



Title	フコシル化は膵がんの様々ながん幹細胞に共通した糖鎖修飾である
Author(s)	寺尾, 尚子
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51907
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

〔 題 名 〕

フコシル化は、膵がんの様々ながん幹細胞に共通した糖鎖修飾である
(Fucosylation is common oligosaccharide modification in pancreatic cancer stem-like cells under various conditions)

保健学専攻機能診断科学講座 寺尾 尚子

〔 背 景 と 目 的 〕

がん幹細胞(Cancer Stem Cells; CSCs)は、抗がん薬や放射線治療に対して抵抗性を示し、自己複製と多分化を繰り返すことが特徴である。これまでCSCの単離・同定を行う際には、抗がん薬耐性、sphere形成やCDマーカーによる単離などの手法が用いられている。しかし、多分化した様々なタイプのCSCを包括的に捉えることのできるマーカーは、今日まで存在しない。本研究では、膵がん細胞株Panc1を用いてグライコミクスの手法によって、膵がんのCSCに共通する糖鎖構造を探索し、その糖鎖が変化するメカニズムと生物学的意義を検討した。

〔 方 法 〕

ヒト膵がん細胞株Panc1を用い、異なるアプローチで三種類のCSC様細胞を誘導した。まず膵がん治療の第一選択薬であるGemcitabine耐性株Panc1-RGを樹立した。次にPanc1をEGF, basic FGF, B27, insulin, transferrinを含むDMEM-F12培地で培養し、sphere形成細胞を得た。また膵がんのCSC表面マーカーとして知られるCD24とCD44抗体を用いて、cell sorterによりCD24^{high}CD44^{high}CSCを得た。糖鎖構造の解析は、レクチンマイクロアレイとレクチンブロット法で行った。糖鎖関連遺伝子の発現はreal-time RT-PCRで解析し、糖鎖の生物学的機能を知るため糖鎖遺伝子をshRNAを用いてノックダウンした。また、CSC様細胞のIL6産生量をELISA法にて測定した。

〔 結 果 〕

Panc1-RGとPanc1-P（親株）の糖鎖構造をレクチンマイクロアレイで解析したところ、Panc1-RGではフコースを認識するレクチンであるAAL, AOL, UEA-1レクチンとの結合性が亢進していた。AALによるレクチンブロット法で、その結果を検証した。さらに、Panc1より誘導したsphere形成細胞とPanc1より単離したCD24^{high}CD44^{high}細胞のCSC様細胞においても、同様にフコシル化(フコースによる糖鎖修飾)が増加していた。以上のことからフコシル化の増加は、異なる方法により濃縮したCSC様細胞間において共通した現象であることが分かった。これらのCSC様細胞で、フコシル化関連遺伝子の発現をreal-time RT-PCR法で解析したところ、FUT1, FUT2, FUT3, FUT4, FX, GDP-fucose Transporter (GDP-fuc Tr)などの遺伝子発現の亢進を認めた。中でも、FUT1とFUT3は発現亢進が顕著であった。これまでの報告から、FUT1

は抗がん薬耐性に関与するということが知られている。そこでPanc1-RGを用いて、FUT1遺伝子とフコシル化の重要なファクターであるGDP-fuc Tr遺伝子のノックダウンを行った。しかし、Gemcitabine耐性能に差は認められなかったことから、フコシル化はGemcitabine耐性に直接関与せず、膵がんのCSC様細胞変化に付随した現象であることがわかった。次に、膵がんのCSCにおいてフコシル化が増加するメカニズムについて検討した。その結果、IL-6-Stat3シグナルや転写因子HNF1 α /4 α の関与が示唆された。

