The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	口腔扁平上皮癌細胞の遊走能におけるbeta-catenin経路の関与
Author(s)	米川, 敦子
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49788
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

【８】

氏　　名	米川敦子（よねかわあつこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２２８３０　号
学位授与年月日	平成21年３月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学　位　論　文　名	**口腔扁平上皮癌細胞の遊走能における beta-catenin 経路の関与**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　由良　義明 （副査） 教　授　上﨑　善規　　准教授　小川　裕三　　准教授　大倉　正也

論　文　内　容　の　要　旨

【研究目的】

Wnt シグナル伝達経路は個体の発生過程において様々な役割を担っている。Wnt シグナル伝達経路は, beta-catenin 経路, PCP 経路, Ca^{2+}経路の 3 つの経路があるが, その中心をなすのがbeta-catenin経路であり, 成体においても, 細胞の増殖や分化の制御に重要とされている。大腸癌を始め多くの癌では, APC/axin, beta-catenin の変異や過剰発現などがあり, この経路の恒常的な活性化が癌化に寄与すると考えられている。実際, 数多くの癌で beta-catenin の細胞質や核での異常集積, Tcf/Lef の転写活性の亢進が知られており, 口腔扁平上皮癌でも beta-catenin の核や細胞質での集積, 癌浸潤先端部での beta-catenin の集積が認められている。一方, 近年, beta-catenin 経路の標的遺伝子として, 細胞の運動や浸潤に関わる遺伝子の存在が報告されている。しかし, 口腔扁平上皮癌で浸潤や転移と beta-catenin 経路との関連性を明らかにした研究は少ない。そこで, 本研究では beta-catenin の細胞内集積が口腔扁平上皮癌細胞の浸潤と転移に寄与する遊走能に及ぼす影響について解析を行った。

【材料と方法】

1.ヒトの口腔扁平上皮癌細胞として Ca9-22, C1, C5 を用いた。C1, C5 は beta-catenin が細胞膜に局在する Ca9-22 を親株として, beta-catenin が分解される際にリン酸化を受ける部位である exon3 を欠失した変異型 beta-catenin 遺伝子をトランスフェクションして樹立された stable cell line で, beta-catenin が核と細胞質に集積する。変異型 beta-catenin 遺伝子は Tet-off system で制御されるため, ドキシサイクリン存在下では遺伝子発現が off となる。

2.細胞遊走能は, transwell chamber assay, wound healing assay にて測定した。

3.アクチン細胞骨格は, ファロイジンによる蛍光免疫染色法にて観察した。

4.低分子量 G 蛋白の活性は, cell lysate を活性型 Rho family 分子のエフェクター分子に存在する DNA 結合領域を持つグルタチオンセファロビーズと反応させ, 低分子量 G 蛋白に対する抗体を用い, Western blotting で検出した。

5. beta-catenin-Tcf/Lef 複合体による転写活性は, Tcf の DNA 結合領域をホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだ TOP flash をトランスフェクションし, luciferase repoter gene assay にて測定した。

6.Tcf/Lef の転写活性の阻害するために, beta-catenin との結合部位に変異がある dominant negative Tcf4 遺伝子をトランスフェクションした。

7. Wnt ファミリーの発現については, Ca9-22, C1, C5 から RNA を抽出し, それぞれの Wnt 遺伝子に特異的なプライマーを設定して半定量 RT-PCR を行った。

【結果】

1. 変異型 beta-catenin 遺伝子を導入したトランスフェクタント C1, C5 は, 親株である Ca9-22 と比して, 紡錘形を呈し, いずれも細胞間接着が疎なコロニーを形成した。細胞遊走能につき, transwell chamber assay で膜通過細胞数を算定すると, C1, C5 は親株に比して, 有意に高値を示した。ドキシサイクリンで変異型 beta-catenin の発現を off にすると, これらの値は低下した。また, wound healing assay では C1, C5 は 48 時間で傷は修復されたが、Ca9-22 では修復されなかった。

