

学位論文題名

Swainsonine reduces 5-fluorouracil tolerance in the multistage resistance of colorectal cancer cell lines

(スワンソニンが多段階薬剤耐性大腸癌細胞株で5-FU 耐性を減弱させる)

学位論文内容の要旨

【背景】

癌の治療において外科治療は有効な手段の一つであるが、手術のみでは癌の治療はなしえない。それ故色々な治療の組み合わせが必要となるが、中でも化学療法は放射線療法と共に以前よりよく用いられてきた手段である。しかしこの化学療法において、薬剤耐性という大きな問題が存在する。化学療法薬剤への耐性獲得は治療効果の減弱のみならず副作用を惹起し、明らかに癌治療患者の生活の質を損なう物である。しかし、薬剤耐性の機序は数多く解ったものの、この機序の数多さがまた薬剤耐性機序を解明する上での弊害となっている。近年の研究では、癌化や癌の悪性度の増強に細胞に発現する糖鎖の変化が見られることがよく報告されるようになってきており、薬剤耐性に対する糖鎖の変化について研究を行った。

【材料と方法】

まず最初に薬剤耐性の細胞株を樹立した。マウス大腸・直腸癌株である colon26 を親株とし、対象とする薬剤を 5-FU とした。培地中に低濃度から 5-FU を添加し step wise 法にて数週間毎濃度を上げ、多段階濃度の耐性株を作成した。細胞株は培地中の 5-FU 濃度にて名前を付けた。細胞障害性、増殖抑制性の判定のために Mosmann's MTT assay 及び CD-DST 法を使用した。また、Swainsonine の影響を測るため培地中に Swainsonine を添加した物と添加しなかったものを作り MTT assay にて細胞障害性の程度を比較した。Swainsonine 添加群では Swainsonine を 5 μ L/mL となるよう濃度調整し添加した。5-FU 耐性株の耐性因子の検討のため Western blotting にて thymidylate synthase(TS)、orotic acid phosphoribosyltransferase(OPRT)、dihydropyrimidine dehydrogenase(DPD)の各蛋白質を測定した。m-RNA の測定は DPD、OPRT、TS のほか TP、UP を Real time RT-PCR 法にて測定した。糖鎖構造の測定は培養細胞を酵素消化した後、糖鎖のみを抽出後高速液体クロマトグラフィーにて ODS および Amide の 2 種類のカラムを用いて溶出パターンを測定し、2D マッピング法にて構造決定を行った。

【結果】

colon26 を用いて、様々な耐性濃度を呈したそれぞれが耐性機序の異なる 5-FU 耐性株をまず樹立した。それぞれの細胞の 5-FU 耐性能は MTT、CD-DST 法にて測定し高濃度の 5-FU を含む培地で培養可能な細胞は、より高濃度の 5-FU 耐性を示すことが確認された。5-FU 耐性機序でよく知られている耐性因子である thymidylate synthase(TS)、orotic acid phosphoribosyltransferase(OPRT)の蛋白発現を見ると、TS は耐性株で強発現しており、OPRT は高濃度耐性株で発現が弱まっていた。しかし RNA レベルにおいて、これら耐性株で TS、OPRT、Uridine phosphorylae (UP) の発現を測定すると、各耐性細胞株で発現パターンは異なっており、また dihydropyrimidine dehydrogenase(DPD)、Thymidylate synthase (TP) はほとんど発現が見られず、耐性株それぞれで耐性獲得機序は異なってい

ると考えられた。ここに N-結合形糖鎖の生合成阻害薬として α マンノシダーゼ II 阻害薬である Swainsonine を添加し MTT assay にて細胞増殖抑制濃度の変化を測定した。親株である colon26 ではほとんど 5-FU による細胞増殖抑制濃度は変化が見られなかったが、耐性株では 5-FU 耐性度の低下が見られた。単一の耐性機序の抑制だけでなく、5-FU 耐性の様々な機序に Swainsonine は抑制をかけると考えられた。次に実際に細胞株で発現している糖鎖構造の変化を確認すると、添加した Swainsonine の濃度では一部の糖鎖の生合成阻害が確認された。また、この濃度の Swainsonine 単剤では細胞障害性は見られなかった。

【考察】

遺伝的な背景を同一とし、耐性機序の異なる 5-FU の耐性株の樹立を行った。培地中の 5-FU 濃度により L0-200、500、1000 と名前を付けたが、MTT アッセイでは IC-50 で比較すると親株よりも 9.7、35、44 倍それぞれ高く、培地に添加した 5-FU 濃度よりも 5.4、7.7、4.9 倍それぞれで高い値を示した。この耐性機序の解明のため Western blotting で TS、OPRT を測定した。耐性株において TS は up-regulate し OPRT は down-regulate していた。TS は 5-FU を非活性化し、OPRT は 5-FU を活性化する物とする今までの報告に合致する物であった。しかし RNA レベルでは必ずしもこの結果と一致しておらず、蛋白質への転写の time-lag や蛋白質の分解速度の違いが現れた結果と考えられた。

