



Title	rho-MEDIATED PROTEIN TYROSINE PHOSPHORYLATION IN LYSOPHOSPHATIDIC-ACID-INDUCED TUMOR-CELL INVASION
Author(s)	今村, 文生
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40926">https://hdl.handle.net/11094/40926</a>
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、<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

氏名	今村文生
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第13346号
学位授与年月日	平成9年7月7日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	rho-MEDIATED PROTEIN TYROSINE PHOSPHORYLATION IN LYSOPHOSPHATIDIC-ACID-INDUCED TUMOR-CELL INVASION (リゾホスファチジン酸が誘起する腫瘍細胞浸潤におけるrho介在性蛋白チロシン磷酸化の役割)
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 忠三 (副査) 教授 高井 義美 教授 宮坂 昌之

### 論文内容の要旨

#### (目的)

がん細胞の浸潤機構を解明し、その抑制剤を発見することによりがん転移の制御法を開発する。

#### (方法ならびに成績)

ドンリューラット腹腔に腹水肝癌(AH)細胞を摂取すると、癌細胞は腹膜に浸潤結節を形成し、癌性腹膜炎を引き起こす。癌細胞の浸潤機構を解析するために、この *in vivo* の系に対する *in vitro* のモデル系を開発した。ラット腹腔に摂取された癌細胞が浸潤巣を形成する過程での最初のバリアである中皮細胞をラット腹腔より採取、*in vitro* で培養し単層の中皮細胞層を形成させる。Confluent な中皮細胞層上で、10%ウシ胎児血清(FCS)存在下に AH 細胞を重層培養する(4-24時間の培養)。重層された AH 細胞の一部は、中皮細胞層の細胞間隙より細胞層下に浸潤、増殖し浸潤巣を形成する。この浸潤巣数を計る事により AH 細胞の浸潤能が定量できる。AH 細胞の浸潤性の異なるクローリン、浸潤性を修飾した AH 細胞(TGF- $\beta$ 処理、活性化マクロファージとの共存培養)の解析より、*in vitro* 実験系を用いた浸潤能の定量は、実験的癌性腹膜炎での癌細胞の浸潤性をよく反映した。

AH 細胞の *in vitro* の浸潤性は、C キナーゼ (PKC) 阻害剤(H7) やジブチリル cAMP を実験系に添加したり、コレラ毒素で AH 細胞を処理することにより著明に抑制される。これらの結果は、AH 細胞の浸潤が PKC, PKA 等の関与する細胞内シグナルにより制御されていることを示唆する。

AH 細胞の浸潤を誘起するシグナルを解析するために、まず実験系の培養液より血清を除去した。AH 細胞は無血清条件では浸潤しない。浸潤における血清要求性は AH 細胞に特異的ではなく、ラット悪性黒色腫(B16FE7)細胞、ヒト肺小細胞癌(OC10)細胞等でも見られた。一方、ヒト卵巣癌(RMUG-S)細胞は浸潤に血清を全く要求しなかった。AH 細胞、B16FE7 細胞や OC10 細胞は浸潤に関与するシグナルを解析する目的に適すると考えられた。

血清中の浸潤誘導因子を同定するために、既知の血清中蛋白(Albumin, Insulin, Transferrin, Fibronectin, Vitronectin, EGF, PDGF, IGF, HGF 等)を実験系に添加したが、AH 細胞の浸潤は引き起こせなかった。血清中より AH 細胞の浸潤誘導物質の精製を試みた。活性物質は分子量約10万の糖蛋白であることが判明したが構造の決定

には至っていない。

視点を変え、細胞内シグナル伝達系の刺激剤を無血清の実験系に添加し、癌細胞の浸潤の誘導を試みた。PKC を刺激する PMA や OAG、カルシウムイオノフォア (A23187) では MM1細胞の浸潤を引き起こせなかった。一方、25  $\mu$ M 前後のリゾホスファチジン酸 (LPA) が10% FCS に匹敵する浸潤を誘導することを見いだした。ホスファチジン酸も LPA の約25%の浸潤誘導活性を有す。LPA は細胞膜の受容体を刺激し、細胞内に蛋白磷酸化、細胞内カルシウム上昇、ホスホリパーゼ C 活性化等のシグナルを引き起こす。一方、AH 細胞の浸潤は蛋白チロシン磷酸化酵素阻害剤であるゲニスチン、ハービマイシンで抑制される。抗ホスホチロシン抗体によるウェスタンブロッティングで、LPA は120 kD, 60-70 kD 付近の蛋白質をチロシン磷酸化する事が判明した。磷酸化は25  $\mu$ M 前後の LPA で最も強く、これは AH 細胞の浸潤を誘導する濃度とほぼ一致した。磷酸化は10分で最大になり、30分後にはほぼ元のレベルに復帰した。免疫沈降実験で120 kD のバンドの主要なものは focal adhesion kinase (FAK), 60-70 kD のバンドにはパキシリンが含まれることがわかった。これらの磷酸化は低分子量 G 蛋白質 rho の機能を特異的に抑制するボツリヌス C3 毒素で抑制され、rho の下流に位置するイベントと理解された。C3 は AH 細胞の浸潤も強く抑制した。

(総括)

1) ある種の癌細胞の浸潤性は誘導可能であり、少なくとも *in vitro* では LPA という単純なリン脂質により誘導できる。2) LPA の作用の一部は、低分子量 G 蛋白質 rho の活性化を介した FAK, パキシリン等の蛋白チロシン磷酸化による。FAK やパキシリンはアクチンの高次構造や接着斑形成に関与しており、それらを通じて浸潤などの細胞運動が制御されると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

著者らは *in vitro* の癌細胞の浸潤実験系を開発し、その系において単純な構造を有するリン脂質であるリゾホスファチジン酸 (LPA) がラット腹水肝癌細胞などの癌細胞浸潤を誘起することを見いだした。更に LPA の細胞内シグナル伝達を解析することにより、低分子量 G 蛋白質 rho を介する接着斑キナーゼやパキシリン等のチロシン磷酸化経路を刺激することが LPA による癌細胞の浸潤誘導の本質であるという結果を得た。この結果は癌細胞における浸潤性、転移性の発現機構の解明につながるものであり学位に値すると考える。