

学位論文

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 α_v のプロセッシング

学位申請者 末松 美玲

広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻

(主任指導教員：岡本哲治教授)

平成26年度

謝辞

本研究に際し、御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門分子口腔医学・顎顔面外科学 岡本哲治教授に深厚なる謝意を表します。また、本論文作成上、御教示、御校閲を賜りました基礎生命科学部門生体材料学 加藤功一教授ならびに基礎生命科学部門硬組織代謝生物学 吉子裕二教授に深く感謝致します。

本研究を進めるに際し、終始御懇切なる御指導と御配慮を賜りました広島大学病院顎・口腔外科 講師林堂安貴博士に心から感謝の意を表します。さらに、多大なる御支援、御協力を頂きました本学分子口腔医学・顎顔面外科学研究室の教室員の先生方に感謝致します。本研究に際し、御協力頂きました広島大学医学部附属動物実験施設関係者各位にお礼申し上げます。

最後に本学への進学、研究に際し、暖かく見守っていただいた両親に心より感謝いたします。

目次

第1章 緒言

第2章 材料および方法

第1節 細胞培養法

- 1) 細胞培養液
- 2) 細胞と培養方法

第2節 扁平上皮癌細胞におけるインテグリン α_v の蛋白翻訳後修飾についての検討

- 1) 各細胞からの total RNA の抽出
- 2) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) による
インテグリン $\alpha_v, \beta_1, \beta_3, \beta_5, \beta_6$ 及び β_8 の mRNA 発現の検討
- 3) テトラサイクリン発現誘導システムを用いたインテグリン α_v の一過性
発現系の構築
- 4) インテグリン α_v の転写後および翻訳後修飾の解析
- 5) インテグリン α_v の蛋白翻訳後修飾に対する各種プロテアーゼ阻害剤の
影響についての検討
- 6) 間接蛍光抗体法による扁平上皮癌細胞におけるインテグリン α_v と
Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) 発現の検討
- 7) 共免疫沈降法によるインテグリン α_v と p62 とユビキチンの複合体形
成と、インテグリン α_v のユビキチン化についての検討

第3節 インテグリン β 鎖が α_v 蛋白発現に与える影響についての検討

- 1) インテグリン $\beta 1, \beta 3, \beta 5, \beta 6, \beta 8$ 発現ベクターの構築
- 2) A431 α_v -0n への $\beta 1, \beta 3, \beta 5, \beta 6$ または $\beta 8$ の遺伝子導入
- 3) インテグリン β 鎖が α_v 蛋白の蛋白翻訳後修飾に与える影響の検討
- 4) 共免疫沈降法によるインテグリン α_v と $\beta 1, \beta 3, \beta 5, \beta 6, \beta 8$ の複合体形成についての検討
- 5) インテグリン $\alpha_v, \beta 1, \beta 3, \beta 5, \beta 6$ および $\beta 8$ 蛋白の細胞内での局在の検討

第4節 インテグリン α_v ファミリーが、扁平上皮癌細胞の増殖に与える影響についての検討

- 1) *in vivo*における α_v のテトラサイクリン発現誘導システムの機能確認
- 2) ノードマウスでの造腫瘍性の判定

第3章 結果

- 1) テトラサイクリン発現誘導システムによる α_v の発現誘導
- 2) インテグリン α_v の転写後及び翻訳後の修飾
- 3) インテグリン α_v の蛋白翻訳後修飾に対する各種プロテアーゼ阻害剤の影響
- 4) A431 α_v -0n におけるインテグリン α_v と Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) の局在
- 5) 共免疫沈降法によるインテグリン α_v と p62 の複合体形成と、インテグリン α_v のユビキチン化についての検討
- 6) インテグリン β 鎖が α_v 蛋白の蛋白翻訳後修飾に与える影響

- 7) 共免疫沈降法によるインテグリン α_v と β_1 , β_3 , β_5 , β_6 , β_8 の複合体形成
- 8) インテグリン α_v 蛋白及び β 蛋白の細胞内での局在
- 9) *in vivo* における α_v のテトラサイクリン発現誘導システムの機能確認
- 10) ノードマウスでの造腫瘍性の判定

第4章 考察

第5章 総括

文献

図表

第1章 緒言

がん細胞の浸潤・転移は、がん細胞自身の特性によってのみ制御されているのではなく、周囲の間質成分をはじめとする宿主との相互作用によっても影響を受けていると考えられている[1-3]。間質の主な構成蛋白である細胞外基質蛋白は、組織や器官の構成を維持する支持体としての機能だけではなく、成長因子やサイトカインなどの液性因子と同様に、細胞膜上に存在するインテグリン等の受容体を介し、多様な生物活性を示し、がん細胞の増殖、蛋白分解酵素産生、細胞接着や運動の調節因子として浸潤や転移においても重要な役割を担っていることが知られている[4, 5]。

インテグリンは、 α サブユニットと β サブユニットからなるヘテロ二量体の膜貫通型の糖タンパク質である。現在までに18種類の α 鎖インテグリンと8種類の β 鎖インテグリンが存在し、リガンド特異性が異なる24種類のヘテロ二量体を形成することが確認されている[6]。インテグリンの細胞外ドメインは細胞外基質蛋白と結合し、細胞内ドメインはテーリン、 α -アクチニンやアクチンフィラメントなどの細胞骨格蛋白と結合している[7-10]。さらにインテグリンは、自らはチロシンキナーゼ活性を持たないものの、細胞外基質蛋白との結合により、 β 鎖の細胞内ドメインに結合した focal adhesion kinase(FAK)を活性化し、様々なシグナルを細胞に伝達をすることが知られている[1, 11-13]。このように、インテグリンは単に細胞と細胞外基質蛋白との接着分子として機能しているだけでなく、細胞形態、運動、増殖や分化に関連したシグナル伝達を調節し、器官発生や組織分化においても重要な役割を担っている[14-17]。

悪性腫瘍において、インテグリン発現と、浸潤・転移や予後との関連性が報告されている[18-20]。インテグリン $\alpha v \beta 3$ は、がん細胞の運動能を調整するとと

もに、メラノーマ細胞や口腔扁平上皮癌細胞において活性型マトリックスメタロプロテアーゼ 2 (MMP-2) の細胞膜上の受容体として、細胞膜上の蛋白分解活性を制御していることが明らかにされている。また、 α_v のアンタゴニストが、がん細胞のアポトーシスを誘導し、増殖を抑制することが報告されている[21, 22]。このように、インテグリン α_v は、がんの増殖や浸潤・転移を調節し、がん進展において重要な役割を担っていると考えられている[23]。

インテグリン α_v は、 β_1 , β_3 , β_5 , β_6 及び β_8 の 5 種類の β サブユニットと二量体を形成することが知られている。著者の所属する研究室での先行研究において、遺伝子導入によるインテグリン α_v の発現亢進は、口腔扁平上皮癌細胞における β_8 mRNA の転写には影響を与えないものの、 β_8 蛋白発現を亢進させることが明らかとなっている[24]。さらに、単量体のインテグリン β_8 は、ユビキチン/プロテアソーム系で分解されるのに対し、 α_v と二量体形成することで、ユビキチン/プロテアソーム系での分解から保護され、 $\alpha_v\beta_8$ として細胞膜上で安定発現することがみいだされている。このことから、扁平上皮癌細胞におけるインテグリン α_v も β 鎖との二量体形成により、そのタンパク翻訳後修飾や発現に何らかの影響を受けている可能性が考えられた。

本研究では、扁平上皮癌におけるインテグリン α_v 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 α_v の蛋白質翻訳後修飾を解析するとともに、 α_v の安定発現におけるインテグリン β 鎖の関与について検討した。さらに、 α_v ファミリーが扁平上皮癌細胞の増殖に与える影響について検討した。

第2章 材料と方法

第1節 細胞培養法

1) 細胞培養液

Dulbecco's modified Eagle's medium と Nutrient Mixture Ham F-12 (Sigma-Aldrich, MO, USA) [25] を 1: 1 に混合した DME-F12 培地 (DF 培地) を, Milli-Q 水 (Direct-Q[®] 3 UV; Millipore, MA, USA) に溶解し, 90mg/L ペニシリン G ナトリウム, 90mg/L カナマイシン, 165mg/L ピルビン酸ナトリウム, 20mM N-2 ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸 (HEPES) 及び 2.0g/L 重炭酸ナトリウムを添加後 pH. 7.4 に調整し, メンブレンフィルター (孔径 0.2 μ m, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germany) で濾過滅菌し, DF 培地とした [26, 27].

2) 細胞と培養方法

細胞株として, 外陰部扁平上皮癌細胞株 A431 [28], 口腔扁平上皮癌細胞株 SCCKN [29] と KO [18], ヒト歯肉由来線維芽細胞 [30], ヒトメラノーマ細胞株 SK-Mel [31] を用いた. 各細胞を 5% Calf Serum (CS : Hyclome, Logan, UT, USA) を含む DF 培地を用いて 37°C, 95% Air/5% CO₂ 気相下, CO₂ インキュベータ (ウオータージャケット型 CO₂/マルチガスインキュベーター SCA-165DS, アステック, 福岡) 内で培養した. 継代培養は細胞がコンフルエントになった時点で行った. 細胞を 0.05% trypsin (Sigma-Aldrich) と 0.04% エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA; 同仁化学, 熊本) を含む Dulbecco's Ca, Mg-free phosphate-buffer saline (CMF-PBS) (Trypsin/EDTA) で分散後, 通法に従い継代培養を行った.

第2節 扁平上皮癌細胞におけるインテグリン α_v の蛋白翻訳後修飾についての検討

1) 各細胞からの total RNA の抽出

各細胞の total RNA は TRIzol[®] Reagent (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) を用いて抽出した。各細胞を TRIzol[®] Reagent に溶解し、1/5 量のクロロホルムを加え混和した。室温にて 3 分静置後、4°C で 12,000×rpm, 15 分間遠心した。上層を回収後、等量のイソプロパノールを加え、室温にて 10 分静置後、4°C で 12,000×rpm, 10 分間遠心し RNA を沈殿させた。沈殿した RNA を 75 % エタノールで洗浄後、nuclease-free water (Sigma-Aldrich) に溶解し、分光光度計 (NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer, エル・エム・エス, 東京) にて total RNA 量を定量した。

2) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) によるインテグリン α_v , β_1 , β_3 , β_5 , β_6 及び β_8 の mRNA 発現の検討

1) で抽出された total RNA 1 μ g に、Random hexamers 及び Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) 逆転写酵素 (以上, ReverTra Ace[®], 東洋紡績, 大阪) を加え、アニーリング 30°C, 10 分, 酵素反応 42°C, 30 分, 変性反応 99°C, 5 分反応させて cDNA を合成した。合成された cDNA を鋳型として、各インテグリン遺伝子の cDNA 配列より設計したプライマー対 (α_v センスプライマー: 5' - : GATCAACAGGCTTGAACGC-3', α_v アンチセンスライマー: 5' - TCCTCACACTGCATCAGTCC-3'; β_1 センスプライマー: 5' -TCTGGCAAATTCTGCGAGTGT-3', β_1 アンチセンスライマー: 5' -TGACACATCTCACACGTTTGCC-3'; β_3 センスプライマー: 5' -TCTGCCACAGCAGTGACTTTG-3', β_3 アンチセンスライマー: 5' -ACATGCAGGTGTCAGTACGC-3';

β5 センスプライマー：5'-ACCAAACCTCGCGGAGGAGATG-3'，β5 アンチセンスプライマー：5'-TGCCGTGTAGGAGAAAGGAGAG-3'；β6 センスプライマー：5'-ATCATCTCAGCTTATGAAGAACTGC-3'，β6 アンチセンスプライマー：5'-TTGCCACAAACACAGTCCCCGC-3'；β8 センスプライマー：5'-TGTTGATGTCTCAGCATCAATGCAC-3'，β8 アンチセンスプライマー：5'-TGATTATGAATCCTTTTCGGGGTG-3'）と KOD DNA Polymerase (KOD FX NEO[®]，東洋紡績) を用いて 98℃，10 分処理後，94℃；1 分，57℃；1 分，72℃；1 分を 1 サイクルとし 25 サイクルの反応を行った．なお，対照遺伝子である GAPDH には，5'-ATCATCAGCAATGCCTCCTGC-3'（センスプライマー：）と 5'-TGCCAGTGAGCTTCCCGTTC-3'（アンチセンスプライマー）のプライマー対を使用した．PCR 増幅産物を 1%アガロースゲルで電気泳動後，SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Life Technologies Corporation) で染色し解析した．

3) テトラサイクリン発現誘導システムを用いたインテグリンα_v の一過性発現系の構築 (図 1，2)

インテグリンα_v 蛋白の一過性発現のために，T-REx[™] System (Life Technologies Corporation) にてテトラサイクリン (Tet) 発現誘導システムを構築した．Joseph C. Loftus 博士 (Mayo Clinic Arizona, USA) より供与されたインテグリンα_v cDNA を鋳型として PCR 法を行い，インテグリンα_v の open reading frame を含む領域を増幅した．すなわち，PCR は制限酵素 *EcoRI* 認識配列（下線部）を付加したセンスプライマー：5'-CGGAATTCTTCGGCGATGGCTTTTCCGC-3' と *SmaI* 認識配列（下線部）を付加したアンチセンスプライマー：5'-TCCCCCGGGTAAAGTTTCTGAGTTTCCTTCACCAT-3' を用い，94℃，2 分処理後，変性反応 98℃，10 秒，アニーリング 59℃，30 秒，伸長反応 68℃，1 分 30 秒を 1 サイクルとして 30 サイクルの反応を行った．続いて，PCR 増幅産物とテトラサイ

クリン発現誘導ベクターpcDNA4/TO を、制限酵素 *EcoRI* と *SmaI* (以上, New England Biolabs, Ipswich, MA) で切断後, DNA Ligation Kit Ver.2 Solution (タカラバイオ, 滋賀) で 16°C, 8 時間リガーゼ反応を行った. これを *E.coli* JM109 株に形質転換した後, 100µg/ml アンピシリン (和光純薬) 添加 LB 培地 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) でアンピシリン耐性の形質転換株を選択しプラスミドを調節した. pcDNA4/TO に組み込まれたインテグリン α_v 遺伝子の塩基配列を CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Brea, CA) を用いて確認し, pcDNA4/TO/ α_v として実験に用いた.

pcDNA4/TO/ α_v を Tet リプレッサー発現ベクターpcDNA6/TR とともに, A431 に TransFast™ Regent (Promega, 東京) を用いたりポフェクタミン法にて遺伝子導入を行った. 5 % CS, 3 µg/ml Blasticidin 及び 300µg/ml Zeocin (以上, Life Technologies Corporation) を含む DF で培養し, Blasticidin 及び Zeocin 耐性細胞を分離した. A431 に pcDNA4/TO/ α_v 及び pcDNA6/TR が導入された細胞を, A431 α_v -On とし実験に用いた (図 1, 2). A431 α_v -On は, 5% Tetracycline Screened FBS (Thermo Fisher Scientific) を含む DF 培地を用いて培養した.

