

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 6 日現在

機関番号：33902

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06712

研究課題名(和文) 血液型抗原Lewis yによる口腔扁平上皮癌の制御機構

研究課題名(英文) Mechanisms for the regulation of oral squamous cell carcinomas by blood group antigen Lewis y

研究代表者

浜村 和紀 (HAMAMURA, KAZUNORI)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：00422767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌において、血液型抗原Lewis yがEGF受容体(R)に付加され、EGFRのリン酸化を抑制し、悪性形質を減弱することを示した。そのメカニズムとして、EGFRに付加されたLewis yが、EGFRにあるEGF結合サイトを妨害し、その結果、EGFRの2量体形成が減少し、EGFRのリン酸化が減弱することが示された。また、Lewis yの発現低下により、癌細胞はEGF刺激により剥がれやすくなり、また、細胞外マトリックスへの接着能が低下する。このことより、癌細胞がより異なる部位へ移動しやすい環境をLewis yの発現低下が作り、癌細胞の悪性形質増強の一端を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： It was demonstrated that blood group antigen Lewis y modification on EGF receptor (R) suppresses phosphorylated EGFR, resulting in the attenuation of malignant properties in oral squamous cell carcinomas. As the mechanisms, it was shown that Lewis y modification on EGFR blocks EGF binding sites on it, resulting in the reduction of dimerization of EGFR and the suppression of phosphorylation of EGFR.

Attenuation of expression of Lewis y in cancer cells leads to the detachment of cells under EGF stimulation and the suppression of adhesion to extracellular matrix. Collectively, this study suggests the reduction of expression of Lewis y makes up environments that cancer cells are tend to move to different areas, resulting in the promotion of malignant properties.

研究分野：歯科薬理学

 キーワード：口腔扁平上皮癌 血液型抗原 Lewis y 糖タンパク質 フコシルトランスフェラーゼ EGFR チロシン  
リン酸化

1. 研究開始当初の背景

糖鎖修飾が癌の悪性形質に深く関与し、ジシアリル糖脂質 (GD3 や GD2) が癌の悪性形質増強に関与するのに対して、モノシアリル糖脂質 (GM1) は悪性形質を減弱させるということが明らかになってきた。また、タンパク質に付加される糖鎖修飾も癌の悪性形質に関与することが、様々な癌で示されてきた。

一方、口腔領域で、最も発生頻度の高い扁平上皮癌において特異的に発現する糖鎖として、血液型抗原である Lewis y が同定された。Lewis y は、扁平上皮癌の悪性形質に重要な EGF 受容体 (R) 付加され、EGFR のチロシンリン酸化を抑制することが、遺伝子改変口腔扁平上皮癌細胞株を用いた実験から明らかになった。しかし、その機序や意義については不明であった。一方、Lewis y が癌で発現するにも拘らず、悪性化によってむしろ発現減少が認められることから、予後診断への応用が期待される。よって、口腔扁平上皮癌における Lewis y の発現とその機構および作用機序を明らかにすることは、癌の治療法開発に新たな展開をもたらす。

2. 研究の目的

本研究では、口腔扁平上皮癌において、EGFR への Lewis y 構造の付加が、どのようなメカニズムで EGFR のチロシンリン酸化および癌形質の抑制を招くのかについて明らかにする。また、Lewis y が EGFR へ結合した後、どのような細胞内シグナルを介して悪性形質を減弱するのかを明らかにする。以上のことを明らかにすることにより、口腔扁平上皮癌細胞における Lewis y の発現の意義を検討する。

3. 研究の方法

(1) 2種類の Lewis y 遺伝子改変口腔扁平上皮癌細胞株を用いて実験を行った。

口腔扁平上皮癌細胞株である HSC-3 の亜株で、Lewis y が発現していない細胞株にフコシルトランスフェラーゼ (fut1) の cDNA を遺伝子導入して Lewis y を高発現させた細胞株 (Lewis y<sup>+</sup>) とそのコントロール細胞株 (Lewis y<sup>-</sup>)。

口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3-34 に発現しているフコシルトランスフェラーゼ (fut1) を miR RNAi を用いてノックダウンして、Lewis y がノックダウンされた細胞株 (Lewis y<sup>-</sup>) とコントロール細胞株 (Lewis y<sup>+</sup>)。

(2) EGFR の 2 量体形成能を EGF 刺激後、EGFR を BS3 で cross-link した細胞ライセートを用いて、免疫プロットングにより検討した。

(3) EGF 結合のキネティクスを EGF binding assay を用いて検討した。

(4) EGF 刺激後の細胞接着能に関係する

Focal adhesion kinase (FAK) および paxillin のチロシンリン酸化レベルの変化を検討するため、EGF 刺激後の細胞ライセートを FAK あるいは paxillin に対する抗体で免疫沈降し、抗チロシンリン酸化抗体 (PY20) で免疫プロットングすることで、評価した。

(5) プレートにコラーゲンタイプ I あるいはフィブロネクティンでコーティングして、そのプレートに細胞をまき、細胞接着能を細胞接着解析システム (RT-CES システム) を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌細胞において、EGFR に結合する Lewis y 構造がどのようなメカニズムで EGFR のチロシンリン酸化を抑制するのかを解明するために、口腔扁平上皮癌細胞株である HSC-3 の亜株で、Lewis y が発現していない細胞株 (Lewis y<sup>-</sup>) とその細胞にフコシルトランスフェラーゼ (fut1) の cDNA を遺伝子導入した Lewis y 高発現細胞株 (Lewis y<sup>+</sup>) を用いて以下の実験を行った。

