

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)	氏名	藤井 隆彦
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
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			
論文審査担当者			
主 査	教 授	加 藤 功 一	印
審査委員	教 授	吉 子 裕 二	
審査委員	講 師	林 堂 安 貴	
〔論文審査の要旨〕			
<p>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。</p> <p>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。</p> <p>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/TO に $\beta 6$ の cDNA を組み込んだ pcDNA4/TO/$\beta 6$ 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。A431 $\beta 6$-On を Tet 処理により $\beta 6$ を発現誘導させた後、さらに Tet 非存在下で培養した時の $\beta 6$ の mRNA 及び蛋白の発現変化を、それぞれ RT-PCR 及びウエスタンブロットで解析することで、$\beta 6$ の転写後および翻訳後修飾を検討した。さらに、$\beta 6$ 発現に対する 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 $\beta 6$-On に pCI-neo または pCI-neo/αv を導入し、それぞれ A431mock/$\beta 6$-On または A431 αv/$\beta 6$-On を分離した。</p> <p>$\beta 6$ 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</p>			

タンブロットで解析した。

インテグリン $\alpha v \beta 6$ が、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 $\alpha v / \beta 6$ -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 $\alpha v / \beta 6$ -0n の in vitro 及び in vivo での増殖能についても検討した。その結果、以下のことが明らかとなった。

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、 $\beta 6$ 蛋白発現は 24 時間後にほぼ消失した。
2. A431 $\beta 6$ -0n で一過性に誘導された $\beta 6$ 蛋白は、リソソーム阻害剤 pepstatinA とカルパイン阻害剤 ALLN の添加によっても、 $\beta 6$ 蛋白発現が低下したのに対し、プロテアソーム阻害剤の MG132 または Lactacystin 処理は、 $\beta 6$ 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 $\beta 6$ 蛋白の大部分は膜面分中に存在したが、Tet 非存在下で培養すると、膜面分中の $\beta 6$ 蛋白量は低下した。これに対し、MG132 で処理された A431 $\beta 6$ -0n では、膜面分中の $\beta 6$ 蛋白発現の低下はみられなかった。
4. Tet 処理により誘導された $\beta 6$ mRNA 発現は、A431mock/ $\beta 6$ -0n 及び A431 $\alpha v / \beta 6$ -0n とともに、Tet 非存在下では 12 時間後には消失した。A431mock/ $\beta 6$ -0n の $\beta 6$ 蛋白は Tet 非存在下では発現量が低下したのに対し、A431 $\alpha v / \beta 6$ -0n では、Tet 非存在下で培養しても $\beta 6$ 蛋白発現が維持された。
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、A431 $\alpha v / \beta 6$ -0n の matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 活性は抑制された。
6. Tet 処理は、A431 $\alpha v / \beta 6$ -0n の細胞増殖能には影響を与えなかったが、ヌードマウスでの造腫瘍能を低下させた。

以上の結果から、インテグリン $\beta 6$ 蛋白は合成された後、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と考えられた。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及び MMP-9 活性に対し抑制シグナルを伝達し、扁平上皮癌の浸潤・増殖を低下させていることが示唆された。本論文は口腔外科学をはじめ歯科医学の発展に寄与するところが大きいものと評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。