

# 学位論文審査

## 2次審査用書類

### 作成見本

### (乙)

<注意事項>

見本のとおりを作成し、原稿2部を医学部大学院係まで提出願います。

論文の内容の要旨

明朝 14P

明朝 9P

6 cm位

明朝 14P

12 cm位

論文提出者氏名	松 本 太 郎 1 cm位
論文審査担当者	主 査 長 野 一 郎 2 cm位 副 査 豊 科 次 郎・大 町 三 郎
論文題目	Shinshu University Graduate School of Medicine ..... 3 cm位 (信州大学大学院医学研究科.....)
<p>(論文の内容の要旨)</p> <p>[背景と目的] 移植臓器の不足や臓器移植待機時に必要となる人工.....</p> <p>欧文 Times 11P 訳文 (和文) 明朝 11P</p> <p>明朝 9P 行間一行</p> <p><u>※外国人留学生に限り英文で作成も可</u></p> <p><u>※2,000字以内</u></p>	

18 cm位

論文審査の結果の要旨

明朝 9P

明朝 14P

6 cm位

明朝 9P

4 cm位

明朝 9P

2 cm位

6 cm位

報告番号	乙 第 号	氏 名	松 本 太 郎 <sup>1 cm位</sup>
論文審査担当者	主 査 長 野 一 郎 副 査 豊 科 次 郎・大 町 三 郎		明朝 14P 2 cm位

明朝 9P

明朝 9P

1 スペース取る

(論文審査の結果の要旨)

発癌に対する研究は.....

明朝 9P  
行間 1 行

※外国人留学生に限り英文で作成も可

※1, 0 0 0 字以内

21 cm位

# 学力確認の結果の要旨

明朝 9P 6 cm位 報 告 番 号	明朝 9P 4 cm位 乙 第 号	明朝 9P 2 cm位 氏 名	明朝 14P 6 cm位 松 本 太 郎 <sup>1 cm位</sup>
学力の確認担当者	主 査 長 野 一 郎 副 査 豊 科 次 郎・大 町 三 郎 明朝 14P 2 cm位		
(学力確認の結果の要旨) 明朝 9P 明朝 9P 1スペース取る 最初に主査は、「氏 名」に本研究の概略を述べさせた。次いで、主査・両副査と「氏 名」との間に次のような 質疑応答が行われた。 申請者の氏名 明朝 9P 行間 1行 問： 答： ※ <u>質疑応答部分は、外国人留学生に限り英文で作成も可</u> 21 cm位 1次審査書類「学位申請書」で選択した外国語を記入する。その他は削除する。 以上のように質問に対する応答は概ね適切であり、本研究の遂行に十分な学力を有しているものと認めた。 語学試験は、英語については、平成〇〇年度第〇回信州大学大学院医学系研究科統一外国語試験（大学院入試合格者の場合：平成〇〇年度信州大学大学院医学系研究科博士課程入学試験）に合格しており、独語、仏語又は日本語については、口頭試問により「氏 名」が大学院修了者と同等の学力を有するものと認めた。			

