

論文の内容の要旨

論文題目 原癌遺伝子Aktによる細胞運動の制御

樋口 麻衣子

1 緒言

癌の発生に関与する遺伝子には、癌遺伝子と癌抑制遺伝子があり、それらの遺伝子の変異が多段階的に蓄積することが、癌の発生および悪性化の原因である。通常、生体には細胞の増殖、分化、死などを調節する制御機構があり、それらが正常に保たれていることが生体の維持に必要である。しかし、遺伝子の変異によりこの制御機構を逸脱した細胞が出現すると、細胞が異常増殖を始め、癌が発生する。さらに遺伝子変異が蓄積し、癌細胞が運動性を獲得すると癌は悪性し、他の組織への浸潤・転移を起こす(図1)。このため、細胞運動のメカニズムの詳細を解明することができれば、癌の悪性化に対する予防治療への応用が期待できる。

細胞運動には、アクチン細胞骨格系の再編成が重要であり、その中心的な役割を果たしているのがRhoファミリーGタンパク質である。繊維芽細胞は血小板由来成長因子(PDGF)などの刺激により運動性が上昇するが、このとき細胞内では、PI3キナーゼが活性化し、その下流でRhoファミリーGタンパク質のRac/Cdc42が活性化する。活性化されたRac/Cdc42はさらに下流のエフェクターを介してアクチン重合を促進し、細胞の運動性を上昇させる(図2)。一方、Rac/Cdc42と同様にPI3キナーゼの下流で活性化されるものとして、Aktがよく知られている。Aktはウイルス性癌遺伝子v-Aktの細胞性ホモログとして同定されたキナーゼで、Aktの増幅・活性化が癌の悪性化と密接な相関があることが知られている。Aktは細胞の生存を促進することが様々な系で報告されているが、Rac/Cdc42との関係および細胞運動への関与については不明であった(図3)。そこで、本研究では、哺乳類繊維芽細胞において、Aktが運動性に関与する可能性について検討を行った。

2 Aktによる細胞運動の制御

本研究では、細胞の運動性を評価するために、Boyden Chamberを用いたMigration Assayを行った。このアッセイでは、多孔性membraneの上層に細胞をまき、一定時間後に下層に移動した細胞をカウントすることにより、運動性を評価する(図4)。

2-1 Aktの導入による運動性の変化

Rat1繊維芽細胞にPDGF刺激を加えた時の運動性の変化について検討を行った。細胞にPDGF刺激を加えると運動性が上昇した。これまでの報告通り、優性抑制型Racを細胞に導入すると、PDGF刺激による運動性の上昇が阻害されたが、優性抑制型Cdc42およびRhoでは阻害されなかった。本研究では、優性抑制型Aktを導入することにより、PDGF刺激による運動性の上昇が著しく阻害されることを見出した(図5)。このことから、PDGF刺激による運動性の上昇にはAktの活性化が必要であるということが示された。

次に、活性型Aktを細胞に導入することにより、運動性の上昇が見られるか、検討を行った。細胞に活性型RacおよびCdc42を導入すると、これまでの報告通り細胞の運動性が上昇した。今回、活性型Aktを導入した場合にも、細胞の運動性が著しく上昇することを見出した(図6)。このことから、Aktの活性化が細胞の運動性上昇に十分であるということがはじめて示された。

2-2 Rac/Cdc42とAktの関係

AktはT308とS473がリン酸化されることで活性化される。そこで、リン酸化型Aktに対する抗体で細胞染色を行い、細胞内のどこでAktが活性化されているか、検討を行った。RacおよびCdc42は運動方向先端のleading edgeに局在するが、リン酸化型Aktも同様にleading edgeに局在し、それらの局在が重なることが示された(図7)。このことから、Rac/Cdc42の下流でAktが活性化されている

可能性が示唆された。そこで、Rac/Cdc42をNIH 3T3細胞に導入し、リン酸化型Aktに対する抗体でウエスタンブロッティングを行った。活性型Rac/Cdc42の導入により、いずれもAktのリン酸化が上昇した（図 8）。このことから、Rac/Cdc42の下流でAktが活性化されていることが示された。そこで次に、Rac/Cdc42とAktの関係について、Migration Assayを行い、検討した。活性型Rac/Cdc42によって上昇した細胞の運動性は、優性抑制型Aktを導入することにより完全に抑制された（図 9）。このことから、Rac/Cdc42による運動性の上昇にはAktの活性が必要であるということが示された。

