



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on invasiveness of irradiation-tolerant lung adenocarcinoma cells by three dimensional collagen matrices [an abstract of dissertation and summary of dissertation review]
Author(s)	石原, 誠一郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11049号
Issue Date	2013-06-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53239
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Ishihara_Seiichiro_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士 (生命科学) 氏 名 石 原 誠一郎

学 位 論 文 題 名

Study on invasiveness of irradiation-tolerant lung adenocarcinoma cells
by three dimensional collagen matrices
(3次元コラーゲン基質を用いた肺腺がん細胞の浸潤性に関する研究)

がんは、がん細胞の発生により生じ、浸潤および転移を経て進行する。がん細胞とは、DNAの変異によって、無限の増殖能を獲得した細胞のことを指す。がん細胞は増殖し、原発腫瘍を形成する。がんが進行すると、がん細胞は周囲の組織内へ侵入する。これを浸潤とよぶ。また、がんの進行にともない、がん細胞は原発腫瘍から離れた場所に別の腫瘍を形成する。これを転移とよぶ。がん細胞は浸潤および転移などをともなう組織や臓器を破壊する。これにより生体は命の危機にさらされる。このように、がんの進行において浸潤や転移は重要な位置を占める。

がんに対する治療法のひとつに、放射線療法がある。放射線療法は、がん細胞に放射線を照射することによりその細胞を死滅させる治療法である。この方法は、手術で取り除けないような部位の腫瘍にも適用でき、さらに完治が期待できる治療法のため、現在主要ながん治療法のひとつとなっている。その一方で過去の研究により、放射線を照射されたがん細胞が生き残って、より高い浸潤能および転移能を示すことが報告されている。しかし、放射線照射後に生き残ったがん細胞がなぜ高い浸潤能や転移能をもつのか、その詳細なメカニズムは不明である。そのため本研究では放射線照射後に生き残ったがん細胞に着目し、そのがん細胞が高い浸潤能を示すメカニズムの解明を目指した。

まず、放射線照射前のがん細胞と、照射後に生き残ったがん細胞における浸潤能を解析した。ヒト肺腺がん由来 A549 細胞をクローニングし P-3 株を樹立した。この細胞株に対して放射線 10 Gy を照射し、その後継続して培養したところ、照射 30 日後に放射線生残株 IR 株を樹立することに成功した。3次元コラーゲン基質は生体内の結合組織に近い成分・構造をとるため、*in vitro*においてがん細胞の浸潤能を解析する上で適した基質である。そこで3次元コラーゲン基質中で細胞を培養し、その浸潤能を評価した。3次元コラーゲン基質中において P-3 株は丸い形態を示し、基質中をほとんど浸潤しなかった (Figure 1)。一方、IR 株は突起を伸ばしながら基質中を浸潤した (Figure 1)。この結果より、放射線照射後に生き残った IR 株は、放射線照射前の P-3 株に比べて高い浸潤能を持つことが明らかになった。

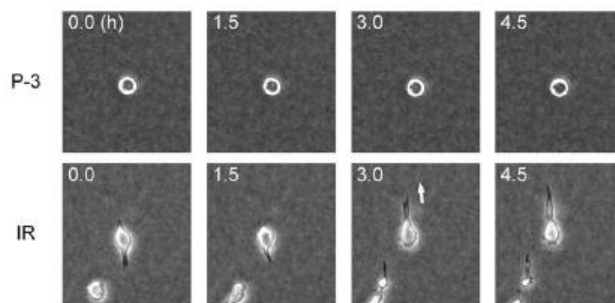


Figure 1 P-3株とIR株の3次元コラーゲン基質中における浸潤能。左上の数値は観察時間。白矢印は浸潤方向。Bar = 50 μ m.

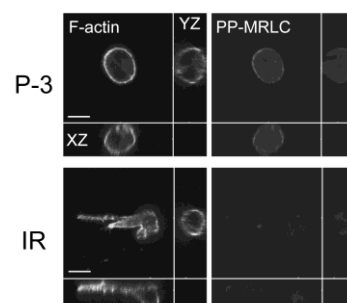


Figure 2 P-3株とIR株の3次元コラーゲン基質中における F-actin と PP-MRLC の染色像。XZ, YZ : 縦軸像。Bar = 20 μ m.

