The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	VCP (p97) Regulates NFκB Signaling Pathway, Which is Important in the Metastatic Event of Osteosarcoma Cell Line
Author(s)	浅井, 達哉
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43763
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

【50】

氏　　名	浅　井　達　哉（あさ い たつ や）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学 位 記 番 号	第　16847　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 医学系研究科分子病態医学専攻
学 位 論 文 名	VCP (p97) Regulates NFκB Signaling Pathway, Which is Important in the Metastatic Event of Osteosarcoma Cell Line （VCP は NFκB の活性化に関与することを通じてマウス骨肉腫株化細胞の肺転移を促進する。）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　青笹　克之 （副査） 教　授　北村　幸彦　　教　授　吉川　秀樹

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

骨肉腫の肺転移に関与する遺伝子をマウス骨肉腫細胞株とその高肺転移亜株を用いてサブトラクション法により検索し、転移機序を解明することが本研究の目的である。

【方法ならびに成績】

マウス骨肉腫細胞株 Dunn と、その高肺転移亜株 LM8を用い、SSH（Suppression Subtractive Hybridization）法により発現量の異なる遺伝子を検索し、640の候補遺伝子をサブクローニングした。この中からドット・ブロット及びシークエンス解析により、転移に関与する候補遺伝子として VCP（Valosin-Containing Protein）を選択した。VCP は全長3.1Kb、AAA（ATPase family with various cellular activities）に属する遺伝子で、その機能の一つとして転写因子 NFκB のインヒビターである IκB が活性化した後の degradation に関与することが知られている。

ノザンブロット法およびウエスタンブロット法により VCP が confluent な状態の Dunn で発現が低下するのに対し、LM8ではその発現が維持されていることが分かった。

次に VCP を Dunn へ導入し、Stable transfectant（Dunn/VCPs）を作成した。コントロールとしては、Dunn 細胞、並びに vector のみを導入したものを用いた。免疫染色及びゲルシフトアッセイ法において、TNFα刺激により、核内の NFκB が、コントロールでは confluent な状態で認められなくなるのに対し、Dunn/VCPs では confluent な状態でも認められた。同時に行ったウエスタンブロット法においても、コントロールでは Dunn/VCPs より多くのリン酸化 IκB を細胞質中に確認した。これらのことは、コントロールでは confluent な状態で TNFα刺激により IκB のリン酸化はおこるがその degradation が抑制されるために NFκB の転写が抑制され、これに対し、Dunn/VCPs では confluent な状態でも VCP の発現が維持されている為、リン酸化 IκB が degradation され NFκB が活性化されることを示す。

さらに、NFκB により転写制御される遺伝子の１つでアポトーシス抵抗性に関係する c-IAP1の遺伝子発現を検討した。confluent な状態で Dunn/VCPs ではコントロールより有意に高い c-IAP1の遺伝子発現を示した。

TNFαに対するアポトーシス抵抗性を検討したところ、コントロールに比し Dunn/VCPs は有意に高い生存率を示した。

in vivo における転移実験でも Dunn/VCPs はコントロールに比し有意に高い転移巣形成能を示した。

【総括】

1）SSH 法によりマウス骨肉腫肺転移に関与する新規遺伝子を検索し、その結果見いだされた VCP の機能解析を行った。

2）VCP はマウス骨肉腫細胞株において、confluent な状態で発現が低下するのに対し、高転移株ではその発現が維持されていることが示された。

3）VCP の発現レベルが、TNF α 刺激による NFκB の活性化と、アポトーシス抵抗性に関与することが示された。in vivo 転移実験において Dunn/VCPs により高い転移巣形成能が認められた。これらの結果により VCP の発現が維持されることによるアポトーシス抵抗性ががんの転移に関係することが示された。

論文審査の結果の要旨

本研究の目的は悪性腫瘍の転移に関する新たな遺伝子の検討である。血行性転移のモデルとしてマウスの骨肉腫細胞株 Dunn とその高肺転移亜株である LM8の組み合わせを使用し、サブトラクション法として Suppression subtractive hybridization（SSH）法を用いて Dunn と LM8で発現の異なる遺伝子を検討した。640の候補遺伝子をさらにドット・ブロット及びシークエンス解析により検討し、VCP（Valosin-Containing protein）を選択した。ノザンブロット法およびウエスタンブロット法により VCP が confluent な状態の Dunn で発現が低下するのに対し、LM8ではその発現が維持されていた。

次に VCP を Dunn へ導入し、stable transfectant（Dunn/VCPs）を作成した。免疫染色及びゲルシフトアッセイ法において、TNF α 刺激による NFκB の核内移行が、コントロールでは confluent な状態で認められなくなるのに対し、Dunn/VCPs では confluent な状態でも認められた。同時に行ったウエスタンブロット法においても、コントロールでは Dunn/VCPs より多くのリン酸化 IκB を細胞質中に確認した。これらのことは Dunn/VCPs では VCP の発現が常に維持されている為、リン酸化 IκB が効率良く degradation され NFκB が活性化されることを示す。

続いて NFκB により転写制御される遺伝子 c- I AP1の発現を検討したところ、Dunn/VCPs で有意に高い c- I AP 1の遺伝子発現を示した。TNF α に対するアポトーシス抵抗性においても Dunn/VCPs は有意に高い生存率を示した。in vivo 転移実験でも Dunn/VCPs は有意に高い転移巣形成能を示した。

本研究により VCP の発現が維持されることにより腫瘍細胞はアポトーシス抵抗性を示すことと、高転移性を示すことが確認された。以上得られた知見は転移機序や治療法の解明につながることが期待されるものであり、学位の授与に値するものである。