

Title	Involvement of up-regulated Necl-5/Tage4/PVR/CD155 in the loss of contact inhibition in transformed NIH3T3 cells
Author(s)	南, 有紀子
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47496">https://hdl.handle.net/11094/47496</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	南 有紀子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 20971 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Involvement of up-regulated Necl-5/Tage4/PVR/CD155 in the loss of contact inhibition in transformed NIH3T3 cells (形質転換された NIH3T3 細胞における接触阻害の消失への過剰発現された Necl-5/Tage4/PVR/CD155 の関与)
論文審査委員	(主査) 教授 門田 守人  (副査) 教授 宮坂 昌之 教授 米田 悦啓

### 論文内容の要旨

#### [ 目的 ]

正常細胞を培養すると、細胞はコンフルエントになるまで運動と増殖を続け、コンフルエントになると細胞間接着が形成され、細胞の運動と増殖は停止する。この現象は古くから接触阻害として知られているが、その分子機構の詳細は不明である。一方、がん細胞ではこの現象は消失している。ポリオウィルス受容体として知られている Necl-5 は細胞の運動や増殖を促進する。しかし、細胞同士の接触によって Necl-5 とネクチン-3 がトランス結合すると、細胞膜表面の Necl-5 はエンドサイトーシスによって減少し、その結果、細胞の運動と増殖が抑制される。以上のことから、Necl-5 は少なくとも接触阻害の制御因子の一つであることが明らかとなっている。一方、種々のがん細胞で Necl-5 は過剰発現しており、この過剰発現の一因は活性型のがん遺伝子産物 Ki-Ras (V12Ki-Ras) による Necl-5 遺伝子プロモーターの転写活性の上昇によることが明らかとなっている。これらのことから、Necl-5 ががん細胞における接触阻害の消失にも関与するのではないかと想定される。そこで、Necl-5 を過剰発現する V12Ki-Ras によって形質転換された NIH3T3 細胞(以下、V12Ki-Ras-NIH3T3 細胞)を用いて、がん細胞の運動と増殖の接触阻害の消失への Necl-5 の関与について解析した。

#### [ 方法ならびに成績 ]

##### I. Necl-5 による細胞の運動と増殖の促進

Necl-5 は V12Ki-Ras-NIH3T3 細胞では過剰発現している。そこで、過剰発現している Necl-5 がこの細胞の運動や増殖を促進しているのか、RNA 干渉法による Necl-5 のノックダウンによって検討した。ボイデンチャンバー法で細胞の運動を測定した結果、Necl-5 がノックダウンされた細胞では運動が低下していた。また、BrdU の取り込みにより細胞の増殖を測定した結果も、Necl-5 がノックダウンされた細胞では増殖が低下していた。以上の結果から、過剰発現された Necl-5 は V12Ki-Ras-NIH3T3 細胞の運動と増殖を促進していることが明らかとなった。

##### II. Necl-5 の細胞表面量およびエンドサイトーシス

V12Ki-Ras-NIH3T3 細胞は、親株の NIH3T3 細胞とは異なりコンフルエントになっても細胞の運動と増殖は抑制されず、重層する。また、親株がコンフルエントになった時、細胞表面の Necl-5 はエンドサイトーシスによって減少する。そこで、V12Ki-Ras-NIH3T3 細胞における細胞密度に依存した Necl-5 の量的変化について検討した。免疫蛍光染色により Necl-5 を染色した結果、V12Ki-Ras-NIH3T3 細胞では細胞密度に依存した Necl-5 の減少は認められなかった。また、細胞表面タンパク質をビオチン化することによって Necl-5 の細胞表面の量を測定した結果も、細胞密度による減少は認められなかった。しかし、Necl-5 のエンドサイトーシスを測定した結果、Necl-5 は細胞密度の上昇に伴ってエンドサイトーシスされていた。以上の結果から、Necl-5 は細胞密度に依存してエンドサイトーシスされるが、V12Ki-Ras による Necl-5 の過剰発現のため、見かけ上、細胞表面の Necl-5 の量は減少しないことが明らかとなった。