この細胞株を用いて今回我々は 5-FU の耐性度を下げる手段として swainsonine を添加した。細胞毒性が見られない低濃度で添加したが、5-FU の耐性能は低下した。実際に糖鎖構造を見ると、完全に糖転移酵素を抑制したわけではないが、産物の糖鎖の構成比率は明らかに変化し complex type は減少していた。過去の報告で α -mannosidase II を完全抑制したマウスは致命的とされており、この程度の swainsonine 濃度が副作用の少ない濃度と考えられた。過去の報告では癌の転移を抑えたり、薬剤の毒性を抑えたり、免疫を増強させるといった文献もあり swainsonine は色々な効果を有すると考えられる。今回の結果より癌治療において swainsonine を含め種々の糖転移酵素阻害薬の効果が期待される。

【結語】

これら結果より、この大腸癌細胞株では薬剤耐性に関わる酵素群よりも N-結合形糖鎖は 5-FU 耐性に関しては関わっている可能性が示唆された。さらに N-結合形糖鎖をターゲットとした治療法の可能性も考えられた。また、swainsonine 添加などによる糖鎖構造の変化を来すことで薬剤耐性を減弱させられる可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 藤 堂 省

学位論文題名

Swainsonine reduces 5-fluorouracil tolerance in the multistage resistance of colorectal cancer cell lines

(スワンソニンが多段階薬剤耐性大腸癌細胞株で5-FU 耐性を減弱させる)

糖鎖分子は細胞の癌化や癌の特性において重要な役割を担っているとされている。近年、糖転移酵素の研究から、特に癌の転移能を初めとする特性の変化と糖鎖分子の変化との関係が明らかにされた。しかし、抗癌剤に対する耐性との関係も示唆されてはいるが十分な解明はなされていない。本研究では現在我が国で増加した大腸癌を対象とし、多段階 5-FU 耐性株を colon26 を親株として作成し、それぞれの N-結合型糖鎖の変化を観察し、糖鎖構造の変化を確認した。その上で、糖鎖合成阻害薬の 1 つである swainsonine を添加し、意図的に耐性株の糖鎖構造を変化させることにより、5-FU 耐性度の減弱を確認した。また、癌細胞の糖鎖構造が薬剤耐性機構に大きく関わっていることが強く示唆された。

公開発表にあたり、副査の秋田教授より 1) swainsonine の腫瘍の効果を検討した研究の有無について、2) swainsonine の癌の増殖・浸潤に関する報告の有無、3) アスパラギン結合型糖鎖と薬剤耐性との研究の有無、4) 大腸癌を対象として初めての発表かどうか、5) 卵巣癌の細胞株ではターゲット蛋白は明確になったのか、6) 今回の結果からターゲット蛋白の解析はどうしていくのか、について質問があった。これらの質問に対し、1) 抗腫瘍効果としての面から見た研究はあるが side effect が強いいため臨床では使われていない。2) 論文上ははっきりと言及されておらず、まだ解明されていない。3) 卵巣癌の薬剤耐性の患者間の細胞株での報告がされているが ABC トランスポーターとの関わりなどが議論されている。4) 大腸癌を対象とした薬剤耐性と糖鎖の研究としてはまだされていない。5) ABC トランスポーターの一種 P-glycoprotein がターゲットの一つと考えられている。6) ある特定の原因となっている糖鎖構造が見つければ、糖鎖から逆に蛋白質を糖蛋白の形で拾い上げ、蛋白質を同定することなどが考えられる、と回答した。

また、主査の浅香教授からは、1) 大腸癌株ではなく肝癌細胞株では AFP-L3 というのではなくこの様な詳細な糖鎖構造での研究はされているのか、2) swainsonine は side effect が強い様であるが、臨床応用できるのか、3) 耐性の機序の解明として他の細胞株で

同様の実験をしているのか、4) swainsonine と似たもので臨床応用可能と考えられる薬剤はあるのか、5) 診断への応用は可能か、と言う質問が寄せられた。これら質問に対しては、

- 1) 現在肝癌の糖鎖の研究を進めているところであり、今後の data 解析に注目している。
- 2) 臨床応用の術としては、血中濃度のモニタリングや、より side effect の少ないアナログを挿訳すると言ったことが考えられる、
- 3) 残念ながら今回他の細胞株では同様の実験を行っていない。
- 4) 数十種類の糖鎖合成阻害薬が知られているがその中でも文献上よく知られた物に tunicamycin があり、濃度などをよく検討すれば使用できる可能性は高いと考える。
- 5) 薬剤が効くのか、効かないのかを施行前に調べるマーカーとしての応用範囲があると思われる。と回答した。

副査の藤堂教授からは浅香・秋田両教授と質問の内容が重複し、かつ適切な回答が得られたとのことで追加質問はなかった。

本研究は、抗癌剤耐性に関して糖鎖分子が強く関わること、更にその糖鎖分子の改変にて薬剤耐性度を変化しうることを明らかにしたことにより、抗癌剤耐性機構の解明、および創薬・治療への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども合わせ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。