

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 Robiul Hasan Bhuiyan

論 文 題 目

Expression analysis of O-series gangliosides in human cancer cell lines with monoclonal antibodies generated using knockout mice of ganglioside synthase genes

(ガングリオシド合成酵素遺伝子のノックアウトマウスを用いて作成した単クローン抗体によるヒト癌細胞株における O-シリーズガングリオシドの発現解析)

論文審査担当者

名古屋大学教授

主 査 委員

門松 健 治 

名古屋大学教授

委員

藤 本 豊 士 

名古屋大学教授

委員

高 橋 隆 

名古屋大学教授

指導教授

岡 島 徹 也 

論文審査の結果の要旨

別紙 1-2





酸性スフィンゴ糖脂質であるガングリオシドのあるものは、腫瘍関連抗原と考えられてきた。しかし、GD1 α やその前駆体である GM1b などの 0-系列ガングリオシドのヒト腫瘍における発現パターンは検討されてこなかった。その主な要因は、特異的な抗体が存在しなかったことによる。私たちは、GM2/GD2 合成酵素 (*B4galnt1*)-ノックアウト (KO) マウス を、GD1 α あるいは GM3 合成酵素 (*St3gal5*)-ノックアウトマウス由来の 脳抽出物酸性画分を免疫原として用いることにより、GM1b or GD1 α に特異的に反応するモノクローナル抗体を樹立した。作成したモノクローナル抗体を用いて、GD1 α および GM1b の発現解析を行ったところ、若干数のヒトの腫瘍細胞株で、有意な GD1 α や GM1b の発現を認めるとともに、関連糖転移酵素遺伝子の妥当な発現を認めた。

本研究に対し、以下の点を議論した。

1. 網膜芽細胞腫 Y79 および小細胞肺癌 HS 細胞株において、GD1 α および/または GM1b 等の 0-系列ガングリオシド の発現が見られるとともに、それらの合成に関わる糖転移酵素遺伝子の発現も認められた。
2. *ST6GalNAc5* 遺伝子は、GD1 α の合成に働くとともに、乳がんの脳転移に関与するとの報告があることから、重要であると考えた。
3. GD1 α は接着分子として機能すると考えられ、かつてマウスリンパ肉腫細胞の肝臓転移に関与するとの報告がなされている。
4. HS 細胞株における GD1 α の発現を繰り返し解析したところ、HS 細胞の約 2% に GD1 α の発現を認めた。
5. 作成したモノクローナル抗体の特異性に関して、podoplanin の免疫沈降物のイムブロットイングにおける陰性の結果より、糖脂質に限局して反応することを示した。さらに、これらのモノクローナル抗体が反応性を示した Y79 および HS からの抽出糖脂質を用いた TLC-免疫染色を行って、GD1 α /GM1b に特異的に反応することを示した。
6. 糖脂質合成をその根幹で阻害する PDMP 存在下で培養した Y79 and HS 細胞に対して flow cytometry を行って、GD1 α や GM1b の発現が非処理細胞に比べて大幅に減少することを明らかにした。この結果からも、樹立したモノクローナル抗体が、糖タンパク質ではなく、糖脂質に特異的に反応することが示された。
7. 抗 GD2 抗体の臨床応用に際には、補体依存性細胞傷害作用のせいもあって、神経性疼痛が惹起される。この副作用は、抗体の CH2 ドメインの 322 番目のアミノ酸の変異(lysine から alanine)を導入して、補体の作用を抑制することで対処が可能となったが、私たちの抗体でも同様の問題が起きた時には、抗体の修飾を検討する必要がある。

以上の理由により、本研究は博士 (医学) の学位を授与するにふさわしい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※甲第	号	氏名	Robiul Hasan Bhuiyan
試験担当者	主査 門和建  藤本豊  高橋隆  指導教授 岡島徹也 			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 0-系列が Y79 や HS 細胞株に発現する理由は何か。 2. <i>St6galnac5</i> の重要性について。 3. GD1αの想定される機能は何か。 4. HS細胞における GD1α の発現はずっと 2%ぐらいなのか。 5. 作成した単クローナル抗体が糖脂質に特異的であることを、イムノブロテイングで示したというが、もっと違う方法でその点を明らかにできないのか。 6. 臨床の場で、抗GD2抗体が神経疼痛を惹起するため、抗体の改変が試みられているが、今回の抗体に関する抗体の副作用の軽減方法は何か。 <p>以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、分子細胞化学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。</p>				