

論文内容要旨

口腔扁平上皮癌細胞におけるインテグリン $\beta 6$ の
蛋白翻訳後修飾の解析と浸潤・増殖における関与

応用生命科学部門 分子口腔医学・顎顔面外科学

(主指導教員：岡本 哲治 教授)

基礎生命科学部門口腔顎顔面病理病態学

(副指導教員：高田 隆 教授)

総合健康科学部門歯科麻酔学

(副指導教員：入船 正浩 教授)

藤井 隆彦

論文内容要旨

論文題目 口腔扁平上皮癌細胞におけるインテグリン $\beta 6$ の蛋白翻訳後修飾の解析と浸潤・増殖における関与

学位申請者 藤井 隆彦

【目的】

がん化やがんの増殖は、がん細胞自身の特性のみならず、細胞外基質蛋白などの周囲の間質成分との相互作用によって制御されている。インテグリンは α 鎖と β 鎖からなるヘテロ二量体として細胞膜上に存在し、細胞外基質との相互作用により細胞の接着や運動能を制御している。特にインテグリン αv ファミリーは、がん細胞の運動能のみならず蛋白分解活性を調節し、がんの浸潤・転移に密接に関与していると考えられている。本研究では、インテグリン αv を唯一のカウンターパートとする $\beta 6$ の蛋白翻訳後修飾機構の解析と、 $\alpha v\beta 6$ が扁平上皮癌細胞の浸潤・増殖に与える影響について検討した。

【方法】

実験には、外陰部扁平上皮癌細胞株 A431 を用いた。A431 に $\beta 6$ 蛋白を一過性に発現誘導させるため、テトラサイクリン(Tet)発現誘導システムを使用した。すなわち、Tet 誘導性発現プラスミド pcDNA4/T0 に $\beta 6$ の cDNA を組み込んだ pcDNA4/T0/ $\beta 6$ を作製し、Tet リプレッサー発現ベクター pcDNA6/TR とともに A431 に導入し、A431 $\beta 6$ -On を分離した。Tet 処理により A431 $\beta 6$ -On に $\beta 6$ を発現誘導させた後、さらに Tet 非存在下で培養した $\beta 6$ の mRNA 及び蛋白の継続的発現変化を、それぞれ RT-PCR 及びウエスタンブロットで解析し、 $\beta 6$ の転写後および翻訳後修飾を検討した。さらに、 $\beta 6$ 発現に及ぼす αv の影響を検討する

ため、哺乳動物発現ベクターpCI-neoに αv cDNAを組み込んだpCI-neo/ αv を作製した。A431 $\beta 6$ -0nにpCI-neoまたはpCI-neo/ αv を導入し、それぞれA431mock/ $\beta 6$ -0nまたはA431 αv / $\beta 6$ -0nを分離した。

$\beta 6$ 蛋白の細胞内での局在を検討するため、各細胞から細胞質蛋白、膜蛋白、核蛋白、クロマチン結合蛋白及び細胞骨格蛋白の各分画抽出し、各細胞画分中の $\beta 6$ 蛋白をウエスタンブロットで解析した。

インテグリン $\alpha v\beta 6$ の、扁平上皮癌細胞の浸潤・増殖に与える影響を検討するため、Tet存在下でのA431 αv / $\beta 6$ -0nの細胞運動能をBoyden chamberの変法にて解析するとともに、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)活性をゼラチンザイモグラフィにて検索した。さらにA431 αv / $\beta 6$ -0nのTet存在下あるいは非存在下でのin vitro及びin vivoにおける増殖能についても検討した。

【結果】

1. Tet処理により、A431 $\beta 6$ -0nは、 $\beta 6$ のmRNA及び蛋白発現が誘導されたが、Tet非存在下で培養すると、いずれも経時的に発現量が低下し、12時間後にmRNA発現が消失し、24時間後には $\beta 6$ 蛋白発現もほぼ消失した。
2. A431 $\beta 6$ -0nで一過性に誘導された $\beta 6$ 蛋白の、Tet非存在下での発現低下は、リソソーム阻害剤pepstatinAやカルパイン阻害剤ALLNでは抑制されなかったが、プロテアソーム阻害剤MG132あるいはLactacystinにより、 $\beta 6$ 蛋白の発現低下を抑制した。
3. A431 $\beta 6$ -0nで、発現誘導された $\beta 6$ 蛋白の大部分は膜画分中に存在したが、Tet非存在下では、膜画分中の $\beta 6$ 蛋白量は低下した。これに対し、MG132処理A431 $\beta 6$ -0nでは、膜画分中の $\beta 6$ 蛋白発現の低下はみられなかった。
4. Tet処理で誘導されたA431mock/ $\beta 6$ -0nにおける $\beta 6$ mRNA発現は、Tet非存

在下では12時間後には消失し、 $\beta 6$ 蛋白の発現も低下した。一方、A431mock/ $\beta 6$ -0n における $\beta 6$ mRNA 発現は、Tet 非存在下では同じく 12 時間後には消失したが、 $\beta 6$ 蛋白発現は維持されていた。

5. Tet 処理により、A431 $\alpha v / \beta 6$ -0n の運動能が低下するとともに、同細胞の matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 活性も抑制された。
6. Tet 処理は、A431 $\alpha v / \beta 6$ -0n の *in vivo* での細胞増殖能には影響を与えなかったが、Tet 投与ヌードマウスでの造腫瘍能は低下した。

[結語]

インテグリン $\beta 6$ 蛋白は蛋白翻訳後、細胞膜に移行するが、単量体の $\beta 6$ は、細胞膜から細胞質に移動しユビキチン化され、プロテアソームにより分解されることが明らかとなった。これに対し、 αv と二量体を形成した $\beta 6$ は、ユビキチン・プロテアソーム系による分解を受けず、細胞膜で $\alpha v \beta 6$ として安定発現し、扁平上皮癌細胞の運動能及び MMP-9 活性に対し抑制することで、浸潤・増殖を低下させることが示唆された。