OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Wnt5a promotes cancer cell invasion and proliferation by receptor-mediated endocytosis-dependent and -independent mechanisms,respectively
Author(s)	庄嶋, 健作
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51903
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	庄嶋　健作
論文題名 Title	Wnt5a promotes cancer cell invasion and proliferation by receptor-mediated endocytosis-dependent and -independent mechanisms, respectively (受容体エンドサイトーシスを介して癌の浸潤に関与する Wnt5a シグナルが、エンドサイトーシス非依存性に癌の増殖を促進する)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

Wnt5a は β-カテニン非依存性経路を活性化する代表的リガンドである。これまでに我々は Wnt5a の過剰発現が胃癌や前立腺癌の悪性化、特に浸潤、転移に関与することを明らかにしてきた。また Wnt5a に中和活性を持つポリクローナル抗体 (pAb5a-5) を作製し、Wnt5a 依存性の受容体エンドサイトーシスを抑制することで、胃癌細胞の浸潤、転移を阻害することを示した。一方、胃癌や前立腺癌の検討で、Wnt5a は細胞増殖とは関与しないと考えられてきた。しかし近年、Wnt5a の発現がある種の癌細胞の増殖に関わることが報告されてきている。そこで今回我々はポリクローナル抗体と比較し、量的にも質的にも安定に供給できる抗 Wnt5a モノクローナル抗体 (mAb5A16) を作製し、Wnt5a が癌細胞増殖をどのような機構で制御するかを明らかにすることを目的に実験を行った。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

ファージディスプレイ法を用いて mAb5A16 を単離・精製し、エピトープ解析を行った。mAb5A16 は Wnt5a の 211-217 アミノ酸残基 (YESARIL)、pAb5a-5 は 281-287 アミノ酸残基 (RGKLVQV) をエピトープ部位としており、これらは立体構造的に近い位置に存在していた。

胃癌由来の KKLS 細胞を用いて、mAb5A16 の機能解析を行ったところ、Wnt5a 依存性の受容体エンドサイトーシス、Rac の活性化を阻害した。次に、mAb5A16 の浸潤、転移に対する影響を検討したところ、*in vitro* で浸潤、転移を抑制した。また、ヌードマウスの脾臓被膜下に KKLS 細胞を移植し、肝転移を評価したところ、mAb5A16 投与により肝転移の抑制を認めた。

Wnt シグナルは、Wnt が受容体に結合した後エンドサイトーシスを引き起こすことで、そのシグナルが細胞内に伝達されると考えられている。これまで我々は、Wnt5a による受容体のエンドサイトーシスを観察してきたが、Wnt5a 自体のエンドサイトーシスを観察することはできていなかった。そこで、リジン残基内のアミノ基を蛍光標識する AlexaFluor 546 carboxylic acid succinimidyl ester で精製した Wnt5a をラベルし、Wnt5a 自体のエンドサイトーシスを蛍光免疫染色により観察した。その結果、蛍光ラベル Wnt5a は細胞膜表面上に存在する受容体 Frizzled2 (Fz2) に結合後、Fz2 と共にエンドサイトーシスされる様子が観察できた。ここに mAb5A16 を添加すると、このエンドサイトーシスは阻害されることが明らかとなった。

子宮頸癌由来の HeLaS3 細胞や肺癌由来の A549 細胞では Wnt5a が高発現しており、これらの癌細胞で Wnt5a のノックダウンを行うと胃癌細胞とは異なり、その増殖が抑制され、一方で Wnt5a を過剰発現すると増殖が亢進することが確認された。また、ヌードマウスの皮下に shRNA を用いて Wnt5a の発現を恒常的に抑制した A549 細胞を移植したところ、有意に腫瘍塊の増殖が阻害されることが確認できた。

これらの細胞では、Wnt5a 受容体である Fz2 や Ror1/2 の発現抑制を行うことで増殖の抑制を認めたが、mAb5A16 やクラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤 monodansylcadaverin (MDC) の処理では増殖阻害が認められなかった。このことから、Wnt5a は受容体エンドサイトーシスを介さない経路で、増殖を制御していることが示唆された。そこで、これまでに Wnt5a に関連して増殖に関わることが報告されている分子を、siRNA を用いて探索した。その結果、Wnt5a のノックダウンによって Src Family kinase (SFK) のリン酸化が減弱し、Wnt5a の過剰発現細胞株ではリン酸化の増強が観察された。また、Src の発現抑制で、HeLaS3 細胞や A549 細胞の増殖は抑制されたが、mAb5A16 や MDC 処理では SFK のリン酸化は阻害されなかった。以上の結果から、これらの細胞株において Wnt5a はエンドサイトーシスを介さない機構で SFK を活性化し、癌細胞の増殖を制御すると考えられた。

〔総　括(Conclusion)〕

mAb5A16 を作製し、その機能評価を行なった。この抗体は Wnt5a 依存性受容体エンドサイトーシスを阻害することで、癌細胞の転移・浸潤を阻害した。胃癌細胞や前立腺癌細胞以外のいくつかの癌細胞種では、Wnt5a シグナルは細胞運動だけではなく、増殖も制御することが判明した。Wnt5a シグナルはエンドサイトーシスを介さない機構で SFK を活性化し、癌細胞の増殖を制御することが判明した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）庄嶋　健作

論文審査担当者	（職）	氏名
主　査	大阪大学教授	菊池　章
副　査	大阪大学教授	宮崎純一
副　査	大阪大学教授	森　正樹

論文審査の結果の要旨

Wnt5a は癌の悪性化と関連することが知られ、癌治療につながる分子標的として研究が進められている。本研究では、抗 Wnt5a モノクローナル抗体を新規に作成し、Wnt5a 依存性の受容体のエンドサイトーシスを阻害することで、転移能を抑制することを示した。また、ある種の癌細胞では、Wnt5a シグナルが運動能だけでなく、増殖能の制御にも関わることを示した。そのメカニズムとして、Wnt5aシグナルはエンドサイトーシスを介さない機構で Src Family Kinases を活性化し、癌細胞の増殖能を制御することを、Wnt5a モノクローナル抗体や、クラスリン依存性のエンドサイトーシス阻害剤である Monodansylcadaverin を用いて明らかにした。

以上、抗 Wnt5a モノクローナル抗体を用いて、Wnt5a の癌細胞における機能を解析した本研究は、癌研究における新たな知見と考えられ、博士(医学)の学位授与に値すると考えられる。