論文の内容の要旨

参考見本

論文提出者氏名	○ ○ ○ ○
論文審査担当者	主 査 ○ ○ ○ ○ 副 査 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
論文題目 Usefulness of the Real-time Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction Targeted to $\alpha$ 1-4 <i>N</i> Acetylglucosaminyltransferase for the Detection of Gastric Cancer ( $\alpha$ 1-4 <i>N</i> アセチルグルコサミン転移酵素をターゲットとした逆転写ポリメラーゼ連鎖反応による胃癌の分子診断の有用性)	
(論文の内容の要旨) [目的] GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4Gal $\beta$ 残基は胃粘膜の副細胞や幽門腺, 十二指腸のブルネル腺ならびに幽門腺化生を示した膵管・胆嚢粘膜から分泌される粘液内にもみ見出されるユニークな糖鎖である。一方, $\alpha$ 1, 4- <i>N</i> アセチルグルコサミン転移酵素 ( $\alpha$ 4GnT) は GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4Gal $\beta$ 残基を生成する糖転移酵素であり, 最近、発現クローニング法を用いて $\alpha$ 4GnT の cDNA が単離され, その基質特異性ならびに組織細胞内局在が明らかにされた。ところで GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4Gal $\beta$ 残基は胃癌細胞でも高頻度に発現していることから, $\alpha$ 4GnT も胃癌細胞で発現している可能性がある。今回我々は胃癌細胞における $\alpha$ 4GnT の発現パターンを免疫組織化学的に検討し, 次に胃癌患者の末梢血中に存在する微量な胃癌細胞を捉えるため, 末梢血の有核細胞分画を対象に $\alpha$ 4GnT mRNA をターゲットとした real-time RT-PCR を行い, このアッセイ法が胃癌の早期診断に有用か否かを検討した。 [方法] 1) インフォームドコンセントの得られた 29 名の胃癌患者から外科的切除された胃癌組織ホルマリン固定・パラフィン切片を対象に, $\alpha$ 4GnT に対する特異抗体を用いてストレプトアビジン・ビオチン法にて免疫染色を行った。2) インフォームドコンセントの得られた胃癌術前患者 37 名, 慢性活動性胃炎患者 9 名, 慢性消化性潰瘍患者 4 名, 健常人 23 名から採取された末梢血の有核細胞から全 RNA を抽出し, ABI PRISM7700 (PE Applied Biosystem 社) を用いて real-time RT-PCR を行い, $\alpha$ 4GnT mRNA の定量を行った。内部標準としては GAPDH mRNA を用い, $\alpha$ 4GnT mRNA との比率を算出した。 [結果と考察] 免疫組織化学的に $\alpha$ 4GnT は 75.9% の胃癌症例において胃癌細胞のゴルジ野に証明され, $\alpha$ 4GnT は正常胃・十二指腸粘膜だけでなく胃癌細胞においても GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4Gal $\beta$ 残基の生成に関わる糖転移酵素であることが示された。また, $\alpha$ 4GnT は好中球, リンパ球等の末梢血有核細胞では全く検出されなかった。以上の結果は $\alpha$ 4GnT mRNA をターゲットとした RT-PCR 法が胃癌患者の末梢血中に存在する微量な胃癌細胞の検出に有用である可能性を示唆している。実際に末梢血有核細胞から抽出した全 RNA に対して real-time RT-PCR により $\alpha$ 4GnT mRNA の定量を行うと, $\alpha$ 4GnT mRNA は健常人からは全く検出されなかったが, 胃癌患者では 23 名 (62.2%) に検出され, さらに $\alpha$ 4GnT mRNA/GAPDH mRNA も胃癌の臨床病期が進行するにつれて増加した。興味深いことに $\alpha$ 4GnT mRNA は, ステージ I の早期癌でも 57.9% の症例で陽性となった。さらに, これら末梢血における $\alpha$ 4GnT mRNA の発現レベルを real-time RT-PCR によって解析した結果と, 上述の術後摘出された胃癌組織における $\alpha$ 4GnT の発現を抗 $\alpha$ 4GnT 抗体である I17K を用いて免疫組織化学的に解析した結果とは有意に関連していた。一方, 慢性活動性胃炎や消化性潰瘍患者からもそれぞれ 3 名 (33%) と 4 名 (100%) に $\alpha$ 4GnT mRNA が検出された。この結果は $\alpha$ 4GnT mRNA をターゲットとしたアッセイ法が必ずしも胃癌細胞のみを特異的に検出するものではなく, 慢性活動性胃炎や消化性潰瘍のように胃粘膜に強い傷害が生じた場合でも陽性になることを示している。実際, 内視鏡による胃粘膜生検の前後で末梢血を採取し, これらの有核細胞成分から全 RNA を抽出して $\alpha$ 4GnT mRNA に対する RT-PCR を行うと, 生検直後から一過性に $\alpha$ 4GnT が検出される。しかしながら, 慢性活動性胃炎や消化性潰瘍患者における $\alpha$ 4GnT mRNA の発現レベルは胃癌患者に比べて低値であり, またこのアッセイ法は非侵襲的で早期胃癌を高頻度に検出できることから, $\alpha$ 4GnT 遺伝子をターゲットとした胃癌の遺伝子診断法は癌のスクリーニングや術後のモニタリングに有用であるものと考えられた。	

## 論文審査の結果の要旨

報 告 番 号	乙 第 号	氏 名	○ ○ ○ ○
論文審査担当者	主 査	○ ○ ○ ○	, .
	副 査	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○

(論文審査の結果の要旨)

胃腺粘液細胞で特異的に発現している GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4Gal $\beta$  残基は胃癌細胞でも高頻度に発現していることから、この糖鎖は胃癌関連糖鎖抗原の一つと考えることができる。このことは GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4Gal $\beta$  残基を誘導する糖転移酵素である  $\alpha$ 1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 ( $\alpha$ 4GnT) も同様な意義を有すると考えられる。そこで清水は胃癌患者における本酵素の意義を (1) 胃癌組織中の  $\alpha$ 4GnT を抗  $\alpha$ 4GnT 抗体 (I17K) を用いた免疫染色による検出と、(2) 血液中の末梢血有核細胞分画での  $\alpha$ 4GnT mRNA を real-time RT-PCR 法による検出、の両方により検討した。

