

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
松本和子	主査 教授 花房 俊昭
	副査 教授 林 秀行
	副査 教授 朝日 通雄
	副査 教授 谷川 允彦
	副査 教授 大道 正英
<p>主論文題名</p> <p><i>N</i>Glycan fucosylation of epidermal growth factor receptor modulates receptor activity and sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor  (上皮成長因子受容体のN型糖鎖のフコシル化は受容体の活性と上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬に対する感受性を制御する)</p>	
学位論文内容の要旨	
<p>《目的》</p> <p>細胞表面蛋白の糖鎖修飾は分化、成長、老化の過程で変化し、さまざまな糖鎖構造は生物学的機能において重要な役割を果たしている。蛋白や脂質はゴルジ体、小胞体でN型糖鎖により修飾され、糖蛋白の折りたたみや安定に寄与する。癌と糖鎖の関係においては、細胞表面の糖蛋白が癌の形質転換過程において変化することが知られている。さらに特定の糖鎖構造を決定する糖転移酵素は、転移など癌の生物学的過程を制御していることが報告されている。上皮成長因子受容体(EGFR)は多くの固形癌で発現しており、その過剰発現は予後と密接に関連している。そのためEGFRは重要な治療標的とされ、EGFRを標的としたがん分子標的薬が開発されている。ゲフィチニブはEGFRチロシンキナーゼ阻害薬であり、非小細胞肺癌において、EGFR遺伝子のエクソン19、21に遺伝子変異のある症例では、高い抗腫瘍効果をもたらすことが知られている。しかし、ゲフィチニブは遺伝子変異のない場合においても有効性があり、遺伝子変異以外に感受性を規定している因子の存在が示唆される。EGFRは細胞外ドメインに11個のN型糖鎖が存在し、EGFRの糖鎖修飾の変化は受容体の活性に影響を与えることが知られている。本研究は、EGFRのN型糖鎖のフコシル化が、受容体の活性化とEGFRチロシンキナーゼ阻害薬に対する感受性に与える影響について検討した。</p> <p>《方法》</p> <p>HEK293(ヒト胎児腎)細胞にEGFR遺伝子及び<math>\alpha</math>1,6-fucosyl-transferase(FUT8)遺伝子を導入した強制発現細胞(293/EGFR/FUT8細胞)を作成した。また、HEK293細胞、非小細胞肺癌株であるA549細胞にshort-hairpin RNAを用いてFUT8ノックダウン細胞を作成した。これらの細胞において、MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide)法を用いてリガンド刺激下における細胞増殖、及びゲフィチニブに対する感受性の変化について検討した。さらにFUT8ノックダウン細胞において、EGFRのフコシル化がEGFRのリン酸化及び下流シグナルに与える影響について、ウェスタンブロット法を用いて検討した。</p>	

## 《結果》

まず、EGFR のフコシル化の状態が細胞増殖に与える影響について検討した。その結果、293/EGFR/FUT8 細胞では、EGF 刺激下において、293/EGFR 細胞と比較し有意に細胞増殖が亢進していた。FUT8 ノックダウン細胞においては、コントロールと比較し有意に細胞増殖が低下していた。A549 細胞における検討では、ノックダウン細胞はコントロールと比較し、EGF 刺激下において有意に細胞増殖が低下していた。これらの結果より、EGFR のフコシル化は EGF 刺激下における細胞増殖を促進させることが示された。

さらにこれらの細胞において、ゲフィチニブに対する感受性の変化について検討した。HEK293 細胞における検討では、FUT8 強制発現細胞においてゲフィチニブに対する感受性が亢進し、FUT8 ノックダウン細胞においては低下していた。A549 細胞による検討においても同様に、FUT8 ノックダウン細胞はゲフィチニブに対する感受性が低下していた。これらの結果より、EGFR のフコシル化はゲフィチニブに対する感受性を亢進させることが示された。

FUT8 ノックダウン細胞における下流シグナルの検討では、EGF 刺激による EGFR のリン酸化、及び mitogen-activated protein kinase のリン酸化が低下していた。これらのことより、EGFR のフコシル化の低下は EGFR の活性化と下流シグナルを低下させることが示された。

## 《考察》

本研究において、EGFR のフコシル化は EGF 刺激に対する細胞増殖及びゲフィチニブに対する感受性を変化させることが示された。フコシル化が EGF 刺激に対する反応性を変化させるメカニズムとして、2 つの可能性が考えられた。Rebbaa らは、グリオーマ細胞において N-acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII) の強制発現株は EGFR の糖鎖修飾を変化させ、その結果、EGFR と EGF の結合を減少させ、EGFR の自己リン酸化を抑制することを報告している。本研究においても、EGFR のフコシル化は、EGFR と EGF の結合親和性に影響を与えた可能性がある。さらに、Tsuda らは、EGFR の細胞外ドメインの N 型糖鎖修飾の変化は、リガンド非依存的なダイマー化と受容体の活性化を引き起こすことを報告しており、EGFR のフコシル化が EGFR のダイマー化に影響を与えた可能性も考えられる。本研究は、野生型 EGFR において、EGFR のフコシル化が EGF 刺激に対する細胞増殖に影響を与え、ゲフィチニブに対する感受性を変化させることを示した。

## 《結論》

FUT8 遺伝子により制御される EGFR のフコシル化修飾は、EGF 刺激による細胞増殖を変化させ、ゲフィチニブに対する感受性に影響を与える。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	松本和子
論文審査担当者		主 査 教授 花 房 俊 昭	
		副 査 教授 林 秀 行	
		副 査 教授 朝 日 通 雄	
		副 査 教授 谷 川 允 彦	
		副 査 教授 大 道 正 英	
主論文題名			
<p><i>N</i>Glycan fucosylation of epidermal growth factor receptor modulates receptor activity and sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor  (上皮成長因子受容体の N 型糖鎖のフコシル化は受容体の活性と上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬に対する感受性を制御する)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>細胞表面蛋白の糖鎖修飾は生物学的に重要であり、がんの分野においても転移など生物学的機能に深く関わっていることが近年明らかになりつつある。しかし、糖鎖修飾が膜型受容体のシグナル伝達および細胞形質にどのような影響を与えるのか、また、薬剤の感受性にどのような影響を与えるのかについての研究はほとんど行われていない。</p> <p>申請者は、膜型受容体である上皮成長因子受容体(EGFR)に着目し、N 型糖鎖修飾の一種であるフコシル化が、受容体の活性に及ぼす影響、および EGFR チロシンキナーゼ阻害薬に対する感受性に与える影響について検討を行った。</p> <p>その結果、EGFR のフコシル化が増加するとリガンド刺激による細胞増殖が促進されること、および、フコシル化が減少すると細胞増殖が低下することが示された。EGFR チロシンキナーゼ阻害薬(ゲフィチニブ)に対する感受性についての検討では、フコシル化が増加するとゲフィチニブに対する感受性が亢進し、フコシル化が減少すると、感受性が低下していることが示された。同様の結果は、非小細胞肺癌株においても示された。さらに、下流シグナルの検討においても、EGFR のフコシル化の低下は EGFR の活性化と下流シグナルを低下させることが示された。</p> <p>本研究は、EGFR のわずかな糖鎖修飾の変化がシグナル伝達や細胞増殖能を変化させ、分子標的薬の感受性に影響を与える可能性があることを示しており、膜型受容体に対する糖鎖修飾と薬剤効果規定因子の関連を初めて明らかにした点で、その臨床的意義は大きいと考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p>			
(主論文公表誌)			
Cancer Science 99(8): 1611-1617, 2008			