

第 8 号様式

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)	氏名	坂上 泰士
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ユビキチン/プロテアソーム系によるインテグリン $\beta 8$ の蛋白翻訳後修飾についての解析			
論文審査担当者			
主 査	教 授	加藤 功一	印
審査委員	教 授	兼松 隆	
審査委員	講 師	林堂 安貴	
〔論文審査の要旨〕			
<p>インテグリンは α 鎖と β 鎖からなるヘテロ二量体の細胞膜蛋白で、細胞の増殖や運動等を制御し、がんの浸潤・転移にも密接に関与している。これまでに、ある種の扁平上皮癌細胞株においては、インテグリン $\beta 8$ ($\beta 8$) は蛋白翻訳後、細胞内で分解等の修飾を受けている可能性が示されている。</p> <p>本研究では、口腔扁平上皮癌細胞における $\beta 8$ 蛋白翻訳後修飾におけるユビキチン/プロテアソーム系の関与と、αv との二量体形成が $\beta 8$ 蛋白の安定化に与える影響について解析した。</p> <p>実験には舌癌由来扁平上皮癌細胞株 SCCKN と外陰部扁平上皮癌細胞株 A431 を用いた。αv または $\beta 8$ の cDNA を哺乳動物発現ベクター pCI-neo に組み込み、それぞれ pCI-neo/αv または pCI-neo/$\beta 8$ を作製した。pCI-neo, pCI-neo/αv または pCI-neo/$\beta 8$ を A431 に導入し、それぞれ A431mock, αv 発現細胞株 A431 αv または $\beta 8$ 発現細胞株 A431 $\beta 8$ を分離した。各細胞を、リソソーム阻害剤 Pepstatin A, カルパイン阻害剤 ALLN またはプロテアソーム阻害剤 MG132 で処理後、$\beta 8$ 蛋白発現を Western blot 法で解析した。さらにユビキチンリガーゼ human double minute 2 (Hdm2) の阻害が、各細胞の $\beta 8$ 蛋白発現に与える影響について解析した。Hdm2 と $\beta 8$ の複合体形成を、MG132 処理した SCCKN の cell lysate に対し、抗 $\beta 8$ 抗体または抗 Hdm2 抗体を用いた共免疫沈降法で検討した。さらに mammalian</p>			

two-hybrid 法にて Hdm2 と $\beta 8$ との結合を検討した。すなわち Hdm2 と $\beta 8$ の cDNA を、それぞれ GAL4 DNA-Binding Domain Cloning Vector である pM と Activation Domain Cloning Vector である pVP16 に組み込み、Hdm2-pM と $\beta 8$ -pVP16 を作製し、Reporter Vector である pG5SEAP とともに A431 に導入し、培養上清中のアルカリフォスファターゼ活性を指標に Hdm2 と $\beta 8$ との結合を評価した。 $\beta 8$ 蛋白上における Hdm2 の結合部位を検討するため、inverse PCR 法により作製した $\beta 8$ -pVP16 の deletion mutant を用いて mammalian two-hybrid 法を行った。 $\beta 8$ 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用いた。すなわち、Tet リプレッサー発現ベクター-pcDNA6/TR と Tet 誘導性発現ベクター-pcDNA4/T0 に $\beta 8$ の cDNA を組み込んだ pcDNA4/T0/ $\beta 8$ を作製し、A431mock または A431 αv に導入し、それぞれ A431mock/ $\beta 8$ -0n または A431 αv / $\beta 8$ -0n を分離した。Tet 処理により $\beta 8$ 蛋白を発現誘導させた各細胞を、Tet 非存在下でさらに培養し、 $\beta 8$ 蛋白発現の変化を解析することで、 $\beta 8$ 蛋白の安定化に与える αv の影響について検討した。さらに、A431 αv / $\beta 8$ -0n の運動能を Boyden chamber の変法にて解析した。その結果、以下のことが明らかとなった。

1. SCCKN 及び A431 $\beta 8$ は、 $\beta 8$ 蛋白を殆ど発現していなかったが、MG132 処理により本来 90kDa の $\beta 8$ 蛋白が約 120kDa の蛋白として発現した。Hdm2 阻害剤は 90kDa の $\beta 8$ 蛋白を高発現させた。
2. 共免疫沈降法で、Hdm2 と $\beta 8$ の複合体形成が確認された。
3. Hdm2-pM 及び $\beta 8$ -pVP16 を co-transfection した A431 は、コントロールに比べ、アルカリフォスファターゼ活性が約 5 倍亢進した。
4. 481-576 番目の EGF-like repeat domain を含むアミノ酸領域を欠失したミュータント $\beta 8$ では、アルカリフォスファターゼ活性が低下した。
5. Tet 処理により、A431mock/ $\beta 8$ -0n 及び A431 αv / $\beta 8$ -0n において $\beta 8$ 蛋白発現が誘導されたが、A431mock/ $\beta 8$ -0n は Tet 非存在下では発現量が低下し、12 時間後にはほぼ消失した。これに対し、A431 αv / $\beta 8$ -0n では、Tet 非存在下においても $\beta 8$ 蛋白発現は維持された。
6. Tet 処理により、A431 αv / $\beta 8$ -0n の運動能は促進された。

以上の結果から、口腔扁平上皮癌細胞において単量体の $\beta 8$ は Hdm2 と結合し、ポリユビキチン化されてプロテアソームで分解されることが明らかとなった。さらに $\beta 8$ の脚部に存在する EGF-like repeat domain の 481-576 番目のアミノ酸領域が Hdm2 との結合に関与していることが示された。これに対し、 αv と二量体形成した $\beta 8$ は、ユビキチン/プロテアソーム系による分解を受けず安定発現し、運動能を促進することで、がん浸潤を亢進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）の学位を授与するのに十分な価値あるものと認めた。