その結果以下の成績を得た。

- 1) 胃癌組織 29 例中 22 例 (75.9%) に  $\alpha$ 4GnT の発現を認めた。
- 2) 血中  $\alpha$ 4GnT mRNA は健常人の末梢血有核細胞分画では検出感度以下であったが、術前胃癌患者 37 名中 23 名 (62.2%) に検出された。
- 3) 末梢血中  $\alpha$ 4GnT mRNA の発現レベルを定量 PCR 法によって解析した結果と、摘出胃癌組織における免疫組織化学的に染色した  $\alpha$ 4GnT の発現とは有意に相関していた。
- 4) 血中  $\alpha$ 4GnT mRNA は、胃癌細胞が粘膜あるいは粘膜下組織に限局する早期癌でも、それぞれ 80.0%, 56.3% の症例で検出された。
- 5) 血中  $\alpha$ 4GnT mRNA は、癌進行度や遠隔転移と相関がみられた。
- 6) 既存の腫瘍マーカーである、CEA や CA19-9 と比較し、高率に検出された。
- 7) 胃癌の術後モニタリングにおいて、再発例では経過とともに  $\alpha$ 4GnT mRNA が上昇したが、非再発例では有意な上昇が見られなかった。
- 8) 慢性活動性胃炎や慢性消化性潰瘍の患者においてもそれぞれ 3 名 (33.3%) と 4 名 (100%) で  $\alpha$ 4GnT mRNA が検出されたが、 $\alpha$ 4GnT mRNA の発現レベルは胃癌に比べて低値であった。

以上より、血中  $\alpha$ 4GnT mRNA を定量 PCR 法で検出することは胃癌の早期診断や術後のモニタリングに有用であると考えられた。また、本方法は新しい腫瘍マーカーとして臨床応用される可能性がある。したがって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

## 学力確認の結果の要旨

報 告 番 号	乙 第 号	氏 名	○ ○ ○ ○
学力の確認担当者	主 査 ○ ○ ○ ○	副 査 ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○
<p>(学力確認の結果の要旨)</p> <p>最初に主査は「<span style="border: 1px solid black; display: inline-block; width: 100px; height: 1em; vertical-align: middle;"></span>」に本研究の内容の概略を述べさせた。次いで、主査・両副査と「<span style="border: 1px solid black; display: inline-block; width: 100px; height: 1em; vertical-align: middle;"></span>」との間に次のような質疑応答が行われた。</p> <p>問：血液中にα4GnT mRNA が検出されるのは、癌細胞の数が多いのか、個々の細胞の発現量が多いのか。</p> <p>答：本アッセイ系は末梢血有核細胞分画中のα4GnT mRNA を発現している癌細胞を検出しており、理論上は末梢血 5ml 中にα4GnT mRNA が 1.6 copy 以上存在する場合に陽性になります。従って、α4GnT mRNA を発現している癌細胞の数が多の場合にも陽性になりますし、数が少なくても個々の癌細胞がこの酵素を強く発現している場合にも陽性になると考えられます。</p> <p>問：免疫染色では個々の癌細胞における酵素の発現レベルはどうか。</p> <p>答：同一症例でも個々の癌細胞におけるα4GnT の発現量は強いものから殆ど発現していないものまで様々の程度に混在して認められます。</p> <p>問：胃癌患者の 62.2%で陽性で、残りが陰性ですが、陰性の意味付けについて説明して下さい。</p> <p>答：本アッセイ系で陰性であった場合には、癌細胞がα4GnT mRNA を発現していても末梢血中に存在している癌細胞の数が少ない可能性と、たとえ多くの癌細胞が末梢血中に存在しても癌細胞自体がα4GnT mRNA をほとんど発現していない可能性が考えられます。</p> <p>問：癌細胞でもα4GnT を産生していない細胞があるということか。</p> <p>答：ご指摘の通り、同じ症例でもα4GnT を発現した癌細胞と発現していない癌細胞の両者が存在しています。</p> <p>問：術後の経過で、少し上昇したケースがあるが、こうした場合はどのようにみているのか。</p> <p>答：数値的には胃炎レベルであり、内視鏡でも胃炎が確認された症例です。しかしながら将来的には再発する可能性も完全には否定できませんので、今後も注意深くフォローが必要と思います。なお、術後モニタリングにおける本アッセイ法の有用性については今後もさらに症例を追加して検討する予定です。</p> <p>問：同じ癌組織でも酵素を発現しているものとしていないものがあるが、病理組織学的にどのように考えるべきか。発生元の細胞の性格を維持しているのか。</p> <p>答：胃癌は Lauren 分類におけるびまん型、腸型にかかわらず、表層粘液細胞の形質発現を示す細胞と腺粘液細胞の形質発現を示す細胞が種々の割合で混在しています。α4GnT は胃癌細胞が腺粘液細胞の形質発現を示した場合に陽性になります。</p> <p>問：酵素を発現しなくなったものをどう評価するか。</p> <p>答：酵素を発現していない癌細胞は表層粘液細胞の形質発現を示したものと考えられます。</p> <p>問：胃癌細胞によりα4GnT を発現するものとしらないものがあるが、陰性の組織の特徴には何かあるか。</p> <p>答：胃癌細胞におけるα4GnT の発現パターンと胃癌の病理組織型分類との間に有意な相関は認められませんでした。従ってα4GnT 陰性胃癌の組織学的な特徴は特に見出されておられません。</p> <p>問：胃癌の組織発生活起源は。</p> <p>答：胃粘膜腺頸部の増殖帯に存在する胃粘膜上皮の幹細胞と考えられています。</p>			

