の問題は無いのか。 22. ・混在している腸内細菌由来の糖鎖などの評価への影響は如何に?さらに癌の進行に伴って腸内細菌叢が変化することでの糖鎖の変化はあるのか? <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。