2. アクチン細胞骨格を蛍光免疫染色したところ, C1, C5 では, ストレスファイバーが伸展し, 細胞周囲に仮足様の突起が認められた。

3. 低分子量 G 蛋白質 Rho family 分子の活性を測定した結果, C1 , C5 において, Cdc42 と Rac で活性化が認められた。低分子量 G 蛋白質阻害剤である Clostridium difficile ToxinB 存在下に transwell chamber assay を行うと, 膜通過細胞数は低下した。

4. beta-catenin-Tcf/Lef 複合体による転写活性化を測定すると, C1, C5 は親株よりも転写

活性は高値を示した。また，ドキシサイクリン存在下でその活性は低下した。

5. beta-catenin-Tcf/Lef 複合体を阻害する dominant negative Tcf4 を C1, C5 にトランスフェクションすると細胞形態は丸みを帯び，ストレスファイバーの伸展が不明瞭になった。また, transwell chamber assay における膜通過細胞数も低下した。
6. Wnt 遺伝子の発現について, C1, C5 で半定量 RT-PCR を行ったところ, Wnt5a の発現上昇が認められ，ドキシサイクリンによって beta-catenin の細胞内集積を抑制するとその発現は低下した。

【考察】

変異型 beta-catenin 遺伝子を導入したトランスフェクタント C1, C5 は紡錘形となり，細胞遊走能の亢進がみられた。ストレスファイバーは伸展し，細胞辺縁では仮足の形成がみられ，細胞骨格の再構成が観察された。アクチン細胞骨格を制御する低分子量 G 蛋白質では，仮足の形成にかかわる Cdc42 と Rac の活性が上昇しており，その活性化が C1, C5 における細胞形態や細胞運動性に関与すると考えられた。また，これら細胞では beta-catenin-Tcf/Lef 複合体の転写活性の亢進が確認され，しかも，活性の亢進を dominant negative Tcf4 で阻害すると，細胞形態の変化や遊走能の亢進が失われることから，核内に移動した変異型 beta-catenin は Tcf/Lef の転写活性化を介して遊走能を亢進させるものと考えられた。Wnt の中には発癌よりも細胞の浸潤や運動に重要な役割を果たすものが知られている。Wnt シグナルを開始する Wnt の発現を調べたところ, C1, C5 において, Wnt5a の発現上昇がみられ，ドキシサイクリンによって beta-catenin の細胞内集積を抑制すると, Wnt5a の発現も低下したたことより, beta-catenin の細胞内集積が Wnt5a の発現に影響を及ぼすことが示唆された。以上より, C1, C5 では beta-catenin 経路の活性化を通じて，Wnt5a 遺伝子の発現が亢進し，これがオートクライン機構で細胞外から作用し, Wnt5a 受容体からのシグナルを介して, Rac や Cdc42 が活性化され，細胞形態や細胞運動性が変化するものと推察された。

このように beta-catenin 経路は，口腔扁平上皮癌細胞の遊走能に深く関与することが明らかとなったが，他のシグナルとも複雑なクロストークを持つと思われる。今後は Tcf/Lef を介する標的遺伝子の検索や他のシグナルとの具体的な関連を解明する必要がある。

論文審査の結果の要旨

本研究は，Wnt シグナル伝達経路を構成する因子のなかで癌細胞に集積するとされる beta-catenin の役割を明らかにするために，beta-catenin を遺伝子導入した口腔扁平上皮癌細胞を用いて，その性状を解析したものである。

その結果，beta-catenin を細胞内で集積させた細胞では，遊走能の亢進，アクチン細胞骨格の再構成，低分子量 G 蛋白質の活性化，Tcf/Lef の転写活性化ならびに Wnt5a の発現亢進を認め，beta-catenin の細胞内集積が癌細胞の浸潤・転移に必要な遊走能の変化を引き起こすことを明らかにした。

これらの知見は，口腔扁平上皮癌の浸潤・転移のメカニズムを解明する上で貴重な示唆を与えるものであり，博士(歯学)の学位授与に値するものと認める。