



# Down-regulation of $\alpha 6$ integrin, an anti-oncogene product, by functional cooperation of H-Ras and c-Myc

藤本, 浩子

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2943

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002943>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 9 4 】

氏 名・（本 籍） 藤本 浩子 （兵庫県）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博い第1554号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成16年3月31日

【 学位論文題目 】

Down-regulation of  $\alpha 6$  integrin, an anti-oncogene  
product, by functional cooperation of H-Ras  
and c-Myc

（H-Ras と c-Myc の協調作用による癌抑制遺伝子産物  
 $\alpha 6$  インテグリンの発現抑制）

審 査 委 員

主 査 教 授 片岡 徹

教 授 寺島 俊雄

教 授 饗場 篤

## 【緒言】

低分子量 G タンパク質である H-Ras 及び転写因子である c-Myc は、がん原遺伝子産物であり、リンパ球の活性化・増殖過程においてそれぞれ異なるタイミングで一過的に活性化あるいは発現誘導を示す。H-Ras は、がん(原) 遺伝子産物の Ras ファミリーのメンバーの一つで Raf-MAP キナーゼ経路を介した遺伝子発現誘導により細胞の増殖や分化などを制御する。c-Myc は、核内がん(原) 遺伝子産物であり、血清刺激によって発現誘導される最初期応答遺伝子群(immediate early gene)として知られており、正常な細胞周期進展に必要とされる。がん遺伝子産物は、その多くがシグナル伝達経路で働き、その機能亢進あるいは発現異常により無制限な増殖シグナルが伝達され細胞の癌化を引き起こすと考えられている。中でも Ras と c-Myc については多くの研究成果が報告されており、両者の協調的作用によってラット胎仔由来初代繊維芽細胞を形質転換すること、活性化 H-Ras と c-Myc を過剰発現して形質転換した細胞株をヌードマウスに移植すると癌化に加え、癌の浸潤・転移を引き起こすことが知られている。

IL-3 (interleukin-3)依存性のマウスプロ B 細胞株である BAF-B03 細胞に、H-Ras の活性化型 (H-Ras<sup>V12</sup>) と c-Myc を恒常的にそれぞれ単独に発現する細胞株 (以下各細胞を BR<sup>V12</sup>, BM 細胞) と両方を発現する細胞株 (以下 BMR<sup>V12</sup> 細胞) を用いた実験で、親株の BAF-B03 細胞の細胞表面に発現する VLA-4 (very late antigen-4,  $\alpha 4 \beta 1$ ) は BM 細胞は変化がないが、BR<sup>V12</sup> 細胞では活性化し、そして BMR<sup>V12</sup> 細胞においては、VLA-4 のリガンドである VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) の発現が誘導され、VLA-4 と VCAM-1 の結合による細胞凝集を引き起こす。さらに IL-3 非依存的な細胞増殖が確認されている。これらの細胞を用いて VLA-4 と VCAM-1 を含めた様々な接着分子について詳細な細胞動態解析を行った。

## 【方法】

BAF-B03 細胞に H-Ras<sup>V12</sup> 及び c-Myc の発現ベクターをそれぞれトランスフェクションした細胞株 (BR<sup>V12</sup>, BM 細胞) と両方をトランスフェクションした細胞株 (BMR<sup>V12</sup> 細胞) に発現するインテグリン分子種及び一連の接着分子の検索を、特異抗体を用いたフローサイトメトリー解析とノザンプロット解析により検索した。

また細胞外基質ラミニン(LM)を用いた細胞接着実験を行い、細胞外基質への接着について検討した。

## 【結果】

〔細胞表面の接着分子の解析〕一連の細胞に発現するインテグリン分子種及び一連の接着分子を特異抗体を用いたフローサイトメトリー解析した結果、

BAF-B03 細胞および、BM 細胞、BR<sup>V12</sup> 細胞の細胞表面にはインテグリン  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  サブユニットが同じレベルで高い発現を示し、またやや低いレベルながら  $\alpha 5$  サブユニットが発現していることが明らかとなった。BAF-B03 細胞と BR<sup>V12</sup>, BM 細胞では発現が見られなかった VCAM-1 が BMR<sup>V12</sup> 細胞においては高いレベルで発現することが既に知られているが、さらに  $\alpha 6$  インテグリンの顕著な down-regulation (発現抑制) が認められた。