4) インテグリン α_v の転写後及び翻訳後修飾の解析

A431 α_v -On を 1µg/ml テトラサイクリン存在下で, 0 時間, 1 時間, 2 時間, 4 時間, 6 時間, 12 時間, 24 時間培養後, 第 2 節 - 1) 及び第 2 節 - 2) の方法に準じて, インテグリン α_v の mRNA 発現の経時的変化を解析した.

また, A431 α_v -On を 1µg/ml テトラサイクリン存在下で各時間培養した後, PBS にて洗浄後, Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) を添加した cell lysis buffer (10mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% TritonX-100) を加え, 超音波破碎処理を行った後, 4°C, 15,000rpm, 15 分間遠心し, 得られた上清を

細胞溶解液として用いた。細胞溶解液を 5×sample buffer (625mM Tris-HCl, pH6.8, 10mM EDTA, 15% SDS, 50% Glycerol, 0.1%BPB) で調整し、非還元下または還元下で 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後、PVDF メンブレン (Bio-Rad Laboratories) に、Trans-Blot SD Cell (BIO-RAD) を用いて Electrotransfer 法にて転写した。転写メンブレンを 5%スキムミルク及び 0.1% Tween20 を含む 0.1M Tris-HCl (pH. 7.4) で室温下 1 時間ブロッキング後、500 倍希釈マウス抗ヒトインテグリン α_v モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) と室温下で 1 時間反応させた。なお、対照である β -actin に対して、1000 倍希釈ウサギ抗ヒト β -actin ポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いた。続いて、メンブレンを 0.1% Tween20 を含む 0.1M Tris-HCl (pH7.4) で洗浄後、インテグリン α_v の検出には、2 次抗体として 1000 倍希釈 HRP 標識ウマ抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を、 β -actin の検出には 2000 倍希釈 HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いた。続いて、それぞれ 1 時間反応させた後、Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories) にて検出した。

5) インテグリン α_v の蛋白翻訳後修飾に対する各種プロテアーゼ阻害剤の影響についての検討

A431 α_v -On を 1 μ g/ml テトラサイクリン添加 DF 培地で 24 時間培養後、100 μ g/ml のリソソーム阻害剤クロロキン (Sigma-Aldrich), 10 μ g/ml のカルパイン阻害剤 ALLN (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) あるいは 1 μ g/ml のプロテアソーム阻害剤 MG132 (Merck KgaA) を添加した DF 培地で 24 時間培養し、細胞蛋白中の α_v 蛋白を、第 2 節 - 4) の方法に準じた Western Blot 法で解析した。

6) 間接蛍光抗体法による扁平上皮癌細胞におけるインテグリン α_v と Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) 発現の検討

A431 α_v -On 細胞におけるインテグリン α_v と、オートファゴソームマーカーである LC3 の局在を蛍光二重免疫染色で検討した。2x10⁴個の A431 α_v -On 細胞を Lab-Tek Chamber (Nalge Nunc International, NY, USA) 上でテトラサイクリン存在下にて 24 時間培養後、テトラサイクリン非存在下で、50 μ M クロロキン添加培地にてさらに 24 時間培養した。PBS にて洗浄後、4%パラホルムアルデヒドにて 10 分間固定した。PBS にて洗浄後、0.1% Triton X-100 処理し、200 倍マウス抗ヒト α_v 抗体と 500 倍ウサギ抗ヒト LC3 抗体 (Medical & Biological Laboratories) で 37°C, 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、1000 倍希釈した Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Life Technologies Corporation) 及び Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Life Technologies Corporation) で 37°C, 1 時間反応させ PBS にて洗浄、VECTASHIELD Hard・Set Mounting Medium (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA) でスライドグラスに封入し、焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Carl Zeiss, Oberkochen) で観察した。

7) 共免疫沈降法によるインテグリン α_v と p62 とユビキチンの複合体形成と、インテグリン α_v のユビキチン化についての検討

テトラサイクリン及びクロロキンで 24 時間処理した A431 α_v -On の細胞溶解液と、あらかじめ 4 μ g の非免疫ウサギ IgG, ウサギ抗ヒトインテグリン α_v ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) またはウサギ抗ヒト p62 ポリクローナル抗体 (MEDICAL&BIOLOGICAL LABORATORIES) を吸着させた Dynabeads[®] Protein G (Life Technologies Corporation) を、室温下で 10 分間振盪しながら反応さ

せた. 続いて PBS にて 3 回洗浄し, laemmli sample buffer を加えて 95°C で 3 分間処理した後, 磁気分離することで Dynabeads[®] Protein G より溶出した結合蛋白を上清中に回収し標品とした.

同標品に対し, マウス抗ヒトインテグリン α_v モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) またはマウス抗ヒト p62 モノクローナル抗体 (Medical & Biological Laboratories) を用いて Western Blot を行い, 標品中のインテグリン α_v 蛋白または p62 蛋白の検出を行った. さらにウサギ抗ヒトインテグリン α_v ポリクローナル抗体で免疫沈降した標品に対して, ウサギ抗ユビキチン抗体 (Thermo Fisher Scientific, 東京) を用いて Western Blot を行い, α_v 蛋白のユビキチン化を検索した.

第 3 節 インテグリン β 鎖が, α_v 蛋白発現に与える影響についての検討

1) インテグリン $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ 及び $\beta 8$ 発現ベクターの構築 (図 3)

第 2 節-3) に準じて, インテグリン $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ 及び $\beta 8$ 発現ベクターを作成した. すなわち, 口腔扁平上皮癌細胞あるいは線維芽細胞の total RNA から合成された cDNA を鋳型として, 各 β 鎖の open reading frame 内に設計した以下のプライマー対を用いて各 β 鎖の cDNA を合成した.

$\beta 1$ センスプライマー: 5' -GGAATTCGCCACCATGAATTTACAACCAATTTTCTGGATTGG -3' (下線部は *EcoRI* 認識配列), $\beta 1$ アンチセンスプライマー: 5' -GCTCTAGATCATTTTCCCTCATACTTCGGATTG -3' (下線部は *XbaI* 認識配列); $\beta 3$ センスプライマー: 5' -CCGCTCGAGGCCACCATGCGAGCGCGGCC-3' (下線部は *XhoI* 認識配列), $\beta 3$ アンチセンスプライマー: 5' -GCTCTAGATTAAAGTCCCCGGTACGTG-3' (下線部は *XbaI* 認識配列); $\beta 5$ センスプライマー: 5' -GGAATTCGCCACCATGCCGCGGGCCCCGGC-3' (下線部は *EcoRI* 認識配列), $\beta 5$ アンチセンスプライマー: 5' -GCTCTAGATTAAAGTCCCCGGTACGTG-3' (下線部は *XbaI* 認識配列).

チセンスライマー：5'-GCTCTAGATCAGTCCACAGTGCCATTGTAGGATTTGTTG-3'（下線部は *Xba*I 認識配列）； β 6 センスプライマー：5'-GGAATTCACCATGGGGATTGAACTGCTTTGCC-3'（下線部は *Eco*RI 認識配列）， β 6 アンチセンスライマー：5'-GCTCTAGACTAGCAATCTGTGGAAAGGTC-3'（下線部は *Xba*I 認識配列）； β 8 センスプライマー：5'-GGAATTCTTTGCATTATGTGCGGCTCGG-3'（下線部は *Eco*RI 認識配列）， β 8 センスプライマー 5'-TCCCCCGGGTTAGAAGTTGCACCTGAAAGTT-3'（下線部は *Sma*I 認識配列）。

増幅された PCR 産物と哺乳動物発現ベクター pCI-neo（Promega）を各制限酵素で切断した後，リガーゼ反応を行い，pCI-neo にインテグリン β 1， β 3， β 5， β 6 または β 8 の open reading frame を組み込み，それぞれ pCI-neo/ β 1，pCI-neo/ β 3，pCI-neo/ β 5，pCI-neo/ β 6 または pCI-neo/ β 8 を作製した．pCI-neo に組み込まれたインテグリン β 1， β 3， β 5， β 6， β 8 遺伝子の塩基配列は CEQTM 8000 Genetic Analysis System を用いて確認した．

2) A431 α v-On への β 1， β 3， β 5， β 6 または β 8 の遺伝子導入（図 3）

第 2 節 - 3) の方法に準じて，A431 α v-On に pCI-neo，pCI-neo/ β 1，pCI-neo/ β 3，pCI-neo/ β 5，pCI-neo/ β 6 または pCI-neo/ β 8 に A431 α v-On を導入し，それぞれ A431 α v-On/mock，A431 α v-On/ β 1，A431 α v-On/ β 3，A431 α v-On/ β 5，A431 α v-On/ β 6 または A431 α v-On/ β 8 の細胞株を分離した．

3) インテグリン β 鎖が α v 蛋白の蛋白翻訳後修飾に与える影響の検討

A431 α v-On/ β 1，A431 α v-On/ β 3，A431 α v-On/ β 5，A431 α v-On/ β 6 または A431 α v-On/ β 8 を 1 μ g/ml テトラサイクリン存在下で 24 時間培養した後，さらに テトラサイクリン非存在下で各時間培養した時のインテグリン α v 蛋白発現を，

第2節4)の方法に準じて Western Blot で解析した。β1, β3, β5, β6 またはβ8 の検出には, それぞれ 500 倍希釈ウサギ抗ヒトインテグリンβ1 ポリクローナル抗体, ヤギ抗ヒトインテグリンβ3 ポリクローナル抗体, ヤギ抗ヒトインテグリンβ5 ポリクローナル抗体, ウサギ抗ヒトインテグリンβ6 ポリクローナル抗体, ヤギ抗ヒトインテグリンβ8 ポリクローナル抗体(以上 Santa Cruz Biotechnology) と, それぞれ 2 次抗体として 1000 倍希釈 HRP 標識ウマ抗マウス IgG 抗体, HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(以上 Cell Signaling Technology) または 20000 倍希釈ウサギ HRP 標識抗ヤギ IgG 抗体 (KPL)を用いた。

4) 共免疫沈降法によるインテグリンαv とβ1, β3, β5, β6, β8 との複合体形成についての検討 (図4)

テトラサイクリンで 24 時間処理した A431αv-On/β1, A431αv-On/β3, A431αv-On/β5, A431αv-On/β6 または A431αv-On/β8 の細胞溶解液と, あらかじめ 4 μg の非免疫ヤギ IgG (Santa Cruz Biotechnology) またはウサギ抗ヒトインテグリンαv ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を吸着させた Dynabeads® Protein G 用いて免疫沈降を行い, 得られた標品に対し抗ヒトインテグリンβ1, β3, β5, β6 及びβ8 ポリクローナル抗体を用いて Western Blot を行い, 標品中のインテグリンβ1, β3, β5, β6 及びβ8 蛋白の検出を行った。

5) インテグリンαv, β1, β3, β5, β6 及びβ8 蛋白の細胞内での局在の検討

テトラサイクリンで 24 時間処理した A431αv-On/β1, A431αv-On/β3, A431αv-On/β5, A431αv-On/β6 または A431αv-On/β8 の各細胞画分を, Subcellular Protein Fractionation Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて分離した (図5)。すな

わち, Trypsin/EDTA 処理で分散・回収した細胞を Cytoplasmic Extraction Buffer で 4°C, 10 分間攪拌後遠心し, 上清を細胞質画分として回収した. 沈渣を Membrane Extraction Buffer に懸濁し 4°C, 10 分間攪拌後遠心後, 上清を膜画分として回収した. 得られた沈渣を Nuclear Extraction Buffer で 4°C, 30 分間攪拌後遠心し, 上清を可溶性核画分とした. さらに沈渣を chromatin-bound extraction buffer で室温, 15 分反応後, 遠心し, 上清をクロマチン結合画分として分離した. 得られた沈渣を Pellet Extraction Buffer で室温, 10 分間反応後遠心し, 上清を細胞骨格画分とした. 上記の方法で得られた各細胞画分中の α_v , β_1 , β_3 , β_5 , β_6 , β_8 蛋白を, 第 2 節 - 4) の方法に準じて Western Blot 法で検討した.

第 4 節 インテグリン α_v ファミリーの扁平上皮癌細胞の造腫瘍能における関与

1) *in vivo*における α_v のテトラサイクリン発現誘導システムの機能確認

生理食塩水に浮遊させた 2×10^6 個の A431 α_v -On/mock, A431 α_v -On/ β_1 , A431 α_v -On/ β_3 , A431 α_v -On/ β_5 , A431 α_v -On/ β_6 または A431 α_v -On/ β_8 を 4 週齢のヌードマウス (Balb/cAJCnu/nu) の背部皮下に接種し, 接種直後より 15 日間, 200 μ g/ml のドキシサイクリンを含む飲料水を与えた. 細胞接種後 15 日目に形成腫瘍を摘出し, ホモジネートを調整した. ホモジネートに対し第 2 節 - 3) の方法に準じて Western Blot を行い, 形成腫瘍における α_v と, β_1 , β_3 , β_5 , β_6 または β_8 の発現を解析し, *in vivo*においてもテトラサイクリン発現誘導システムが機能してるか否かを検討した.

2) ヌードマウスでの造腫瘍性の判定

第 4 節- 1) において, 形成された腫瘍の長径と短径を経時的に測定した. 腫瘍体積は以下に示す計算式にて算出した.

$$\text{体積} = 1/2 \times \text{長径} \times (\text{短径})^2$$

なおヌードマウスを使用した一連の実験は，広島大学医学部附属動物実験施設で行った．

第3章 結果

1) テトラサイクリン発現誘導システムによる α_v の発現誘導

本研究では、インテグリン α_v とそのカウンターパートである β_1 , β_3 , β_5 , β_6 及び β_8 , いずれの発現も低下している外陰部扁平上皮癌細胞株 A431 (図6) を使用した. α_v 蛋白の一過性発現のために, テトラサイクリン発現誘導システムを A431 に導入し, A431 α_v -On を分離した. A431 α_v -On をテトラサイクリン存在下で培養すると 1 時間後より mRNA 発現がみられ, 12~24 時間後にその発現は最大となった (図7). また α_v 蛋白発現は, テトラサイクリン処理 1 時間後よりみられ, 経時的に発現が亢進し, 24 時間後にその発現は最大になった (図8).

2) インテグリン α_v の転写後及び翻訳後の修飾

A431 α_v -On をテトラサイクリン存在下で 24 時間培養した後, さらにテトラサイクリン非存在下で各時間 (具体的に時間を書くこと) 培養し, α_v の mRNA と蛋白の発現をそれぞれ RT-PCR 法と Western Blot 法にて解析した. A431 α_v -On をテトラサイクリン処理することにより一過性に発現誘導された α_v mRNA は, テトラサイクリン非存在下で培養すると, 1 時間後にはほぼ消失した (図9). また, テトラサイクリン処理により発現誘導された α_v 蛋白の発現は, テトラサイクリン非存在下では, 12 時間から 24 時間後には著しく低下した (図10).