EGF 刺激 60 分後、EGFR を BS3 で cross-link して、Lewis y 構造の有無による EGFR の 2 量体形成能の相違を免疫プロットングにて検討した。その結果、Lewis y 細胞株の方が、Lewis y<sup>-</sup>細胞株と比較して、2 量体の EGFR の量が約 2.5 倍多かった。

EGF binding assay を用いて、EGFR に付加された Lewis y 構造の有無による EGF 結合にキネティクスの相違を検討した。その結果、EGF の解離定数 (Kd 値) は、Lewis y 細胞株と Lewis y<sup>-</sup>細胞株とは、有意な差は認められなかった。一方、EGF の最大結合 (Bmax) 値は、Lewis y 細胞株より Lewis y<sup>-</sup>細胞株の方が、1.3~2.5 倍低かった。

以上の結果より、EGFR に付加された Lewis y が、EGFR にある EGF の結合サイトを妨害したため、EGF の EGFR への結合が阻害され、その結果、EGFR の 2 量体形成が減少し、さらには EGFR のチロシンリン酸化が減弱したことが示された (図 1)。

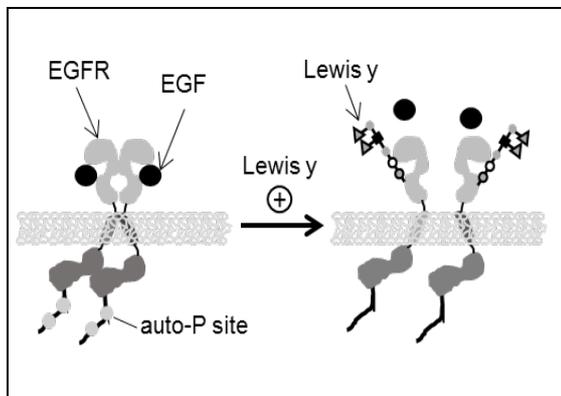


図 1 Lewis y 構造による EGF の EGFR への結合阻害によって、EGFR の 2 量体形成が抑制される。

(2) 口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3-34 に発現しているフコシルトランスフェラーゼ (fut1) を miR RNAi を用いてノックダウンして、Lewis y がノックダウンされた細胞株 (Lewis y<sup>-</sup>) とコントロール細胞株 (Lewis y<sup>+</sup>) における EGF (2.5 ng/ml) 刺激後の細胞形態を検討した。

興味深いことに Lewis y のノックダウンによって、EGF 刺激後、突起を伸ばしていた細胞が丸くなり、中には浮遊する細胞も多く認められるようになった。

EGF 刺激後の細胞接着能に深く関係する FAK および paxillin のチロシンリン酸化レベルを検討した結果、Lewis y<sup>+</sup>細胞株と比較して、Lewis y<sup>-</sup>細胞株の方が、FAK および paxillin のチロシンリン酸化も抑制されることが明らかになり、Lewis y の発現の低下が、細胞の接着能を減弱することが明らかになった。

(3) Lewis y 発現による細胞接着能への影響を細胞接着解析システム (RT-CES システム) を用いて解析した。

Lewis y<sup>+</sup>細胞の方が Lewis y<sup>-</sup>細胞と比較して、コラーゲンタイプ I あるいはフィブロネクティンへの接着能が強いことが明らかになった。

細胞接着時に上昇する paxillin のチロシンリン酸化レベルが、Lewis y<sup>-</sup>細胞では抑制されることが示された。

(2) および (3) の結果より、口腔扁平上皮癌細胞は Lewis y の発現が低下することで、EGF 刺激により剥がれやすくなり、また、コラーゲンタイプ I あるいはフィブロネクティンなどの細胞外マトリックスへの接着能がむしろ低下することが示された。このことより、癌細胞がより異なる部位へ移動しやすい環境を Lewis y の発現低下が作り上げ、癌細胞の悪性形質増強の一端を担っている可能性が示唆された (表 1)。

	口腔扁平上皮癌細胞	
	Lewis y 陽性	Lewis y 陰性
EGFR のリン酸化	弱い	強い
細胞接着能	強い	弱い
細胞浸潤能	弱い	強い
腫瘍形成能	低い	高い

表 1 Lewis y 発現の有無による口腔扁平上皮癌形質の違い

口腔扁平上皮癌の治療において、EGFR の発現および活性化の抑制が重要な鍵になっているが、Lewis y による EGFR の活性抑制機構が明らかになったことにより、Lewis y を制御することによって、口腔扁平上皮癌治療の新たな展開が期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

浜村 和紀、古川 鋼一、戸苅 彰史、糖鎖修飾による癌の悪性形質制御機構、口腔組織培養学会誌、査読有、25 巻、2016、9-17

〔学会発表〕(計 2 件)

浜村 和紀、戸苅 彰史、口腔扁平上皮癌細胞において、血液型抗原 Lewis y は EGFR のリン酸化を抑制する、第 53 回日本口腔組織培養学会学術大会、2016 年 11 月 18 日、石川県立美術館 (石川県金沢市)

浜村 和紀、戸苅 彰史、血液型抗原 Lewis y による口腔扁平上皮癌の悪性形質制御機構、第 58 回歯科基礎医学学会学術大会、2016 年 8 月 25 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜村 和紀 (HAMAMURA, Kazunori)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：00422767

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし ( )