

肺癌の抗がん剤感受性における スフィンゴ糖脂質の機能解析

学位論文内容の要旨

スフィンゴ糖脂質は、セラミドに糖鎖が結合した分子であり、全ての脊椎動物に存在する生体膜構成成分である。ガングリオシドはシアル酸を分子内に含有する酸性糖脂質の総称であり、細胞の分化や増殖あるいは接着の調節・制御に関わっている。今日までにガングリオシドの生合成異常が様々な病態と関連していることが示唆されてきた。例えば癌化の過程においてガングリオシド組成は著しく変化し、一般的に GM1 や GD1a などの高級なガングリオシドから GM3 などの単純なガングリオシドへ移行することが知られている。しかしながら、現在までにガングリオシド組成の変化そのものによる機能的意義についての統一的な見解がなされていない。そこで、本研究ではガングリオシド生合成経路の出発物質であり、最も基本的な構造を持つガングリオシド GM3 と抗癌剤感受性との関連性について明らかにするため、分子レベルおよび臨床レベルでの検討を行った。

マウス 3LL ルイス肺癌細胞野生株より単離された GM3 欠損株 J5 に GM3 合成酵素 (SAT-I) 遺伝子を導入した GM3 再構成細胞 J5/SAT-I を樹立し、内因性 GM3 の癌細胞に対する機能解明を試みた。以前の研究で、本細胞において軟寒天培地中での足場非依存性増殖能の増大やマウスにおける *in vivo* 造腫瘍能の亢進が見られ、GM3 高発現による悪性度の亢進が示唆された。そこで GM3 と抗癌剤感受性との関連性を明確にするため、抗がん剤感受性試験を行ったところ、GM3 再構成細胞はエトポシドやドキソルビシンに対して薬剤抵抗性を獲得していることが明らかとなった。GM3 再構成細胞では、細胞ストレスによってリン酸化される p53 の 15 番目のセリン残基がエトポシド処理によりリン酸化を受けたが、カスパーゼ-9、カスパーゼ-3 の活性化が顕著に抑制されており、アポトーシスシグナル経路がカスパーゼ-9 の上流で抑制されていることが示唆された。また、アポトーシス抑制因子 Bcl-2 の発現量が蛋白質レベルで亢進していることが明らかとなった。さらに GM3 再構成細胞では、エトポシドの標的分子トポイソメラーゼ II α のエトポシド処理時における発現量が高く、トポイソメラーゼ II α の分解が抑制されていることが示唆された。一方、TNF- α 処理による DNA 断片化やカスパーゼ-8、カスパーゼ-3 の活性化に GM3 再構成細胞では遅延が認められ、TNF 受容体を介するアポトーシスに対して若干の遅延が見られることが明らかとなった。以上の結果から、内因性のガングリオシド GM3 の発現による Bcl-2 の蛋白質レベルでの発現量亢進、およびトポイ

