

Title	Involvement of oligosaccharide changes in $\alpha 5\beta 1$ integrin in a cisplatin-resistant human squamous cell carcinoma cell line
Author(s)	中原, 晋
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45306
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	なか はら すずむ 中 原 晋
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 8 5 4 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学 位 論 文 名	Involvement of oligosaccharide changes in $\alpha 5 \beta 1$ integrin in a cisplatin-resistant human squamous cell carcinoma cell line (シスプラチン耐性扁平上皮癌細胞における $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンの糖鎖 改変とその役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 久 保 武 (副査) 教 授 谷 口 直 之 教 授 宮 坂 昌 之

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

シスプラチンは、頭頸部癌を始めとして、様々な固形腫瘍の治療に頻用される抗癌剤である。しかし、腫瘍の多くは、シスプラチンによる初期治療で効果を認める場合が多いが、治療の経過に伴い耐性を獲得し、抗腫瘍効果が減弱してくる。これまでシスプラチン耐性獲得の原因として、グルタチオン抱合の増加によるシスプラチン不活化や多剤耐性タンパク質 (MRP) の発現上昇による細胞内シスプラチン濃度の低下などが報告されているが、既知のメカニズムだけでは十分な説明とは言い難い。

糖鎖は、生体内で多様な生物学的機能を有しており、特に癌における糖鎖の変化は、癌の分化・転移・浸潤などに深く関与することが知られている。これら癌細胞における糖鎖構造の変化は、その性質を著明に変化させる可能性が高い。

本研究では、シスプラチン耐性頭頸部扁平上皮癌細胞株と親株との糖鎖構造の変化をグライコミクス手法により比較検討し、シスプラチン耐性獲得機序に関与する糖鎖および糖タンパク質について解析した。

[方法ならびに成績]

(1)シスプラチン耐性扁平上皮癌細胞株の樹立

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株である HSC-2 に、シスプラチンを段階的に暴露 ($2 \mu\text{M} \times 6$ ヶ月 $\rightarrow 3 \mu\text{M} \times 3$ ヶ月 $\rightarrow 5 \mu\text{M} \times 3$ ヶ月) し、そのシスプラチン耐性細胞株である HSC-2/CR を樹立した。両細胞株の、シスプラチンによる IC50 (半数致死濃度) を MTT アッセイにて検討した結果、HSC-2 で $4 \mu\text{M}$ 、HSC-2/CR で $14.6 \mu\text{M}$ となり、約 3.6 倍の耐性獲得が認められた。

(2)シスプラチン耐性化に伴う糖鎖構造の変化

HSC-2、HSC-2/CR よりそれぞれ whole cell lysate を抽出し、種々のレクチンプロットにより糖鎖構造の比較をした。HSC-2/CR では、100-150 kD 付近の分子における L_4 -PHA レクチン (アスパラギン結合型糖鎖のうち、 $\beta 1-6\text{GlcNAc}$ 鎖を特異的に認識するレクチン) との親和性が低下していた。 $\beta 1-6\text{GlcNAc}$ 鎖は、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) により合成されるため、GnT-V の発現をウェスタンブロットで検討したが、発現量自体に

は差を認めなかった。

(3)GnT-V 過剰発現によるシスプラチン感受性の変化

HSC-2のGnT-V過剰発現細胞株を作成し、シスプラチン感受性をMTTアッセイにて対照細胞株と比較検討した。その結果、GnT-V過剰発現株は、対照株に較べてシスプラチン高感受性であることが分かった。

(4)細胞外基質に対する接着性の変化と $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの糖鎖変化

細胞外基質に対する接着性を比較したところ、HSC-2/CRのフィブロネクチンへの接着性が増加していた。そこで、 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンに注目し、その糖鎖構造を、 $\alpha 5\beta 1$ インテグリン抗体で免疫沈降後、L₄-PHAレクチンブロットにて検討した。その結果、HSC-2/CRの、特に $\beta 1$ インテグリンに付加される $\beta 1-6\text{GlcNAc}$ 鎖の量の低下が明らかとなった。

(5)Focal Adhesion Kinase (FAK) のリン酸化の変化

FAKは、 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンを介するシグナルの中心的な役割を担う分子の一つであり、その活性化はアポトーシスの回避に関与する。実際、FAKのリン酸化を特異的に認識する抗体でウェスタンブロットを施行したところ、HSC-2では、シスプラチン投与後24時間の時点でFAKのリン酸化が低下していたのに対し、HSC-2/CRでは著明に亢進していた。

(6)抗癌剤耐性における $\alpha 5\beta 1$ インテグリン中和抗体の効果

$\alpha 5\beta 1$ インテグリン中和抗体の投与によるシスプラチン感受性の変化をMTTアッセイにて検討した。HSC-2/CRに対して、中和抗体(1 $\mu\text{g/ml}$)で12時間前処理した後のシスプラチン感受性は、HSC-2とほぼ同程度まで回復した。

[総括]

本研究により、 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンのうち、特に $\beta 1$ インテグリンに付加される $\beta 1-6\text{GlcNAc}$ 鎖の量の低下が扁平上皮癌におけるシスプラチン耐性に寄与していることが明らかとなった。このように特定の糖タンパク質における糖鎖変化は、抗癌剤治療の新たな標的となる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

頭頸部癌の抗癌剤による治療にはシスプラチンが頻用されているが、治療の経過に伴いシスプラチンに対する耐性を獲得し、抗腫瘍効果が低下することが問題となっている。一方、糖鎖は核酸・タンパク質に次ぐ第3の生命鎖と呼ばれ、タンパク質の翻訳後修飾をなす重要な生体分子である。申請者は、本研究において、癌細胞が抗癌剤のシスプラチンに対する耐性を獲得する機構として $\beta 1-6\text{GlcNAc}$ 鎖という特殊な構造が関与すること、また $\beta 1-6\text{GlcNAc}$ 鎖が付加される標的分子として $\alpha 5\beta 1$ インテグリンを同定した。抗癌剤の耐性機構に関する研究はいくつか報告されているが、本研究は糖鎖を介するまったく新しい抗癌剤耐性メカニズムの発見であり大変意義があるものと思われる。また自然に培養細胞で生じた現象ゆえに実地臨床の場でも起こり得るものであり、 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの糖鎖改変を利用した抗癌剤耐性の新たな分子標的治療に結びつく可能性がある。よって博士の学位を授与するにふさわしいものと考え、ここに推薦する。