3) インテグリン α_v の蛋白翻訳後修飾に及ぼす各種プロテアーゼ阻害剤の影響

A431 α_v -On において一過性に発現誘導された α_v 蛋白は, テトラサイクリン非存在下では時間依存性に発現が低下したことから, 翻訳後に細胞内で分解等の修飾を受けていると考えられた. そこで, インテグリン α_v の蛋白翻訳後の細

胞内での分解機序の解明のため、テトラサイクリンにより α_v 蛋白発現を誘導した A431 α_v -On を、リソソーム阻害剤クロロキン, カルパイン阻害剤 ALLN あるいはプロテアソーム阻害剤 MG132 存在下で培養した後、 α_v 蛋白の発現を Western Blot 法で解析した。ALLN 及び MG132 を添加しても α_v 蛋白発現は低下したが、クロロキン添加により、 α_v 蛋白発現は維持されていた (図 1 1)。

4) A431 α_v -On におけるインテグリン α_v と Microtubule-associated protein lightchain 3 (LC3) の局在

テトラサイクリン処理により α_v 蛋白を発現誘導後、クロロキン存在下、テトラサイクリン不含培地で培養した A431 α_v -On 細胞では、核に近接した部位に、LC3 陽性の類円系の顆粒が認められた。また、 α_v 蛋白も核に近接した部位での発現が確認され、マージ画像で α_v 蛋白とオートファゴソームの共在が示唆された (図 1 2)。

5) 共免疫沈降法によるインテグリン α_v と p62 の複合体形成と及びインテグリン α_v のユビキチン化についての検討

テトラサイクリンによる α_v 蛋白の発現誘導後、クロロキン存在下、テトラサイクリン不含培地で培養した A431 α_v -On の細胞溶解液に対し、抗 p62 抗体で免疫沈降を行なった標品中に α_v 蛋白が検出され、さらに抗 α_v 抗体で免疫沈降を行った標品中にも p62 が検出されたことから、p62 と α_v が、細胞内で複合体を形成していることが示された。また、抗 α_v 抗体で免疫沈降を行った蛋白がユビキチン化されていることも明らかとなった (図 1 3)。

6) インテグリン β 鎖が α_v 蛋白の蛋白翻訳後修飾に与える影響

α_v のカウンターパートであるインテグリン $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ または $\beta 8$ が, α_v 蛋白発現に与える影響について検討した.

$\beta 1$ または $\beta 8$ 発現細胞である A431 α_v -On/ $\beta 1$ または A431 α_v -On/ $\beta 8$ では, 一過性に発現誘導された α_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, $\beta 3$, $\beta 5$ または $\beta 6$ 発現細胞である A431 α_v -On/ $\beta 3$, A431 α_v -On/ $\beta 5$ または A431 α_v -On/ $\beta 6$ では, 一過性に発現誘導された α_v 蛋白はテトラサイクリン非存在下でも発現が維持されていた (図 1 4).

7) 共免疫沈降法によるインテグリン α_v と $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 8$ の複合体形成

A431 α_v -On/ $\beta 1$, A431 α_v -On/ $\beta 3$, A431 α_v -On/ $\beta 5$, A431 α_v -On/ $\beta 6$ または A431 α_v -On/ $\beta 8$ において発現誘導された α_v が, それぞれ $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ または $\beta 8$ と二量体を形成しているかを共免疫沈降法で検討した. テトラサイクリンで 24 時間処理した各細胞の細胞溶解液を抗 α_v 抗体で免疫沈降し, 抗 $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ または $\beta 8$ 抗体を用いて Western Blot を行った. その結果, 抗 α_v 抗体で免疫沈降した標品中に, それぞれの β 鎖が検出されたことから, テトラサイクリン処理した A431 α_v -On/ $\beta 1$, A431 α_v -On/ $\beta 3$, A431 α_v -On/ $\beta 5$, A431 α_v -On/ $\beta 6$ または A431 α_v -On/ $\beta 8$ においては, α_v が, それぞれ $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ または $\beta 8$ と二量体を形成していることが示された (図 1 5).

8) インテグリン α_v 蛋白及び β 蛋白の細胞内での局在

α_v の細胞内局在を検討するため, A431 α_v -On/ $\beta 1$, A431 α_v -On/ $\beta 3$, A431 α_v -On/ $\beta 5$, A431 α_v -On/ $\beta 6$ または A431 α_v -On/ $\beta 8$ の各細胞画分中の α_v 蛋白及び $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ または $\beta 8$ 蛋白を検索した. その結果, いずれの細胞においても, α_v 蛋白は一部が細胞質と核に局在したが, その大部分は膜分画に存在

していた。また、 $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ 及び $\beta 8$ 蛋白の大部分は、 αv 蛋白同様、膜面に存在していた (図 1 6)。

9) *in vivo*における αv のテトラサイクリン発現誘導システムの機能確認

A431 αv -On/ $\beta 1$, A431 αv -On/ $\beta 3$, A431 αv -On/ $\beta 5$, A431 αv -On/ $\beta 6$ または A431 αv -On/ $\beta 8$ をヌードマウスの背部皮下に接種し、接種直後より 15 日間、200 μ g/ml のドキシサイクリンを含む飲料水を与え、接種 15 日後に形成腫瘍を摘出し、 αv 及び $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ または $\beta 8$ 蛋白の発現を、Western Blot 法にて検討した。その結果、テトラサイクリン投与マウスに形成された腫瘍では、各 β 鎖の蛋白発現が認められるとともに、 αv 蛋白の発現も強く誘導されていた (図 1 7)。

1 0) ヌードマウスでの造腫瘍性の判定

テトラサイクリン投与及び非投与マウスに、A431 αv -On/ $\beta 1$, A431 αv -On/ $\beta 3$, A431 αv -On/ $\beta 5$, A431 αv -On/ $\beta 6$ および A431 αv -On/ $\beta 8$ の各細胞を接種し、形成された腫瘍の増殖を検討した結果、A431 αv -On/ $\beta 5$ 細胞の増殖はテトラサイクリン投与により抑制された。一方、A431 αv -On/ $\beta 1$, A431 αv -On/ $\beta 3$ および A431 αv -On/ $\beta 6$ 細胞の増殖は、テトラサイクリン投与により促進された (図 1 8)。

第4章 考察

インテグリンは α 鎖と β 鎖の2つの膜貫通型サブユニットからなるヘテロ二量体の細胞膜蛋白で、細胞外基質蛋白の受容体として細胞外基質への細胞の接着を調節するだけでなく[32]、細胞の増殖、分化や運動を制御するシグナルの伝達を行っていることが知られている[33]。インテグリンは器官発生や組織分化のみならず、がん化やがん細胞の運動や蛋白分解酵素産生の調節因子として、がん浸潤や転移においても重要な役割を担っている[16]。

特に、 α_v ファミリーは、悪性腫瘍の増殖や進展と密接に関連していることが知られている。これまでに、メラノーマ細胞や口腔扁平上皮癌細胞において、インテグリン α_v が、活性型マトリックスメタロプロテアーゼ2 (MMP-2) の細胞膜上の受容体として機能していることや、口腔扁平上皮癌の浸潤、転移に密接に関与していることが報告されている[34, 35]。

インテグリン α_v は、 $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ または $\beta 8$ と二量体を形成することが知られている。これまでに、 α_v のカウンターパートであるインテグリン $\beta 8$ は、蛋白翻訳後すみやかにユビキチン/プロテアソーム系で分解されるが、 α_v との二量体形成が $\beta 8$ 蛋白の安定発現に重要な役割を担っていることが報告されている[36]。

本研究では、扁平上皮癌におけるインテグリン α_v 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 α_v の蛋白質翻訳後修飾を解析するとともに、 α_v の安定発現におけるインテグリン β 鎖の関与について検討した。さらに、 α_v ファミリーが扁平上皮癌細胞の造腫瘍能に与える影響について検討した。

扁平上皮癌細胞における α_v の蛋白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て、 α_v ファミリー発現がほとんどみられない外陰部扁平上皮癌細胞株 A431 に一過性に α_v 蛋白を発現誘導した後、テトラサイ

クリン非存在下での同蛋白の経時的な発現変動を検討した。テトラサイクリン処理により, A431 α v-On において一過性に発現誘導された α v 蛋白は, A431 α v-On をテトラサイクリン非存在下で培養すると, 時間依存性に発現が低下したことから, α v は蛋白翻訳後, 細胞内で分解等の修飾を受けていると推測された。

細胞内の変性蛋白や不要な蛋白を分解する代表的なシステムとして, 標的蛋白にユビキチン鎖が付加されることによりプロテアソームで選択的な蛋白分解を受けるユビキチン/プロテアソーム系と, 隔離膜と呼ばれる膜画分によって, 細胞質やオルガネラ等の蛋白質を取り囲むことにより形成されるファゴソームにリソソームが融合することでオートファゴソーム内の蛋白質を非特異的に分解するオートファジー系が知られている。これらの蛋白分解機序は, 変性蛋白や細胞にとって不要な蛋白の排除を行うだけでなく、細胞周期, シグナル伝達や転写制御などの細胞の機能維持に関与していることが知られている[37]。

α v 蛋白の分解機構を明らかにするために, 細胞内での蛋白分解酵素群の阻害が, A431 α v-On で一過性に発現誘導された α v 蛋白の発現に与える影響について検討した。カルパイン阻害剤 ALLN やプロテアソーム阻害剤 MG132 は, α v 蛋白発現低下には影響をしめさなかったが, リソソーム阻害剤クロロキンは, α v 蛋白の発現低下を抑制した。このことから, α v は蛋白翻訳後にオートファジーによる分解を受けている可能性が考えられた。

オートファジーが誘導されると隔離膜と呼ばれる膜構造が出現し, 細胞質成分をとりかこみながら膜を伸長させ, 最終的には二重膜構造であるオートファゴソームが形成される。Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) は, 細胞質内で合成された後, リン脂質等の修飾を受け, 隔離膜やオートファゴソーム膜のリン脂質分子フォスファチジルエタノールアミンを介して特異的に結合することから, オートファゴソームマーカーとして広く用いられている[38]。

クロロキン存在下で培養した A431 α v-On 細胞における α v 蛋白と LC3 の局在を蛍光二重免疫染色で検討したところ、 α v と LC3 が共在していることが示されたことから、 α v はオートファゴソーム内に存在していると推測された。

従来、オートファジーは非特異的な蛋白分解機構であると考えられてきたが、近年、特定のたんぱく質をファゴソーム内で分解する選択的オートファジーの存在が明らかになっている[39-41]。選択的オートファジーは、ユビキチン化されたものの、プロテアソームによって分解されなかった蛋白が、アダプター蛋白による結合を受けることで選択的にファゴソームに取り込まれ分解される機構で、代表的なアダプター蛋白として p62 や Nbr1 が知られている[42, 43]。 α v 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、 α v と p62 との複合体形成とともに、 α v のユビキチン化を共免疫沈降法にて解析した。その結果、p62 と α v が複合体を形成していること、さらに α v がユビキチン化されていることも明らかとなった。

インテグリンの α 鎖と β 鎖はリボソームで合成された後、小胞体で会合することで二量体を形成し、細胞膜上に移動し発現すると考えられている [44]。マウス由来線維芽細胞において、インテグリン α 4 を発現誘導すると、そのカウンターパートである β 1 及び β 7 の発現が亢進することが報告されている[45]。さらに口腔扁平上皮癌細胞株 SCCKN において α v を発現誘導すると、 β 8 の転写には影響を与えないものの、 β 8 蛋白発現が亢進することが報告されている[24]。このように、インテグリン発現においては、 α 鎖と β 鎖との二量体形成が重要な役割を担っており、インテグリン α v の発現においてもカウンターパートである β 1, β 3, β 5, β 6 及び β 8 が何らかの影響を与えていると考えられた。そこで、それぞれの β 鎖が α v 発現に与える影響を検討するために、A431 α v-On に β 1, β 3, β 5, β 6 または β 8 遺伝子を導入し、各 β 鎖が発現している細胞株を作製した。共免疫沈降法

にて、これらの細胞株において αv は $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ または $\beta 8$ と複合体を形成していることが示された。さらに αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ 及び $\beta 8$ の細胞内局在を解析すると、いずれの細胞においても、テトラサイクリンで発現誘導された αv 蛋白の大部分は膜分画中に存在し、 $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ 及び $\beta 8$ 蛋白の大部分は、 αv 蛋白と同様に膜分画中に存在していた。 $\beta 1$ 及び $\beta 8$ 発現細胞では、テトラサイクリンにより一過性に発現誘導された αv 蛋白は、テトラサイクリン非存在下では、その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、テトラサイクリン非存在下でも αv 発現が維持されていた。このことから、インテグリン $\beta 3$, $\beta 5$ または $\beta 6$ と二量体形成した αv は、オートファジーによる分解を受けず、細胞膜上で安定発現していると考えられた。

口腔扁平上皮癌における αv ファミリーの浸潤・増殖における関与が指摘されているが、詳細については不明な点が多い [46]。そこで A431 αv -On/ $\beta 1$, A431 αv -On/ $\beta 3$, A431 αv -On/ $\beta 5$, A431 αv -On/ $\beta 6$ または A431 αv -On/ $\beta 8$ で αv 蛋白発現を誘導させ、ヌードマウスにおける造腫瘍能を検討した。A431 αv -On/ $\beta 5$ による造腫瘍能は、テトラサイクリン投与群では非投与群に比べ低下した。一方、A431 αv -On/ $\beta 1$, A431 αv -On/ $\beta 3$ 及び A431 αv -On/ $\beta 6$ による造腫瘍能は、テトラサイクリン投与により亢進した。このことから、 $\alpha v\beta 5$ 発現は、扁平上皮癌細胞の造腫瘍能を低下させ、 $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ と $\alpha v\beta 6$ 発現は扁平上皮癌細胞の造腫瘍能を亢進させていることが示された。

これまでの研究結果より、扁平上皮癌細胞において、単量体のインテグリン αv 蛋白はユビキチン化されるがプロテアソームでの分解は受けず、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 $\beta 6$ と二量体を形成した αv は、オートファジーによる分解から保護され、 $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ または $\alpha v\beta 6$ として安定発現していた。 $\alpha v\beta 5$

は扁平上皮癌細胞の造腫瘍能の抑制に関与し、 $\alpha v\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ と $\alpha v\beta 6$ は造腫瘍能の亢進に関与していると考えられた.

以上の結果より、 $\alpha v\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 5$ 及び $\alpha v\beta 6$ 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 $\alpha v\beta 6$ は扁平上皮癌の治療を行う上で、重要な標的分子となりうる可能性が示唆された.

