

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	末松 美玲
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・ 2 項該当		
論 文 題 目			
扁平上皮癌細胞でのオートファジーによるインテグリン $\alpha v$ のプロセッシング			
論文審査担当者			
主 査		加藤 功一	印
審査委員		吉子 裕二	
審査委員		林堂 安貴	
〔論文審査の要旨〕			
<p>インテグリンは、<math>\alpha</math> 鎖と <math>\beta</math> 鎖からなるヘテロ二量体の細胞膜蛋白で、インテグリン <math>\alpha v</math> ファミリーは、癌細胞の運動能のみならず、蛋白分解活性を調節し、癌の浸潤・転移に密接に関与していると考えられている。本研究では、扁平上皮癌におけるインテグリン <math>\alpha v</math> ファミリーの安定発現機構を明らかにするためにインテグリン <math>\alpha v</math> の蛋白質翻訳後修飾を解析するとともに、<math>\alpha v</math> の安定発現におけるインテグリン <math>\beta</math> 鎖の関与について検討した。さらに、インテグリン <math>\alpha v</math> が扁平上皮癌の増殖に与える影響について検討した。</p> <p>実験には、インテグリン <math>\alpha v</math>、<math>\beta 1</math>、<math>\beta 3</math>、<math>\beta 5</math>、<math>\beta 6</math>、<math>\beta 8</math> がほとんど発現されていない外陰部扁平上皮癌由来細胞株 A431 を用いた。<math>\alpha v</math> 蛋白の翻訳後修飾を解析するために、テトラサイクリン発現誘導システムを用いた Tet リプレッサー発現ベクター pcDNA6/TR と、Tet 誘導性発現プラスミド pcDNA4/T0 に <math>\alpha v</math> c DNA を組み込んだ pcDNA4/T0/<math>\alpha v</math> を作製し、A431 に導入し、A431 <math>\alpha v</math>-on を分離した。Tet 処理により <math>\alpha v</math> を発現誘導させた後、さらに Tet 非存在下で培養し、<math>\alpha v</math> の mRNA 及び蛋白の発現変化を、それぞれ RT-PCR 及びウエスタンブロット法で解析することで、<math>\alpha v</math> の転写後および翻訳後修飾を検討した。細胞内蛋白の分解に関与する種々の酵素の阻害剤の、A431 <math>\alpha v</math>-On のインテグリン <math>\alpha v</math> 蛋白の発現に与える影響についてウエスタンブロット法にて解析した。さらに、<math>\alpha v</math> が、オートファゴソームに取り込まれているかを検討するために、<math>\alpha v</math> とオートファゴソームの膜構成蛋白である LC3 の局在を蛍光二重染色法にて解析した。また、<math>\alpha v</math> 蛋白の分解に、p62 を介した選択的オートファジーが関与しているかを検討するために、<math>\alpha v</math> と p62 との複合体形成を共免疫沈降法にて解析した。</p>			

$\alpha v$  のカウンターパートである  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$  及び  $\beta 8$  が,  $\alpha v$  蛋白の安定性に与える影響を検討するため, まず哺乳動物発現ベクター pCI-neo に  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$  または  $\beta 8$  cDNA を組み込んだ pCI-neo/ $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 8$  を作製した. 続いて A431  $\alpha v$ -On 細胞に遺伝子導入を行い, 各  $\beta$  鎖を高発現している細胞株 A431  $\alpha v$ -on/ $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 8$  を分離し, テトラサイクリン存在下, 非存在下にて培養し,  $\alpha v$  発現の変化をウエスタンブロット法にて解析した.

$\alpha v$  と  $\beta$  鎖の細胞局在について解析するため, 各細胞から細胞質蛋白, 膜蛋白, 核蛋白, クロマチン結合蛋白及び細胞骨格蛋白の各画分を抽出し, 各細胞画分中の  $\alpha v$  と  $\beta$  蛋白をウエスタンブロット法で検索した. インテグリン  $\alpha v$  の *in vivo* における腫瘍増殖能に及ぼす影響を明らかにするため, A431  $\beta 1/\alpha v$ -On, A431  $\beta 3/\alpha v$ -On, A431  $\beta 5/\alpha v$ -On, A431  $\beta 6/\alpha v$ -On 及び A431  $\beta 8/\alpha v$ -On 細胞を, ヌードマウスの背部皮下に接種し, テトラサイクリンの前駆体であるドキシサイクリンを含む飲料水を与え, 形成腫瘍の体積を算定した. その結果, 以下のことが明らかとなった.

1. A431  $\alpha v$ -On をテトラサイクリン存在下で培養したところ,  $\alpha v$  の mRNA 及び蛋白発現は時間依存性に誘導された. 一方, テトラサイクリン非存在下では, いずれの発現も 24 時間後にほぼ消失した.

2. テトラサイクリン非存在下での  $\alpha v$  蛋白の発現低下は, カルパイン阻害剤 ALLN, プロテアソーム阻害剤 Lactacystin や MG132 では影響を受けなかったがリソソーム阻害剤 chloroquine により発現低下は抑制された.

3. 蛍光二重染色で  $\alpha v$  と LC3 の共局在が認められた.

4. p62 と  $\alpha v$  は, 細胞内で複合体を形成していることが示唆された.

5.  $\beta 1$  及び  $\beta 8$  発現細胞では, 一過性に発現誘導された  $\alpha v$  蛋白は, テトラサイクリン非存在下で培養すると発現が低下したのに対し,  $\beta 3$ ,  $\beta 5$  及び  $\beta 6$  発現細胞では,  $\alpha v$  発現が維持されていた.

6.  $\alpha v$  蛋白とともに,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 8$  蛋白の大部分は細胞膜画分中に存在した.

7. Tet 処理は, A431  $\alpha v$ -On/ $\beta 1$ , A431  $\alpha v$ -On/ $\beta 3$ , 及び A431  $\alpha v$ -On/ $\beta 6$  のヌードマウス背部皮下での増殖能を亢進させたが, A431  $\alpha v$ -On/ $\beta 5$  の増殖能を抑制した.

以上の結果より扁平上皮癌細胞において, 単量体のインテグリン  $\alpha v$  蛋白は, p62 と結合し複合体を形成した後, 選択的オートファジーにより分解されると推測された. これに対し,  $\beta 3$ ,  $\beta 5$  または  $\beta 6$  と二量体形成した  $\alpha v$  は, オートファジーによる分解から保護され,  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 5$  及び  $\alpha v \beta 6$  として細胞膜上で安定発現していると考えられた.  $\alpha v \beta 5$  は, 扁平上皮癌細胞の *in vivo* での増殖抑制に関与し,  $\alpha v \beta 1$ ,  $\alpha v \beta 3$  と  $\alpha v \beta 6$  は, 増殖促進に関与していると考えられた. 以上より  $\alpha v \beta 1$ ,  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 5$ ,  $\alpha v \beta 6$  は扁平上皮癌の増殖動態予測や予後予測因子として有用であり, 特に  $\alpha v \beta 1$ ,  $\alpha v \beta 3$  と  $\alpha v \beta 6$  を標的とした扁平上皮癌の分子標的治療の可能性が示唆された.

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.