



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_Shinichiro_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 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

審査担当者	主 査	教 授	芳 賀 永
	副 査	教 授	綾 部 時 芳
	副 査	教 授	川 端 和 重
	副 査	准教授	福 井 彰 雅

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)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

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、より高い悪性度すなわち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悪性度をもつのか、その詳細な動態やメカニズムは不明である。

本論文は、放射線照射後に生き残ったがん細胞が *in vitro* の系において高い浸潤能を示すことを明らかにし、さらにそれを制御する分子メカニズムを解明したものである。まず、著者は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。一方、IR 株は突起を伸ばしながら基質中を浸潤していた。このように著者は、放射線照射後に生き残った IR 株は、3次元コラーゲン基質中において突起形成を伴った浸潤を行うことを明らかにした。

次に、著者は IR 株が高い浸潤能を示す分子メカニズムを解析した。はじめに、インテグリンβ1に着目した。インテグリンβ1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。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β1の局在を観察した。P-3 では、インテグリンβ1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β1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β1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、著者は IR 株が

3次元コラーゲン基質中を浸潤する際には、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を示した。

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。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。さらに、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った浸潤が抑制された。これらの結果により、著者は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を明らかにした。

最後に、著者はがん細胞の放射線耐性に関与する転写因子activating transcription factor 5（以下ATF5）に着目した。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。さらに、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。以上の結果より著者は、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を示した。

これらの研究成果より、著者は、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を示し、さらにこの浸潤能は、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を明らかにした。この成果は、放射線照射後のがん再発に対する新規治療薬の開発等に大きく貢献するものである。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。