第 5 章 総括

扁平上皮癌におけるインテグリン α_v 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 α_v の蛋白質翻訳後修飾を解析するとともに、 α_v の安定発現におけるインテグリン β 鎖の関与について検討した。さらに、 α_v ファミリーが扁平上皮癌細胞の造腫瘍能に与える影響について検討し、以下のことが明らかとなった。

1. 単量体の α_v 蛋白は、翻訳後、細胞膜に移行するが、その後、細胞質内で p 62 を介した選択的オートファジーにより分解された。
2. α_v は β_3 , β_5 , β_6 と二量体を形成することでオートファジーによる分解を受けず、細胞膜上で安定発現していた。
3. $\alpha_v\beta_5$ は、扁平上皮癌細胞のヌードマウスにおける造腫瘍能を低下させ、 $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ と $\alpha_v\beta_6$ は扁平上皮癌細胞の造腫瘍能を亢進させた。

参考文献

1. Cambier, S., et al., *A role for the integrin $\alpha v \beta 8$ in the negative regulation of epithelial cell growth*. Cancer Res, 2000. 60(24): p. 7084-93.
2. Kanda, E., et al., *Activation of Rac and tyrosine phosphorylation of cytokine receptors induced by cross-linking of integrin $\alpha 4 \beta 1$ and cell adhesion in hematopoietic cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. 301(4): p. 934-40.
3. Levinson, H., J.E. Hopper, and H.P. Ehrlich, *Overexpression of integrin αv promotes human osteosarcoma cell populated collagen lattice contraction and cell migration*. J Cell Physiol, 2002. 193(2): p. 219-24.
4. Wang, L.H., *Molecular signaling regulating anchorage-independent growth of cancer cells*. Mt Sinai J Med, 2004. 71(6): p. 361-7.
5. Wicki, A., et al., *Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton*. Cancer Cell, 2006. 9(4): p. 261-72.
6. Berman, A.E., N.I. Kozlova, and G.E. Morozevich, *Integrins: structure and signaling*. Biochemistry (Mosc), 2003. 68(12): p. 1284-99.
7. Moulder, G.L., et al., *Talin requires beta-integrin, but not vinculin, for its assembly into focal adhesion-like structures in the nematode *Caenorhabditis elegans**. Mol Biol Cell, 1996. 7(8): p. 1181-93.
8. Calderwood, D.A., *Talin controls integrin activation*. Biochem Soc Trans, 2004. 32(Pt3): p. 434-7.
9. Hirata, H., K. Ohki, and H. Miyata, *Dynamic change in the distribution of $\alpha 5 \beta 1$ integrin on isolated ventral membrane: effect of divalent cation species*. Cell Motil Cytoskeleton, 2004. 59(2): p. 131-40.
10. Izzard, T., et al., *Vinculin activation by talin through helical bundle conversion*. Nature, 2004. 427(6970): p. 171-5.
11. Lewis, J.M., D.A. Cheresh, and M.A. Schwartz, *Protein kinase C regulates $\alpha v \beta 5$ -dependent cytoskeletal associations and focal adhesion kinase phosphorylation*. J Cell Biol, 1996. 134(5): p. 1323-32.
12. Takeuchi, Y., et al., *Differentiation and transforming growth factor-beta receptor down-regulation by collagen- $\alpha 2 \beta 1$ integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells*. J Biol Chem, 1997. 272(46): p. 29309-16.
13. Chen, J., et al., *$\alpha(v)$ integrin, p38 mitogen-activated protein kinase, and urokinase plasminogen activator are functionally linked in invasive breast*

- cancer cells*. J Biol Chem, 2001. 276(51): p. 47901-5.
14. Aplin, A.E., A.K. Howe, and R.L. Juliano, *Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth*. Curr Opin Cell Biol, 1999. 11(6): p. 737-44.
 15. Darribere, T., et al., *Integrins: regulators of embryogenesis*. Biol Cell, 2000. 92(1): p. 5-25.
 16. Watt, F.M., *Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation*. Embo j, 2002. 21(15): p. 3919-26.
 17. Juliano, R.L., et al., *Integrin regulation of cell signalling and motility*. Biochem Soc Trans, 2004. 32(Pt3): p. 443-6.
 18. Michimukai, E., et al., *Mutations in the human homologue of the Drosophila segment polarity gene patched in oral squamous cell carcinoma cell lines*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2001. 37(7): p. 459-64.
 19. Berry, M.G., et al., *Integrin expression and survival in human breast cancer*. Eur J Surg Oncol, 2004. 30(5): p. 484-9.
 20. Gruber, G., et al., *Correlation between the tumoral expression of beta3-integrin and outcome in cervical cancer patients who had undergone radiotherapy*. Br J Cancer, 2005. 92(1): p. 41-6.
 21. Hood, J.D. and D.A. Cheresh, *Role of integrins in cell invasion and migration*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(2): p. 91-100.
 22. McNeel, D.G., et al., *Phase I trial of a monoclonal antibody specific for alphavbeta3 integrin (MEDI-522) in patients with advanced malignancies, including an assessment of effect on tumor perfusion*. Clin Cancer Res, 2005. 11(21): p. 7851-60.
 23. Jones, J., F.M. Watt, and P.M. Speight, *Changes in the expression of alpha v integrins in oral squamous cell carcinomas*. J Oral Pathol Med, 1997. 26(2): p. 63-8.
 24. Hayashido, Y., et al., *Overexpression of integrin alphav facilitates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via MEK/ERK signaling pathway that is activated by interaction of integrin alphavbeta8 with type collagen*. Int J Oncol, 2014. 45(5): p. 1875-82.
 25. Ham, R.G., *An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines*. Exp Cell Res, 1963. 29: p. 515-26.
 26. Barnes, D. and G. Sato, *Serum-free cell culture: a unifying approach*. Cell, 1980. 22(3): p. 649-55.
 27. Darmon, M., et al., *Isolation of myoblastic, fibro-adipogenic, and fibroblastic clonal cell lines from a common precursor and study of their requirements for*

- growth and differentiation*. Exp Cell Res, 1981. 132(2): p. 313-27.
28. Giard, D.J., et al., *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. J Natl Cancer Inst, 1973. 51(5): p. 1417-23.
 29. Urade, M., et al., *Establishment of human squamous carcinoma cell lines highly and minimally sensitive to bleomycin and analysis of factors involved in the sensitivity*. Cancer, 1992. 69(10): p. 2589-97.
 30. Rose, G.G. and P.B. Robertson, *Collagenolysis by human gingival fibroblast cell lines*. J Dent Res, 1977. 56(4): p. 416-24.
 31. Carey, T.E., et al., *AU cell-surface antigen of human malignant melanoma: solubilization and partial characterization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(6): p. 2898-902.
 32. Partridge, C.A., et al., *Localization and activation of type IV collagenase/gelatinase at endothelial focal contacts*. Am J Physiol, 1997. 272(5 Pt 1): p. L813-22.
 33. Hynes, R.O., *Cell adhesion: old and new questions*. Trends Cell Biol, 1999. 9(12): p. M33-7.
 34. Brooks, P.C., et al., *Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3*. Cell, 1996. 85(5): p. 683-93.
 35. Guo, W. and F.G. Giancotti, *Integrin signalling during tumour progression*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. 5(10): p. 816-26.
 36. Yasutaka Hayashido, et al., *Overexpression of integrin αv facilitates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via mek/erk signaling pathway that is activated by interaction of integrin $\alpha v \beta 8$ with type I collagen*. International Journal of Oncology, 2014: p. 1875-1882
 37. Ciechanover, A., *Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting*. Neurodegener Dis, 2012. 10(1-4): p. 7-22.
 38. Kabeya, Y., et al., *LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation*. J Cell Sci, 2004. 117(Pt 13): p. 2805-12.
 39. Mizushima, N. and M. Komatsu, *Autophagy: renovation of cells and tissues*. Cell, 2011. 147(4): p. 728-41.
 40. Komatsu, M., et al., *Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice*. Nature, 2006. 441(7095): p. 880-4.

41. Hara, T., et al., *Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice*. Nature, 2006. 441(7095): p. 885-9.
42. Bjorkoy, G., et al., *p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death*. J Cell Biol, 2005. 171(4): p. 603-14.
43. Johansen, T. and T. Lamark, *Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins*. Autophagy, 2011. 7(3): p. 279-96.
44. Bouvard, D., et al., *Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. 14(7): p. 430-42.
45. Webb, D.L., et al., *Induction of mouse beta integrin expression following transfection with human alpha 4 chain*. J Cell Biochem, 1996. 61(1): p. 127-38.
46. Takada, Y., X. Ye, and S. Simon, *The integrins*. Genome Biol, 2007. 8(5): p. 215.

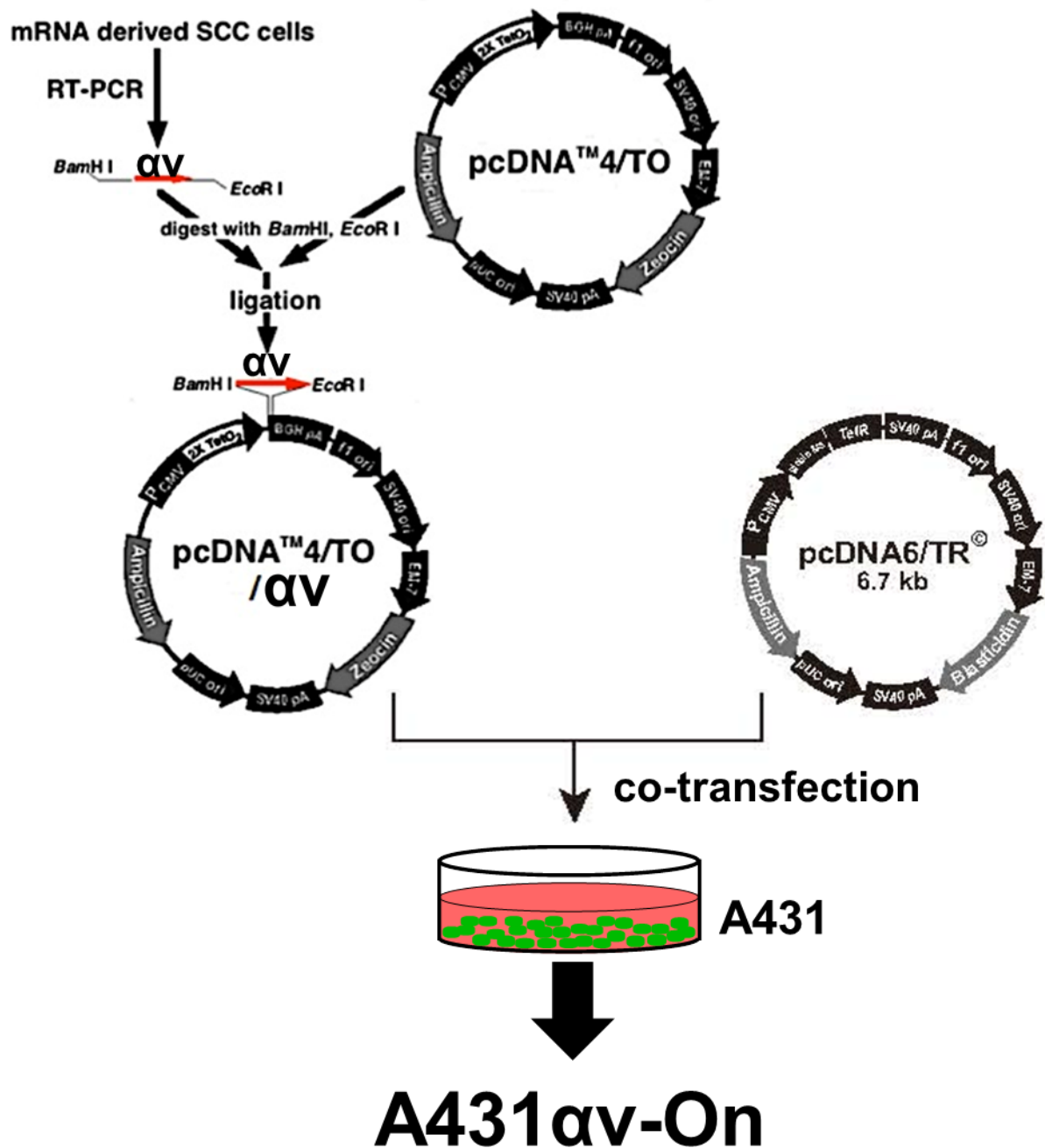


図1 テトラサイクリン発現誘導システムの概略

テトラサイクリン誘導性発現ベクターpcDNA4/TO に αv cDNA を組み込んだ pcDNA4/TO/ αv を作製し，Tet リプレッサー発現ベクターpcDNA6/TR とともに，外陰部扁平上皮癌細胞株 A431 に導入し，A431 αv -On を分離した。

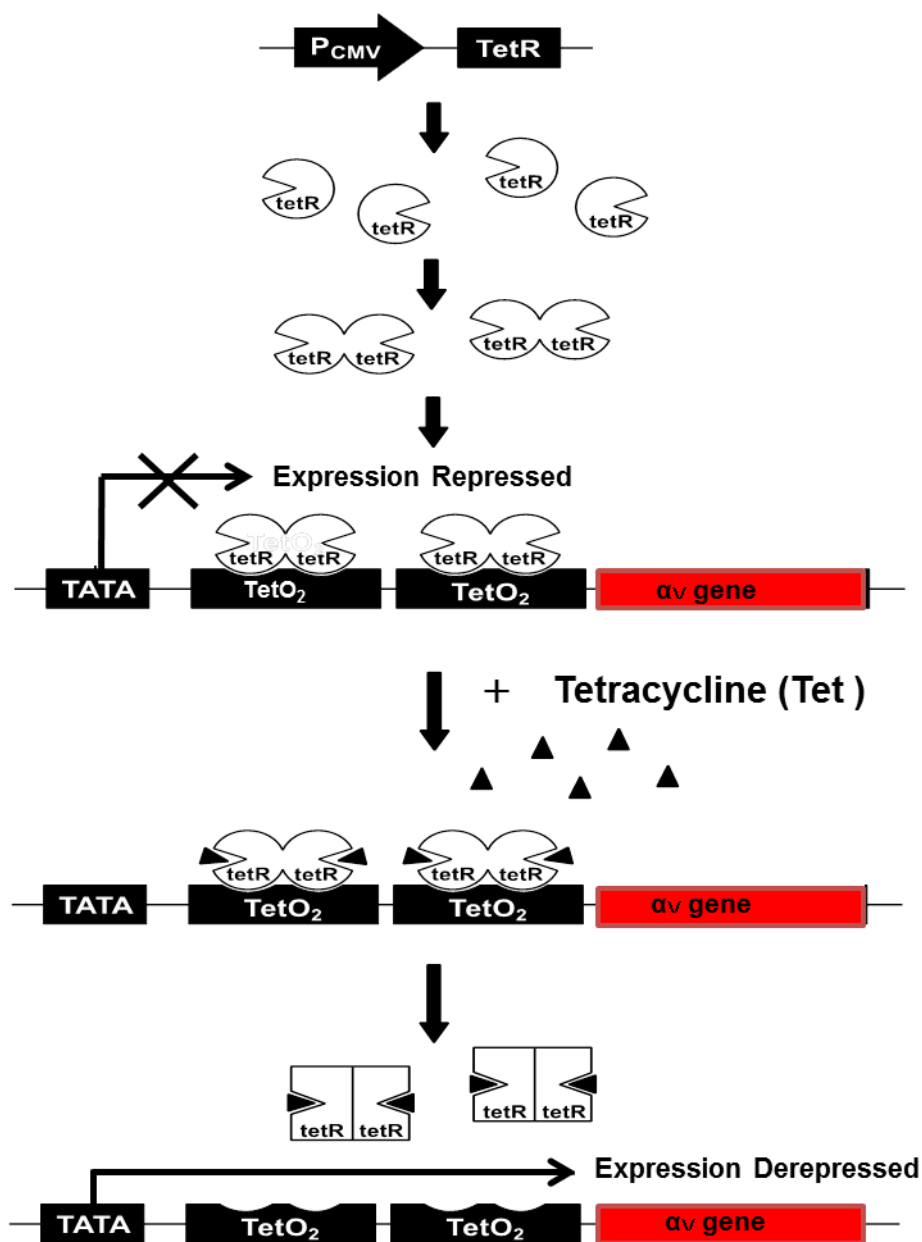


図2 テトラサイクリン発現誘導システムの作用機序

pcDNA6/TR 導入細胞は、テトラサイクリン非存在下では Tet リプレッサータンパクのホモダイマーが、オペレーター配列に結合することで、目的遺伝子である αv の転写が抑制されている。テトラサイクリン添加により、Tet リプレッサータンパクが、オペレーターから遊離することで、 αv 遺伝子の転写が誘導され、蛋白が翻訳される。

