

氏 名 ばば はやと  
馬場 逸人

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 411 号

学位授与年月日 令和 5 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程  
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 食道扁平上皮癌における *B4GALNT4* 遺伝子の発現と悪性度との関連  
(Expression and malignant potential of *B4GALNT4* in esophageal  
squamous cell carcinoma)

論文審査委員

(主査)	教 授	平林 健一
(副査)	教 授	安田 一朗
(副査)	教 授	西田 尚樹
(副査)	特命教授	土谷 智史
(指導教員)	教 授	藤井 努

Expression and malignant potential of *B4GALNT4*  
in esophageal squamous cell carcinoma

食道扁平上皮癌における *B4GALNT4* 遺伝子の発現と悪性度との関連

富山大学大学院 医学薬学教育部 生命・臨床医学専攻

馬場 逸人

## 要旨

### 目的:

食道扁平上皮癌は日本を含めたアジアに多い悪性疾患であり、世界的にも癌死亡の第6位に挙げられる重大な健康課題である。近年の集学的治療の発展にもかかわらず依然として予後不良な病態であり、更なる予後改善に向けては予後予測や新規治療につながり得る新たな癌関連遺伝子の同定が重要な研究課題といえる。

近年、細胞表面の糖タンパク質の構造変化が腫瘍発生における細胞生存、遊走、浸潤、細胞外マトリックス(ECM)接着などの悪性挙動と関連することが示唆されている。中でも腫瘍関連糖タンパク質である GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc の生合成に関わる糖転移酵素  $\beta$ -1,4-N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ 4(B4GALNT4)は、いくつかの癌で発現が上昇し予後不良と関連していることが知られている。しかしながら、食道扁平上皮癌における B4GALNT4 の発現と機能は明らかにされていない。本研究では、食道扁平上皮癌における B4GALNT4 の発現、機能、および臨床的意義について検討することを目的とした。

### 方法および結果:

B4GALNT4 mRNA の発現に関して、17種のヒト食道扁平上皮癌細胞株を用いて qRT-PCR による解析を行なった。遺伝子発現上位であった2種の細胞株(KYSE590 および KYSE1440)を用いて、small interfering RNA (siRNA)による遺伝子ノックダウン解析を行い、B4GALNT4 遺伝子の食道扁平上皮癌細胞に対する増殖、浸潤、遊走、接着能への関与を検討した。

臨床検体を用いた検討では、147例と159例の根治切除が施行された食道扁平上皮癌患者からなる2つの独立したコホートから採取された食道組織検体を用いて、それぞれ qRT-PCR と免疫組織化学によって B4GALNT4 mRNA と蛋白の発現解析を行なった。両患者コホートにおいて、臨床病理学的因子および予後データと臨床検体における B4GALNT4 発現との関連を検討した。


B4GALNT4 mRNA の発現量は、細胞株の分化状態や由来組織(原発/転移組織由来)にかかわらず、食道扁平上皮癌細胞株により大きく変動していた。B4GALNT4 遺伝子の siRNA によるノックダウンにより、KYSE590 株において細胞増殖、遊走能は有意な低下を示した。また、B4GALNT4 遺伝子ノックダウンにより、検討した5つ全ての ECM 成分(フィブロネクチン、コラーゲン I、コラーゲン IV、ラミニン I、フィブリノーゲン)に対する KYSE590 の接着能の減弱を認めた。また、KYSE1440 株を用いた浸潤能評価では、B4GALNT4 遺伝子のノックダウンにより浸潤能が有意に抑制された。

B4GALNT4 mRNA は、食道扁平上皮癌原発組織において隣接する正常食道組織と比較して有意に発現が増加していた。B4GALNT4 mRNA の高発現は、無再発生存期間の短縮( $p = 0.044$ )および血行性再発の増加( $p = 0.042$ )と有意な関連を示した。B4GALNT4 蛋白の高発現に関しても疾患特異的生存期間の短縮と有意に関連していた( $p = 0.044$ )。多変量解析においても、B4GALNT4 mRNA の高発現は根治切除後の無再発生存に対する独立した予測因子であった(ハザード比 3.92, 95%信頼区間 1.09-14.1,  $p = 0.036$ )。いずれの患者コホートにおいても、B4GALNT4 mRNA および蛋白の高発現は、病期、リンパ管侵襲、腫瘍マーカーなどの既知の予後因子と相関を認めなかった。

### 総括:

B4GALNT4 遺伝子は食道扁平上皮癌細胞の悪性度に寄与しており、その減弱により癌抑制的な作用を示した。また、食道扁平上皮癌では癌組織における B4GALNT4 発現亢進を認め、その発現は、既知の危険因子とは独立した食道扁平上皮癌患者の新たな予後予測マーカーとして有用である可能性が示唆された。

