

学位論文の内容の要旨

論文申請者氏名	遠藤 葉月
論文審査担当者	主査：澁谷 浩司 副査：田中 真二 副査：中西 啓
論文題目	Analysis of the non-Apoptotic Anoikis (アポトーシス非依存的な新規アノイクシ機構の解明)
<p>(論文内容の要旨)</p> <p><諸言></p> <p>アノイクシは、細胞間あるいは細胞外基質との接着を失った細胞に生じる細胞死であり、足場を失った細胞の他の場所への移動や、不適切な接着を防ぐ役割を担っている。アノイクシ不全は、がんの転移を容易にするなど、重篤な疾患を引き起こす。これまでアノイクシは、アポトーシスにより実行されると報告されてきた。本研究では、昨今、多様な非アポトーシス性細胞死の存在が明らかとなり、メカニズムが解明されつつある背景を受けて、非アポトーシス性アノイクシの検討を行った。</p> <p>この論文では、MEF に非アポトーシス性アノイクシが誘導されることを見出し、その細胞死機構が FAK 依存的事であることを明らかにした。さらに、アノイクシ時の FAK は、接着時とは異なり細胞質にドット状の局在を示し、アノイクシに関わる可能性が考えられた。</p> <p><方法></p> <p>マウス胎児線維芽細胞株 (MEF) を脱接着させることによりアノイクシを誘導した。アポトーシス、オートファジー細胞死、ネクロプトーシスとの関与を明らかにするために、欠損細胞株や阻害剤を用い、死細胞の定量を行った。また、脱接着時の接着斑構成分子について、発現量の変化を検出するためウェスタンブロットを用い検討し、さらに、様々な変異 FAK を用い、死細胞の定量や顕微鏡を用いたイメージングを行った。本研究では、化合物ライブラリーを用いたスクリーニングも行き、死細胞を定量することで、新規アノイクシ機構に関わる分子の探索を行った。</p> <p><結果></p> <p>本研究では、MEF を脱接着させることでアノイクシを誘導し、まず、アポトーシスとの関連を検討した。その結果、興味深いことに、アポトーシスの実行因子である Caspase3 の活性化が認められなかった。加えて、アポトーシスに必須な遺伝子を欠損させた Bax/Bak KO においても、WT と同程度の細胞死が認められた。また、代表的な非アポトーシス性細胞死であるオートファジー細胞死、ネクロプトーシスの関与も認められず、新たな細胞死の存在が示唆された。</p> <p>アノイクシ時、接着斑の崩壊に伴い、生存シグナルを伝達する FAK が不活性化され、細胞死の引き金となることが報告されている。そこで、本研究においても FAK に注目し、解析を行った。接着斑の構成タンパク質の発現を検討したところ、これまでの報告とは逆に、FAK の活性化が認められた。MEF のア</p>	

ノイキスにおける FAK の関与を検討するために、FAK ノックダウン、FAK 過剰発現の細胞死に対する影響を調べたところ、驚くべきことに接着時とは相反し、FAK が細胞死を促進することが明らかとなった。さらに、変異 FAK の解析により、FAK のキナーゼ活性が細胞死に必要であることが明らかとなった。また、FAK の局在を免疫染色法で観察したところ、細胞質中にドット状の局在を示し、初期エンドソーム上に一部局在していた。この細胞質中に局在している FAK と細胞死の関連を検討するため、遺伝子操作により、FAK を強制的に細胞膜へ局在させ、アノイキスを誘導した。この時、細胞質でのドット状の局在が見られず、細胞死も抑制された。これまでの結果から、新規アノイキス機構は、FAK の活性化を介した新たな細胞死経路であることが明らかとなった。

さらに、新規アノイキス機構の分子機構を解明するため、機能既知の化合物ライブラリーを用い、新規アノイキスを抑制する化合物のスクリーニングを行った。その結果、ムスカリン受容体 1 のアンタゴニストにより細胞死が抑制された。ムスカリン受容体 1 はアセチルコリンの受容体であり、主に脳で発現しているが、MEF においても発現が認められた。しかしながら、ムスカリン受容体 1 のアンタゴニストによる細胞死の抑制は部分的であり、新規アノイキス機構の主要な制御分子ではないと考えられる。

<考察>

本研究にて、非アポトーシス性アノイキスの存在が見出された。驚いたことに、このアノイキスは、これまで細胞生存シグナルを伝達することが知られていた FAK によって促進された。また、この新規アノイキスは、細胞質に認められたドット状の局在を示す FAK を介して誘導されている可能性が考えられた。

生体内でのアノイキスは、小腸上皮細胞、血管内皮細胞において生じることが最もよく知られていることもあり、多くの研究で上皮細胞、内皮細胞を用いたアノイキスの解析が行われ、アポトーシスとの関連が示されてきた。一方で、アノイキスは、繊維芽細胞においても生じることが報告されている。しかしながら、繊維芽細胞を浮遊培養すると、細胞同士が接着しやすく、アノイキスに耐性を示すため、これまで十分にアノイキスのメカニズムの解析が行われていなかった。そこで、本研究では、細胞間の接着を抑えるために用いられている、メチルセルロースを含んだ粘性の高い培地で浮遊培養し、アノイキスの解析を行ったところ、MEF において非アポトーシス性細胞死を見出した。

FAK を介しどのようなシグナル伝達経路で細胞死が生じているかを明らかにするために、FAK の下流シグナル分子である Akt、p38MAPK シグナル伝達経路との関連、アノイキス関連分子との関与を検討したが、いずれも関与は認められなかった。今後、活性化された FAK に結合する分子を探索し、新規アノイキス機構のシグナル伝達経路を明らかにしたいと考えている。また、アノイキス時、FAK が細胞質にドット状の局在を示したことから、エンドサイトーシスされた FAK が、エンドソーム上で活性化し、細胞死シグナルを伝達している可能性が考えられる。接着細胞において、接着分子と共にエンドサイトーシスされた FAK が、Akt や Erk などの分子を介して生存シグナルを伝達する例は報告されている。しかしながら、ドット状の FAK のうち、エンドソームとの共局在は、ごく一部であるため、FAK のクラスター化による活性化や、他のオルガネラに局在することで活性化していることなど、様々な可能性を検討すべきだと考えている。

学位論文の審査の要旨

論文提出者氏名	遠藤 葉月
論文審査担当者	主査：澁谷 浩司 副査：田中 真二 副査：中西 啓
論文題目	Analysis of the non-Apoptotic Anoikis (アポトーシス非依存的な新規アノイクシ機構の解明)
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>申請者はマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) を用い、非アポトーシス性アノイクシに着目し、解析を進めた。非アポトーシス性アノイクシを示し、非アポトーシス性細胞死であるオートファジー細胞死、ネクロトーシスの関与も認められず、新たな細胞死機構が存在すること、新規アノイクシ機構は FAK の活性化を介した新たな細胞死経路によるものであること、他の繊維芽細胞である NIH3T3、上皮系細胞である MDA-MB-231 でも FAK の活性化を介する非アポトーシス性アノイクシを認めることを初めて明らかにした。</p> <p>予備審査で付された疑問点、修正点について追加実験を含め、概ね妥当と思われる回答をし、提出された博士論文において修正が為され、概ね改善されたものとなった。一連の機能解析は新規性を含め、高いレベルの研究成果と思われた。したがって、博士学位 (理学) 論文として評価できる。</p>	