Osaka University Knowledge Archive

Title	Overexpression of ADAM 9 enhances growth factor-mediated recycling of E-cadherin in human colon cancer cell line HT29 cells
Author(s)	平尾, 隆文
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48981
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【55】

氏　　　　　名	平　尾　隆　文（ひら　お　たか　ふみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２１６０３　号
学位授与年月日	平成 19 年 9 月 26 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	Overexpression of ADAM 9 enhances growth factor-mediated recycling of E-cadherin in human colon cancer cell line HT29 cells （ヒト大腸癌細胞株 HT29 において ADAM9 高発現は増殖因子による E-cadherin の細胞膜への recycling を増強させる）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　門田　守人 （副査） 教　授　青笹　克之　　教　授　野口眞三郎

論　文　内　容　の　要　旨

（目的）

癌転移の過程には、癌細胞の原発巣からの離脱と標的臓器への接着という一見背反するプロセスが存在する。これに対応して最も強力な細胞間の接着分子である E-cadherin が原発巣で一時的に機能を喪失し、転移巣では回復する現象が知られており、E-cadherin のダイナミックな制御が考えられている。E-cadherin を制御する多くの因子の中で、増殖因子によるチロシンキナーゼ刺激は、癌の浸潤転移を促進することが臨床的基礎的によく知られているが、詳細なメカニズムは明らかにされていない。今回、増殖因子 HB-EGF による E-cadherin の変化において膜型 metalloprotease である ADAM9（a disintegrin and metalloprotease9）がどのように関与しているかを明らかにしょうと検討した。

（方法ならびに成績）

Metalloprotase inhibitor による細胞 scattering の抑制

ヒト大腸癌細胞株 HT29 を増殖因子 HB-EGF（heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor）で刺激すると細胞が scattering することが確認された。ここに metalloprotease inhibitor を添加するとその scattering が抑制されることがわかった。HB-EGF で刺激された E-cadherin の局在を免疫染色にて観察すると、細胞膜における発現レベルの著明な減弱が認められた。

ADAM9 高発現による細胞 scattering の促進

HT29 に ADAM9 を遺伝子導入により高発現させ、細胞 scattering に対する影響を検討した。ADAM9 を高発現した HT29 細胞（以下 A9w）を HB-EGF で刺激すると scattering は著明に増強した。しかし、ADAM9 の metalloprotease domain に point mutation をいれた dominant negative type を高発現させた HT29 細胞（以下 A9m）では HB-EGF で刺激しても scattering は増強されなかった。また A9w に metalloprotease inhibitor を添加すると HB-EGF による scattering の増強が抑制された。

細胞 scattering に伴う E-cadherin の変化

scattering が生じた過程で、細胞膜に存在する E-cadherin がどのように変化するかを検討する目的で、免疫沈

降法を用いて細胞膜、細胞内の E-cadherin を同定した。A9w では、HB-EGF で刺激すると E-cadherin の著明な細胞膜からの down-regulation が観察され、一方、E-cadherin の細胞内プールは経時的に著しく増加した。つまり、細胞膜上の E-cadherin の down-regulation は internalization によるものと考えられた。しかし、A9m では HB-EGF で刺激しても internalization は促進されなかった。また、A9w の HB-EGF 刺激による E-cadherin の internalization は metalloprotease inhibitor を添加することにより抑制された。

つまり E-cadherin の internalization は、ADAM9 に依存性で metalloprotease inhibitor で抑制されることにより、ADAM9 の metalloprotease 活性が増殖因子の刺激による、E-cadherin の internalization に必要であることが示唆された。

ADAM9 の metalloprotease 活性による E-cadherin の細胞膜への recycling の促進

細胞内に internalization した E-cadherin は ubiquitination を受け分解される。A9w では、HB-EGF 刺激により internalization を促進された E-cadherin は、ubiquitination されず、大部分が細胞膜に recycling することが免疫沈降法で確認された。一方、A9w では親株と同様に HB-EGF で刺激され internalization した E-cadherin は、ubiquitination され、細胞膜に recycling されることはなかった。つまり、ADAM9 の metalloprotease 活性が、E-cadherin の ubiquitination を抑制し細胞内で破壊されず、細胞膜への recycling を促進させることが示唆された。

（総括）

増殖因子刺激は ADAM9 の metalloprotease 活性を介して E-cadherin の細胞内への internalization を促進させる一方で、その後の過程では、細胞内での分解を抑制し細胞膜への recycling を促進させた。すなわち、このカスケードは細胞間接着を一時的に強く抑制するが、それは可逆的に回復される。これは転移においてしばしば観察される現象で、理論的にも合目的に作用する。ADAM9 は転移制御の key molecule として治療標的としての可能性が期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

癌転移では原発巣における細胞接着の喪失と標的臓器での細胞接着の回復という現象が sequential に起きている。その分子メカニズムとして接着間分子 E-cadherin が増殖因子刺激により細胞内へ internalization を起こして一時的に機能を喪失するということが知られている。一方、ADAM9（a disintegrin and metalloprotease9）は基礎実験、臨床的観察より転移に関与することが想定されているが、その機序は明らかになっていない。そこで今回増殖因子による E-cadherin の機能制御において ADAM9 がどのような影響を与えるかを検討した。ADAM9 はその metalloprotease 活性を介して増殖因子 HB-EGF（heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor）による E-cadherin の internalization を促進させた。また、HB-EGF により internalization した E-cadherin の多くはユビキチンープロテアゾームで分解されるが、ADAM9 は E-cadherin のユビキチン化を阻害し、その結果 E-cadherin の多くは細胞膜へ recycling された。すなわち、増殖因子による E-cadherin の機能制御において、ADAM9 は機能喪失と機能回復の双方を促進することが明らかになった。本研究は、ADAM9 が増殖因子による E-cadherin の機能制御の修飾因子として関わることを明らかにしたもので、今後癌転移のメカニズムのひとつとしてさらなる研究の展開が期待されるものである。よって本研究は学位の授与に値するものと考えられる。