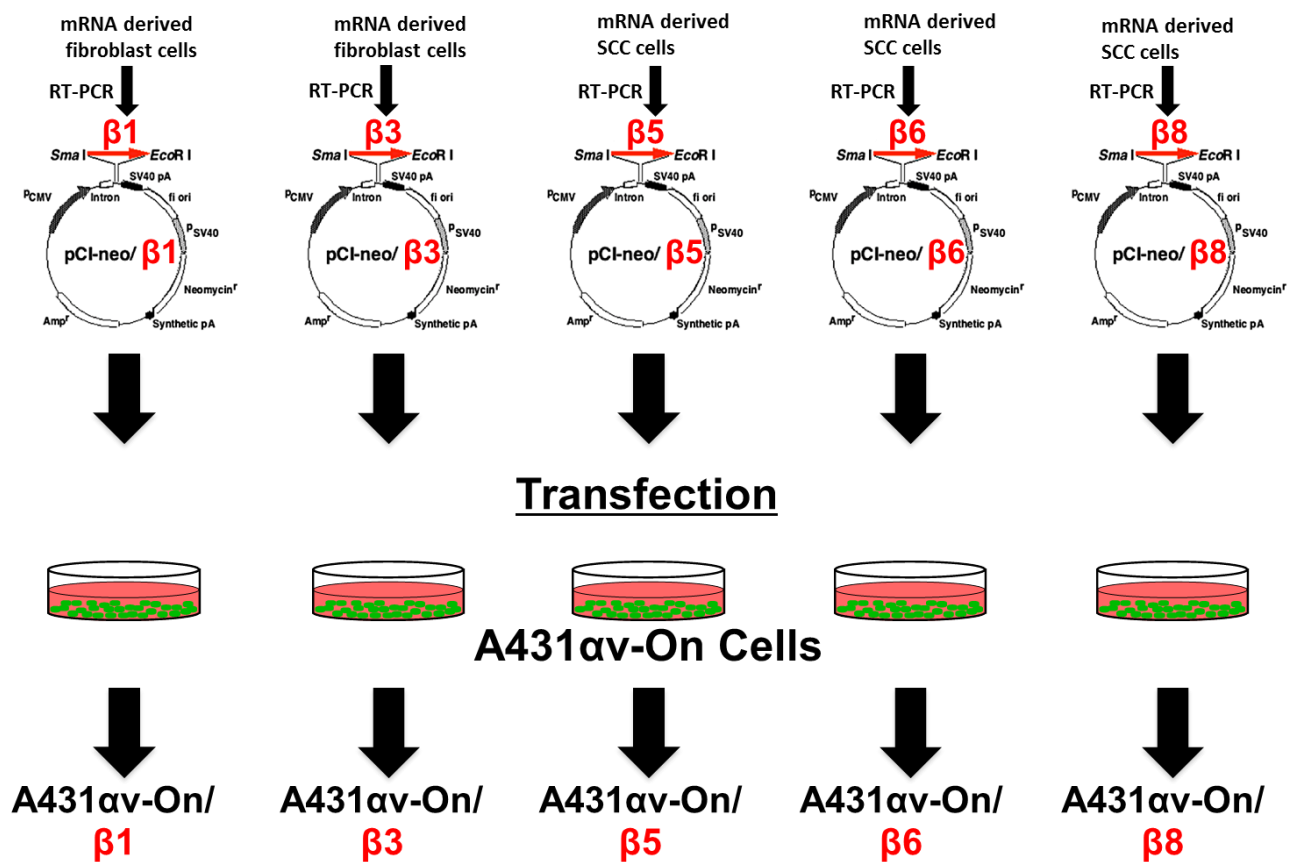


図3 インテグリンβ1, β3, β5, β6, β8発現ベクターの構築と遺伝子導入

αv 蛋白の安定性に与えるβ1, β3, β5, β6, β8の影響を検討するため, 哺乳動物発現ベクターpCI-neo/にβ1, β3, β5, β6, β8の cDNA を組み込んだ pCI-neo/ β1, pCI-neo/β3, pCI-neo/β5, pCI-neo/β6, pCI-neo/β8を作製した. そして, pCI-neo, pCI-neo/ β1, pCI-neo/β3, pCI-neo/β5, pCI-neo/β6, pCI-neo/β8を A431αv-On に導入し, それぞれ A431αv-On /mock または A431αv-On/ β1, A431αv-On/β3, A431αv-On/β5, A431αv-On/β6, A431αv-On o/β8を分離した.

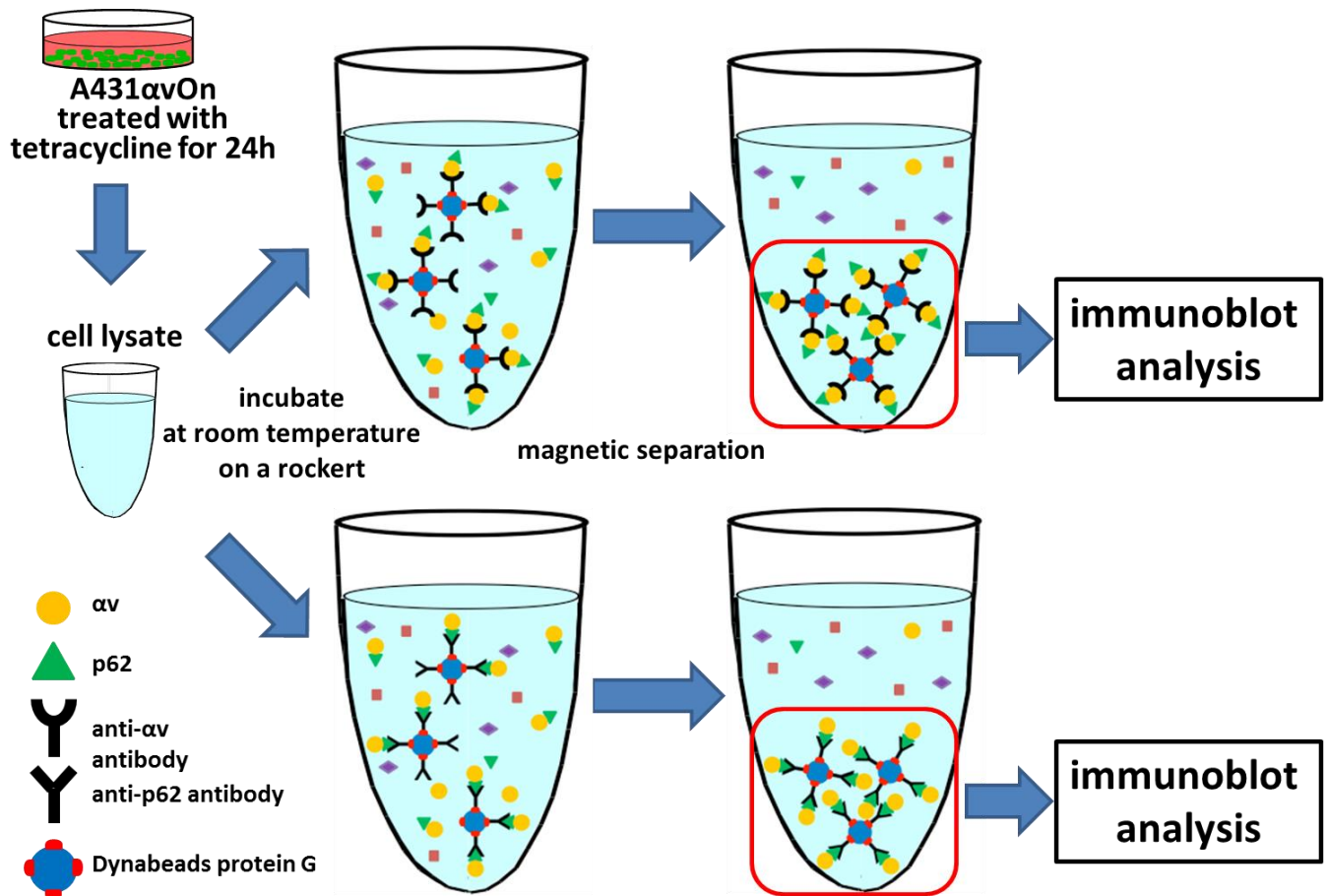


図4 共免疫沈降法によるインテグリン αv とp62の複合体形成についての検討
 テトラサイクリン (1 μ g/ml) で24時間処理した A431 αv -On の cell lysate を、
 抗 αv 抗体または抗p62抗体で免疫沈降した標品に対し、それぞれ抗p62抗体ま
 たは抗 αv 抗体を用いて immunoblot を行った。また、抗 αv 抗体で免疫沈降した
 標品に対し、抗ユビキチン抗体を用いて immunoblot を行った。

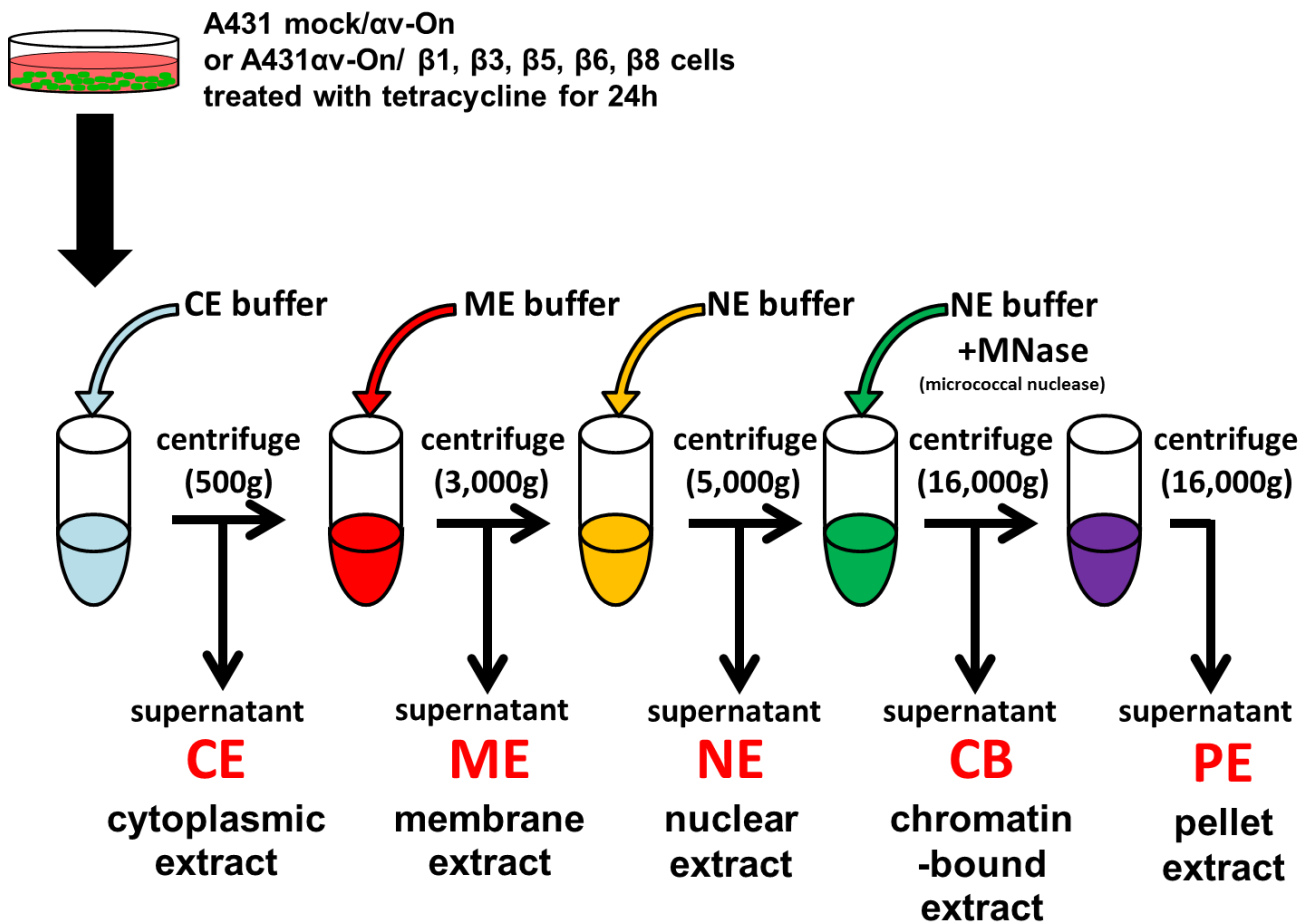


図5 インテグリン α v 蛋白の細胞内での局在の検討

テトラサイクリン (1 μ g/ml) で 24 時間処理した各細胞の細胞画分を分離し、各画分中の α v, β 1, β 3, β 5, β 6, β 8 蛋白を Western Blot 法で解析した。