ソメラゼ II α の分解抑制を介した新たな抗癌剤抵抗性機序の存在が示唆された。

以前より、種々の抗がん剤耐性株において GM3 発現量が変化するという報告がなされており、GM3 発現量と抗がん剤感受性との関連性が示唆されてきた。由来する細胞株や糖脂質のバックグラウンドの違いにより、相反する報告もなされており、癌における GM3 の意義について不明な点が多く残されている。そこで、病態としての肺癌に着目し、非小細胞肺癌における GM3 とその合成酵素 SAT-I の機能的役割について明らかにするため、臨床検体を用いた検討を行った。抗がん剤治療開始前の非小細胞肺癌患者組織 40 検体における SAT-I mRNA 発現量および糖脂質の解析を行った結果、SAT-I mRNA 発現量は腺癌の中でも細気管支肺胞上皮癌(BAC)所見を示す組織で高く、一方、扁平上皮癌および大細胞癌では有意に低かった。また、扁平上皮癌や大細胞癌においては、正常組織と比較して SAT-I mRNA 発現量が低下しており、癌化の過程において SAT-I の遺伝子発現制御が行われている可能性が示された。また糖脂質解析の結果、全ての組織分類において GM3 が主要なガングリオシドであり、SAT-I mRNA 発現量と GM3 発現量は相関性を示すことが明らかとなった。近年、非小細胞肺癌治療薬として認可された上皮成長因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブは分子標的治療薬であり、本剤に対して奏効性を示す患者では、高頻度に EGFR の遺伝子変異が見られることが報告されている。腺癌患者組織 18 検体における EGFR 変異の解析結果、SAT-I mRNA 発現量との間に相関性は認められなかった。一方で EGFR 変異のないヒト非小細胞肺癌細胞株において、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 AG1478 およびゲフィチニブに対する IC₅₀ 値と SAT-I mRNA 発現量は負の相関性が見られることが明らかとなった。従って EGFR に変異のない条件下において、SAT-I mRNA 発現量が高ければ EGFR チロシンキナーゼ阻害剤が有効であるという、ガングリオシド合成酵素遺伝子が薬剤選択の際の新たな判断材料となりうる可能性が示唆された。

GM3 と EGFR チロシンキナーゼ阻害剤感受性との関連性を明らかにするため、先に樹立にした GM3 再構成細胞 J5/SAT-I を用いて解析を行ったところ、本細胞では EGFR 発現量が蛋白質レベルで増加し、ゲフィチニブに対する感受性が亢進していることを見出した。また、GM3 再構成細胞では EGF 刺激により EGFR のリン酸化およびその下流のシグナルである ERK1/2 の活性化が亢進しており、ゲフィチニブ処理により EGFR のリン酸化が顕著に阻害されることが明らかとなった。以上の結果から、GM3 再構成細胞ではゲフィチニブにより EGFR を介するシグナル伝達経路が遮断され、ゲフィチニブ感受性が亢進することが示唆された。

GM3 高発現によるエトポシド抵抗性獲得機序およびゲフィチニブ感受性亢進機序、さらには SAT-I mRNA 発現量と EGFR チロシンキナーゼ阻害剤感受性の負の相関性を示す機構とその意義についてはさらなる検証が必要であり、現在詳細な解析を行っている。また、ゲフィチニブ投与患者における SAT-I mRNA 発現量の解析と臨床成績との関連性についての検討を試みている。本研究を足がかりに SAT-I mRNA 発現量を治療薬選択の指標としたテーラーメイド治療へ応用されることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 五十嵐 靖 之

副 査 教 授 有 賀 寛 芳

副 査 教 授 井ノ口 仁 一 (東北薬科大学)

副 査 助教授 木 原 章 雄

学 位 論 文 題 名

肺癌の抗がん剤感受性における スフィンゴ糖脂質の機能解析

スフィンゴ糖脂質は、セラミドに糖鎖が結合した分子であり、全ての脊椎動物に存在する生体膜構成成分である。ガングリオシドはシアル酸を分子内に含有する酸性糖脂質の総称であり、細胞の分化や増殖あるいは接着の調節・制御に関わっている。今日までにガングリオシドの生合成異常が様々な病態と関連していることが示唆されてきた。例えば、癌化の過程においてガングリオシド組成は著しく変化し、一般的に GM1 や GD1a などの複雑なガングリオシドから GM3 などの単純なガングリオシドへ移行することが知られている。しかしながら、現在までにガングリオシド組成の変化そのものによる機能的意義についての統一的な見解がなされていない。ガングリオシド生合成経路の出発物質であり、最も基本的な構造を持つガングリオシド GM3 と癌の悪性度との関連性が示唆されていることから、本研究では GM3 の癌細胞に対する機能解明を目的として、抗がん剤感受性との関連性を検討し、分子レベルおよび臨床レベルでの解析を行った。

