



|              |                                                                                                                                                       |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Cell Cycle-Dependent Rho GTPase Activity Dynamically Regulates Cancer Cell Motility and Invasion In Vivo                                              |
| Author(s)    | 賀川, 義規                                                                                                                                                |
| Citation     | 大阪大学, 2014, 博士論文                                                                                                                                      |
| Version Type |                                                                                                                                                       |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/34230">https://hdl.handle.net/11094/34230</a>                                                                   |
| rights       |                                                                                                                                                       |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# 論文内容の要旨

## Synopsis of Thesis

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名<br>Name                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 賀川 義規                                                                                                                                                     |
| 論文題名<br>Title                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Cell Cycle-Dependent Rho GTPase Activity Dynamically Regulates Cancer Cell Motility and Invasion <i>In Vivo</i><br>(細胞周期依存的なRho GTPase活性が癌細胞の可動性と浸潤を制御する) |
| 論文内容の要旨 (Abstract of Thesis)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                           |
| <p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>癌細胞の特徴には、細胞周期の調整システムの破綻による異常増殖、周囲組織へ浸潤、遠隔臓器へ転移することがあげられる。近年の細胞周期をリアルタイムで可視できる蛍光プローブが開発され生細胞の細胞周期を直接観察出来るようになった。また、二光子顕微鏡を用いた生体イメージング技術の進歩により、従来の方法ではアプローチ出来なかった癌細胞の動きを生体内で時空間的に解析する事が可能になった。これらの技術を駆使し癌細胞の異常な細胞周期と浸潤の関係に現象からせまり、分子生物学的解析よりその関連分子、そして新規の癌治療標的を探索することが本研究の目的である。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                           |
| <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>細胞周期を2色の蛍光プローブ (G1期-赤、S/G2/M期-緑) でリアルタイムに可視化するFucci(Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator)をヒト大腸癌細胞株 (HCT116) に遺伝子導入し安定株を作成した。この細胞株をNOD/SCIDマウスの皮下に移植し4週間後に二光子顕微鏡を用い生体イメージングでがん細胞の挙動を時空間的に観察した。赤 (G1) と緑 (S/G2/M) の細胞の動きをイメージングで追跡し、細胞周期によって移動速度を計測した結果、G1期-赤 (n=310) とS/G2/M期-緑 (n=450) の細胞の平均速度は、緑 (S/G2/M期) の細胞の方が速いことが判明した (p=0.033)。この結果より、Fucciの赤 (G1) と緑 (S/G2/M) のシグナルを利用し、癌細胞を赤 (G1) と緑 (S/G2/M) にソーティングし、それぞれからtRNAを抽出しマイクロアレイで細胞周期と動きに関連ある分子を探索した。細胞周期による遺伝子の発現を比較したマイクロアレイから、緑の細胞 (S/G2/M) で高発現する可動性に関連するRhoGAP (ARHGAP11A) を抽出することに成功した。この分子は、細胞周期を制御するE2F/Rb pathwayによって細胞周期依存的に転写制御されていることをCHIP assay, Luciferase assayで確認した。また、細胞骨格に関わるRhoAの活性を下げ、F-actin合成とミオシンリン酸化を抑制する事で、細胞骨格に大きな変化を与える事がわかった。次に、細胞の能動的な動きに関わる分子であるRac1の活性を定量できるFRET probeを用いて、ARHGAP11Aの過剰発現株でRac1の活性を定量するとコントロールに比べRac1の活性が上がっていることがわかった。マトリゲルを用いたinvasion assayでは、ノックダウン株で浸潤能が抑制されることを確認し、In vivoでの機能を確認するために野生型の細胞をEGFP(緑)、ノックダウン株をDsRed(赤)でラベルし、混合した腫瘍を生体イメージングで観察すると、ノックダウン株で癌細胞の動きが抑制される事を可視化することに成功した。siRNAを用いて治療実験を施行した。マウスの皮下に作成した大腸癌腫瘍にsiRNAをアテロコラーゲンを用いて局注しこの分子をノックダウンさせると腫瘍の増殖を抑制する事が確認できた。臨床サンプルを用いた検討では、大腸癌手術切除症例のマイクロアレイ (癌部74例、正常部5例) のデータから、この分子は癌部で有意に高発現しており、TNM分類の浸潤深度を示すT因子においてT1からT4の間で段階的に上昇していた。</p> |                                                                                                                                                           |
| <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>本研究により、生体イメージングを駆使する事で、癌細胞の「細胞周期と浸潤」との二つのダイナミクスを同時に時空間的に解析し、そのメカニズムに関与する分子 (ARHGAP11A) を同定した。この分子の機能については、今まで報告がなく、我々の機能解析から癌細胞の浸潤に深く関与していることが明らかになった。さらに、臨床サンプルにおいても癌部で高発現しており、治療実験で腫瘍抑制効果をもとめたことから、新たな癌治療への発展が期待される。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                           |

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 賀川 義規

|         | (職)        | 氏 名    |  |
|---------|------------|--------|--|
| 論文審査担当者 | 主 査 大阪大学教授 | 森 正 樹  |  |
|         | 副 査 大阪大学教授 | 月田 早智子 |  |
|         | 副 査 大阪大学教授 | 野口 真三郎 |  |

## 論文審査の結果の要旨

生体イメージング技術の進歩により、癌細胞の動きと細胞周期を時空間的に解析する事が可能になった。細胞周期を2色の蛍光プローブ (G1期-赤、S/G2/M期-緑) でリアルタイムに可視化する Fucci(Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator)をヒト大腸癌細胞株 (HCT116) に遺伝子導入し安定株を作成した。この細胞株をNOD/SCIDマウスの皮下に移植し二光子顕微鏡でがん細胞の挙動を観察した。細胞周期によって移動速度を計測した。また、Fucciの赤(G1)と緑(S/G2/M)のシグナルを利用し、マイクロアレイで細胞周期と動きに関連ある分子を探索した。結果はG1期-赤 (n=310) と S/G2/M期-緑 (n=450) の細胞の平均速度は、緑の細胞の方が速かった (p=0.033)。細胞周期による遺伝子の発現を比較したマイクロアレイから、緑の細胞 (S/G2/M) で高発現する可動性に関連する RhoGAP (ARHGAP11A) を抽出した。この分子は浸潤能や細胞骨格の制御に関わっていた。大腸癌切除サンプル(74例)においても、正常部より高発現していた。癌細胞の細胞周期と浸潤との二つのダイナミクスを同時に時空間的に解析し、そのメカニズムに関与する分子 (ARHGAP11A) を同定した。この論文は、学位に値するものと認める。