

Title	リゾホスファチジン酸によるがん細胞浸潤の解析と環状ホスファチジン酸による抑制
Author(s)	向井, 睦子
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42701">https://hdl.handle.net/11094/42701</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	向井睦子
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 16376 号
学位授与年月日	平成13年3月23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	リゾホスファチジン酸によるがん細胞浸潤の解析と環状ホスファチジン酸による抑制
論文審査委員	(主査) 教授 小林 資正
	(副査) 教授 今西 武 教授 山元 弘 教授 馬場 明道

### 論文内容の要旨

がんは異常な増殖性ととも、他の臓器に転移するという形質をもっている。臨床的には転移の有無ががん患者の予後を左右する大きな要因のひとつである。原発巣より遊離したがん細胞は細胞外基質成分を分解しながら浸潤し、脈管系に侵入する (intravasation)。脈管内での宿主免疫細胞よりの攻撃等から逃れたがん細胞は、遠隔臓器で血管内皮細胞に接着し、内皮細胞層を越えて浸潤する (extravasation)。血管外に脱出したがん細胞は増殖し、転移巣を形成する。このような多段階のステップを含む転移の中で、宿主細胞層 (血管内皮細胞など) を越えての浸潤は非常に特徴的な段階である。

著者は正常ラットの腸間膜から分離培養した中皮細胞層と AH130 腹水肝がん細胞を用いて宿主細胞層を越えてがん細胞が位置移動する浸潤を、定量的に評価できる実験系を開発した。この実験系を用いて浸潤能の高いクローンと低いクローンを分離し、それらをラットの腹腔に移植すると浸潤能に応じて浸潤性腫瘍を形成することから、in vitro と in vivo が非常に良く対比していることがわかった。著者は、その実験系を用いて、がん細胞が外からの刺激を受けて宿主細胞層の下へ浸潤していくという細胞運動のシグナル伝達系を解析し、浸潤の抑制をはかりたいと考えている。著者の開発した実験系は in vitro の培養系であるが、assay 系から、血清 (fetal calf serum、FCS) を除去すると浸潤が起こらなくなるが、血清の代わりに 1-オレオイルリゾホスファチジン酸 (LPA) を加えると AH130 腹水肝がん細胞の高浸潤性クローン (MM1 細胞) の浸潤が強く誘導されることを初めて見いだした。MM1 細胞以外に浸潤する時に LPA や FCS を必要とする細胞群としてマウスメラノーマ細胞 B16、ヒト肺小細胞がん細胞 OC-10、ヒト膀胱がん細胞 PSN-1 と必要としない細胞群、ヒト線維肉腫細胞 HT-1080、ヒト卵巣がん細胞 R MUG-S などが存在することも明らかにした。浸潤のシグナル伝達系として現在までに LPA が低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho を活性化することが細胞運動に必要であることを明らかにした。つまり Rho を特異的に ADP リボシル化することにより不活化するボツリヌス菌体外酵素である C3 酵素でがん細胞を前もって処理しておくことで浸潤が強く抑制されること、及び、活性化 rhoA cDNA をがん細胞に導入することにより、LPA や FCS の存在なしで浸潤が誘導されることから裏づけられた。C3 酵素で前もってがん細胞を処理しておくことで、LPA や FCS を必要とする細胞群もそれらを必要としない細胞群も浸潤が抑制された。Rho から細胞骨格へのシグナル経路は共通で Rho に至る経路が異なっていると考えると理解しやすいかもしれない。さらに、Rho の下流にアクチンの重合及び FAK、Paxillin のチロシンリン酸化が起こることが細胞運動に必要であることを明らかにした。

