

学 位 論 文 題 名

口腔癌におけるPTP4A1のシスプラチン内因性耐性メカニズム

学位論文内容の要旨

口腔癌の標準的治療は根治性の観点から手術による外科的切除が中心であるが、進行癌に対して外科的切除による広範囲な浸襲は、口腔機能及び審美性に多大なる影響を及ぼし、患者のQOLの著しい低下を招く。近年では手術前に化学療法を行い、がんを縮小させて口腔の機能温存を期待する術前化学療法を手術に併用する場合が増加しており、シスプラチンはその中心的薬剤の一つである。その主な作用はDNAに直接結合して複合体を形成し、細胞分裂や転写などの細胞の生存に必要な働きを阻害することで、アポトーシス経路を活性化し強力な殺細胞効果を示す。しかしながら、シスプラチンに対して抵抗性を示す腫瘍も存在し、現在のところ、腫瘍の抗癌剤感受性または耐性は、実際に治療を行なって初めて明らかとなる。化学療法施行前に感受性の有無を予測できると的確な治療法の選択が可能になるため、抗がん剤に対する感受性を予測できるシステムの構築は大きな意義をもつと考えられる。

抗癌剤に対する抵抗性の原因の一つとして、耐性遺伝子の発現上昇が知られている。耐性遺伝子には内因性耐性遺伝子と獲得性耐性遺伝子の2種類が存在し、内因性耐性遺伝子とは、癌細胞内で本質的に発現が亢進しており、それによって腫瘍が耐性を示すような遺伝子である。それに対し獲得性耐性遺伝子は、元来癌細胞内で発現が低いのが、抗癌剤で処理されると発現が上昇し、それが耐性に寄与する遺伝子である。抗癌剤耐性遺伝子を検索する一般的な方法は、まず細胞株を抗癌剤で処理し、生き残った細胞を耐性細胞株として樹立する。そして耐性株と親株の遺伝子発現を比較して、耐性株で強く発現しているものを耐性遺伝子とする方法であるが、この方法で同定された遺伝子は、内因性かあるいは獲得性かは不明である。術前の抗癌剤感受性予測マーカーを検索する場合、獲得性耐性遺伝子ではその要件を満たさず、内因性耐性遺伝子のみを同定する必要がある。そこで、ヒト口腔がん細胞株HSC-3よりシングセルクローニングを行い内因性耐性遺伝子のみを検索できる実験方法を考案し、シスプラチン耐性を術前に予測できるマーカーの検索を目的として研究を行ってきた。

口腔病理病態学教室では、以前にヒト口腔がん細胞株HSC-3よりシングセルクローニング法で、シスプラチン感受性株および耐性株を樹立した。培養細胞はヘテロの集団で、そこからシング

ルセルクローニング法によって細胞を分離し、そのひとつの細胞から細胞株を樹立すると、それぞれわずかに異なる性質をもつ細胞株を得ることができる。実際にそれぞれの細胞株にシスプラチンを作用させると、生き残る細胞数が異なった。次に、それぞれの細胞株の遺伝子の発現をマイクロアレイによって検索し、シスプラチンの抵抗性を示す細胞株では多く発現し、感受性を示す細胞では発現が低い遺伝子を検索することで、幾つかの内因性耐性遺伝子の候補を同定した。そのうちのひとつである PTP4A1 遺伝子について解析を行った。

PTP4A1(Protein Tyrosine Phosphatase type 4A1)別名 PRL-1 は、チロシンフォスファターゼのひとつであり、肝臓の再生時に発現が上昇するタンパク質として同定された。その後正常組織の脳や、消化管上皮に発現を認め、また、いくつかの腫瘍組織において発現が亢進し、PTP4A1 の過剰発現が細胞増殖の亢進や転移に関与するという報告がある。著者が渉猟した限りでは PTP4A1 の発現量と抗癌剤耐性の関係を示した報告はなく、今回 PTP4A1 のシスプラチンに対する耐性機序について検討することとした。

PTP4A1 を強制発現させた口腔がん細胞株 HSC-3、SAS 細胞は、細胞増殖能が亢進することが明らかとなった。このことは、以前に小細胞肺癌細胞株において報告されており、口腔がん細胞株においても PTP4A1 の発現が細胞増殖能の調節に関与し、シスプラチン耐性以外にも細胞増殖能を亢進させて悪性度を増加していると考えられた。

PTP4A1 を強制発現させた HSC-3 細胞ではシスプラチンに対して抵抗性を示し、SAS 細胞でも同様に PTP4A1 の強制発現によってシスプラチンに抵抗性を示したことから、PTP4A1 のシスプラチン抵抗性は HSC-3 細胞固有の現象でないことが明らかとなった。

