The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Cdc42-N-WASP-Arp2/3シグナル伝達による浸潤突起(Invadopodia)形成の制御 |
| Author(s) | 三浦, 康寛 |
| Citation | 大阪大学, 2004, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/45200 |
| 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

【10】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 三浦康寛（みうらやすひろ） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（歯　学） |
| 学位記番号 | 第　18581　号 |
| 学位授与年月日 | 平成16年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当<br>歯学研究科統合機能口腔科学専攻 |
| 学位論文名 | **Cdc42-N-WASP-Arp2/3シグナル伝達による浸潤突起（Invadopodia）形成の制御** |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教　授　古郷　幹彦<br>（副査）<br>教　授　由良　義明　　助教授　石田　武　　講　師　平賀　徹 |

## 論文内容の要旨

（緒言）

近年、癌治療の現場において局所制御は可能になりつつあるものの、癌細胞の遠隔転移の制御が最大の問題となっている。癌の浸潤・転移を特異的に制御し得る薬剤の開発が可能であれば非常に有益なことであり、ゲノム創薬を含め種々の研究がなされている。癌の浸潤・転移にはさまざまな複雑な過程が存在しており、その開発は困難な状況であったが、新しい浸潤モデルの開発によりその複雑な過程の解明に手がかりができてきた。

細胞機能の多くの生命現象において、細胞運動は必須の機能であり、癌細胞の浸潤・転移においてもダイナミックな細胞運動が行われていることが推測される。細胞は細胞骨格構造を有し、運動の際には、アクチンを中心とした細胞骨格蛋白の再構成を行っており、低分子量GTP結合蛋白質（small G proteins）がアクチンの再構成の制御に関わっていることが知られている。一方、細胞にはアクチン重合の律速段階として、重合核となるよう Actin related protein 2/3（Arp2/3）複合体という蛋白質が存在する。癌細胞における運動、および浸潤の先端部、すなわち浸潤突起（Invadopodia）においてもアクチン重合が非常に活発であることが推測され、近年、様々な研究結果により、small G proteins、およびその標的蛋白質が Arp2/3 複合体を活性化させ、アクチン重合に大きく関与していることが報告されている。しかし、それらが癌細胞の細胞骨格の制御、さらには浸潤・転移能をいかに制御しているかについてはいまだ不明である。

本実験においては、small G proteins である Rac、Cdc42、Rho さらには Cdc42 の標的蛋白質である Wiskott-Aldrich syndrome protein（N-WASP）と Arp2/3 複合体へいたるシグナル伝達に着目し、それら蛋白質が細胞骨格の制御、さらには浸潤・転移過程の重要ポイントである基底膜浸潤、すなわち Invadopodia の形成をいかに制御しているかについて検討した。

（実験）

Small G proteins である Cdc42、その標的蛋白質である N-WASP、Cdc42 との binding domain を欠損させた ΔCRIB N-WASP、Arp2/3 complex との binding domain を欠損させた ΔVPH N-WASP、さらには Arp2/3 遺伝子を RPMI7951 細胞に Lipofectamin 法を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入させた細胞を、免疫染色にて細胞形態の変

化、フィブロネクチン分解・浸潤モデルにて基質への浸潤能、さらに接着分子であるCD44、膜型蛋白分解酵素（MMP）であるMT1-MMPの局在について観察した。さらに、Western Blotting、Real-Time PCR、Gelatin zymographyにてMMPsの発現、活性を測定した。

（結果）

N-WASP、Arp2/3遺伝子を導入することにより、RPMI7951細胞の変化は各々filopodiaの形成、アクチンの凝集を認めた。ΔCRIB N-WASP、ΔVPH N-WASP遺伝子を導入した細胞では細胞形態の変化は認めなかった。細胞動態はCdc42、N-WASP、Arp2/3遺伝子導入細胞においては浸潤面積の増加を認めたが、ΔCRIB N-WASP、ΔVPH N-WASP 遺伝子導入細胞では浸潤面積の増加は認めなかった。免疫沈降にてシグナル伝達分子である Cdc42、N-WASP、Arp3は結合していることが確認され、その局在は各々、Invadopodiaとの一致を認めた。さらにCD44、MT1-MMPはN-WASP遺伝子導入細胞においてfilopodiaへの局在の変化を認めた。MMPsの発現、活性はCdc42遺伝子導入細胞においては有意に上昇していたが、N-WASP遺伝子導入細胞においては有意な上昇は認められなかった。

（考察）

Cdc42の標的蛋白質であるN-WASPはその上流にてCdc42と、下流にてArp2/3複合体とBindingしシグナルを伝達することにより、細胞の形態変化および浸潤能の増大を誘導していた。この結果によると、Cdc42-N-WASP-Arp2/3 シグナル伝達物質の複合体の形成が、filopodia の形成という細胞骨格再構成を制御し、filopodiaの先端部にCD44、MT1-MMPを集積させ、Invadopodiaの形成を制御していると考えられる。一方、Cdc42遺伝子導入細胞においてはMMPsの活性、及び発現の上昇を認めたが、N-WASP遺伝子導入細胞においては、MMPsの明らかな活性、発現の上昇は認められなかったという結果より、Cdc42は細胞骨格制御のシグナルとMMPsの遺伝子発現を制御しており、N-WASPはCdc42-N-WASP-Arp2/3シグナル伝達においてアダプターとして重要な役割を果たしていることが示された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は癌細胞の浸潤・転移過程において、基底膜浸潤の初期段階における分子機構をフィブロネクチン分解・浸潤モデルを用いて解析した。その結果、癌細胞の基底膜浸潤の初期段階にはCdc42-N-WASP-Arp2/3というシグナル伝達がアクチン細胞骨格の制御によるInvadopodiaの形成に大きく関与していることが明らかになった。

この論文は、癌細胞の浸潤・転移過程において細胞骨格再構成の重要性を示すものであり、博士（歯学）の学位に値するものと認める。