

学位論文題名

ヒト腎細胞癌培養株における硫酸化糖脂質
及び糖脂質硫酸転移酵素に関する研究

学位論文内容の要旨

I 研究目的

硫酸化糖脂質は腎細胞癌組織において、正常腎組織に比して著しく増加しており、その合成酵素である硫酸転移酵素活性が組織及び患者血清において上昇していることが報告されている。また、細胞の癌化と蛋白質リン酸化反応とは密接に関わっていると考えられている。そこで、本研究では、ヒト腎細胞癌培養株において硫酸化糖脂質の増加及び糖脂質硫酸転移酵素活性の上昇を明かにし、プロテインキナーゼCの関与を検討することを目的としたものである。

II 実験方法

- 1) ヒト腎細胞癌株の培養：ヒト腎細胞癌株(SMKT-R-3)は 10% fetal bovine serumを含む培地DMEMにて継代培養を行った。
- 2) 糖脂質の分離と同定：上記細胞を超音波破碎後、クロロホルム、メタノール、水の混合溶媒にて脂質を抽出し、弱アルカリ加水分解した。これをSephadex A-25のカラムにかけて酸性糖脂質画分を得た。抽出した糖脂質を薄層プレート上に展開後、糖脂質一般をオルシノール硫酸試薬により、硫酸化糖脂質をアズールA試薬により発色した。
- 3) 硫酸化糖脂質のメタボリックラベリング： 3×10^6 個の本細胞に終濃度 $5 \mu\text{Ci/ml}$ となるように $[^{35}\text{S}]\text{Na}_2\text{SO}_4$ を加え24時間培養し、その後、酸性糖脂質画分を分離し、薄層プレート上に展開後、オートラジオグラフィ

ーを行った。

4) 糖脂質硫酸転移酵素活性の測定：ガラクトシルセラミド(GalCer)及びラクトシルセラミド(LacCer)を基質として、それぞれに対する硫酸転移酵素活性を [35 S]PAPS(3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate)を用いて測定した。

5) 糖脂質硫酸転移酵素反応産物の同定：上記の酵素反応液より酸性糖脂質画分を抽出し薄層プレート上に展開後、クロマトスキャナーを用いて標識糖脂質を検出した。

6) 糖脂質硫酸転移酵素活性に対するプロテインキナーゼCの関与：本細胞に12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) およびプロテインキナーゼC阻害剤 H-7、スタウロスポリンを投与し、その効果を検討した。

7) 糖脂質硫酸転移酵素活性に対するepidermal growth factor (EGF)の効果：本細胞にEGFを無血清条件下で投与し、その効果を検討した。さらに、TPAもしくはH-7前処理後にEGFを投与し、本酵素活性に対するプロテインキナーゼCとEGFの相互関係を検討した。

III 結果

1) ヒト腎細胞癌培養株の硫酸化糖脂質：SMKT-R-3細胞では、硫酸化糖脂質としてSM4(galactosylceramide 3'-sulfate)、SM3(lactosylceramide 3'-sulfate)、及びSM2(gangliosylceramide 3'-sulfate)が多量に発現していた。硫酸標識によるメタボリックラベリングにおいても、これらの硫酸化糖脂質の生合成されることが確認された。

2) 糖脂質硫酸転移酵素：酵素反応生成物を薄層プレート上に展開し、標識硫酸化糖脂質の放射活性を測定した。その結果、酵素反応産物として GalCer を基質として SM4が、LacCer を基質として SM3 が生成された。本細胞における、GalCerを基質とした硫酸転移酵素の K_m 値は $43.2 \mu M$ 、 V_{max} は 9.2 nmol/h/mg蛋白 と計算された。LacCerを基質とした場合は、 K_m 値 $358 \mu M$ 、 V_{max} は 9.4 nmol/h/mg蛋白 であった。

3) 糖脂質硫酸転移酵素活性におけるプロテインキナーゼCの関与：TPAを本細胞に48時間作用させると $10^{-10} \sim 10^{-7} M$ の範囲で、GalCer及びLacC

erを基質とした硫酸転移酵素活性が濃度依存的に低下した。 10^{-8} MのTPAを作用させると、3時間後には両基質に対する本酵素活性の低下を認め、48時間後まで時間依存的に活性が低下した。これらの結果よりTPAのプロテインキナーゼCのdown-regulation効果が示唆された。そこで、プロテインキナーゼCの阻害H-7投与の効果を検討したところ、50~500 μ Mの範囲で濃度依存的に両基質に対する本酵素活性が低下した。同様に、スタウロスポリン投与により、 10^{-8} ~ 10^{-6} Mの範囲で濃度依存的に本酵素活性が低下した。以上より、本細胞において本酵素の活性発現にプロテインキナーゼCの関与していることが示された。

