



Title	Rous sarcoma virus-transformed cells develop peculiar adhesive structures along the cell periphery.
Author(s)	中村, 憲正
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38965
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	なか むら のり まさ
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学 位 記 番 号	第 11249 号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Rous sarcoma virus-transformed cells develop peculiar adhesive structures along the cell periphery. (ラウス肉腫ウイルス形質転換細胞辺縁部に形成される特異的な接着構造)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 祖父江憲治 (副査) 教授 小野 啓郎 教授 越智 隆弘

論 文 内 容 の 要 旨

(目的)

培養線維芽細胞はラウス肉腫ウイルス (RSV) による悪性形質転換により、基質との密な接着構造である接着斑が崩壊消失するとともに基質とより距離を隔てた不安定な接着構造が形成され、この変化が悪性化に伴う形質転換細胞特有の接着性の低下や運動性の亢進に深く関与するものと考えられてきた。しかしこの悪性細胞特有の基質接着機構の物質的基盤は明らかではない。本研究では細胞外基質受容体であるインテグリン分子群の中で、特に接着斑形成への関与が知られているフィブロネクチン受容体及びビトロネクチン受容体をマーカーにして、形質転換による細胞の基質接着構造の変化を主に形態学的に検討することを目的とした。特にアクチン細胞骨格との関連を追求するとともに、運動性に富むその他の細胞種における接着構造についても検討を行った。

(方法ならびに成績)

ラット線維芽細胞の樹立細胞株 (3Y1) とこれを RSV で形質転換した細胞株 (BY1) を対象とした。まずフィブロネクチン受容体及びビトロネクチン受容体に対する特異抗体を用いたイムノプロッティング法により、形質転換に伴う両分子の発現変化を検討し、フィブロネクチン受容体はその発現が減少していたがビトロネクチン受容体の発現量は維持されることを確認した。間接蛍光抗体法による形態学的研究により、正常細胞は、ストレスファイバーの収束点である接着斑に基質と約 10-15 nm の距離で接着しており、干渉反射顕微鏡にて黒いイメージで描出されるが、同部にビトロネクチン受容体優位に両インテグリンが集積していた。これに対し形質転換細胞では干渉反射顕微鏡にて灰色のイメージで描出される、基質と約 30-50 nm の距離で接する接着領域を細胞辺縁に形成した。同部にはビトロネクチン受容体の集積を見たが、フィブロネクチン受容体は集積していなかった。さらに共焦点レーザー顕微鏡による観察により、この辺縁接着部にはアクチン束が収束しないことが明らかとなった。またビトロネクチン受容体の基質確認ドメインである RGD 配列を含んだペプチドによる処理により、辺縁接着部は接着斑に比して容易に破壊され、同部の基質接着の不安定性が示唆された。

形質転換細胞には辺縁接着部とは別に、干渉反射顕微鏡にて更に明るいイメージで描出され、アクチン束が集積するドット状の接着部 (ポドソーム) が細胞中心部に多数形成されていたが、同部へのインテグリンの集積は乏しかった。辺縁接着部とポドソームにはともに src 遺伝子産物及びチロシン磷酸化蛋白質の強い集積を認めた。一方細胞の収縮要素を構成するアクチン、ミオシン、カルデスモン、トロボミオシンはポドソームに特異的に集積し、辺縁接着

部へは存在していなかった。

またインテグリンの集積、アクチン細胞骨格、干渉反射顕微鏡像の3点に着目して、形質転換細胞の接着構造の基質に付着してからの経時変化を観察すると、辺縁接着部及びポドソームは血清添加の有無を問わず同様の時間経過のうちに出現し、その後も両構造は共存し、接着斑等他の接着構造への移行は見られなかった。この事から、辺縁接着部はポドソームと同様に形質転換細胞に一過性ではなく安定して発現される特有の接着構造であることが示唆された。

さらに、増殖期における正常線維芽細胞、フォルボールエステルによる形質転換細胞、そして数種の癌や肉腫細胞を対象に基質接着構造を同様の手法により形態学的に観察すると、共通の細胞骨格上の特徴を示すインテグリンを介した辺縁接着部が広く認められ、RSV形質転換細胞に見られた辺縁接着部は運動、浸潤性の高い細胞の基質接着構造として広く存在するものである可能性が示唆された。

(総括)

これまで、RSVによる悪性形質転換細胞の基質接着は主としてポドソームを介して行われるとされてきた。しかし本研究により、もう一つの接着装置である辺縁接着部が基質への“接着”により重要な役割を果たしていることが明らかとなった。収縮系蛋白質が集積するポドソームは活発に運動するとともに蛋白質分解酵素を基質に対して分泌しており、この部分が悪性細胞の運動性、浸潤性の鍵となる装置であると考えられる。一方辺縁接着部はポドソームとは異なり収縮系蛋白質を含まず、代わってインテグリン分子に富み、ポドソームより基質との距離が接近している。従って辺縁接着部は運動性に乏しく安定した接着構造であり、正常細胞の主要接着部位である接着斑との機能的な類似性が示唆される。しかし辺縁接着部は接着斑に比べ、インテグリンと基質との結合が弱く、またより距離を隔てて基質と接着しており、その意味でより不安定な構造であると言える。特徴的なのは辺縁接着部はポドソームの存在する細胞中心部を取り囲むように形成されることで、ポドソームから分泌される蛋白質分解酵素による基質破壊の効率を上げるのに寄与している可能性がある。さらにこの辺縁接着部は接着斑およびストレスファイバーを有しない他の細胞種に一般的に存在することが確認できた。従って辺縁接着部は、運動性の亢進した種々の悪性細胞の基質接着の基盤となっている可能性が高い。その意味ではこの接着構造の形成崩壊の制御は癌の転移浸潤機構解明の一つの鍵となるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、正常の線維芽細胞とこれをラウス肉腫ウイルスにより悪性形質転換した細胞を対象に、細胞外基質受容体であるインテグリン分子（フィブロネクチン受容体、ビトロネクチン受容体）の細胞内局在を指標として細胞基質間接着構造の形成を詳細に比較検討したものである。その結果、形質転換細胞の細胞辺縁部にインテグリンが集積しているもののアクチングリメントが収束していない細胞基質間接着構造を新たに見いだし、辺縁接着部（peripheral adhesion）と名付けた。干渉反射顕微鏡等による観察により形質転換細胞ではこの辺縁接着部が主たる基質接着構造であることを明らかにした。辺縁接着部は、正常細胞の主要接着部である接着斑と同様に、収縮系蛋白質を含まず運動性に乏しい接着構造ではあるが、後者に比べ、基質との近接度、またインテグリンと基質との結合性の観点からより不安定な構造であることが示された。更にこの辺縁接着部が、種々の癌細胞など、明らかなストレスファイバーを有しない運動性に富む他の細胞種にも形成されていることを示した。

本研究は、多くの悪性細胞に認められる運動性亢進状態における細胞の基質接着の物質的基盤を明らかにしたもので、細胞生物学の進歩、特に癌の転移浸潤機構等の研究の進展に寄与するものと考えられる。したがって本研究は、学位に値するものと考えられる。