HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	正常上皮細胞層からの変異細胞の逸脱を制御するミオシン-II-スペクトリン複合体の役割の解明［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	髙城, 幹太
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第13394号
Issue Date	2018-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/72359
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Mikio_TAKAGI_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　髙城　幹太

学 位 論 文 題 名

正常上皮細胞層からの変異細胞の逸脱を制御するミオシン-II–スペクトリン複合体の役割の解明

がんの発生過程は、その初期段階において 1 つの正常な細胞に 1 つのがん原遺伝子の変異が生じることから始まるとされている。変異した細胞には、さらに複数の変異が生じる。その複数の変異が生じた細胞が無秩序に増殖し、悪性化及び転移を経て、がんが発生すると言われている。

近年の研究では、がん発生の初期段階において、がん原遺伝子である Src もしくは Ras が変異した細胞が、正常上皮細胞層の管腔側へとしばしば逸脱し、排除されることが判明している (Apical extrusion) 。また、細胞極性に関わるタンパク質である Scribble や Mahjong の発現を抑制させると、正常細胞に囲まれたノックダウン細胞は、アポトーシスによって細胞死することも報告されている。さらに、がん遺伝子である Erbb2 が過剰発現した細胞は Apical extrusion が生じ、p53 が変異した細胞はネクロプトーシスにより細胞死することも報告されている。これらの現象は、隣接する細胞が正常細胞ではなく、同種の変異細胞の場合には生じないということが知られている。したがって、正常細胞に囲まれた変異細胞が排除される、もしくは細胞死する現象は、正常細胞と変異細胞の間に生じる細胞競合現象の一つである。細胞競合現象に関する最近の研究では、正常上皮細胞層に囲まれた変異細胞において、細胞骨格タンパク質である EPLIN やプレクチン、パキシリンが集積し、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion に重要な役割を果たすことが報告されている。また、変異細胞に隣接する正常細胞において、細胞骨格タンパク質であるフィラミンが集積し、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion に対して重要な役割を果たすことが報告されている。しかし、正常上皮細胞層から変異細胞を管腔側へ逸脱し、排除させる根本的な分子メカニズムは、未だ明らかとなっていない点が多く残っている。

また近年、ミオシン-II の細胞競合現象への関与も注目されている。ミオシン-II は、細胞移動や分裂に重要な働きを及ぼす主要な細胞骨格タンパク質である。ミオシン-II は重鎖と軽鎖から構成されており、軽鎖がリン酸化されることにより、ミオシン-II の活性が制御される。また、ミオシン軽鎖のリン酸化が、正常細胞に囲まれた変異細胞において亢進されることが報告されている。さらに、ミオシン-II の活性を抑制するブレビスタチンを添加することによって、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion が抑制されることも報告されている。したがって、正常細胞に囲まれた変異細胞におけるミオシン-II の活性が、変異細胞の Apical extrusion に対して重要な役割を担うことが明らかとなっている。しかし、正常細胞に囲まれた変異細胞内のミオシン-II の局在が、変異細胞の Apical extrusion に対してどのような働きをするのか、未だ明らかとなっていない。

本研究では、イヌ腎尿細管上皮細胞由来である MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞を用いて、1) 正常細胞に囲まれた変異細胞におけるミオシン-II が変異細胞の正常上皮細胞層からの逸脱に対する作用を明らかにすること 2) 正常細胞と変異細胞の混合培養条件下において、ミオシン-II と結合するタンパク質の探索及び同定を目的とした。本研究が進むことにより、ヒトのがんに対する予防医学の新規的な治療法の確立に繋がると考えている。

本論文は全 5 章から構成されている。第 1 章では、本研究における序論、第 2 章では本研究での実験手法について述べている。

第 3 章では、正常細胞に囲まれた変異細胞におけるミオシン-II の局在変化とその役割について、

本研究により得られた結果を述べている。MDCK 正常上皮細胞に囲まれた MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 変異細胞内において、非筋肉型ミオシン-II の重鎖である NMHC-IIA (Non-muscle myosin heavy chain-IIA) に特異的な変化が生じるかどうか調べた。すると、Src 変異細胞の単独培養時と比べ、正常細胞に囲まれた変異細胞において NMHC-IIA の発現が強く集積されることが示された。また、Src 変異細胞における NMHC-IIA の発現を抑制させると、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の Apical extrusion の効率が低下することが分かった。この結果、集積した NMHC-IIA が Src 変異細胞の Apical extrusion を積極的に制御することが明らかとなった。

第 4 章では、正常細胞と変異細胞の混合培養条件下において、ミオシン-II と結合するタンパク質について、本研究にて得られた結果を述べている。正常細胞と Src 変異細胞の混合培養条件下において、NMHC-IIA と結合するタンパク質を解析したところ、スペクトリンを同定した。また、スペクトリンの β 鎖である β-spectrin は、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞において、Src 変異細胞の単独培養時よりも強く集積されることが示された。さらに、Src 変異細胞において β-spectrin の発現を抑制すると、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の Apical extrusion の効率が低下することが明らかとなった。その上、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における β-spectrin の集積は、NMHC-IIA の下流で制御されることが明らかとなった。

第 5 章では、本研究の総括及び今後の課題について述べている。本研究を通じて、MDCK 正常上皮細胞層に囲まれた Src 変異上皮細胞において、ミオシン-II 及びスペクトリンが細胞非自律的に集積し、正常上皮細胞に囲まれた Src 変異細胞の Apical extrusion に対して重要な役割を担うことが示された。また、変異細胞におけるスペクトリンの集積がミオシン-II の下流で制御されることも示された。本研究を通じて得られた知見が、正常上皮細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion の分子メカニズムのより詳細な解明に繋がると考えられる。