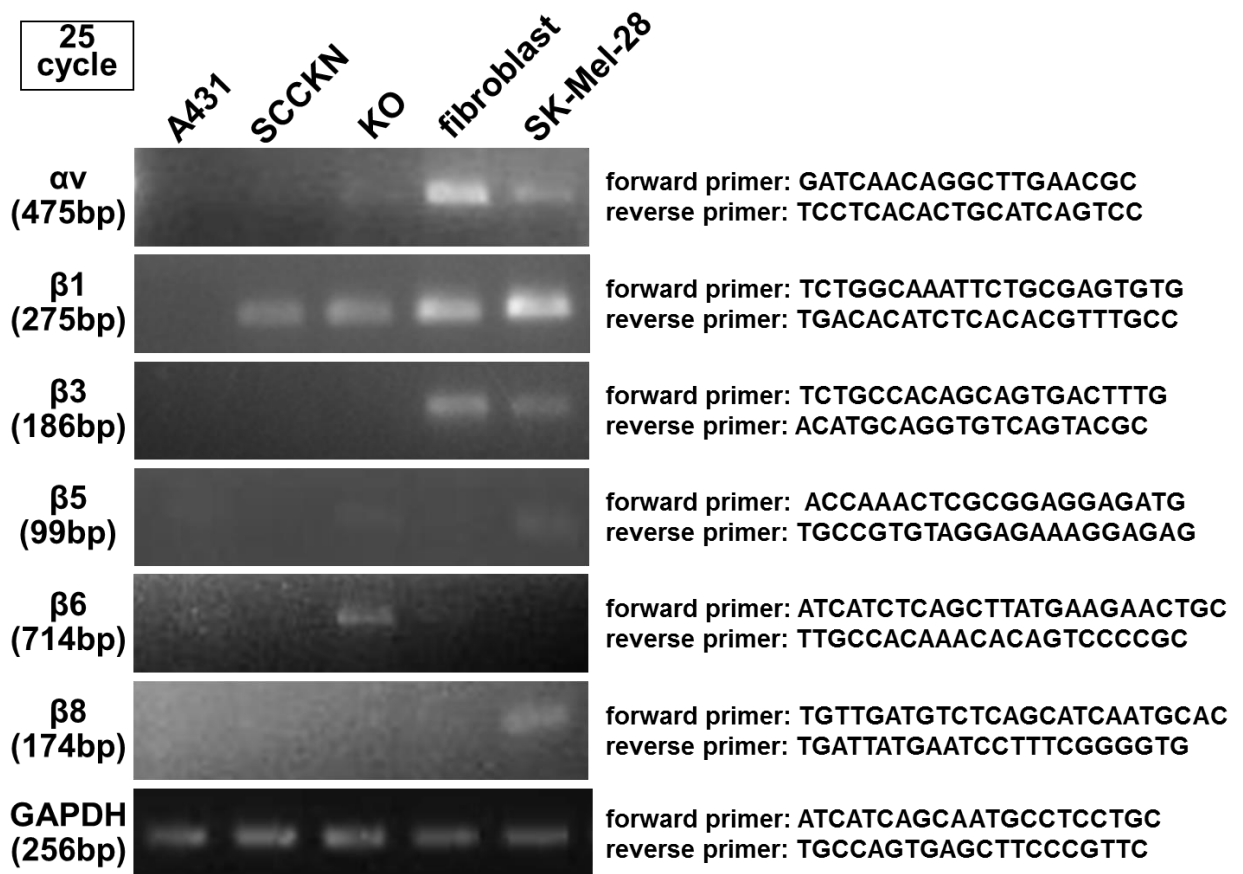


図6 各種細胞におけるインテグリン α vファミリーの mRNA 発現の検討

口腔扁平上皮癌細胞株 SCCKN 及び KO, 歯肉由来線維芽細胞線維芽細胞とヒトメラノーマ細胞株 SK-Mel-28 におけるインテグリン α v, β 1, β 3, β 5, β 6 及び β 8 の mRNA の発現を RT-PCR 法にて解析した.

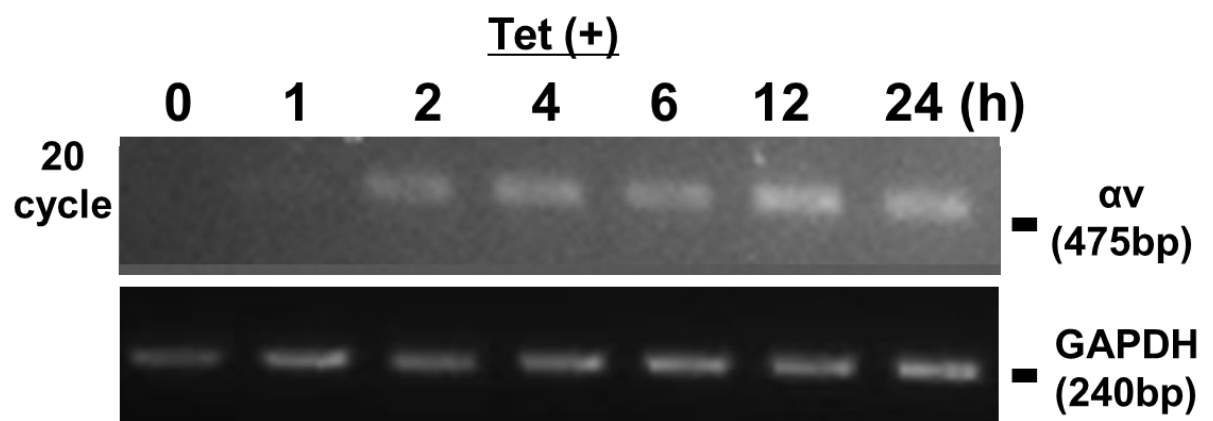


図7 テトラサイクリン発現誘導システムによる αv mRNA 発現の検討

テトラサイクリン (1 μ g/ml) 存在下で各時間培養後, A431 αv -On の αv mRNA 発現を RT-PCR 法にて解析した.

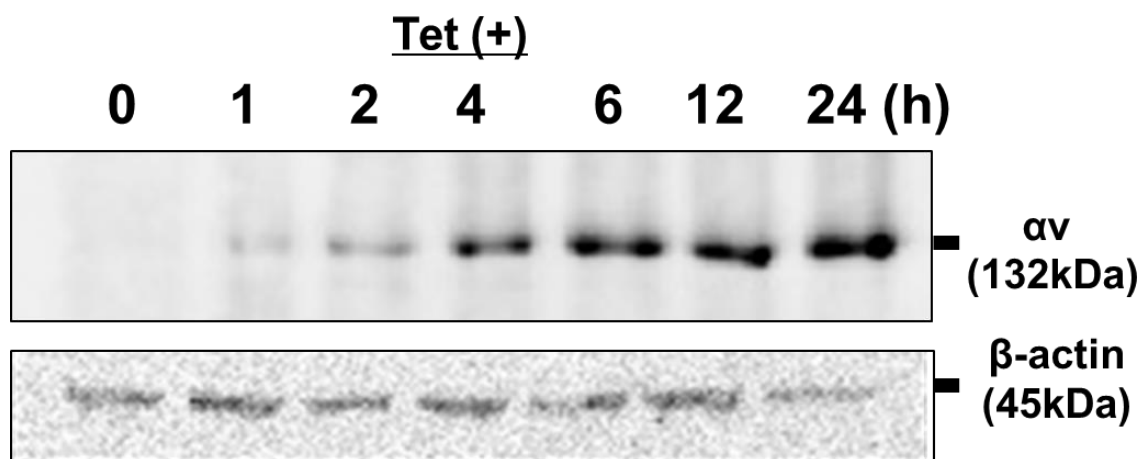


図8 テトラサイクリン発現誘導システムによる α_v 蛋白発現の検討

A431 α_v -On をテトラサイクリン (1 μ g/ml) 存在下で各時間培養後, α_v 蛋白発現を Western blot 法にて解析した.

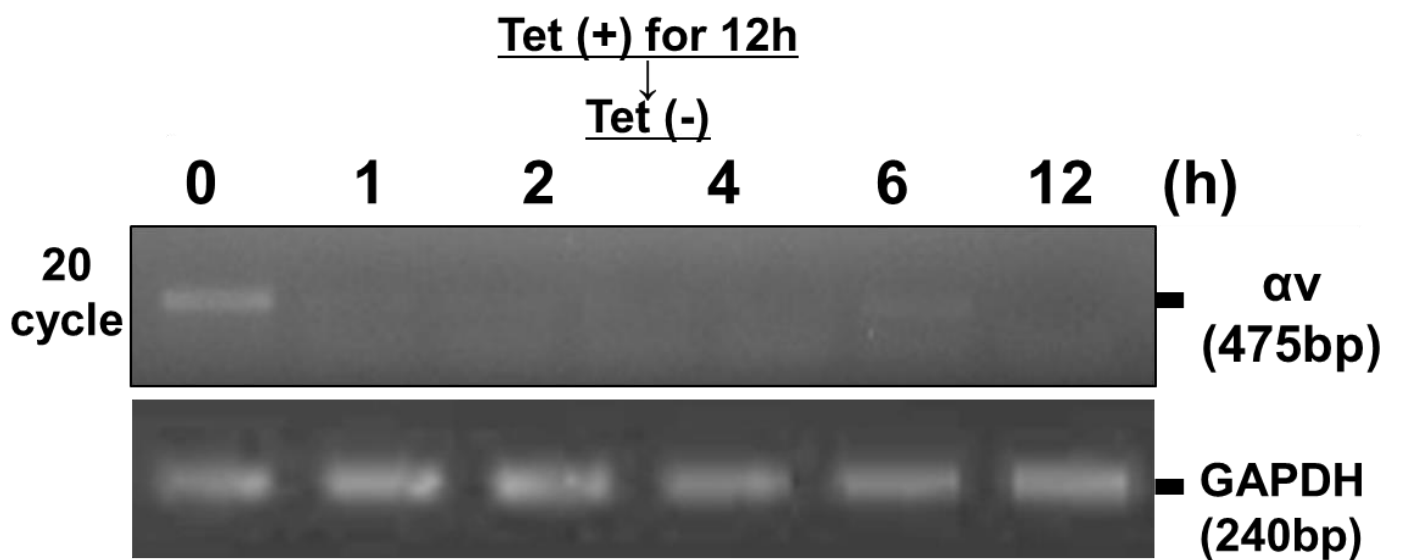


図9 インテグリン αv mRNA の転写後修飾の検討

テトラサイクリン (1 μ g/ml) で 24 時間処理後，テトラサイクリン非存在下で各時間培養後， αv mRNA の発現を RT-PCR 法にて解析した．

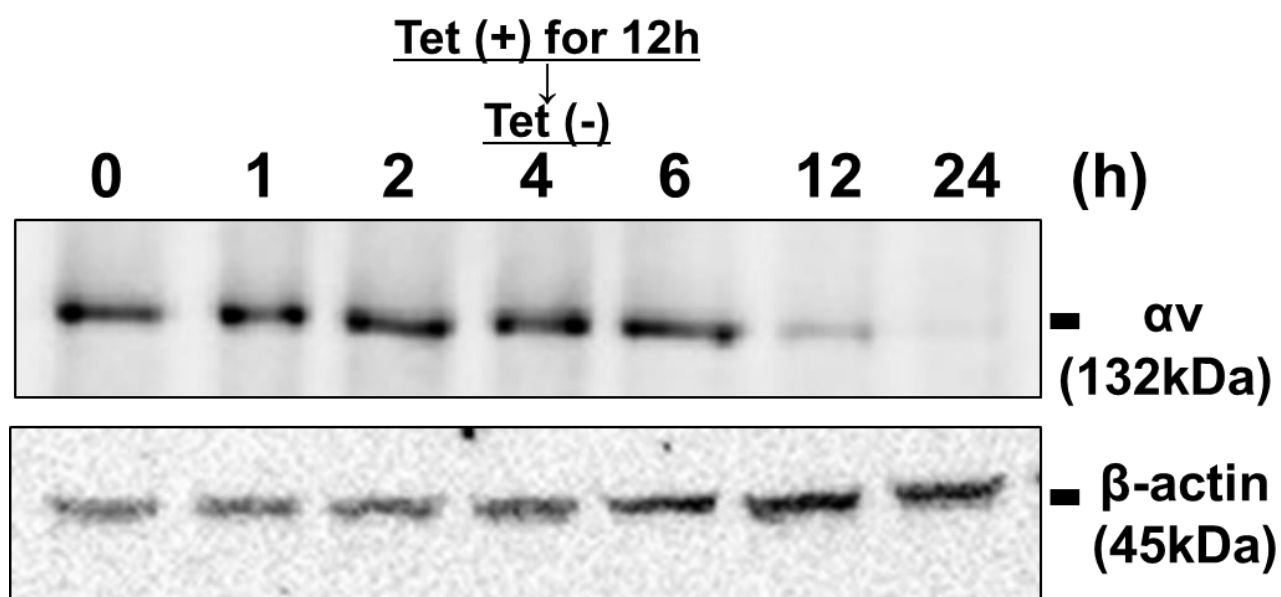


図 1 0 インテグリン α_v 蛋白の翻訳後修飾の検討

テトラサイクリン (1 μ g/ml) で 24 時間処理後, テトラサイクリン非存在下で各時間培養後, α_v 蛋白発現を Western blot 法にて解析した.

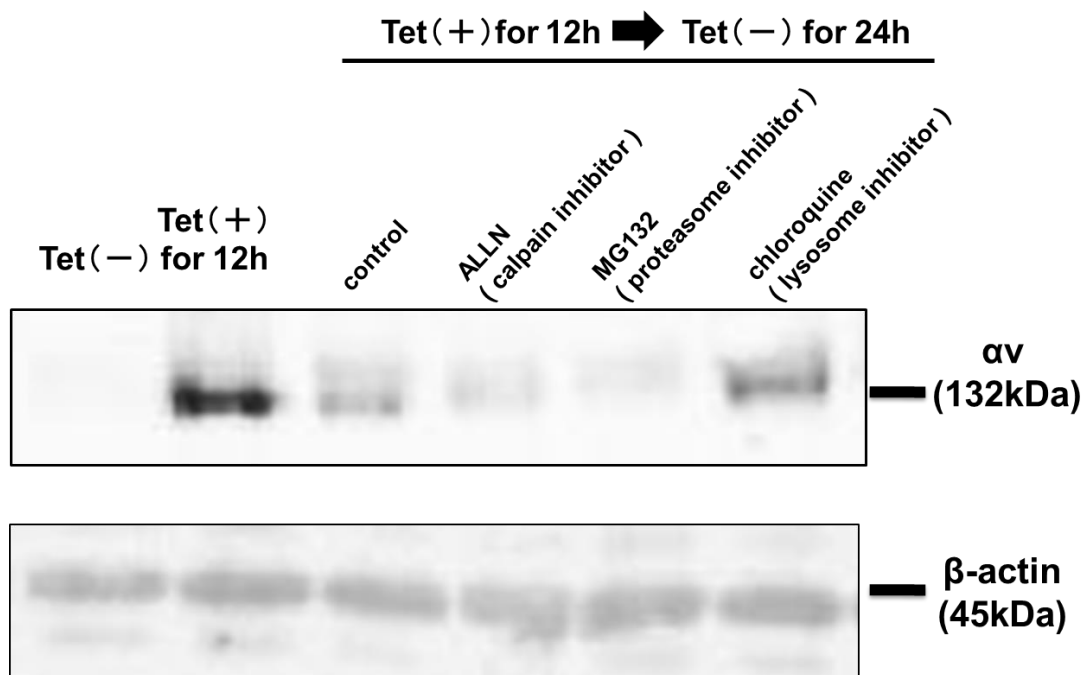


図 11 インテグリン α_v の蛋白翻訳後修飾に対する各種プロテアーゼ阻害剤の影響

テトラサイクリン (1 μ g/ml) 処理により A431 α_v -On に α_v 蛋白発現を誘導後，さらにカルパイン阻害剤 ALLN，プロテアソーム阻害剤 MG132 あるいはリソソーム阻害剤クロロキン添加，テトラサイクリン不含培地で 24 時間培養後， α_v 蛋白の発現を Western Blot 法で解析した．