〔 考 察 〕

一般的に、抗がん薬処理によってCSCが濃縮されることが知られている。Panc1以外に6種類の膵がん細胞株(MiaPaCa-2, PSN-1, BxPC-3, Capan-1, PK8, PK59)に48時間のGemcitabine処理を行うと、Panc1-RGと同様にフコシル化の増加が見られた。先行研究で、肝がんのCSCにおいては、シアル酸が増加していた(Moriwaki K. *et al.* Cancer Sci. 2011, Azuma K. *et al.* J Proteome Res. 2014)ことから、フコシル化の増加は膵がんのCSCに特徴的な現象なのかもしれない。3種類の異なる手法によって濃縮したPanc1のCSC様細胞では、レクチンブロット法によるフコシル化のパターンが異なっていた。この現象は各CSCで誘導される様々な糖タンパク質の違いによると推察される。いずれのCSC様細胞においても共通してフコシル化の増加が見られたことから、共通したフコシル化標的タンパク質を同定できれば、膵がんCSCを包括的に捉えることができるかもしれない。誘導したCSC様細胞では様々なフコシル化関連遺伝子の発現亢進も認められた。最近、Laucらにより、転写因子HNF1 α /HNF4 α がフコシル化関連遺伝子のマスター因子であることが報告されている(Lauc G *et al.* PLoS Genet. 2010)。Panc1のCSC様細胞で認められたフコシル化関連遺伝子の発現上昇にも、この転写因子が関与している可能性がある。また、膵がんのCSC様細胞でIL-6産生が増加していたことは、過去の報告と一致し、IL-6-Stat3シグナルがCSCにおけるフコシル化関連遺伝子の発現を調節する可能性が示唆された。我々の実験結果では、FUT1やGDP-Fuc Trのノックダウンで抗がん薬耐性は変化しなかった。しかし、Cordelらの報告によるとラット大腸がんでは、FUT1と抗がん薬耐性には密接な関係がある(Cordel S. *et al.* Int. J. Cancer 85, 142-148, 2000)という。この違いが細胞種の違いか、ノックダウンの程度によるのか検討の余地がある。また、Panc1-RGの分泌タンパク質においてもフコシル化の増加が確認されたことから、そのターゲットタンパク質の同定により、抗がん薬耐性あるいはCSCの存在を推測する新規血清マーカーとして応用できるかもしれない。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (寺 尾 尚 子)		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査 教 授	三善 英知
	副 査 教 授	杉山 治夫
	副 査 教 授	戸邊 亨

論文審査の結果の要旨

膵がんは、5年生存率が5%未満と非常に予後不良のがんである。早期診断が困難なことに加え、再発・転移が高頻度に見られる原因として、がん幹細胞(Cancer Stem Cell; CSC)の存在が大きく関与すると考えられている。CSCは、がん組織中のごく微小な細胞集団として存在し、抗がん薬や放射線治療に抵抗性を示し、自己複製・多分化を繰り返すことで新たながん組織を形成することができる。これまでのCSCの単離及び同定には、抗がん薬耐性、sphere形成、CDマーカーによる単離といったCSCの性質を利用しているが、研究者間でそのアプローチの共通性は乏しい。そのため実際に見ているCSC集団は一部が重なり合うものの、完全に一致することは非常に少ない。つまり従来のCSCマーカー単独ではすべてのCSCを網羅的に捉えることが難しく、CSCを包括的に捉えることが出来る共通したマーカーは存在しない。

そこで本研究では、様々なタイプの膵がんCSCを網羅的に捉えることのできる包括的な糖鎖マーカーをグライコミクス的手法を用いて探索した。まず、膵がん細胞株Panc1を用いて、抗がん薬(Gemcitabine)耐性細胞を樹立し、レクチンマイクロアレイを行ったところ、親株と比較して抗がん薬耐性細胞ではフコシル化(フコースによる糖鎖修飾)が亢進していた。また、異なるCSC濃縮法であるsphere形成細胞とCDマーカー(CD24/CD44)により単離した細胞においてもフコシル化の亢進は共通して見られた。Real-time RT-PCR法で検討した結果、CSCにおけるフコシル化亢進の理由は、様々なフコシル化関連遺伝子の発現増加によることがわかった。

このフコシル化亢進の生物学的意義について検討するため、抗がん薬耐性細胞で発現亢進していたフコシル化遺伝子のうちFUT1をノックダウンしたが、その耐性能には変化がなかった。さらにGDP-fucose Transporterをノックダウンしてすべてのフコシル化を抑制しても抗がん薬耐性に差が認められなかったことから、フコシル化亢進にはCSCとしての生物学的意義はなく、CSCが濃縮された結果であると考えられた。さらにCSCにおいてフコシル化関連遺伝子が発現上昇するメカニズムについて検討したところ、IL6の産生と転写因子HNF4αの発現の亢進が関与している可能性が示唆された。これまでシアル酸の増加が、がん幹細胞の表面マーカーとして有用という報告は散見するが、フコシル化ががん幹細胞のマーカーに関与するというのは初めての報告である。今後3種類のCSCに共通するフコシル化標的タンパク質の同定により、がん幹細胞あるいは抗がん薬耐性のマーカーとしての有用性が期待できる。

以上の結果より、本論文は博士(保健学)の学位を授与するものに値すると認める。