LPA の構造類似体でリン酸が 2 位と 3 位に環状になっている環状ホスファチジン酸 (cyclicPA、cPA) ががん細胞の浸潤を強く抑制することを見いだした。1 位の側鎖の脂肪酸をいろいろ変えたものを化学合成し、その中でパルミチン酸がついたもの (1-パルミトイルホスファチジン酸、Pal-cPA) の浸潤抑制活性が一番強いことを明らかにした。Pal-cPA は MM1 細胞の LPA による浸潤のみならず、FCS による浸潤も抑制した。Pal-cPA は MM1 細胞以外のがん細胞、LPA や FCS を要求する細胞群も LPA や FCS を要求しない細胞群の浸潤も抑制し、B16メラノーマを用いた実験的肺転移も濃度に依存して抑制することがわかった。Pal-cPA による浸潤、転移の抑制は細胞内 cAMP の濃度の上昇が関与していることが示唆された。活性型 Rho が測定できるようになり、MM1 細胞は LPA によって Rho の活性が一過性に上昇することを明らかにし、cAMP を上昇させる薬剤が浸潤を抑制すると共に、LPA による Rho の活性化を抑制することも明らかになってきた。

LPA は種々のがん細胞にとって強力な浸潤誘導物質である。LPA は Rho の活性化を介して細胞の位置移動に必要な支点 (接着斑) の形成と収縮力の発現をもたらすと考えられる。近年、MM1 細胞の細胞運動には金コロイド法で測定すると LPA 以外にフィブロネクチンが必要なことがわかってきた。フィブロネクチン上での LPA による形態変化は上皮細胞層上での LPA による形態変化と良く似ており、C3 酵素で前もって処理するとそれらの形態変化も抑制されることも明らかになってきた。LPA から送られるシグナルが、インテグリン-フィブロネクチンから送られるシグナルによってどのように修飾されるかも現在検索中である。又、そこに cAMP/PKA がどのように関与するかも興味のもたれるところである。接着と脱接着、収縮と弛緩の制御を解明することが細胞の位置移動を分子レベルで理解するために必須であると考えている。

#### 論文審査の結果の要旨

がんの転移は、原発巣より遊離したがん細胞が、細胞外基質成分を分解しながら血管内に侵入し、再び遠隔臓器で血管内皮細胞に接着し、内皮細胞層を越えて浸潤し、増殖して転移巣を形成するという多段階のステップを含む。

申請者は、正常ラットの腸間膜から分離培養した上皮細胞層と腹水肝がん細胞を用いて、宿主細胞層を越えてがん細胞が位置移動する浸潤を、定量的に評価できる実験系を開発した。この実験系を用いて浸潤能の高いクローンと低いクローンを分離し、それらをラットの腹腔に移植すると、浸潤能に応じて浸潤性腫瘍を形成することから、*in vitro* と *in vivo* での結果が非常に良く対比する実験系であることを示した。また、このアッセイ系から、血清を除去すると浸潤が起こらなくなり、血清の代わりにグリセロールの 1 位にオレイン酸がついた 1-オレオイルリゾホスファチジン酸 (LPA) を加えると、浸潤が強く誘導されることを見いだした。

さらに、この浸潤実験系を用いて浸潤のシグナル伝達系を解析したところ、LPA が GTP 結合蛋白質 Rho を活性化することが細胞運動に必要であることが明らかになった。さらに、Rho の下流でアクチンの重合及びフェイク (FAK)、パキシリンのチロシンリン酸化が起こることが細胞運動に必要であることを明らかにした。すなわち、LPA は Rho の活性化を介して細胞の位置移動に必要な支点 (接着斑) の形成と収縮力の発現をもたらすと考えている。

一方、LPA の構造類似体でリン酸がグリセロールの 2 位と 3 位に環状になっている環状ホスファチジン酸 (cyclicPA) が、がん細胞の浸潤を強く抑制することを見いだした。中でも、パルミチン酸がついた (1-パルミトイル環状ホスファチジン酸、Pal-cPA) の浸潤抑制活性が一番強いことが明らかになった。さらに、Pal-cPA による浸潤、転移の抑制には、細胞内 cAMP の濃度の上昇が関与していることがわかり、cAMP の濃度を上昇させる薬剤が浸潤を抑制すると共に、LPA による Rho の活性化を抑制することも見いだしている。

以上の成果は博士 (薬学) の学位論文として充分価値あるものと認められる。