

Title	Inhibition of cell movement and proliferation by cell-cell contact-induced interaction of Necl-5 with nectin-3
Author(s)	藤戸, 努
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47559
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	藤 戸 努
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 20585 号
学位授与年月日	平成 18 年 4 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Inhibition of cell movement and proliferation by cell-cell contact-induced interaction of Necl-5 with nectin-3 (Necl-5 とネクチン-3 のトランス結合による細胞の運動と増殖の接触阻害)
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、細胞の運動と増殖が停止する。この現象は古くから接触阻害として知られている。一方、がん化した細胞ではこの機構は消失している。細胞の運動と増殖の接触阻害は、生理的にも病理的にも重要な現象であるが、その制御機構は未だ明らかではない。私の所属する研究室では、ポリオウィルスの受容体として同定された分子 Necl-5 が増殖因子受容体やインテグリンと協調して細胞の運動と増殖を促進することを明らかにしている。また、Necl-5 は、自身同士ではトランス結合できないが、細胞間接着形成に重要な働きをする接着分子ネクチン-3 とトランス結合することを明らかにしている。今回私は、細胞の運動、増殖、接着を制御する Necl-5 とネクチン-3 に着目し、これらの分子の細胞の運動と増殖の接触阻害への関与について検討した。

〔 方法ならびに成績 〕

I. 細胞密度に依存した Necl-5 のダウンレギュレーション

細胞密度の上昇に伴う細胞表面の Necl-5 の量の変化を、細胞表面タンパク質のビオチン化法によって測定した。マウス線維芽細胞 NIH3T3 細胞をスパースに撒くと、時間経過に伴って増殖し、やがてコンフルエントになる。それぞれの時間における Necl-5 の量を測定したところ、細胞密度の上昇に伴って Necl-5 がダウンレギュレーションされていた。一方、NIH3T3 細胞には接着分子ネクチン-1、-3 と N-カドヘリンが発現しているが、これらの量に変化はなかった。また、あらかじめ異なる密度で細胞を撒いて培養した場合も、密度が高いと Necl-5 はダウンレギュレーションされていた。これらの現象は、免疫蛍光染色や FACS 解析においても確認された。以上の結果から、Necl-5 は細胞密度に依存してダウンレギュレーションされることが明らかとなった。

II. ネクチン-3 とのトランス結合による Necl-5 のダウンレギュレーション

Necl-5 はネクチン-3 とトランス結合することから、両者の結合が Necl-5 のダウンレギュレーションを制御している可能性について検討した。Necl-5 とネクチン-3 のトランス結合を阻害する抗 Necl-5 抗体を加えて、NIH3T3 細胞

を培養した。その結果、細胞密度に依存した Necl-5 のダウンレギュレーションが抑制された。RNA 干渉法によりネクチン-3 のノックダウンを行った場合も、細胞密度に依存した Necl-5 のダウンレギュレーションが抑制された。さらに、ネクチン-3 の細胞外領域のリコンビナントタンパク質 Nef-3 を加えて培養した細胞では、細胞表面に局在する Necl-5 のシグナルが減少していた。以上の結果から、Necl-5 のダウンレギュレーションは、ネクチン-3 との結合がきっかけとなって起こることが明らかとなった。

III. エンドサイトーシスによる Necl-5 のダウンレギュレーション

前述 (II.) のように NIH3T3 細胞に Nef-3 を加えて培養した時、細胞膜表面の Necl-5 のシグナルは減少した。しかし一方では、細胞の内側に Necl-5 の点状のシグナルが検出された。そこで、Necl-5 がネクチン-3 との結合をきっかけに、細胞内に取り込まれている可能性について検討した。細胞に Nef-3 を加えて培養した後、細胞表面の Necl-5 の染色を試みたところ、Necl-5 の点状のシグナルは検出できなかった。このことから、Necl-5 の点状のシグナルは細胞内に局在することが明らかとなった。また、エンドサイトーシス解析においても、Necl-5 は Nef-3 によ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 はエンドサイトーシスによってダウンレギュレーションされていることが明らかとなった。