### III. ネクチン-3 による Necl-5 のエンドサイトーシス

親株の NIH3T3 細胞において、Necl-5 はネクチン-3 とのトランス結合によってクラスリン依存的にエンドサイトーシスされる。そこで、V12Ki-Ras-NIH3T3 細胞においてもネクチン-3 とのトランス結合によって Necl-5 がエンドサイトーシスされるのか、ネクチン-3 の細胞外領域のリコンビナント蛋白質 Nef-3 を用いて検討した。Nef-3 を加えて V12Ki-Ras-NIH3T3 細胞を培養すると、親株の場合と同様に細胞内部に Necl-5 の点状のシグナルが検出され、Necl-5 がエンドサイトーシスされることが明らかとなった。一方、親株では Nef-3 によって細胞表面の Necl-5 のシグナルが消失したが、V12Ki-Ras-NIH3T3 細胞では消失しなかった。この Nef-3 の効果は、Necl-5 とネクチン-3 のトランス結合を阻害する抗 Necl-5 抗体により阻害された。以上の結果から、V12Ki-Ras-NIH3T3 細胞においても、Necl-5 はネクチン-3 とのトランス結合をきっかけにエンドサイトーシスされることが明らかとなった。

### IV. ネクチン-3 の発現量

V12Ki-Ras-NIH3T3 細胞におけるネクチン-3 の発現量を検討した。その結果、V12Ki-Ras-NIH3T3 細胞では親株の NIH3T3 細胞に比べてネクチン-3 の発現量が顕著に減少していた。

### [ 総 括 ]

V12Ki-Ras によって形質転換された V12Ki-Ras-NIH3T3 細胞では Necl-5 が過剰発現している。この過剰発現している Necl-5 は V12Ki-Ras-NIH3T3 細胞の運動と増殖を促進していた。親株である NIH3T3 細胞では細胞密度に依存して Necl-5 が細胞表面からエンドサイトーシスによって減少する。V12Ki-Ras-NIH3T3 細胞においても細胞密度に依存して Necl-5 のエンドサイトーシスは認められたが、見かけ上、細胞表面の Necl-5 は減少していなかった。V12Ki-Ras-NIH3T3 細胞においても Necl-5 のエンドサイトーシスはネクチン-3 とのトランス結合がきっかけであった。しかし、ネクチン-3 の発現量が親株に比べて顕著に少ないことから、細胞同士が接触しても Necl-5 のエンドサイトーシスは起こりにくくなり、このこともまた Necl-5 の細胞表面の量の維持に貢献していると考えられた。したがって、V12Ki-Ras-NIH3T3 細胞では V12Ki-Ras による Necl-5 の過剰発現とネクチン-3 の減少による Necl-5 のエンドサイトーシスの抑制によって、細胞密度に関係なく細胞表面の Necl-5 が維持され、細胞の運動と増殖を促進し続けていると考えられた。以上の結果から、Necl-5 の過剰発現はがん細胞の接触阻害の消失の一因になっていると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

Necl-5 (Tage4/PVR/CD155) は種々のがん細胞で発現が上昇し、細胞の運動や増殖を制御することが知られている。また、正常細胞においては細胞の運動と増殖の接触阻害において、Necl-5 がその一因となることが明らかにされている。一方、がん細胞においては接触阻害機構は消失している。そこで、本研究では Ras 遺伝子が恒常的に活性化したがん細胞（以下、V12Ras-NIH3T3 細胞）における細胞の運動と増殖の接触阻害の消失に、Necl-5 が関与してい

るかどうかを解析した。

V12Ras-NIH3T3 細胞においては Necl-5 が過剰発現し、運動と増殖を促進していた。また、V12Ras-NIH3T3 細胞でも Necl-5 は nectin-3 とトランスに結合し、エンドサイトーシスされることがわかった。nectin-3 の発現量は NIH3T3 細胞に比べて減少していた。V12Ras による Necl-5 の過剰発現と nectin-3 の減少による Necl-5 のエンドサイトーシスの抑制によって、細胞密度に関係なく細胞表面の Necl-5 が維持され、細胞の運動と増殖を促進し続けることより、がん細胞の接触障害の消失の一因になっていると考えられた。これらの結果は、がんの浸潤転移機構の解明につながるものであり、学位の授与に値すると考えられる。