

学位論文題名

ヒト腎癌細胞における

糖脂質硫酸転移酵素発現機序に関する研究

学位論文内容の要旨

I. 緒 言

複合糖質糖鎖は、癌、感染症、糖尿病等の疾患の発症や病態に関与していることが知られ、細胞レベルでは、糖鎖が細胞認識や細胞内情報伝達系に関与することが実証されている。細胞の増殖、分化、癌転移をはじめとする糖鎖の関与する病態のメカニズムを分子レベルで解明する上で、特定糖鎖の発現調節や構造変化に関する研究は重要と思われる。糖脂質硫酸転移酵素により生成される硫酸化糖脂質は、ラミニン、von Willebrand因子などの細胞外マトリックス分子や、L-セレクトリン、肝細胞増殖因子(HGF)と特異的に結合することが示され、その機能が注目されている。さらに、ヒト腎癌組織においては硫酸転移酵素活性が亢進しており、腎細胞癌培養株SMKT-R3に、上皮成長因子(EGF)、トランスフォーミング成長因子 α (TGF α)、肝細胞増殖因子(HGF)を添加すると、それぞれの受容体を介して硫酸転移酵素活性が上昇することが見出されている。

本研究は、EGFから硫酸転移酵素活性上昇にいたるまでの細胞内情報伝達機構を知る目的で、活性型Rasを安定に発現するヒト腎癌細胞株を樹立し、EGFによる糖脂質硫酸転移酵素活性上昇にRasが関与しているか否かを調べたものである。

II. 方 法

【細胞培養】

ヒト腎癌細胞株SMKT-R3 (札幌医科大学泌尿器科学教室塚本泰司博士より供与)を用い、10%ウシ胎児血清を含む培地DMEM中にて継代培養を行った。

【v-H-Ras発現腎癌細胞の樹立】

v-H-ras発現プラスミドとしてHarvey murine sarcoma virus由来のrasおよびプロモーターを含むDNA断片をpSV2neoに挿入したプラスミド(以下pv-H-ras)を用いた。対照として、同一構築でv-H-Rasの15番目のグリシンがバリンに置換するように変異したプラスミド(以下pG15V)を使用した。これら2つのプラスミドは北海道大学医学部癌研究施設分子遺伝部門小木曾嘉文博士より供与された。

プラスミドDNAとLipofectamineを混和し、室温にて放置した後、洗浄したSMKT-R3細胞に添加した。その後G418を含む選択培地にてG418耐性株を分離した。便宜上、pv-H-rasをトランスフェクトしたG418耐性株をA1, 2, 3と番号をつけ、pG15V

をトランスフェクトしたG418耐性細胞株をB1, 2, 3と番号をつけた。v-H-ras遺伝子の発現は逆転写反応-PCR解析により調べた。

【糖脂質硫酸転移酵素活性及びアリルスルファターゼA活性の測定】

細胞を超音波破碎し酵素源とした。ガラクトシルセラミドを受容体基質として硫酸転移酵素活性を測定し、アリルスルファターゼA活性はp-ニトロカテコール硫酸を基質として測定した。

III. 結 果

G418耐性株のうち、A系列の2株 (A1, A6), B系列の2株 (B1, B4) がv-H-rasを発現していたので、これらの細胞株を用いて以下の実験を行った。

RasがEGF受容体の下流で働いているとすれば、活性型Rasを持続的に発現する細胞株ではEGFの刺激に関係なく糖脂質硫酸転移酵素活性を上昇させるようなシグナルが核に伝わるはずである。A1, A6株の硫酸転移酵素活性は 58.2 ± 28.6 pmol/mg/minで、B1, B4株の硫酸転移酵素活性 20.1 ± 14.6 pmol/mg/minと比較すると高値を示した。トランスフェクションによる影響で細胞間の活性値が変動したことも考えられるので、同一細胞における薬剤投与時の硫酸転移酵素活性の変動率を調べた。その結果、SMKT-R3細胞, B1, B4株ではEGFによる糖脂質硫酸転移酵素活性の上昇がみられるのに対し、A1, A6株ではEGFによる糖脂質硫酸転移酵素活性の上昇は観察されなくなった。

EGF受容体チロシンキナーゼの阻害剤であるGenisteinは、SMKT-R3細胞のEGFによる糖脂質硫酸転移酵素活性の誘導を打ち消すのみならず、EGF未処理のSMKT-R3細胞の硫酸転移酵素活性を用量依存的に低下させた(私信)。このため、硫酸転移酵素活性の発現にはEGF受容体とそれ以外の内在性チロシンキナーゼが関与していると考えられる。そこで、これらチロシンキナーゼ活性とRasの関係を調べるために、v-H-Ras発現腎癌細胞におけるGenisteinの影響を調べたところ、B1, B4株では酵素活性の著明な低下が観察されたが、A1, A6株では低下は軽度に留まっていた。この結果は、活性型Ras発現細胞では、Genisteinによるチロシンキナーゼ阻害のシグナルが、糖脂質硫酸転移酵素活性抑制に繋がらないことを示している。

