The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Negative regulation of p21 by β-catenin/TCF signaling : a novel mechanism by which cell adhesion molecules regulate cell proliferation
Author(s)	亀井, 順子
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45336
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

【13】

氏　　名	亀（かめ）　井（い）　順（じゅん）　子（こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　１８４４１　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 医学系研究科情報伝達医学専攻
学　位　論　文　名	Negative regulation of p21 by β-catenin/TCF signaling : a novel mechanism by which cell adhesion molecules regulate cell proliferation （細胞接着分子がβ-catenin/TCF シグナルを介し p21 を負に制御することにより細胞増殖を調節する）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　堀　　正二 （副査） 教　授　高井　義美　　教　授　宮坂　昌之

論　文　内　容　の　要　旨

[目的]

細胞接着に関わるカドヘリンや細胞間情報伝達に関わるギャップ結合は細胞増殖を含む様々な生物現象に共同的に働く可能性があると考えられている。今回心筋細胞に共発現するカドヘリン、N-cadherin とギャップ結合構成タンパク質、connexin43（Cx43）を HEK293 細胞に過剰発現させ、これらの分子の細胞増殖に対する効果ならびにそのメカニズムを解明した。

[方法ならびに成績]

HEK293 細胞に Cx43、N-cadherin、及びその両者を過剰発現させた stable cell line（Cx43, Ncad, Ncad&Cx43）を作成し、empty vector を導入した parent cell line（parent）と細胞数測定により細胞増殖能を比較した。Ncad と Ncad&Cx43 において前者が parent の 60%、後者が parent の 10%という増殖抑制を認め、N-cadherin と Cx43 が相乗的に細胞増殖抑制に作用することが示された。フローサイトメトリーを用いて細胞周期解析を行ったところ、増殖抑制を認めた Ncad と Ncad&Cx43 において G2/M arrest を生じていた。G2/M 期進行において中心的役割を果たす Cdc2 kinase の活性を測定した。Ncad と Ncad&Cx43 において Cdc2 kinase 活性の有意な低下を認めた。ウェスタンブロット法による検討によって Cdc2 活性の制御因子である CDK inhibitor、p21 は Ncad で発現レベルが上昇しており、Ncad&Cx43 ではさらなる上昇を認めた。カドヘリン存在下ではβ-catenin がカドヘリンと結合することで細胞質内の free β-catenin が減少し、β-catenin/TCF 転写活性が低下するという報告がある。この細胞においてもこの系が成立するかどうかを確かめるためにβ-catenin/TCF 依存性の転写活性を調べたところ、Ncad と Ncad&Cx43 においてはその転写活性が有意に低下していた。次に p21 がβ-catenin/TCF による転写調節をうけるかどうかを検討した。p21 のプロモーター領域を truncate した fragment によって作成した luciferase construct を TCF の constitutive active form もしくは dominant negative form ともに HEK293 細胞に導入し、luciferase 活性を測定した。その結果、constitutive active form の TCF との cotransfection では p21 の転写活性は抑制されており、dominant

negative form の TCF との cotransfection ではそれは増加していた。さらにこの転写調節に関与する cis-element は p21 上流－2600 bp から－1600 bp に存在することがわかった。実際にこの領域には２つの TCF binding motif が存在していた。以上より p21 が β-catenin/TCF signal による負の転写調節をうけることが示唆された。すなわち N-cadherin を介して低下した β-catenin/TCF signal により p21 の負の転写調節が除かれ、その発現が誘導されたと考えられた。また gap junction の機能を欠失させた mutant Cx43 を N-cadherin と共発現させた細胞では細胞増殖抑制作用ならびに p21 発現レベルが N-cadherin と同程度まで回復したことから gap junction を介した細胞間情報伝達（gap junctional intercellular communication ; GJIC）によって N-cadherin の細胞増殖抑制作用が相乗的に高められることが示唆された。

[総括]

N-cadherin と Cx43 が p21 の発現を介して相乗的に細胞増殖抑制に作用することを示した。さらに本研究では p21 が β-catenin/TCF signal による負の転写調節をうけることを初めて明らかとした。すなわち N-cadherin 発現下では β-catenin が N-cadherin に結合することで β-catenin/TCF signal による転写活性が低下し、p21 の負の転写制御が除かれ、その発現が誘導されることが示唆された。さらに Cx43 が共に存在すると GJIC を介してその作用が増幅されると考えられた。これらの知見は細胞接着に関わる分子が協調して細胞増殖を始めとする生物現象に関わることを示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

細胞接着に関わるカドヘリンや細胞間情報伝達に関わるギャップ結合は様々な生物現象に共同的に働く可能性があると考えられている。しかしこれらの分子が細胞増殖に作用する機構は明らかとされていない。本研究では心筋細胞に発現するカドヘリン、N-cadherin とギャップ結合構成蛋白質、connexin43（Cx43）の細胞増殖制御機構を解明する目的で実験を行っている。その結果 N-cadherin と Cx43 は p21 の発現を介して相乗的に細胞増殖を抑制していた。さらに p21 は β-catenin/TCF signal による負の転写調節をうけることを明らかとした。また N-cadherin 発現細胞と N-cadherin と Cx43 の共発現細胞では β-catenin/TCF 依存性の転写活性は有意に低下していた。このことから N-cadherin 発現下では β-catenin が N-cadherin に結合することで β-catenin/TCF signal による転写活性が低下し、p21 の負の転写制御が除かれ、その発現が誘導されて増殖抑制を惹起することが示唆された。さらにギャップ結合能を欠失させた mutant Cx43 と N-cadherin を共発現させた実験から Cx43 が共存するとギャップ結合能を介してその作用が増幅させられることを示した。

これらの知見は細胞接着に関わる分子が協調して細胞増殖を始めとする生物現象に関わることを示唆するものであり、学位に値するものと認める。