4) 糖脂質硫酸転移酵素活性に対するEGFの効果：生体の中で癌細胞のプロテインキナーゼCに關与する可能性のある因子の一つとしてEGFの効果を検討した。EGFは10~50 ng/mlの範囲で濃度依存的に糖脂質硫酸転移酵素の比活性を上昇させた。シクロヘキシミドを同時に投与すると、EGFの効果は消失した。このことより、EGFによる本酵素活性上昇は蛋白合成に伴ったものであることがわかった。また、TPAあるいはH-7により本細胞を前処理した後にEGFを投与しても効果はみられなかった。このことから、EGFの効果発現にはプロテインキナーゼCが必要であることが示唆された。

IV. 考察

本研究により、ヒト腎細胞癌組織における硫酸化糖脂質の増加及び糖脂質硫酸転移酵素の活性上昇は、癌細胞自体に由来することが明らかとなった。従って、本酵素の活性上昇が腎癌細胞における硫酸化糖脂質の増量の大きな要因となっていることが示唆された。

TPAを細胞に長時間作用させた場合、プロテインキナーゼCがプロテアーゼによって分解されることによるdown-regulation効果のみられることが報告されている。本研究で示されたTPAの糖脂質硫酸転移酵素の活性低下はその作用させた時間を考慮すると、プロテインキナーゼCのdown-regulation効果によるものと考えられた。さらに、H-7及びスタウロスポリンの効果を合わせて考えると本酵素の活性発現にはプロテインキナーゼCが関与していることを示している。

最近、EGFによる情報の少なくとも一部は、ホスホリパーゼC- γ を介

してプロテインキナーゼCに伝達されることが報告されている。本研究において、EGFにより糖脂質硫酸転移酵素の活性上昇がみられたが、TPA、H-7で本細胞を前処理するとその効果はみられなかった。この結果は、プロテインキナーゼC活性を抑制することにより、EGFレセプターから糖脂質硫酸転移酵素の活性発現までの細胞内情報伝達経路のどこかで遮断されることを示唆している。また、TPAまたはH-7で前処理した本細胞はEGF添加にもかかわらず、TPA及びH-7未処理でEGF未添加のものに比較して本酵素活性が著しく低下していた。このことは、糖脂質硫酸転移酵素の活性発現にはプロテインキナーゼCが必須であることを示唆している。

V. 結語

ヒト腎細胞癌培養株(SMKT-R-3)を用いて硫酸化糖脂質及び糖脂質硫酸転移酵素活性を検討して、以下の結果を得た。

- 1) ヒト腎癌細胞では糖脂質硫酸転移酵素の活性亢進により、硫酸化糖脂質の合成が増大する。
- 2) ヒト腎癌細胞において糖脂質硫酸転移酵素の活性発現にはプロテインキナーゼCが関与している。
- 3) EGFはヒト腎癌細胞において糖脂質硫酸転移酵素の活性上昇を誘導した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保
副 査 教 授 大河原 章
副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学位論文題名

ヒト腎細胞癌培養株における硫酸化糖脂質
及び糖脂質硫酸転移酵素に関する研究

I 研究目的

硫酸化糖脂質は腎細胞癌組織において、正常腎組織に比して著しく増加しており、その合成酵素である硫酸転移酵素活性が組織及び患者血清において上昇していることが報告されている。そこで、本研究ではヒト腎細胞癌培養株を用いて、硫酸化糖脂質の増量が糖脂質硫酸転移酵素の活性上昇に基づくことを明かにし、またその酵素活性発現におけるプロテインキナーゼCの関与を検討した。

II 実験方法

1) ヒト腎細胞癌株の培養：ヒト腎細胞癌株(SMKT-R-3)は 10% fetal

bovine serumを含む培地DMEMにて継代培養を行った。

2) 糖脂質の分離と同定：上記細胞より酸性糖脂質画分を分離、調製した。糖脂質一般をオルシノール硫酸試薬により、硫酸化糖脂質をアズールA試薬により発色した。

3) 硫酸化糖脂質のメタボリックラベリング：本細胞を $[^3\text{S}]\text{Na}_2\text{SO}_4$ にて標識した後、酸性糖脂質画分を分離し、薄層プレート上に展開後、オートラジオグラフィーを行った。