AKT は多くのがん組織において活性が亢進していることが知られている。著者は、PTP4A1 のシスプラチン耐性のメカニズムを調べるため、細胞生存シグナルである AKT のリン酸化とアポトーシスシグナルである活性型 PARP について解析を行った。HSC-3 に PTP4A1 を過剰発現させると AKT のリン酸化が上昇し、シスプラチン存在下でも AKT のリン酸化は高く維持され、活性型 PARP は減少していた。逆に PTP4A1 の発現を siRNA によってノックダウンすると、AKT のリン酸化の低下と活性型 PARP の発現増加を認め、PTP4A1 がシスプラチンに対する抵抗性に関与していることが示された。

また、EGFP-PTP4A1 の分布は、細胞質および、細胞膜に分布し細胞膜に強く局在することから、細胞膜に局在、あるいは細胞膜から細胞質に局在を変化させるタンパク質で AKT の上流に位置するタンパク質が PTP4A1 と相互作用するのではないかと考え、PTP4A1 の発現と EGFR および PTEN の活性化について検索した。しかし、それらの活性は PTP4A1 の発現とは相関がみられなかった。リン酸化および脱リン酸化は、転写調節、アポトーシス、細胞周期進行、タンパク質分解とタンパク質輸送などの様々なタンパク質の機能的活動に大きな影響を及ぼしている。PTP4A1 はそのアミノ酸配列からチロシンフォスファターゼと考えられており、タンパク質リン酸化の調節の役割を果たす酵素であると考えられている。しかし、PTP4A1 のターゲットは未だに明らかではなく、今後更なる研究が必要と考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	鄭	漢	忠
副査	教授	進	藤	正
副査	教授	北	川	善

学位論文題名

口腔癌におけるPTP4A1のシスプラチン内因性耐性メカニズム

審査は、上記担当者による申請者に対する提出論文と関連事項についての口頭試問により執り行われた。審査を行った論文の概要は以下の通りである。

シスプラチンは頭頸部癌の治療でもっとも一般的に用いられる薬剤である。しかし、ときに期待した治療効果が得られないことがあり、そのことを予測するのは難しい。抗がん剤耐性遺伝子には、細胞内でもともと発現は低い、抗がん剤に曝露されたとき発現が上昇して耐性の原因となる獲得性耐性遺伝子と、もともと発現が高く、それが原因で耐性を示す内因性遺伝子の2種類がある。

ヒト口腔がん細胞株 HSC-3 よりシングルセルクローニングを行い、シスプラチン投与前に、当該がんのシスプラチン感受性を評価するマーカーを見つけるため内因性遺伝子のみを同定し、いくつかの内因性耐性遺伝子の候補を見いだした（北村ら 投稿中）。本研究の目的は、そのうち、チロシンフォスファターゼのひとつである PTP4A1 (Protein Tyrosine Phosphatase type 4A1) 遺伝子に着目し、シスプラチンの薬剤耐性との関連について検討することである。

樹立した耐性株と感受性株で PTP4A1 mRNA の発現を比較したところ、耐性細胞株では感受性細胞株に比べて PTP4A1 の発現量が高かった。次に、PTP4A1 を過剰発現させた細胞および knockdown させた細胞を用いてシスプラチン感受性を検討したところ、過剰発現した細胞はシスプラチン抵抗性が上昇し、knockdown した細胞ではシスプラチン抵抗性が減弱した。

生存シグナルである AKT のリン酸化とアポトーシスシグナルである cleaved PARP を western blotting で検索したところ、PTP4A1 を過剰発現させると AKT のリン酸化が上昇し、シスプラチン存在下でも AKT のリン酸化は高く、cleaved

PARP は減少した。逆に PTP4A1 を knockdown させると AKT のリン酸化の低下と cleaved PARP の増加を認めた。以上の結果から PTP4A1 はシスプラチン耐性に関連する遺伝子であり、そのメカニズムには AKT のリン酸化が重要であることが示唆された。

論文審査にあたっては、申請者による学位論文要旨についての説明後、担当者により研究内容および関連事項についての質問を行った。主な質問事項は、1) 通常 phosphatase はスイッチを off にするが、今回の実験計画全体においてその部分をどのように考えているか、2) 細胞の生存率の縦軸は何を意味するか、そのデータはどのように測定して得られたのか、3) 内因性耐性と獲得性耐性について、4) 遺伝子の過剰発現、knockdown の実験あるいはリン酸化などを直接阻害する実験の各々の持つ意味と信頼性は、5) AKT の上流たんぱく質の検索は negative data だったが今後どの系でみようと考えているか、などであった。これらの質問に対しては申請者から適切かつ明快な回答および説明が得られ、研究の立案と遂行ならびに結果の収集とその評価について、申請者が十分な能力を有していることが確認された。本研究結果は PTP4A1 がシスプラチンの抵抗性に関連することを示唆するものとして意義深いものであることが高く評価された。申請者は、関連分野にも幅広い学識を有し発展的研究にも意欲的であり、今後の研究についての将来性も期待される。本研究業績は口腔外科領域のみならず癌の化学療法領域にも寄与すること大であり、博士（歯学）の学位に値するものと認められた。