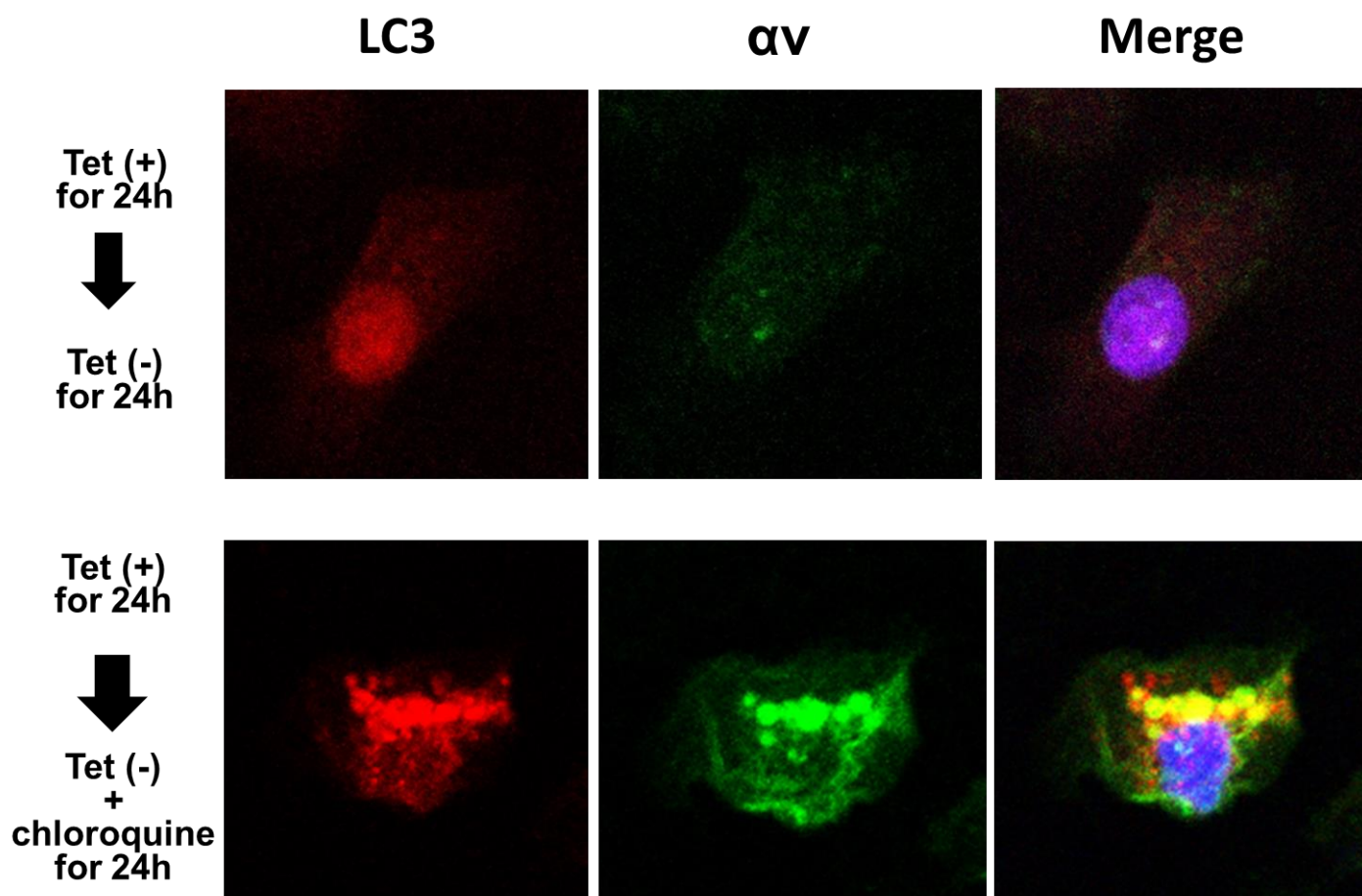


図 1 2 インテグリン αv の蛋白翻訳後修飾におけるオートファジーの関連

A431 αv -On をテトラサイクリン (1 μ g/ml) で 24 時間処理後, テトラサイクリン非存在下, 50mM chloroquine を 24 時間処理後の αv 及び LC3 発現を蛍光二重染色にて解析した.

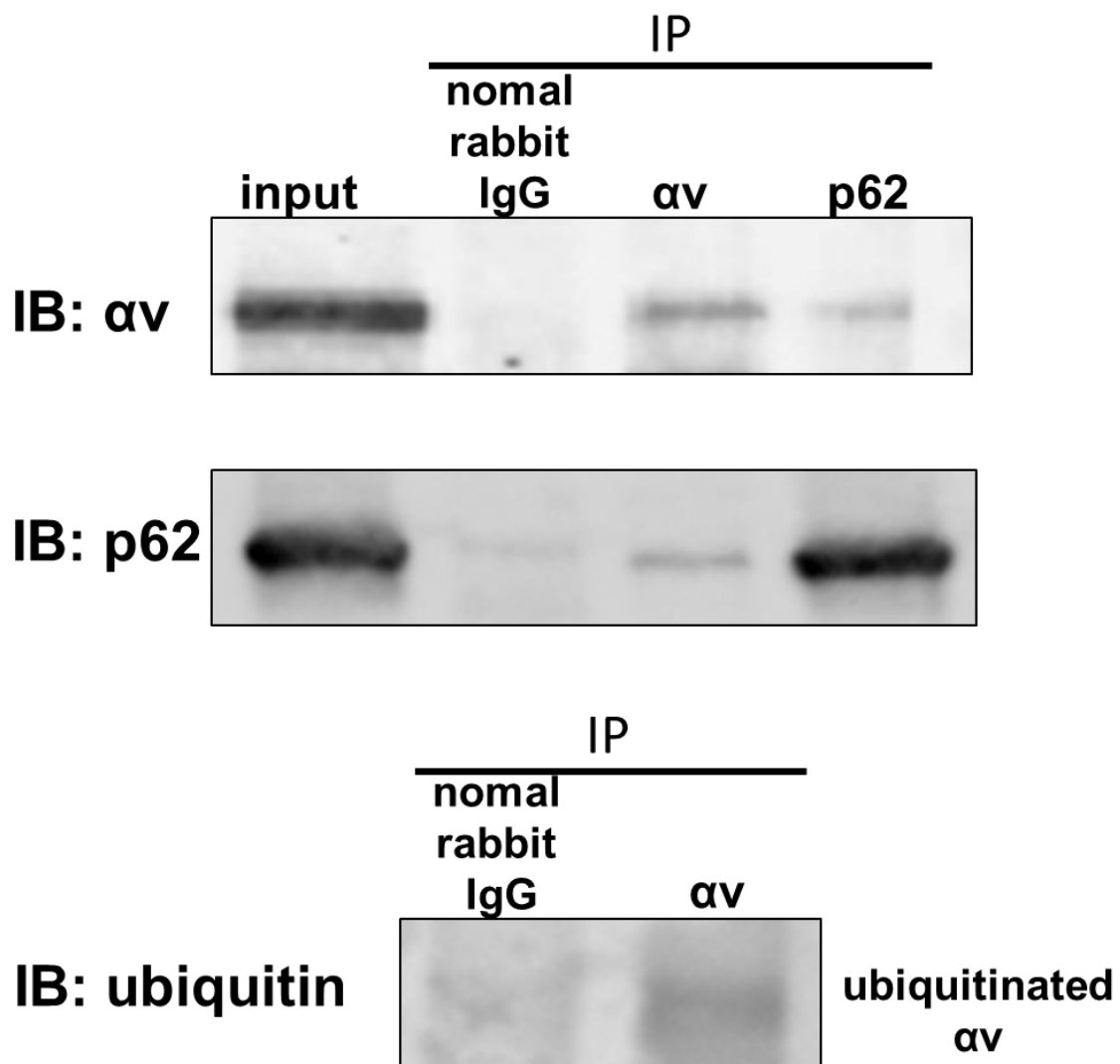


図 1 3 インテグリン α_v の蛋白翻訳後修飾における P62 とユビキチンの関連
テトラサイクリン (1 μ g/ml) で 24 時間処理した A431 α_v -On の細胞溶解液を、非免疫ウサギ IgG, ウサギ抗ヒトインテグリン α_v 抗体またはウサギ抗ヒト p62 抗体を用いて免疫沈降した標品に対し、ウサギ抗 p62 抗体またはマウス抗 α_v 抗体を用いて Western Blot を行い、標品中の p62 及び α_v を解析した。また、ウサギ抗 α_v 抗体を用いて免疫沈降した標品に対し、抗ユビキチン抗体を用いて Western Blot を行った。

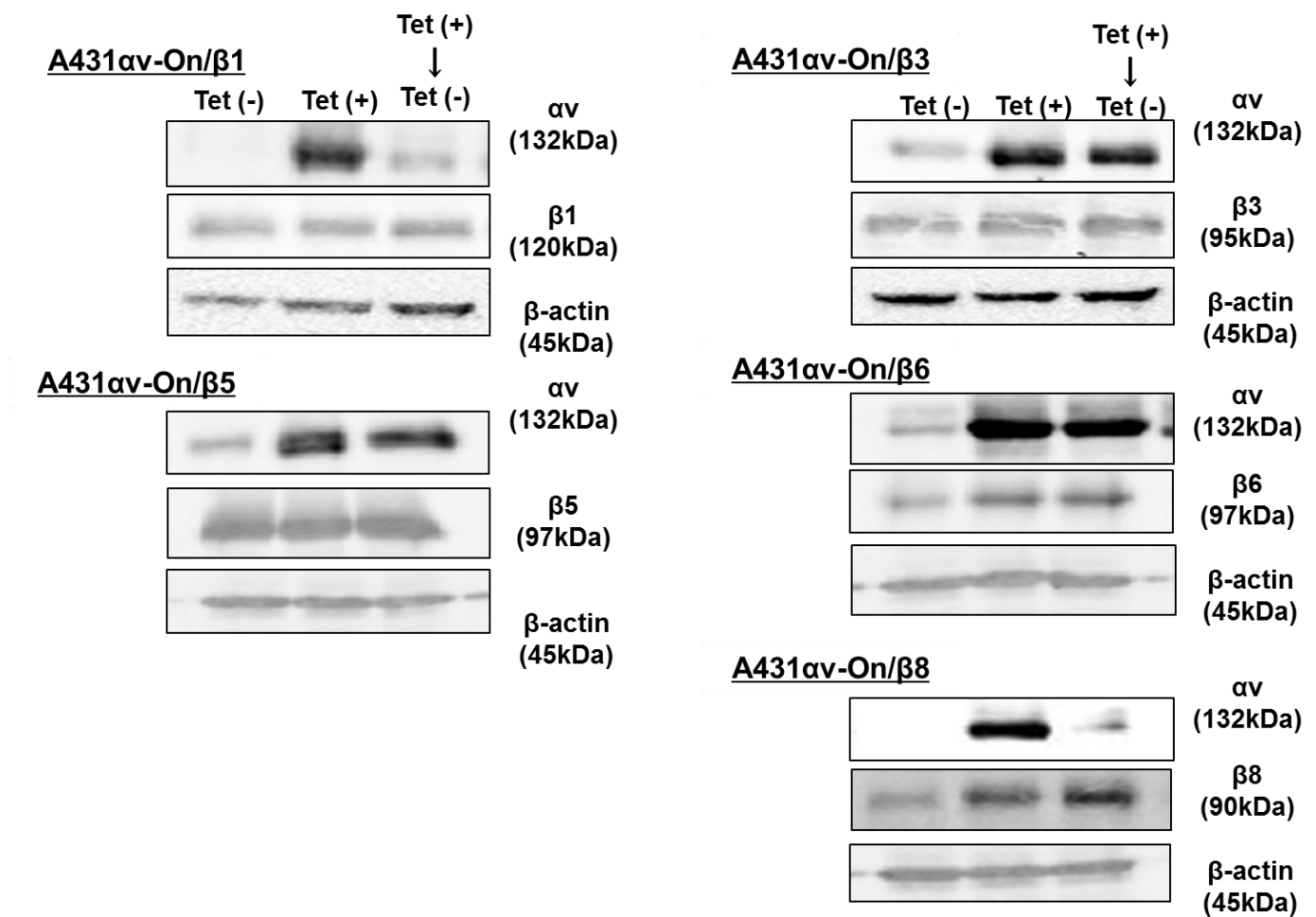


図 14 インテグリン α_v の蛋白翻訳後修飾に対するインテグリン β_1 , β_3 , β_5 , β_6 , β_8 の影響

A431αv-On/β1, A431αv-On/β3, A431αv-On/β5, A431αv-On/β6 及び A431αv-On/β8 を $1 \mu\text{g/ml}$ のテトラサイクリンで 24 時間処理後、テトラサイクリン非存在下で培養後、 α_v , β_1 , β_3 , β_5 , β_6 , β_8 の蛋白発現を Western Blot 法にて解析した。

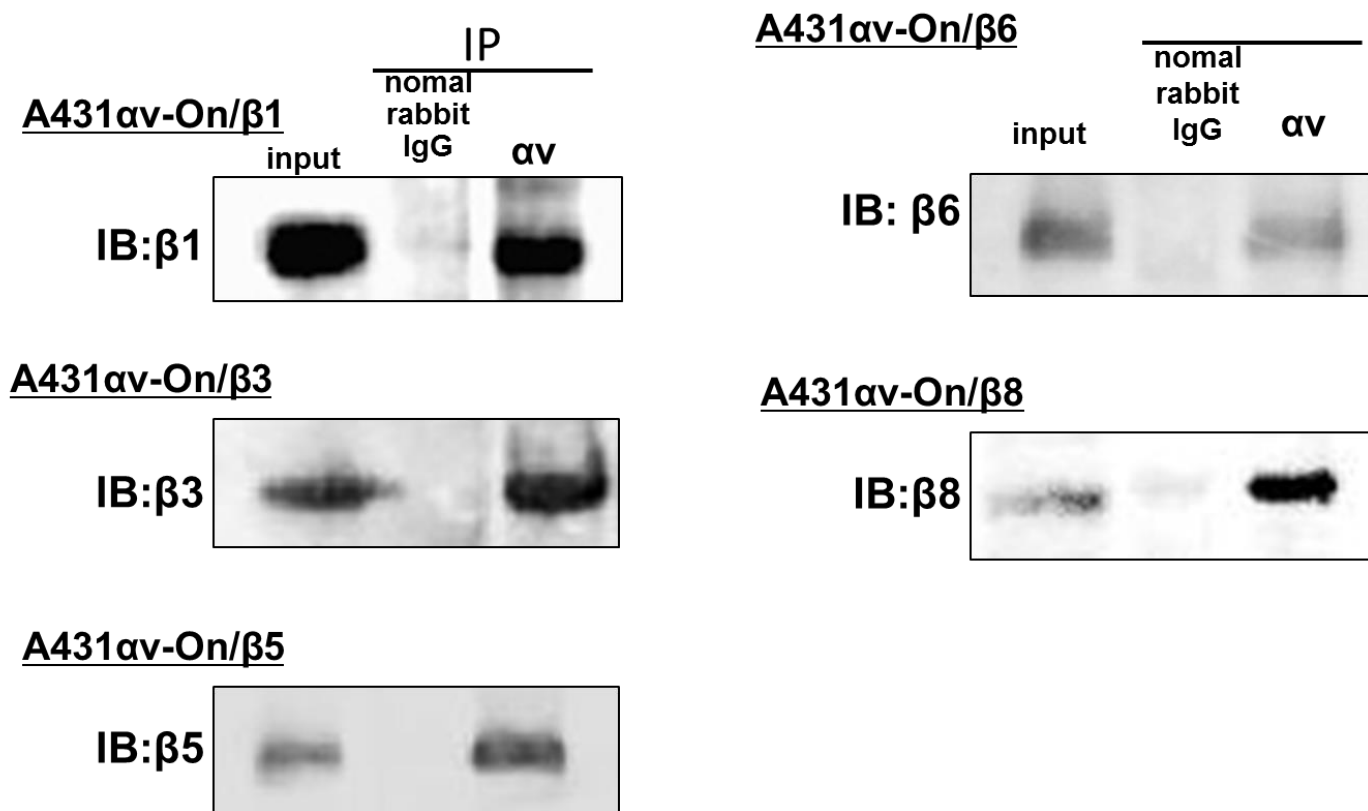


図 1 5 共免疫沈降法によるインテグリン αv と $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 8$ の複合体形成

A431 αv -On/ $\beta 1$, A431 αv -On/ $\beta 3$, A431 αv -On/ $\beta 5$, A431 αv -On/ $\beta 6$ 及び A431 αv -On/ $\beta 8$ をテトラサイクリン (1 μ g/ml) で 24 時間処理後の細胞溶解液を, 抗 αv 抗体を用いて免疫沈降した標品に対し, 抗 $\beta 1$ 抗体, 抗 $\beta 3$ 抗体, 抗 $\beta 5$ 抗体, 抗 $\beta 6$ 抗体, 抗 $\beta 8$ 抗体を用いて Western Blot を行った.

