

論文内容の要旨

申請者氏名 谷 直之

細胞接着および細胞移動は、胚における形態形成、炎症反応、創傷治癒、腫瘍の浸潤、転移、および組織構造の維持といった様々な生命現象に関与することが知られている。このような多様な機能は、インテグリンをはじめとする接着分子、プロテアーゼとそのインヒビター、および細胞外マトリックス蛋白質間の相互作用によってもたらされる。特に、正常および癌細胞の接着や移動といった現象には、インテグリンを介した細胞外マトリックス蛋白質への接着による足場の確保とプロテアーゼによるマトリックス蛋白質の分解が重要であることが明らかにされている。以上の観点から本研究では、当研究室においてマウス脳からクローニングされた新規セリンプロテアーゼ、ニューロプシンおよび癌転移過程におけるインテグリンの役割に関して以下の 2つの研究テーマに沿って実験を行った。

1 ニューロプシンにより切断されたフィブロネクチンの細胞接着、遊走に対する影響

マウス脳からクローニングされた新規セリンプロテアーゼ、ニューロプシンは、フィブロネクチンを効果的に切断する分泌型蛋白質である。フィブロネクチン切断によるマトリックス中の微小環境を変化させることにより、細胞接着や遊走に影響を及ぼしている可能性が考えられた。Chinese hamster ovary (CHO)細胞に特定のインテグリンをトランスフェクトした細胞を用いて、フィブロネクチンに対する接着性や遊走性に及ぼすニューロプシンの影響を検討した。フィブロネクチンに対する接着実験では、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ を発現させた $\alpha 5B2$ 細胞において、ニューロプシンにより切断されたフィブロネクチンに対する接着性が、未切断のフィブロネクチンを用いた場合と比較して、30%程度減少した。一方、フィブロネクチンに対する遊走実験 (Boyden chamber chemotaxis assay)では、フィブロネクチンによって誘導される $\alpha 5B2$ 細胞の遊走性の亢進は、ニューロプシン処理により切断されたフィブロネクチンを用いた場合においても変化しなかった。また、フィブロネクチン以外のコラーゲンやラミニンを用いた場合、およびインテグリン $\alpha 2\beta 1$ を発現する $\alpha 2B2$ 細胞を用いた場合においても、ニューロプシン処理による影響は認められなかった。

これらの結果から、ニューロプシンはフィブロネクチンを切断し、細胞の接着性を減弱させることによって細胞とマトリックス間の微小環境を制御している可能性が示唆された。

2 腫瘍細胞におけるインテグリン $\alpha 5$ 発現量の腎転移率に対する影響

臨床において、癌には原発部位の違いによって転移しやすい臓器があることが知られている。我々は、インテグリンが癌転移の臓器特異性に関与している可能性を想定した。インテグリン $\alpha 5\beta 1$ を様々なレベルで発現しているChinese hamster ovary (CHO)細胞をヌー

ドマウスに接種し自然転移実験を行った。原発巣の増殖性に関しては、これまでの報告と同様に CHO細胞における $\alpha 5$ の発現量に対して逆相関性を示した。また、一定期間後にマウスを解剖し転移臓器を検索した結果、肺、リンパ節、および副腎への転移率は、CHO細胞における $\alpha 5$ の発現量の差異によって変化しなかった。一方、腎臓への転移率は、 $\alpha 5\beta 1$ を過剰発現する $\alpha 5B2$ 細胞を接種したヌードマウスで 40%、内在性のレベルで $\alpha 5\beta 1$ を発現する CHO-K1細胞では 20%、 $\alpha 5$ 欠失変異体である CHO-B2細胞では 0%であった。なお、 $\alpha 5\beta 1$ の発現量が最も高い $\alpha 5$ CHO細胞は原発巣自体を形成しなかったため、転移も認められなかった。これらの結果から、癌細胞における $\alpha 5$ の発現には、転移形成に適した発現量が存在することが示唆された。腎臓において微小転移を検索した結果、認められた転移巣はすべて糸球体に形成されていた。腎臓の凍結組織を用いた接着実験では、 $\alpha 5$ を発現していない CHO-B2細胞が接着しなかったのに対して、 $\alpha 5$ を過剰発現している $\alpha 5B2$ 細胞は効率的に接着した。*in vivo*で見られた腎転移と *ex vivo*で見られた $\alpha 5B2$ 細胞の糸球体への接着は、共に GRGDS ペプチド添加によって有意に抑制された。

これらの結果から、癌細胞に発現する $\alpha 5\beta 1$ と糸球体内に存在するフィブロネクチンの相互作用の結果、腎転移が形成された可能性が高いと考えられた。また、癌細胞におけるインテグリンの発現量には、転移形成に適した発現量が存在することが示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 谷 直之

細胞接着および細胞移動は、生命現象のあらゆる局面において見られる。神経の可塑的变化時におけるシナプス微小環境の変化や癌の浸潤、転移などの現象には、インテグリンを介した細胞の細胞外マトリックスに対する接着とプロテアーゼ分泌による細胞外マトリックスの分解が重要であると考えられている。従って、これらの分子メカニズムを理解することは、記憶や学習能力が低下することで知られるアルツハイマー病や癌の浸潤、転移の進行を阻止する上で重要である。以上の観点から本研究では、当研究室においてマウス脳からクローニングされた新規セリンプロテアーゼ、ニューロプシンおよび癌転移過程におけるインテグリンの役割に関して2つの研究テーマを設定し、以下に示す成果をあげた。

1) ニューロプシンによるフィブロネクチンの分解が、細胞の接着性や運動性にどのような影響を与えるかを *in vitro* の実験系 (adhesion assay および Boyden chamber assay) を用いて検討した。その結果、ニューロプシンによるフィブロネクチンの分解は、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介した細胞の接着性を減弱させることが明らかとなった。

2) 癌細胞におけるインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ の発現変化が、癌の転移性にどのような影響を及ぼすかを、動物実験と上述した *in vitro* 実験系を用いて検討した。その結果、癌細胞上のインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ と糸球体中のフィブロネクチンが相互作用することによって、腎転移が形成される可能性があることが強く示唆された。また、癌の転移性とインテグリンの発現量の関係については、転移形成に適した発現レベルが存在することが示唆された。

以上のように、本論文は細胞接着、細胞移動におけるプロテアーゼ、ニューロプシンと接着分子インテグリンの機能を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。