マウス 3LL ルイス肺癌細胞野生株より単離された GM3 欠損株 J5 に GM3 合成酵素 (SAT-I) 遺伝子を導入した GM3 再構成細胞 J5/SAT-I を樹立し、内因性 GM3 の癌細胞に対する機能解明を試みた。本細胞ではエトポシドやドキソルビシンに対して薬剤抵抗性を獲得していることが明らかとなった。また、GM3 再構成細胞ではエトポシド処理時においてカスパーゼ -9、カスパーゼ -3 の活性化が顕著に抑制されており、アポトーシスシグナル経路がカスパーゼ -9 の上流で抑制されていることが示唆された。さらに、Bcl-2 の発現量が蛋白質レベルで亢進しており、さらにトポイソメラーゼ II α のエトポシド処理時における発現量が高く、トポイソメラーゼ II α の分解が抑制されていることが示唆された。一方、TNF- α 処理による DNA 断片化やカスパーゼ -8、カスパーゼ -3 の活性化に GM3 再構成細胞では遅延が認められ、TNF 受容体を介するアポトーシスに対して若干の遅延が見られることが明らか

となった。以上の結果から、内因性のガングリオシド GM3 の発現による Bcl-2 の蛋白質レベルでの発現量亢進、およびトポイソメラーゼ II α の分解抑制を介した新たな抗癌剤抵抗性機序の存在が示唆された。

以前より、種々の抗がん剤耐性株において GM3 発現量が変化するという報告がなされており、GM3 発現量と抗がん剤感受性との関連性が示唆されてきた。そこで病態としての肺癌に着目し、非小細胞肺癌における GM3 とその合成酵素 SAT-I の機能的役割について明らかにするため、抗がん剤治療開始前の非小細胞肺癌患者組織検体における解析を行った。その結果、SAT-I mRNA 発現量は腺癌の中でも細気管支肺胞上皮癌 (BAC) 所見を示す組織で高く、一方、扁平上皮癌および大細胞癌では有意に低かった。また、扁平上皮癌や大細胞癌においては、正常組織と比較して SAT-I mRNA 発現量が低下しており、癌化の過程において SAT-I の遺伝子発現制御が行われている可能性が示された。糖脂質解析の結果、全ての組織分類において GM3 が主要なガングリオシドであり、SAT-I mRNA 発現量と GM3 発現量は相関性を示すことが明らかとなった。近年、非小細胞肺癌治療薬として認可された上皮成長因子受容体 (EGFR) チロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブが奏効する患者では、高頻度に EGFR の遺伝子変異が見られることが報告されているが、腺癌患者組織検体における EGFR 変異の解析結果、SAT-I mRNA 発現量との間に相関性は認められなかった。一方で、EGFR 変異のないヒト非小細胞肺癌細胞株において、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 AG1478 およびゲフィチニブに対する IC₅₀ 値と SAT-I mRNA 発現量は負の相関性が見られることが明らかとなった。従って EGFR に変異のない条件下において、SAT-I mRNA 発現量が高ければ EGFR チロシンキナーゼ阻害剤が有効であるという、ガングリオシド合成酵素遺伝子が薬剤選択の際の新たな判断材料となりうる可能性が示された。

また、GM3 と EGFR チロシンキナーゼ阻害剤感受性との関連性を明らかにするため、GM3 再構成細胞 J5/SAT-I を用いた検討を行ったところ、本細胞では EGFR の蛋白質発現量が増加し、ゲフィチニブに対する感受性が亢進していることを見出した。また、GM3 再構成細胞では EGF 刺激により EGFR のリン酸化および ERK1/2 の活性化が亢進しており、ゲフィチニブ処理により EGFR のリン酸化が顕著に阻害されることが明らかとなった。

本研究では、ガングリオシド GM3 によるエトポシド抵抗性機序の分子メカニズムを明らかにし、また、SAT-I mRNA 発現量を肺癌治療における EGFR チロシンキナーゼ阻害剤使用の判断基準として臨床応用できる可能性を見出した。よって、申請者は博士 (薬学) の学位を受領するに十分な資質を有する者であることを認めた。