



Title	癌細胞による基底膜浸潤開始の分子機構：低分子量GTP結合タンパク質Rhoファミリーによる浸潤突起(invadopodia)形成の制御
Author(s)	大谷, 朋弘
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43656">https://hdl.handle.net/11094/43656</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	大谷朋弘
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第16931号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	癌細胞による基底膜浸潤開始の分子機構－低分子量GTP結合タンパク質Rhoファミリーによる浸潤突起(invadopodia)形成の制御－
論文審査委員	(主査) 教授 松矢篤三  (副査) 教授 由良義明 助教授 吉田篤 講師 岩本資己

## 論文内容の要旨

## 緒言

近年、癌治療の臨床の場において癌細胞の遠隔転移をいかに制御するかが最大の焦点となっているが、遠隔転移の過程は極めて複雑で未だ癌の浸潤転移機構の詳細は明らかにされていない。低分子GTP結合蛋白質Rhoファミリー(Rho、Rac、およびCdc42)がアクチン細胞骨格の再構成を制御し、細胞接着、細胞運動、細胞分裂などの細胞機能に関与していることが報告されている。しかしながら、癌の基底膜基質分解過程でのRhoファミリーの役割については不明である。

本研究は、細胞による基底膜基質分解を定量的に測定し得るフィブロネクチン分解・浸潤モデルを用いて以下の点を解析した。

1. 低分子量GTP結合タンパク質Rhoファミリーが癌細胞による基底膜浸潤開始の過程でいかなる役割を果たしているのか。

2. 低分子量GTP結合タンパク質Rhoファミリーは接着分子CD44の局在をいかに制御しているのか。

## 実験方法と結果

## 1. フィブロネクチン分解・浸潤モデル

スライドグラス上にゼラチンをコートし、FITCラベルしたフィブロネクチンを結合させ、その基質上で細胞を培養した。基質分解能を持った癌細胞は浸潤突起(invadopodia)を形成し、基質方向へ浸潤性を示した。癌細胞によって分解されたフィブロネクチンの面積をNIH imageにて定量的に測定することにより基質分解能を評価した。細胞はヒトメラノーマ細胞RPMI7951(RPMI細胞)を用いた。

## 2. 低分子量GTP結合タンパク質Rhoファミリーの基質分解への影響

Rho、Rac、Cdc42各々を特異的に刺激する薬剤であるリゾフォスファチジン(LPA)、PDGF、BradykininをRPMI細胞に添加し、細胞形態の変化を観察した。さらにRho、Rac、Cdc42各々のdominant active遺伝子Vall4RhoA、V12Rac1、V12Cdc42をRPMI細胞にトランスフェクトし、細胞形態の変化および基質分解能を測定した。

LPAを添加またはRhoを導入した細胞はアクチン線維の重合を促進したが、基質分解能に影響を与えたなかった。PDGFを添加またはRacを導入した細胞では葉状突起(lamellipodia)の形成を認め、基質分解能においては分解面積の増加を認めた。Bradykininを添加またはCdc42を導入した細胞では糸状突起(filopodia)の形成を認め、ス

スポットタイプの基質分解能の亢進を認めた。

### 3. ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) 活性が浸潤に与える影響

細胞膜構成因子であるイノシトール脂質をリン酸化する酵素の一つである PI3K の dominant negative 遺伝子 BD110X を導入し、その基質分解能を測定した。また PI3K の阻害剤 wortmannin または LY294002を添加した。

BD110X を導入した細胞の基質分解能は抑制された。wortmannin および LY294002は Rac および Cdc42による基質分解促進効果を阻害した。

### 4. 低分子量 GTP 結合タンパク質 Rac、Cdc42による接着分子 CD44の浸潤突起への集積

分解面積およびスポットタイプの分解を促進する Rac および Cdc42について癌細胞の浸潤に大きく関与している接着分子 CD44に影響を与えるのかを検討した。各 dominant active 遺伝子を導入し、CD44の局在を免疫染色で観察した。

Rac、Cdc42は、接着分子 CD44を lamellipodia または filopodia という細胞突起、すなわち浸潤性細胞の invadopodia へ集積させていることが解った。

### 5. 膜貫通型プロテアーゼ MT1-MMP と接着分子 CD44の局在に関する検討

CD44と MT1-MMP の co-localization について、フィブロネクチンフィルム上で RPMI 細胞を培養し MT1-MMP と CD44を免疫蛍光染色することにより検討した。

免疫染色およびそれらの共焦点顕微鏡での観察の結果、MT1-MMP 及び CD44は invadopodia で同一部位に局在していることが確認された。

#### 【結論】

1. 癌細胞の基質分解能の亢進には、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho ファミリーのなかで Rac および Cdc42を介した invadopodia 形成が関与しており、アクチン細胞骨格の制御に関連している PI3K、Rac、Cdc42を介したシグナル伝達分子のカスケードによって制御されていることが明らかとなった。

2. Rac および Cdc42によって癌細胞の基質分解を誘導し形成された invadopodia には、CD44が集積していた。invadopodia へ誘導された CD44と MT1-MMP の会合が基底膜浸潤開始の重要な現象であることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、癌細胞の基底膜浸潤を定量的に測定し得るフィブロネクチン分解・浸潤モデルを用いて、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho ファミリー Rho、Rac、および Cdc42が癌細胞による基底膜浸潤開始の過程でいかなる役割を果たしているのかおよび、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho ファミリーは接着分子 CD44とタンパク分解酵素 MT1-MMP の局在をいかに制御しているのかについて検討したものである。その結果、癌細胞の浸潤能の亢進には、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho ファミリーのなかで Rac および Cdc42を介した invadopodia 形成が関与しており、アクチン細胞骨格の制御に関連している PI3K、Rac、Cdc42を介したシグナル伝達分子のカスケードによって制御されていることが明らかとなった。そして Rac および Cdc42によって癌細胞の浸潤を誘導し形成された invadopodia には、CD44が集積しており、invadopodia へ誘導された CD44と MT1-MMP の会合が基底膜浸潤開始の重要な現象であることが示唆された。以上の結果は、癌細胞の基底膜分解開始機構を究明する上で、重要な知見を与えるものである。よって、本研究者は博士（歯学）の学位を授与するに値する。