問：噴門癌はどうか。癌の発生部位での検討は。

答：噴門癌でも癌細胞が腺粘液細胞の形質発現を示した場合には $\alpha$ 4GnTを発現しますが、今回の検討では胃癌の発生部位別の検討は行っておりません。

問：実用化する上で、内視鏡で見つけるのと、血液で見つけるのとどちらがよいか。

答：本検討では、80%の粘膜内癌からも検出されており、検査も非侵襲的です。スクリーニング的に血液検査を行い、内視鏡検査を併用することで胃癌の診断率がより向上すると思われれます。

問：粘膜内癌でも見つかるということは、既にどこかに飛んでいることなのか。その時点で既に転移しているのか。

答：粘膜内癌でも $\alpha$ 4GnT mRNA が検出されたという結果は、末梢血に癌細胞が流れていることを示唆しています。しかしながら、転移の成立には癌細胞の数や運動能、さらには血管内皮細胞との接着等、様々なファクターが関与しています。従って、この酵素が検出されたからといって、必ずしも既に癌が転移していることを示しているわけではありません。なお、文献的には早期胃癌であっても8.9%でリンパ節転移が認められたとの報告があります。

問：この検査にはコストはかかるのか。

答：実際に用いた試薬のコストを計算しますと、一検体あたり2,000円程度と考えられます。

問：ペプシノーゲンとの関係は。

答：ペプシノーゲンも胃癌のスクリーニングとして広く用いられていますが、ペプシノーゲンと $\alpha$ 4GnTとの相関については今回検討してありません。

問：統計でMann-Whitney *U* test, Kruskal-Wallis testを用いている訳は。

答：データが正規分布を示さないため、ノンパラメトリック解析であるMann-Whitney *U* testとKruskal-Wallis testを用いました。

問：スクリーニングした健常者の方に陽性と出た場合の対処は。

答：スクリーニングした健常者の方にはインフォームドコンセントの際に、本アッセイ法の意義のみならず、もし陽性であった場合には内視鏡検査を希望するかどうかを十分説明し、希望される場合には内視鏡検査を行います。

問：術後経過の推移を示すTable 2では血中 $\alpha$ 4GnT mRNAが手術の翌日には検出感度以下まで低下しているが、そんなに速いものか。腫瘍マーカーでは半減期があるが。

答：今回の検討では $\alpha$ 4GnT mRNAは手術直後に陰性化しましたが、手術前後における $\alpha$ 4GnT mRNAの推移パターンについては今後も更に症例数を重ねて検討を行う予定です。

問：CA19-9は血液型の影響を受けると言われているが、この糖鎖抗原(GlcNAc $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ -R)ではどうか。

答：ご指摘の通り、CA19-9の生合成にはルイス式血液型の影響を受けませんが、GlcNAc $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ -Rの生合成には血液型の違いによる差はありません。

問：胃炎や胃潰瘍の方の経過を見ていくうちに癌ができてきた例はあるか。

答：この様な例はありません。

問：陽性に出た例ではフォローも必要では。

答：陽性になった時点では胃内視鏡検査が必要です。

問：この糖鎖の生理的な意義、機能はわかっているのか。CA19-9のように、癌細胞の浸潤に絡んでいるのか。

答：GlcNAc $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ の生理機能についてはまだ不明な点が多く、今後の研究課題であると考えられます。

問：大腸の粘液とは異なるのか。

答：大腸粘液はGlcNAc $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 残基を含んでおりません。

以上のように質問に対する応答は概ね適切であり、本研究の遂行に十分な学力を有するものと認めた。

語学試験は、英語については平成〇年度第〇回信州大学大学院医学研究科統一外国語試験に合格しており、独語については、口頭試問により「〇〇〇〇」が大学院修了者と同等の学力を有するものと認めた。