次に、IR 株が高い浸潤能を示すメカニズムを解析した。はじめに、インテグリン β 1に着目

した。インテグリン $\beta 1$ は細胞膜貫通型のタンパク質であり、細胞外ドメインにおいてコラーゲン線維と直接結合することが知られている。そのため、IR株が3次元コラーゲン基質中において浸潤するには、インテグリン $\beta 1$ が重要な役割を果たすと考えた。P-3株とIR株において免疫蛍光染色によってインテグリン $\beta 1$ の局在を観察した。P-3では、インテグリン $\beta 1$ は細胞膜上全体に局在していた。一方、IR株ではインテグリン $\beta 1$ は細胞の突起先端に強く局在していた。さらに、インテグリン $\beta 1$ のコラーゲン線維への結合能を阻害すると、3次元コラーゲン基質中においてIR株の浸潤能が低下することがわかった。以上より、IR株が3次元コラーゲン基質中を浸潤するには、インテグリン $\beta 1$ によるコラーゲン繊維への結合が必要であることが明らかになった。

続いて、細胞が発生する張力（細胞内張力）に着目し、細胞内張力と浸潤能との関連を調べた。細胞内張力は細胞の運動や形態維持に重要な役割を果たす。細胞内張力はアクチン繊維（F-actin）とミオシンIIからなるアクトミオシンによって生み出される。この張力は、ミオシン調節軽鎖（以下MRLC）によって強く制御されている。MRLCはThr18とSer19にリン酸化部位を持つ。この2つの部位がリン酸化されたMRLC（以下PP-MRLC）は強い細胞内張力を生み出すことが知られている。この点に着目し、P-3株とIR株におけるPP-MRLCの局在を免疫蛍光染色にて観察した。その結果、PP-MRLCはP-3株ではF-actin上に強く局在していたのに対し、IR株ではほとんど局在が観察されなかった（Figure 2）。さらに、P-3株においてMRLCの脱リン酸化を誘導すると、突起を伸ばした細胞の割合が有意に増加することがわかった。対照的に、MRLCのリン酸化亢進により、IR株における突起伸長をともなした浸潤が抑制された。これらの結果により、P-3株ではアクトミオシンに依存した強い張力が発生しており、それが突起形成を抑制することがわかった。さらに、IR株では張力が低下することにより突起伸長が可能となり、その結果浸潤能が上昇することが明らかになった。

最後に、転写因子activating transcription factor 5（以下ATF5）に着目した。過去の研究により、ATF5を高発現しているマウス線維肉腫細胞はATF5を低発現している細胞に比べて高い放射線耐性を持つことが報告されている。この事実より、放射線照射後に生き残ったがん細胞ではATF5の発現が高いと考えた。そこで、放射線照射後に生残したがん細胞であるIR株においてATF5の発現を調べ、さらにATF5と浸潤能との関与について検証した。ATF5のタンパク質発現をWestern blottingにより検出したところ、IR株はP-3株に比べて高いATF5発現を示した（Figure 3）。さらに、RNAi法を用いてIR株におけるATF5の発現を減少させると、浸潤性の突起形成が抑制されることがわかった。以上の結果より、IR株はATF5を高発現しており、それにより高い浸潤能を示すことが明らかになった。

以上の研究結果より、放射線照射後に生き残った肺腺がん細胞IR株は、放射線照射前のP-3株に比べて高い浸潤能を持つことが示された。そしてこの浸潤能は、①インテグリン $\beta 1$ に依存したコラーゲン繊維への接着、②PP-MRLCに制御された張力、③転写因子ATF5の発現により制御されていることが明らかになった。今後は、これらの分子をターゲットとした新規治療薬のデザインが期待される。

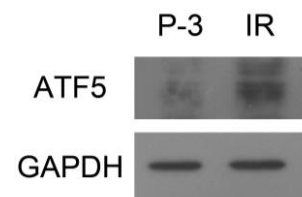


Figure 3 P-3株とIR株におけるATF5のタンパク質発現。コントロールとして、GAPDHのタンパク質発現をともし示してある。