一方、硫酸化糖脂質の脱硫酸に働くアリルスルファターゼA活性は、A系列, B系列, 親株いずれにおいても、EGF, Genisteinの投与によっても有意な変化を受けなかった。したがって、糖脂質硫酸転移酵素活性の変化は特異的な変化であることが示された。

IV. 考 察

腎癌細胞の糖脂質硫酸転移酵素は、EGF, TGF α , HGFによる調節を受けることがわかっているので、本研究では、EGF受容体の下流の情報伝達機構を調べた。

ウイルス由来のv-ras遺伝子がコードするv-Rasは、正常ヒトc-RasのGTPase領域に点突然変異があって、常に活性型として持続的にシグナルを下流へと伝える。本研究で得られた細胞株A1およびA6のv-Rasは持続的に活性型に留まるため、上流のシグナルとは無関係に、下流にシグナルを伝達していると考えられる。従って、EGF未処理でも既に活性化しているために、EGFを添加してもその効果は現れなくなったと考えられる。

Genisteinによる実験結果は、EGFが本酵素活性を調節する場合に、活性型RasはEGF受容体のチロシンキナーゼとは独立して、下流へシグナルを伝え得ることを示している。これは、RasがEGF受容体の下流にあり、通常は律速段階として有効に働いていたものが、持続的活性化によって上流シグナルを切っても下流にシグナルを伝え続けるためであろうと思われる。未だ糖脂質硫酸転移酵素の遺伝子クローニングが行われていないので、硫酸転移酵素の遺伝子発現に関与する転写因子の解析は不可能であるが、近い将来、本酵素のサイトカンによる活性調節機構が遺伝子レベルで解析されることが期待される。そして、EGF、TGF α 、HGFが腎癌細胞の増殖を促進することから、硫酸転移酵素発現の情報伝達機構は、腎癌細胞の増殖シグナルと重複している可能性も高く、増殖機序の解明にも役立つものと期待される。

V. 結 語

腎癌細胞における糖脂質硫酸転移酵素の調節には活性Rasが関与しているが、それはEGF受容体のチロシンキナーゼドメイン下流に作用していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 岸 祐 幸
副 査 教 授 金 田 清 志
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

ヒト腎癌細胞における

糖脂質硫酸転移酵素発現機序に関する研究

今回、申請者は、ヒト腎癌細胞における糖脂質硫酸転移酵素(GST)の発現に、Rasが関与しているか否かを調べるために、ヒト腎癌細胞株であるSMKT-R3に、活性Rasを発現するv-H-ras遺伝子ならびに不活性Rasを発現する対照遺伝子G15Vを導入し、それぞれを安定に発現する細胞株を樹立、これらの細胞株を用いて、上皮成長因子(EGF)およびチロシンキナーゼ阻害剤Genisteinの、GST活性に及ぼす影響を検討した。

その結果、

1. 活性Ras発現株では、親株であるSMKT-R3や不活性Ras発現株に比べ、恒常的にGST活性が亢進していた。
2. 親株SMKT-R3や不活性Ras発現株では、EGFによるGST活性の上昇がみられたが、活性Ras発現株では、観察されなくなった。
3. EGF受容体チロシンキナーゼの阻害剤であるGenisteinは、親株SMKT-R3や不活性Ras発現株において、GST活性を著明に低下させたが、活性Ras発現株では、GST活性阻害はみられなくなった。

これまでの研究で、SMKT-R3細胞におけるEGFによるGST活性の上昇は、蛋白合成を介することが示唆されており、活性Ras発現株でEGFによるGST活性の上昇が観察されなくなったことは、活性Ras発現株ではEGF受容体の下流シグナルが飽和しており、EGFをさらに添加しても反応しないことを示している。

また、EGF受容体チロシンキナーゼの阻害剤であるGenisteinは、SMKT-R3細胞のEGFによるGST活性の誘導を打ち消すのみならず、EGF未処理のSMKT-R3細胞のGST活性を用量依存性に低下させることから、GST発現にはEGF受容体チロシンキナーゼと他の内在性チロシンキナーゼが関与していると考えられるが、活性Ras発現株でGenisteinによるGST活性の低下が観察されなくなったことは、Genisteinによるチロシンキナーゼ阻害のシグナルが、GST活性抑制に繋がらなくなったことを示している。

以上の結果より、GSTの発現にはRasが関与しており、それはEGF受容体の下流で作用していることが示唆され、本研究によって、GST発現機序の一端が解明された。

試問に際し、

金田清志教授より、腎癌と骨転移との関係、腎癌細胞株の形態学的特徴、GST活性測定の臨床的意義についての質問・意見が、加藤紘之教授より、他の腎癌細胞でのGST活性検討の有無、癌細胞研究の臨床応用の方法論についての質問・意見があったが、申請者は概ね適切な答弁をした。

以上により、本論文は、学位授与に値するものと判定した。