4) 糖脂質硫酸転移酵素活性の測定：ガラクトシルセラミド(GalCer)及びラクトシルセラミド(LacCer)を基質として、それぞれに対する硫酸転移酵素活性を $[^3\text{S}]\text{PAPS}$ (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate)を用いて測定した。

5) 糖脂質硫酸転移酵素反応産物の同定：上記の酵素反応液より酸性糖脂質画分を抽出し薄層プレート上に展開後、クロマトスキャナーを用いて標識糖脂質を検出した。

6) 糖脂質硫酸転移酵素活性に対するプロテインキナーゼCの関与：本細胞に12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) およびプロテインキナーゼC阻害剤 H-7、スタウロスポリンを投与し、その効果を検討した。

7) 糖脂質硫酸転移酵素活性に対するepidermal growth factor (EGF)の効果：本細胞にEGFを無血清条件下で投与し、その効果を検討した。さらに、TPAもしくはH-7前処理後にEGFを投与し、本酵素活性に対するプロテインキナーゼCとEGFの相互関係を検討した。

III 結果ならびに考察

1) ヒト腎細胞癌培養株の硫酸化糖脂質：SMKT-R-3細胞では、硫酸化糖

脂質としてSM4(galactosylceramide 3'-sulfate)、SM3(lactosylceramide 3'-sulfate)、及びSM2(gangliosylceramide 3'-sulfate)が多量に発現していた。硫酸標識によるメタボリックラベリングにおいても、これらの硫酸化糖脂質の生合成されることが確認された。

2) 糖脂質硫酸転移酵素：酵素反応生成物を薄層プレート上に展開し、標識硫酸化糖脂質の放射活性を測定した。その結果、酵素反応産物としてGalCerを基質としてSM4が、LacCerを基質としてSM3が生成された。本細胞における、GalCerを基質とした硫酸転移酵素の K_m 値は $43.2 \mu M$ 、 V_{max} は 9.2 nmol/h/mg蛋白 と計算された。LacCerを基質とした場合は、 K_m 値 $358 \mu M$ 、 V_{max} は 9.4 nmol/h/mg蛋白 であった。

3) 糖脂質硫酸転移酵素活性におけるプロテインキナーゼCの関与：TPAを本細胞に48時間作用させると $10^{-10} \sim 10^{-7} M$ の範囲で、GalCer及びLacCerを基質とした硫酸転移酵素活性が濃度依存的に低下した。 $10^{-8} M$ のTPAを作用させると、3時間後には両基質に対する本酵素活性の低下を認め、48時間後まで時間依存的に活性が低下した。これらの結果よりTPAのプロテインキナーゼCのdown-regulation効果が示唆された。そこで、プロテインキナーゼCの阻害剤H-7投与の効果を検討したところ、 $50 \sim 500 \mu M$ の範囲で濃度依存的に両基質に対する本酵素活性が低下した。同様に、スタウロスポリン投与により、 $10^{-8} \sim 10^{-6} M$ の範囲で濃度依存的に本酵素活性が低下した。以上より、本細胞において本酵素の活性発現にプロテインキナーゼCの関与していることが示された。

4) 糖脂質硫酸転移酵素活性に対するEGFの効果：生体の中で癌細胞のプロテインキナーゼCに関与する可能性のある因子の一つとしてEGFの効果を検討した。EGFは $10 \sim 50 \text{ ng/ml}$ の範囲で濃度依存的に糖脂質硫酸転移酵素の比活性を上昇させた。シクロヘキシミドを同時に投与すると、EGFの効果は消失した。このことより、EGFによる本酵素活性上昇は蛋白合成に

伴ったものであることがわかった。一方、TPAあるいはH-7により本細胞を前処理した後にEGFを投与しても効果はみられなかった。このことから、EGFの効果発現にはプロテインキナーゼCが必要であることが示唆された。

IV. 結語

ヒト腎細胞癌培養株(SMKT-R-3)を用いて硫酸化糖脂質及び糖脂質硫酸転移酵素活性を検討して、以下の結果を得た。

- 1) ヒト腎癌細胞では糖脂質硫酸転移酵素の活性亢進により、硫酸化糖脂質の合成が増大する。
- 2) ヒト腎癌細胞において糖脂質硫酸転移酵素の活性発現にはプロテインキナーゼCが関与している。
- 3) EGFはヒト腎癌細胞において糖脂質硫酸転移酵素の活性上昇を誘導した。

以上本研究は、ヒト腎癌細胞における硫酸化糖脂質の増量が糖脂質硫酸転移酵素の活性亢進に基づくことを明かにし、その酵素活性発現にプロテインキナーゼCの関与があることを示したものであり、博士の学位論文として妥当なものと判断される。