

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御科学領域泌尿器腫瘍学教育研究分野 氏名 米山 美穂子
<p>(論文題目)</p> <p>Vimentin intermediate filament and plectin provide a scaffold for invadopodia, facilitating cancer cell invasion and extravasation for metastasis</p> <p>(ビメンチン中間径フィラメントとプレクチンによる浸潤突起の足場形成は癌転移のための浸潤および血管外脱出過程を促進する)</p>	
<p>[背景]</p> <p>癌の転移は多段階の分子機構から成り立っている。その中で、癌細胞の浸潤は癌転移成立の鍵となる過程であると考えられている。癌細胞の遠隔転移には、血行性転移とリンパ行性転移の2つの様式が存在する。血行性転移には、癌細胞が初期転移巣から近傍の血管内へ浸潤する過程 (intravasation) と、癌細胞が転移の標的臓器の血管から脱出して組織浸潤する過程 (extravasation) が含まれる。最近、これら2つの過程では、高浸潤性癌細胞が形成する浸潤突起 (invadopodium) と呼ばれる、F-アクチン (Filamentous (繊維状) アクチン) に富む特殊な膜構造が重要な役割を果たすことが明らかになってきた。しかしながら、浸潤突起形成の分子機構に関する理解は、まだ完全ではない。</p> <p>本研究では、膀胱癌の血行性転移に関わる因子として同定された2つの細胞骨格関連タンパク質、ビメンチン (vimentin)、およびプレクチン (plectin) に焦点を絞った詳細な解析を行った。申請者は、浸潤突起形成過程におけるこれらのタンパク質の機能を細胞生物学的手法により明らかにした。また、これらのタンパク質が肺転移の過程で果たす役割を <i>in vivo</i> の実験系で検討した。</p> <p>[材料と方法]</p> <p>筋層浸潤膀胱癌由来の膀胱癌細胞株 YTS-1、T24、BOY、筋層非浸潤膀胱癌由来の膀胱癌細胞株 KK47、RT4、5637 および組織学的深達度 pTa、pT2 患者の膀胱癌組織由来の初代培養癌細胞を材料として使用した。</p> <p>①ビメンチンおよびプレクチンの発現レベルの解析はウェスタン・ブロッティング法によって行った。プレクチン、ビメンチンの浸潤突起形成における役割の解析には、筋層浸潤膀胱癌由来で浸潤突起形成が最も顕著な YTS-1 を用いた。</p> <p>②浸潤突起は F-アクチンに富む構造であるため、透過性にした細胞を蛍光標識ファロイジンで染色し、免疫蛍光顕微鏡で観察することによって浸潤突起を検出した。</p> <p>③プレクチン、ビメンチンが細胞内で相互作用するタンパク質の生化学的な解析には、免疫沈降法を用いた。</p> <p>④プレクチン、ビメンチンの細胞内局在は、免疫蛍光顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。</p> <p>⑤プレクチン、ビメンチンの機能解析のために、それぞれの siRNA を恒常的に発現する YTS-1 の安定発現株を樹立し、プレクチン、およびビメンチンの発現抑制株として実験に用いた。</p> <p>⑥浸潤突起の細胞外基質分解能の評価は、蛍光標識したゼラチン上に細胞を置き、2時間後に、浸潤突起、および、基質の分解を共焦点レーザー顕微鏡によって解析した。</p> <p>⑦膀胱癌細胞の細胞外基質浸潤能は、マトリゲルを用いた invasion assay で評価した。</p>	

⑧膀胱癌細胞による血管内皮細胞間隙浸潤能は、マウス肺微小静脈由来血管内細胞を用いた invasion assay で評価した。

⑨膀胱癌細胞の肺転移能は、癌細胞をヌードマウス尾静脈に注入し、3週間後肺の組織内に生じた転移巣を顕微鏡下で定量することによって評価した。

[結果と考察]

①浸潤性の高い癌細胞では、浸潤性の低い癌細胞に比べてプレクチン、およびビメンチンの発現が上昇していた。

②免疫沈降法により、浸潤性膀胱癌細胞では、ビメンチン、プレクチン、F-アクチンが複合体を形成していることを確認した。

③このことと共焦点レーザー顕微鏡観察の結果より、浸潤性膀胱癌細胞内では、ビメンチン-プレクチン-浸潤突起内 F-アクチンという linkage が形成されていることが判明した。

④この linkage が浸潤突起形成において果たす役割を調べるために、プレクチン発現を抑制することによってこの linkage を破壊しところ、浸潤突起形成が阻害された。

⑤プレクチン発現を抑制せずに、プレクチンと F-アクチンの結合を阻害してこの linkage を破壊した場合にも浸潤突起形成は阻害された。以上のことから、プレクチンが浸潤突起の F-アクチンをビメンチンに連結することが浸潤突起形成に重要であることがわかった。

⑥この linkage が破壊された細胞は、細胞外基質浸潤活性、および、血管内皮細胞層透過活性が有意に低下しており、肺転移能も低かった。

以上より、浸潤突起形成は、浸潤性癌細胞が血管から脱出し、転移を成立させる過程において重要な役割を果たすことが示唆された。

⑦ビメンチンは分子同士が結合することで、細胞内でビメンチン中間径フィラメントからなる細胞骨格を形成する。ビメンチンの発現を抑制してこの細胞骨格を消失させると、浸潤突起の形成は阻害された。

⑧ビメンチンのタンパク質発現を抑制せずに、分子同士の結合のみを阻害してこの細胞骨格を消失させると、やはり浸潤突起形成が阻害された。

以上より、浸潤突起形成のためには、ビメンチン中間径フィラメントからなる細胞骨格の形成が必要であることがわかった。

[結論]

高浸潤性膀胱癌細胞では、プレクチン、ビメンチンの発現が上昇し、ビメンチン-プレクチン-F-アクチンという linkage が形成される。浸潤突起は、この linkage 形成によってビメンチン中間径フィラメントからなる細胞骨格にアンカーされ、安定化される。この安定化された浸潤突起によって、癌細胞は細胞外基質を分解し、血管内皮細胞層を通過して血管外へ脱出し、組織内へ浸潤する。浸潤突起形成によって促進される血管外脱出過程は、癌細胞の血行性転移に必須の過程である。