

Title	Lewis glycosphingolipids as critical determinants of TRAIL sensitivity in cancer cells
Author(s)	福岡, 智哉
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/91808
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、 〈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

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	福岡 智哉
論文題名 Title	Lewis glycosphingolipids as critical determinants of TRAIL sensitivity in cancer cells (がん細胞においてLewis糖脂質はTRAIL感受性の重要な決定因子となる)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) はがん細胞に細胞死を誘導することで抗腫瘍性サイトカインとして機能する。がん細胞に細胞死を引き起こす一方で、正常細胞にはそのような効果を示さないため新規創薬標的として期待されてきたが、これまでの臨床試験では十分な効果が認められなかった。そのため、TRAIL抵抗性の分子機構の解明や、TRAILの治療効果を予測するバイオマーカーの同定などの新たな戦略が求められている。以前我々は、大腸がん細胞株であるHCT116はフコース転移酵素(FUT)のドナー基質であるGDP-フコースを合成するために必要な酵素であるGDP-mannose 4,6-dehydratase (GMDS)を欠損するためフコシル化が欠損していること、野生型GMDSを導入したHCT116 (HCT^{GMDS})はTRAIL誘導性細胞死が亢進することを示し、フコシル化糖鎖がTRAIL感受性を正に制御することを明らかとした。しかし、TRAIL感受性を制御する詳細なフコシル化糖鎖構造は不明である。そこで、本研究ではTRAIL感受性を制御するフコシル化糖鎖構造と、TRAIL治療の有効性を予測するバイオマーカーの同定を目的とした。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>(1) HCT^{GMDS} 細胞に対してCRISPR/Cas9法を用いてフコース転移酵素であるFUT1/2, FUT3/5/6, FUT8をノックアウトし、それぞれα1-2, α1-3/1-4, α1-6結合のフコシル化糖鎖を欠損させ、TRAIL誘導性細胞死に与える影響を調べた。その結果、α1-3/1-4フコース(Lewis糖鎖)を欠損させるとTRAIL誘導性細胞死がHCT^{mock} 細胞と同程度まで抑制された。このことからLewis糖鎖がTRAIL誘導性細胞死を亢進させると考えられた。</p> <p>(2) HCT^{mock}、HCT^{GMDS} 細胞に対してFLAG-TRAILで刺激後、抗FLAG抗体で免疫沈降を行い、非還元状態でSDS-PAGEを行うことでTRAIL刺激依存的な受容体複合体の形成を観察したところ、Lewis糖鎖の有無によるTRAIL受容体の重合と受容体複合体の形成に違いを認めなかった。一方、TRAIL刺激後に抗caspase 8抗体や抗FADD抗体で免疫沈降することで受容体複合体と細胞質内FADD-caspase 8複合体の形成を観察したところ、Lewis糖鎖によりcaspase 8の複合体の形成が亢進していた。このことから、Lewis糖鎖はリガンド刺激依存性のTRAIL受容体複合体の形成に影響を与えず、リガンド刺激に応じたTRAIL受容体複合体から細胞質FADD-caspase 8複合体の形成を亢進させると考えられた。</p> <p>(3) HCT^{mock}、HCT^{GMDS} 細胞に対してhigh mannose型のN型糖鎖からhybrid型/complex型のN型糖鎖を合成するのに必要な酵素であるMGAT1と、O型糖鎖の伸長に必要な酵素であるC1GalT1C1をCRISPR/Cas9法を用いてノックアウトし、糖タンパク質上にLewis糖鎖が付加できない細胞株を作成し、TRAIL誘導性細胞死に与える影響を調べた。その結果、MGAT1/C1GalT1C1二重欠損株においてもフコシル化によるTRAIL誘導性細胞死の増強効果を認めた。次に、HCT^{mock}、HCT^{GMDS} 細胞に対してlacto/neolacto系糖脂質の合成に必要な酵素であるβ3GnT5をノックアウトし、糖脂質にLewis糖鎖が付加できない株を作成し、TRAIL誘導性細胞死に与える影響を調べた。その結果、β3GnT5欠損株ではフコシル化によるTRAIL誘導性細胞死の増強効果が消失した。このことから、lacto/neolacto系糖脂質に付加されるLewis糖鎖がTRAIL誘導性細胞死を亢進させると考えられた。</p> <p>(4) 10種類のヒト大腸がん細胞株を用いて、細胞表面上のLewis糖鎖の発現レベルをフローサイトメトリーで定量し、TRAIL誘導性細胞死への感受性との相関関係を調べたところ、I型Lewis糖鎖であるLe^aやsLe^aの発現量とTRAIL誘導性細胞死への感受性に有意な正の相関関係を認めた。また、培養上清中のsLe^a濃度をELISAにより定量し、TRAIL誘導性細胞死への感受性との相関を調べたところ、培養上清中のsLe^aの発現量とTRAIL感受性に有意な正の相関関係を認めた。さらに、大腸がん患者のがん組織から樹立したがんオルガノイドを用いて同様の実験を行ったところ、Le^aやsLe^aの発現量とTRAIL誘導性細胞死への感受性に有意な正の相関関係を認めた。また、血清CA19-9値が高値の患者から樹立したがんオルガノイドはTRAILに対して高感受性を示した。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>Lewis糖脂質はTRAIL受容体複合体の形成に影響を与えず、細胞質内FADD-caspase 8複合体の形成を亢進させることによりTRAIL誘導性細胞死を亢進させる。大腸がんにおいてがん細胞表面のI型Lewis糖鎖の発現量や血清CA19-9値はTRAIL感受性を予測する因子となり得る。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		福岡 智哉	
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	大 藪 東一
	副 査	大阪大学教授	竹 田 潔
	副 査	大阪大学教授	渡 邊 登喜子

論文審査の結果の要旨

TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)は、腫瘍免疫監視機構の一翼を担うサイトカインであり、TRAIL受容体を発現するがん細胞に細胞死を誘導する。TRAILはがん細胞に特異的に細胞死を引き起こす性質を持つため、これまでに様々なTRAIL受容体を標的としたがん治療薬が開発され、その臨床応用が期待されてるが、TRAILによる細胞死に耐性を示すがん細胞の存在などの理由で十分な治療効果が見られない患者もおり、未だ臨床応用に至っていない。本研究は、がん細胞表面の糖脂質に付加されるルイス糖鎖という糖鎖構造が、TRAIL誘導性細胞死を促進させる分子メカニズムを明らかとし、ルイス糖鎖の量を測定することでがん細胞のTRAIL誘導性細胞死への感受性を予測できる可能性を示した初めての研究である。これにより、TRAIL受容体分子標的薬、またさらにはがん免疫療法の治療効果の予測とその予測に基づいた新たながん治療戦略の開発につながることを期待され、博士（医学）の学位授与に値する研究内容である。