

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	相澤仁志
論文審査担当者	主査 本田孝行 副査 菅野祐幸・小泉知展
<p>論文題目</p> <p style="text-align: center;"><b>Difference in glycogen metabolism (glycogen synthesis and glycolysis) between normal and dysplastic/malignant oral epithelium</b></p> <p style="text-align: center;">(口腔正常粘膜上皮と異型/悪性粘膜上皮におけるグリコーゲン代謝(グリコーゲン合成と分解)の相違)</p> <p style="text-align: center;">(論文の内容の要旨)</p> <p>〔背景と目的〕 ヨード生体染色は口腔扁平上皮癌(OSCC)の診断・治療に用いられ、主に粘膜の正常上皮と異型上皮の鑑別でその有用性が認められている。現在までの信州大学歯科口腔外科学教室での研究により、ヨード生体染色の不染色域ではグリコーゲンの発現が低下しており、その機序としてOSCCにおいてグリコーゲンの代謝異常があると推察された。そこで本研究ではOSCCのグリコーゲンの代謝に関する詳しい検討を行っており、グリコーゲン合成酵素であるglycogen synthase(GS), phospho-glycogen synthase(PGS)とグリコーゲン分解酵素であるglycogen phosphorylase isoenzyme BB(GPBB), グリコーゲン調整酵素であるglucagon-like peptide-1(GLP-1)の発現について検討した。</p> <p>〔対象と方法〕 2011年6月から2014年9月までの期間、信州大学医学部附属病院特殊歯科・口腔外科で診断を受け、治療を行った未治療OSCC 55例から組織を採取した。手術により切除された摘出物にJG(歯科用ヨードグリセリン溶液)染色を施行し、不染色域および染色域を含む組織を採取した。その際、腫瘍が内向性で満足な染色が得られなかった症例や、切除量が少量であった症例などを除去し、最終的に21例を検討対象とした。採取した組織から凍結切片を作製し、連続切片にHE, PAS染色を行うとともに免疫組織学的にGS, PGS, GPBB, GLP1, 参考としてP53, Ki67染色を行い、JG染色およびPASとこれら酵素の発現状況を比較検討した。GS, PGS, GPBB染色の評価の方法としてJG染色域、JG不染色域で粘膜領域をそれぞれ基底層、傍基底層、表層の3層に分け、各層でランダムに選んだ5箇所(400倍視野内)で、全上皮(腫瘍)細胞数のうち染色されていた細胞の割合の平均値を陽性細胞数として評価した。検定はWilcoxon符号付順位検定を用い、各層でのJG染色域とJG不染色域間の有意差を評価した。加えて、in vitro研究として、同意を得た健康ボランティアから提供を受けた正常歯肉上皮細胞(NHEK), 東北大学から提供いただいた不死化角化上皮細胞(HaCaT), Japanese Collection of Research Bioresourcesから提供いただいたSAS, HSC-2, HSC-3, Ca9-22の4種のOSCC細胞, 九州大学から提供いただいたSQUU-A, SQUU-Bの2種のOSCC細胞を当教室の培養器で培養し、それぞれからタンパク質とRNAを抽出。タンパク質を用いてWestern Blotting法でGSとGPBBのタンパク質の発現を比較した。また抽出したRNAからリアルタイムPCR法を用いてGSとGPBBの発現を定量解析した。また培養中の細胞を用いてGSとGPBBへ蛍光抗体染色を行い蛍光強度の検出を行った。</p> <p>〔結果と考察〕 JG染色域では、上皮細胞は組織学的にすべて正常であり(HE染色)、PAS染色陽性を示した。JG不染色域では、異型上皮細胞の出現を認め、PAS染色では陽性細胞(グリコーゲンの発現)が低下していた。免疫染色ではGS, PGSの陽性細胞はJG染色域、不染色域とともに均等に認められ、陽性細胞率に優位な差は認めなかった。GLP-1は両者とも発現を認めなかった。GPBBの陽性細胞数はJG染色域で少なく、JG不染色域において有意に多かった(Wilcoxon符号付順位検定, <math>P&lt;0.01</math>)。</p>	

また Western Blotting では、正常細胞と腫瘍細胞で GS, PGS ともにバンドが出現したものの差異は認めなかったが、GPBB では腫瘍細胞においてバンドの出現が顕著であった。リアルタイム PCR 法においても、GS の発現は腫瘍細胞、正常細胞で差はなかったが、GPBB の発現は腫瘍細胞で有意に増加していた (Wilcoxon 符号付順位検定,  $P < 0.01$ )。蛍光抗体染色では、腫瘍細胞は正常細胞に比較して GPBB の蛍光強度が有意に強くなっていた (arbitrary unit での比較: Wilcoxon 符号付順位検定,  $P < 0.01$ )。

以上の結果より、悪性化している上皮ではグリコーゲン合成能に変化はないが分解酵素の増加を認めることから、グリコーゲン分解が活発に行われていることが考えられた。