

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名 樋口麻衣子

細胞運動は、発生時の形態形成や、免疫細胞の動員、創傷治癒などの生理現象に関与し、多細胞からなる生体が正常な機能を維持するために必須の役割を担っている。そのため、細胞運動は生体内で厳密に制御されている。そして、その制御機構に異常が生じてしまった例が癌細胞の浸潤・転移で、運動性を獲得した癌細胞は、他の組織へ移動し、病巣を拡大していく。近年、癌原発巣に対する診断・治療は急速に進歩し、新しい診断法・治療法が次々に開発されている。しかし、遠隔臓器への転移・再発については診断・治療が難しく、癌による死亡原因の多くを占めている。従って、癌転移機構の解明とそれに基づく予防・治療法の開発が癌の克服には必要不可欠であり、そのためには細胞運動メカニズムの詳細について理解することが必要である。

一方、脳神経系に存在する神経細胞は、標的に向かって神経突起を伸ばし、きわめて秩序だった神経ネットワークを形成している。神経突起伸長は、細胞運動の一種であると考えられており、突起の先端に存在する成長円錐(growth cone)が突起伸長において重要な働きをしている。この成長円錐(growth cone)の構造は線維芽細胞の先端部(leading edge)とよく似ており、同じようなメカニズムを用いて方向性をもった運動をしていると考えられている。近年、神経疾患に対する治療法として再生医学が注目されており、神経機能障害が軸索再生により回復する例が報告されている。しかし、軸索再生治療には問題も多く残されており、神経修復による治療法の確立には、神経突起伸長のメカニズムの詳細な理解が必要である。

このような、神経突起伸長を含めた細胞運動については、運動性を制御する細胞外因子については詳しい解析がなされてきた。しかし、細胞外からの刺激によってどのようなメカニズムで細胞の運動性が調節されるのか、その細胞内シグナル伝達についてはまだ解明されていない部分が多く残されている。本研究では細胞運動性を制御する細胞内シグナル伝達について、PI3 キナーゼ - Akt 経路が果たす役割を解明することを目的とした。

第一章では、研究の背景、既往の研究、および本研究の意義について述べた。

第二章では、哺乳類線維芽細胞の運動性における PI3 キナーゼ - Akt 経路の役割について解析した。Akt は原癌遺伝子で、Akt の増幅や活性化が癌の悪性化と密接な相関があることが報告されているため、Akt の細胞運動への関与の可能性が考えられた。しかし、Akt は細胞運動に重要であるアクチン重合には関与しないことが報告されており、細胞運動への関与はないものと考えられていた。本章では、Boyden Chamber を用

いた運動性アッセイを行うことにより、Aktの細胞運動性への関与について検討した。線維芽細胞はPDGFなどの増殖因子刺激によって運動性が上昇することが知られているが、まず、優性抑制型Aktを用いた実験から、PDGF刺激による運動性の上昇にAktの活性が必要であることを示した。そして、活性型Aktを用いた実験から、Aktの活性化が細胞運動性の上昇に十分であることを明らかにした。また、Rac/Cdc42はアクチン重合を促進することにより細胞運動性を上昇させることが知られているが、このRac/Cdc42の下流でAktが活性化されることを明らかにし、さらにRac/Cdc42による運動性の上昇にもAktの活性が必要であることを示した。そこで、実際に癌細胞の運動性にAktが関与する可能性についても検討を行った。PTENは癌抑制遺伝子で、PTENの変異を伴う癌細胞では浸潤能が高いことが知られている。実際に、PTENノックアウトマウス由来線維芽細胞では野生型由来の細胞に比べて運動性が上昇しているが、この細胞の運動性の上昇が優性抑制型Aktにより阻害されることが明らかとなった。以上の結果から、Rac/Cdc42の下流でAktが細胞運動性の上昇に重要な役割を果たしている結論し、癌細胞の運動性にもAktが関与する可能性を示した。

第三章では、神経突起伸長におけるPI3キナーゼ - Akt経路の役割について解析した。まず、PI3キナーゼ阻害剤を用いた実験から、PI3キナーゼが神経突起の分岐を抑制する効果を持っていることが明らかとなった。そこで、PI3キナーゼの下流でAktが神経突起伸長に関与する可能性について検討した。まず、活性型Aktを用いた実験から、Aktにも神経突起の分岐抑制効果があることが明らかとなった。また、Aktは神経突起の伸長を著しく促進させる効果があることを示した。さらに、Aktの活性化モニター分子として用いられるGFP-PHAktを導入した細胞をリアルタイムで観察し、細胞が神経突起を伸ばし始める際の突出部分や、神経突起先端にGFP-PHAktが局在し、そのような場所でAktが活性化されることを明らかにした。以上の結果から、Aktが神経突起形成の最初のステップにおいて重要な役割を果たしており、神経突起の形態制御においては、突起の伸長を促進し、分岐を抑制する働きを持っていると結論した。

第四章では、本研究を総括し、今後の研究の展望を述べた。

以上のように、提出者は、PI3キナーゼ - Akt経路の細胞運動性への関与について検討し、Aktが哺乳類線維芽細胞の運動性、および神経突起伸長において重要な役割を果たしていることを示した。これらの成果は、細胞運動性のメカニズムの理解を深めるとともに、癌細胞の浸潤・転移および神経疾患に対する治療の新たなターゲットの可能性を提案する上で、医学・薬学・工学分野に貢献するものである。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。