2-3 PTENノックアウトマウス由来細胞の運動性

実際にAktが癌細胞の運動性に関与する可能性について検討した。癌抑制遺伝子PTENは、さまざまな癌において欠損や変異が見つかっている。PTENはリン脂質フォスファターゼ活性を持ち、PI3Kによって産生されるリン脂質を脱リン酸化することでPI3キナーゼの活性と拮抗する。実際に、PTENのノックアウトマウス由来の細胞では、その運動性が著しく上昇していること、Rac/Cdc42の活性が上昇していること、Aktのリン酸化が亢進していることが報告されている。これまで、運動性の上昇についてはRac/Cdc42の活性の上昇が貢献していると考えられていた。

そこで本研究では、PTENノックアウトマウス由来の繊維芽細胞の運動性上昇にAktが関与する可能性について検討した。PTENノックアウトマウス由来の繊維芽細胞に優性抑制型Rac/Cdc42を導入すると、運動性の上昇が抑制された。そして今回、優性抑制型Aktを導入した場合にも、運動性の上昇が著しく抑制された（図 10）。このことから、PTENノックアウトマウス由来の繊維芽細胞の運動性上昇にもAktが関与していることが示された。

以上、細胞運動性についてのまとめ図を図 11に示す。Aktは癌原遺伝子であるが、その癌化のメカニズムは必ずしも明らかではない。本研究の結果から、Aktが細胞の運動性・浸潤能の上昇に関与している可能性が示唆された。

3 Aktによる神経突起伸長の制御

繊維芽細胞における運動方向先端のleading edgeと神経突起先端のgrowth coneは、同じようなメカニズムで方向性を持った動きをしていると考えられている（図 12）。本研究により繊維芽細胞の運動性にAktが関与することが明らかになったため、神経突起伸長にもAktが関与する可能性について検討を行った。本研究では、神経成長因子（NGF）刺激により神経突起を伸ばし、神経細胞のモデルとして用いられる培養細胞であるPC12細胞を用いて実験を行った。

3-1 活性型Aktの細胞内局在

神経突起を伸ばしたPC12細胞において、どこでAktが活性化されているのか、リン酸化型Aktに対する抗体で細胞染色を行った（図 13）。まず、phalloidineによりF-actinを染色すると、growth coneにアクチンが集積し、またRacはこれまでの報告通り、growth coneに局在していることが確かめられた。今回、リン酸化型Aktも、Racと同様にgrowth coneに局在し、神経突起先端でAktが活性化されていることが示唆された。

AktはPHドメインを介してPI3キナーゼの産生したPIP3に結合するため、AktのPHドメインとGFPとの融合タンパク質GFP-PHAKtはPI3キナーゼの活性モニターとして用いられ、Aktが活性化する場所を可視化することができる。そこで、GFP-PHAKtをPC12細胞に導入し、NGF刺激による局在の変化を観察した（図 14）。GFP-PHAKtはNGF刺激によりすばやく細胞膜付近に移行し、その後細胞体から突出する突起の先端に局在することがわかった。これらの結果から、Aktが神経突起伸長において何らかの役割を果たしていることが示唆された。

3-2 神経突起の形態変化

Aktが神経突起伸長においてどのような役割を果たしているのか検討するため、NGF刺激による

神経突起の形態の変化を観察した。活性型Aktを細胞に導入すると、神経突起の伸長が著しく促進された。このとき、細胞体から伸びる神経突起の数が減少し、突起の分岐が減少するという特徴が見られた。一方、活性型RacおよびCdc42を導入した細胞では突起の分岐が著しく促進され、活性型Aktの特徴とは異なることがわかった（図 15）。そこで、これらの結果を3つのパラメーターで比較した。神経突起の長さの比較を図 16 (A)に示す。活性型Aktを導入すると、神経突起の長さが著しく促進されることがわかった。細胞体から伸びる神経突起の数の比較を図 16 (B)に示す。活性型Racを導入すると神経突起の数が増加するが、逆に活性型Aktでは神経突起の数が減少した。突起の分岐についての比較を図 16 (C)に示す。活性型Racを導入すると、分岐が著しく促進されるのに対し、活性型Aktを導入した場合には分岐が著しく減少するという特徴が見られた。

神経突起伸長におけるまとめ図を図 17に示す。NGF刺激によりPI3キナーゼが活性化され、その下流でRac/Cdc42およびAktが活性化される。Rac/Cdc42は神経突起の伸長、分岐を促進するのに対し、Aktは神経突起の伸長を促進するが、分岐を阻害するという可能性が示唆された。