



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	正常上皮細胞と変異細胞間の相互作用に関与する分子探索の研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	林, 隆史
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第13363号
Issue Date	2018-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71815
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_HAYASHI_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（理学） 氏名 林 隆 史

学 位 論 文 題 名

正常上皮細胞と変異細胞間の相互作用に関する分子探索の研究

上皮組織において変異細胞が出現すると、それを取り囲む周辺の正常細胞との間に新たな相互作用が生じる。すなわち、自らの生存空間の確保や生存競争が生じ、どちらかがもう一方を細胞死へと誘導したり、あるいは存在領域からの排除を行ったりする現象がみられる。この現象は、それぞれが単独で生存している場合には起こらない細胞非自律的な現象であり、細胞競合と呼ばれている。この細胞競合によって敗者となった細胞は組織より排除され、勝者はその生存空間を確保することになる。例を挙げると、正常上皮細胞の中に **RasV12** 変異をもつ形質転換細胞が生じると、変異細胞は頭頂側に押し出され、上皮層から離脱していく現象が観察されている。この現象において、**filamin** タンパク質は重要な働きをすることがこれまでの研究で示されている。すなわち、正常細胞による変異細胞の頭頂側への離脱現象には、正常細胞内の変異細胞境界面に **filamin** が集積することが重要である。このような重要な分子の存在がいくつか明らかになっているが、部分的あるいは局所的な知見でありパスウェイ全体としては未だ不明な点が多い。この作用機序を解明するためには、未だ明らかになっていない多くの関与分子を見出し、それらを検証しながらパスウェイ全体にあてはめていかなければならない。そこで本研究では、正常細胞と変異細胞との相互作用に関連する分子を網羅的に探索することを目的とした。

本学位論文は全 5 章から構成されている。第 1 章では、全般の序論として研究の背景と目的を述べている。第 2 章では、リン酸化タンパク質の網羅的解析によるシグナル分子の探索について述べている。正常細胞と変異細胞との相互作用に反応して変化するリン酸化タンパク質を、**SILAC** (**Stable isotope labeling by amino acids in cell culture**)法を応用した解析により探索した。その結果、正常細胞と変異細胞との混合培養条件下で変動する候補タンパク質として、リン酸化 **AHNAK2** タンパク質を見出した。**AHNAK2** はこれまで詳細に調べられていない、機能未知のタンパク質である。本研究ではリン酸化部位も特定されたため、このリン酸化部位を認識する抗体を作製し、免疫染色にて変動を確認した。その結果、リン酸化 **AHNAK2** は変異細胞に隣接する正常細胞において染色され、しかも単独培養条件下での染色と比較すると強い蛍光強度を示した。**AHNAK2** は隣接する細胞に呼応してリン酸化状態が変化することから、細胞競合現象への何らかの関与が示唆される。

第 3 章では、分泌タンパク質の網羅的解析について述べている。第 2 章と同様に、**SILAC** 法を応用した解析を用い、正常細胞と変異細胞との混合培養条件下で分泌が変動するタンパク

質を解析した。その結果、混合培養下で最も増加する分泌タンパク質として ADAMDEC1 を見出した。ADAMDEC1 は ADAM ファミリーに属するメタロプロテアーゼであるが、研究報告数が少ない機能未知のタンパク質である。ノックダウン細胞を使った実験より、変異細胞との混合培養条件下において、ADAMDEC1 は正常細胞側から遺伝子レベルで発現が上昇しているものであることが明らかになった。さらに ADAMDEC1 は、filamin の集積にも影響を与える上流分子であることも確認された。

第 4 章では、混合培養条件下での分析研究に適した、新しいタンパク質の網羅的解析法 CTAP の確立について述べている。第 2 章、第 3 章の結果より、SILAC 法を応用することで、混合培養という特殊な条件下でも関連分子を見出すことが可能であった。しかし、混合培養下において変化を呈する細胞を見分けることが出来ないという大きな弱点が存在する。CTAP (cell type-specific labeling using amino acid precursors)法は、近年報告された混合培養下で実施可能な新しいタンパク質解析法であり、アミノ酸前駆物質と、その変換酵素との組み合わせにより、混合培養中で特定の細胞に対し選択的に安定同位体ラベルを導入できる画期的な手法である。第 4 章では、この CTAP 法確立に向けた様々な基礎検討実験について述べており、現時点での混合培養下での細胞選択的ラベル効率について評価した。将来この手法が細胞競合現象の作用機序探索に応用可能となれば、作用機序の研究は飛躍的に発展するであろう。

第 5 章では、本論文の総括を述べている。

本研究を通じて、変異細胞を取り囲んだ正常細胞が変異細胞を排除する現象に関与が示唆される 2 つの候補分子を見出すことができた。これらの分子は、正常細胞が変異細胞を排除する現象への関与はこれまで報告されておらず、詳細な解析が行われていない機能未知のタンパク質であった。本研究を通じて得られた知見は、細胞競合の分子機構研究に新たな道を開くものである。