## 学位論文審査の要旨

報告番号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	馬場 逸人
論文審査委員	職 名 (主査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授 (副査) 特命教授	氏 名 平林 健一 安田 一朗 西田 尚樹 土谷 智史	
指導（紹介）教員	教 授	藤井 努	
(論文題目 英文の場合は和訳, 日本語の場合は英訳を付記すること) 食道扁平上皮癌における <i>B4GALNT4</i> 遺伝子の発現と悪性度との関連 (Expression and malignant potential of <i>B4GALNT4</i> in esophageal squamous cell carcinoma)			(判定)  合格
(論文審査の要旨)			
[目的]			
<p>食道扁平上皮癌は日本を含めたアジアに多い悪性疾患であり、世界的にも癌死亡の第6位に挙げられる重大な健康課題である。近年の集学的治療の発展にもかかわらず依然として予後不良な病態であり、更なる予後改善に向けては予後予測や新規治療につながり得る新たな癌遺伝子の同定が重要な研究課題といえる。近年、細胞表面糖タンパクの構造変化が腫瘍発生における細胞生存、遊走、浸潤、細胞外マトリックス (ECM) 接着などの悪性挙動と関連することが示唆されている。中でも腫瘍関連糖タンパク質であるGalNAcβ1-4GlcNAcの生合成に関わる糖転移酵素β-1,4-N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ4 (<i>B4GALNT4</i>) は、いくつかの癌で発現が上昇し予後不良と関連していることが知られている。しかしながら、食道扁平上皮癌における<i>B4GALNT4</i>の発現と機能は明らかにされていない。そこで、馬場氏は食道扁平上皮癌における<i>B4GALNT4</i>の発現、機能および臨床的意義についてヒト食道扁平上皮癌細胞株および食道扁平上皮癌切除検体を用いて検討を行なった。</p>			
[方法ならびに結果]			
<p>まず、馬場氏は<i>B4GALNT4</i> mRNAの発現に関して、17種のヒト食道扁平上皮癌細胞株を用いてqRT-PCRによる解析を行なった。さらに、遺伝子発現上位であった2種の細胞株 (KYSE590およびKYSE1440) を用いて、small interfering RNA (siRNA)による遺伝子ノックダウン解析を行い、<i>B4GALNT4</i>遺伝子の食道扁平上皮癌細胞に対する増殖、浸潤、遊走、接着能への関与を検討した。</p>			

その結果、馬場氏は*B4GALNT4* mRNAの発現量は、細胞株の分化状態や由来組織(原発/転移組織由来)にかかわらず、食道扁平上皮癌細胞株により大きく変動していることを見出した。また、*B4GALNT4*遺伝子のsiRNAによるノックダウンにより、KYSE590株において細胞増殖と遊走能が有意な低下を示し、さらに検討した5つ全てのECM成分(フィブロネクチン、コラーゲンI、コラーゲンIV、ラミニンI、フィブリノーゲン)に対する接着能が減弱することを明らかにした。KYSE1440株を用いた浸潤能評価では、*B4GALNT4*遺伝子のノックダウンにより浸潤能が有意に抑制されることを明らかにした。

さらに、馬場氏は147例と159例の根治切除が施行された食道扁平上皮癌患者からなる2つの独立したコホートから採取された食道組織検体を用いて、それぞれqRT-PCRと免疫組織化学によって*B4GALNT4* mRNAと*B4GALNT4*蛋白の発現解析を行い、*B4GALNT4*発現と臨床病理学的因子および予後データとの関連性を検討した。その結果、*B4GALNT4* mRNAは、食道扁平上皮癌原発組織において隣接する正常食道組織と比較して有意に発現が増加し、その高発現は無再発生存期間の短縮および血行性再発の増加と有意な関連を示すことを明らかにした。*B4GALNT4*蛋白の高発現に関しても疾患特異的生存期間の短縮と有意に関連することを明らかにした。多変量解析においても、*B4GALNT4* mRNAの高発現は根治切除後の無再発生存に対する独立した予測因子であった。いずれの患者コホートにおいても、*B4GALNT4* mRNAおよび *B4GALNT4*蛋白の高発現は、病期、リンパ管侵襲、腫瘍マーカーなどの既知の予後因子と相関を認めなかった。

#### [総括]

本研究により馬場氏は、*B4GALNT4*遺伝子はその発現減弱により食道扁平上皮癌細胞の増殖能・遊走能・浸潤能の抑制に関与し、癌抑制的な作用を示すこと明らかにした。さらに、食道扁平上皮癌の臨床検体を用いた検討では、*B4GALNT4*の高発現が生存期間短縮や血行性再発と有意に関連すること明らかにし、既知の危険因子とは独立した食道扁平上皮癌患者の新たな予後予測マーカーとして*B4GALNT4*が有用である可能性を示した。以上のことから、食道扁平上皮癌における*B4GALNT4*の発現と機能および臨床的意義を明らかにした点は新規性があり、食道扁平上皮癌の病態解明や予後予測の観点から学術的重要性は高い。また、*B4GALNT4*が食道扁平上皮癌の新たな予後予測マーカーや治療標的となり得る可能性があり臨床的発展性も期待できる。以上より本審査会は本論文を博士(医学)の学位に十分値すると判断した。