IV. クラスリン依存性の Necl-5 のエンドサイトーシス

エンドサイトーシスには、クラスリン依存性のエンドサイトーシスと非依存性のエンドサイトーシスがある。Epsin と Eps15 はクラスリン依存性のエンドサイトーシスを、Caveolin はクラスリン非依存性のエンドサイトーシスを、Dynamamin は両方のエンドサイトーシスをそれぞれ制御している。そこで、これらのドミナントネガティブ変異体を発現させた NIH3T3 細胞を高密度で培養し、Necl-5 のダウンレギュレーションについて検討した。その結果、Epsin、Eps15、Dynamamin のドミナントネガティブ変異体によって、Necl-5 のダウンレギュレーションが抑制された。以上の結果から、Necl-5 はクラスリン依存性のエンドサイトーシスによりダウンレギュレーションされることが明らかとなった。

V. Necl-5 のダウンレギュレーションによる細胞の運動と増殖の抑制

細胞の運動や増殖に対する Necl-5 のダウンレギュレーションの影響を、Necl-5 を RNA 干渉法によりノックダウンすることで検討した。ボイデンチャンパー法で細胞の運動量を測定した場合、Necl-5 がノックダウンされた細胞では顕著に運動量が低下した。また、BrdU の取り込みにより増殖を測定した場合も、Necl-5 がノックダウンされた細胞では増殖が低下した。一方、抗 Necl-5 抗体やネクチン-3 をノックダウンすることにより Necl-5 のダウンレギュレーションを抑制した場合、細胞の運動や増殖の接触阻害が抑制された。以上の結果から、細胞密度に依存した Necl-5 のダウンレギュレーションは細胞の運動と増殖の抑制を制御していることが明らかとなった。

[総 括]

Necl-5 は、細胞同士の接触によりネクチン-3 とトランス結合し、その結合がきっかけとなりクラスリン依存性のエンドサイトーシスによって細胞膜表面からダウンレギュレーションされることが明らかとなった。また、その結果として、細胞の運動と増殖が抑制されることも明らかとなった。同様の結果が、マウス初期胚由来線維芽細胞の初代培養においても得られている。以上の結果から、Necl-5 とネクチン-3 が細胞の運動と増殖の接触阻害を制御していると考えられた。また、Necl-5 は種々のがんが発現が上昇していることが報告されていることから、がんにおける接触阻害機構の破綻の一因となっていると考えられた。

論文審査の結果の要旨

正常細胞はスパース (疎) な状態では活発に運動と増殖をするが、コンフルエントになると細胞間接着が形成され、

細胞の運動と増殖が停止する。この現象は古くから細胞の運動と増殖の接触阻害、いわゆる **Contact Inhibition** として知られている。一方、がん化した細胞では **Contact Inhibition** は消失している。この現象は、生理的にも病的にも重要であるが、その制御機構は未だ明らかでない。申請者は、細胞の運動と増殖を制御する免疫グロブリン様分子 **Necl-5** が細胞間接着分子ネクチン-3 とトランス結合することに着目し、これらの分子の細胞の **Contact Inhibition** への関与について解析した。その結果、申請者は、**Necl-5** が細胞同士の接触によりネクチン-3 とトランス結合し、その結合がきっかけとなりクラスリン依存性のエンドサイトーシスによって細胞膜表面からダウンレギュレーションされることを明らかにした。また、その結果として、細胞の運動と増殖が抑制されることも明らかにした。以上の結果から、**Necl-5** とネクチン-3 が **Contact Inhibition** を制御していると考えられた。

本研究は、細胞の運動や増殖の分子メカニズムを解明する上で重要であり、実験結果自体の意義だけでなく、今後のがん研究への発展性も期待できる。したがって、博士（医学）の学位授与に値する。