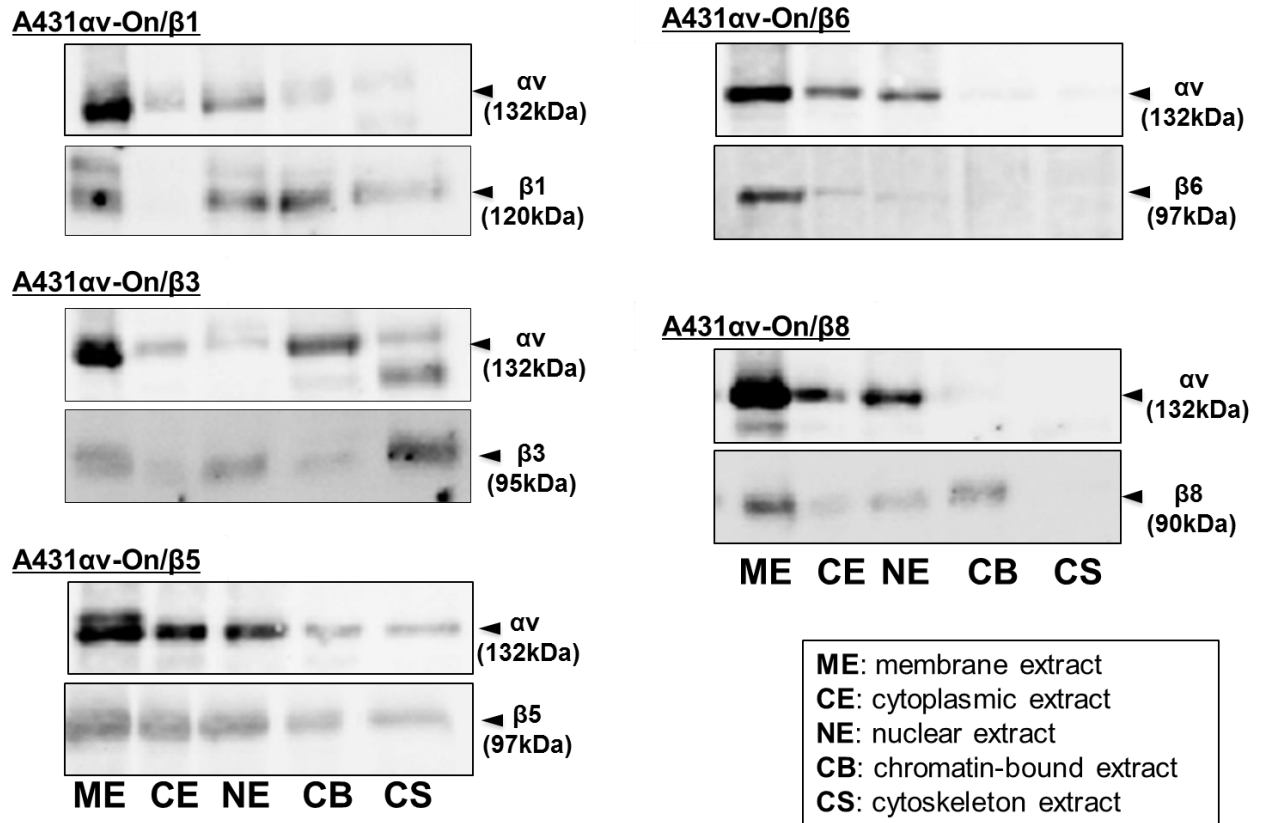


図 1 6 A431 αv -On/ $\beta 1$, A431 αv -On/ $\beta 3$, A431 αv -On/ $\beta 5$, A431 αv -On/ $\beta 6$ 及び A431 αv -On/ $\beta 8$ の各細胞画分中の αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 8$ 蛋白の検討
 テトラサイクリン (1 μ g/ml) 存在下で, A431 αv -On/ $\beta 1$ A431 αv -On/ $\beta 3$, A431 αv -On/ $\beta 5$, A431 αv -On/ $\beta 6$ 及び A431 αv -On/ $\beta 8$ を 24 時間培養後, 各細胞画分を分離した. 各細胞画分中の αv と $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ または $\beta 8$ の蛋白を Western Blot 法にて解析した.

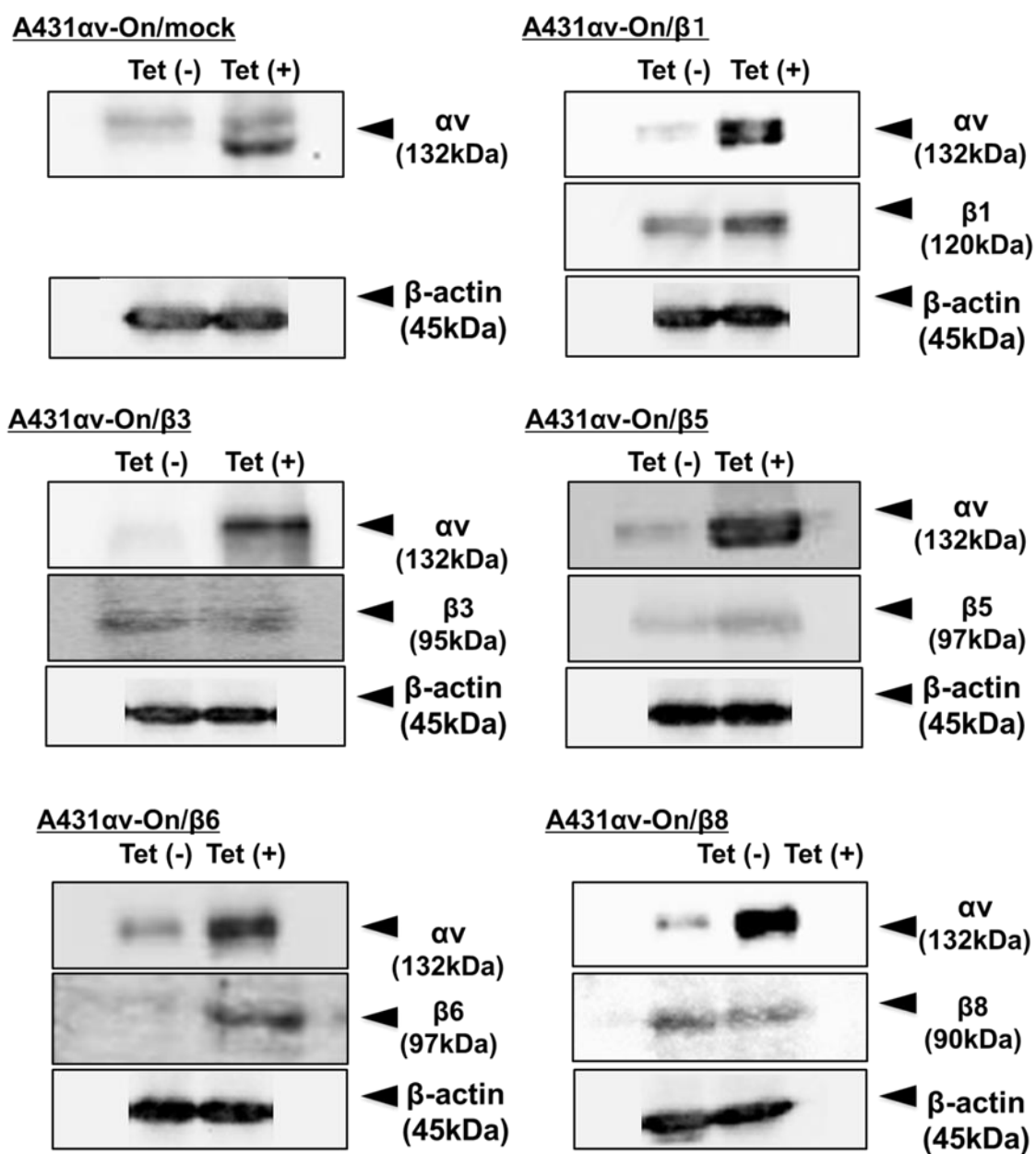
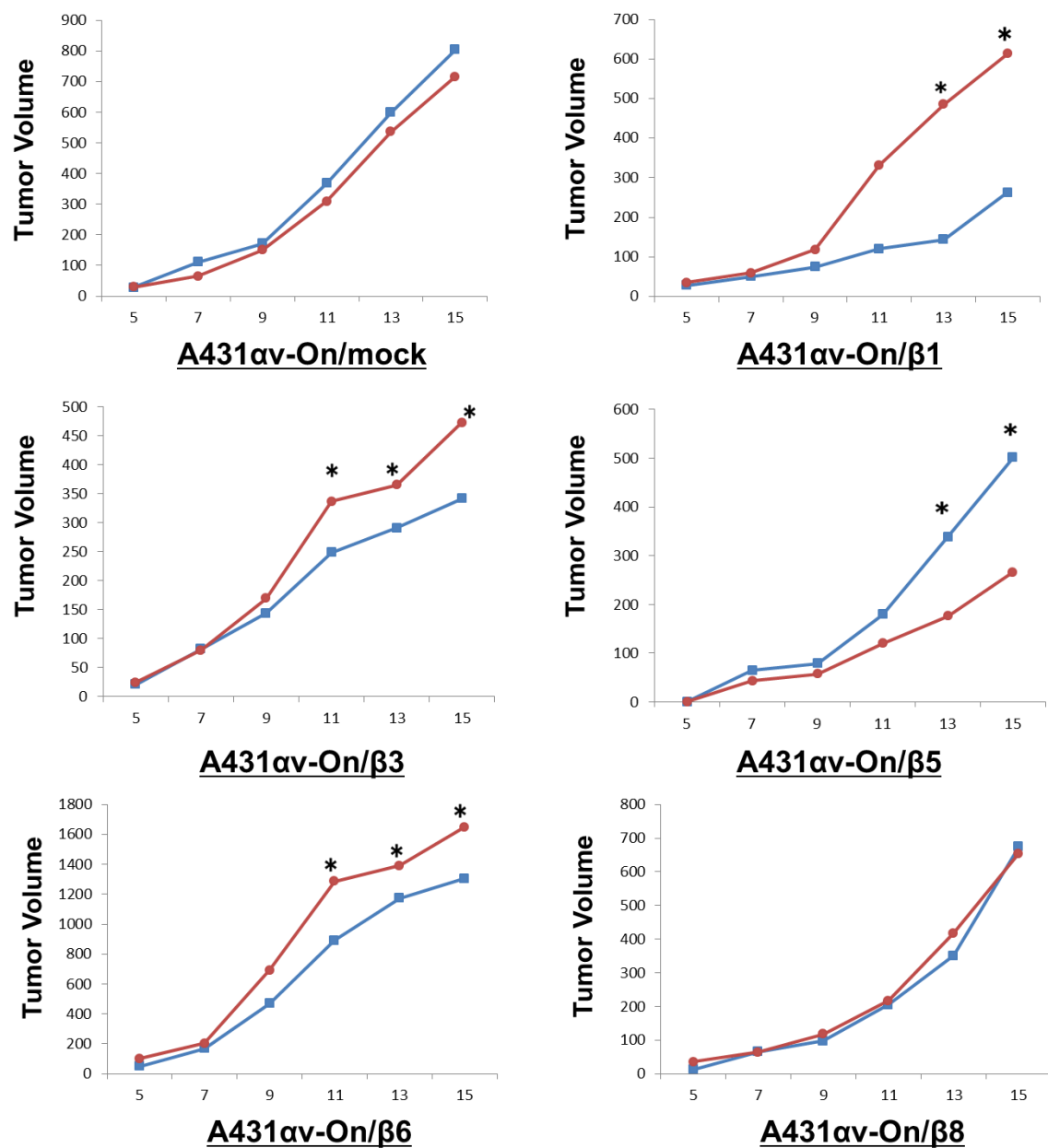


図17 *in vivo*における αv のテトラサイクリン発現誘導システムの評価
 2×10^6 個の A431 αv -On/mock A431 αv -On/ $\beta 1$, A431 αv -On/ $\beta 3$, A431 αv -On/ $\beta 5$, A431 αv -On/ $\beta 6$ 及び A431 αv -On/ $\beta 8$ をヌードマウスの背部皮下に接種し、ドキシサイクリン (200 μ g/ml) を含む (Tet (+)) あるいは不含 (Tet (-)) 飲料水を与え、接種後18日目に形成腫瘍を摘出し、 αv 蛋白の発現を Western Blot 法にて解析した。



* : p < 0.05

図 18 インテグリンαv 発現が *in vivo* での扁平上皮癌細胞の造腫瘍能に与える影響

2×10⁶個の A431 αv-On/mock A431 αv-On/β1, A431 αv-On/β3, A431 αv-On/β5, A431αv-On/β6 及び A431 αv-On/β8 を, 4 週齢のヌードマウスの背部皮下に接種し, 接種直後より 15 日間ドキシサイクリン (200μg/ml) を含む (●) あるいは不含 (■) 飲料水を与え, 形成腫瘍の体積を経時的に算定した。