〔ノザンプロット解析による VCAM-1 及び  $\alpha 6$  インテグリン遺伝子の発現解析〕フローサイトメトリー解析の結果から、BMR<sup>V12</sup> 細胞表面においては、他の細胞株 (BAF-B03, BR<sup>V12</sup>, および BM 細胞) に比べ、VLA-4 のリガンドである VCAM-1 の顕著な発現誘導ならびに、 $\alpha 6$  インテグリンの顕著な down-regulation (発現抑制) が認められた。そこで、接着分子である VCAM-1 及び  $\alpha 6$  インテグリンの発現の調節機序を明らかにするため、ノザンプロット解析を行い、遺伝子の発現レベルを調べた。BMR<sup>V12</sup> 細胞表面での VCAM-1 の発現誘導及び  $\alpha 6$  インテグリン発現抑制の結果に一致し、BMR<sup>V12</sup> 細胞においてのみ VCAM-1 mRNA が高いレベルで検出された。一方、BAF-B03, BR<sup>V12</sup>, および BM 細胞においては、明らかな  $\alpha 6$  インテグリン mRNA の発現レベルが BMR<sup>V12</sup> 細胞において著しく低下していることが見いだされた。このような実験結果より、VCAM-1 及び  $\alpha 6$  インテグリンの発現は、転写あるいは転写後 (mRNA の安定性など) の調節機構により相反的に制御されていることが明らかとなった。

〔ラミニンへの接着性の解析〕BR<sup>V12</sup> 細胞は LM への接着性が亢進し、 $\alpha 6$  インテグリンにたいする特異的阻害抗体によって顕著に抑制された。BMR<sup>V12</sup> 細胞においては、 $\alpha 6$  インテグリンの顕著な発現抑制がみとめられるが、この実験結果に一致して BMR<sup>V12</sup> 細胞の LM への接着はほとんど観察されなかった。

## 【考察】

癌(原) 遺伝子産物によるリンパ球系細胞の接着制御機構を明らかにする目的で、BAF-B03 細胞に H-Ras<sup>V12</sup> と c-Myc を単独もしくは、両者を発現させた細胞株を用い、これらの細胞動態の解析を行った。IL-3 依存性の BAF-B03 細胞が、H-Ras<sup>V12</sup> と c-Myc の両者を発現させると、IL-3 非依存的に増殖を示すことが知られている。これは、癌(原) 遺伝子産物である H-Ras と c-Myc は協調的に働き、*in vitro* における細胞増殖あるいは、細胞の形質転換を誘導する「癌(原) 遺伝子産物の細胞増殖過程における協調作用」という知見を指示するものと考えられる。さらに、H-Ras<sup>V12</sup> 単独で VLA-4 および  $\alpha 6$  インテグリンを活性化し、その結果 H-Ras<sup>V12</sup> を発現する BAF-B03 細胞においては、細胞外気質であるファイブロネクチン (FN) および LM に対する接着性が亢進すること、また H-Ras<sup>V12</sup> と c-Myc が協調的に働き、VLA-4 のリガンドである VCAM-1 の発現が誘導され、その結果 VLA-4 と VCAM-1 相互作用によりホ

モフィリックな細胞接着（凝集）が誘導されるという細胞接着をも制御することが既に報告されている。

今回私は、H-Ras<sup>V12</sup>とc-Mycが協調的に働き、 $\alpha 6$  インテグリンの発現を抑制することにより、細胞の LM に対する接着性が消失することが明らかとした。BMR<sup>V12</sup>細胞において $\alpha 6$  インテグリンの down-regulation（発現抑制）が認められたことは、以下のような観点から重要性が示唆される。 $\alpha 6$  インテグリンは癌抑制遺伝子と考えられ、 $\alpha 6$  インテグリンを発現する細胞において癌化に伴う発現低下とともにその癌化した細胞が転移能を獲得すると $\alpha 6$  インテグリンの発現が完全に消失することが報告されている。従って本研究において H-Ras と c-Myc の協調作用により $\alpha 6$  インテグリンの顕著な down-regulation（発現抑制）が認められたことは、「癌（原）遺伝子産物の協調作用により癌抑制遺伝子産物の発現が抑制される」という新しい分子機構が存在することを示唆している。また、 $\alpha 6$  インテグリンの発現抑制の結果、細胞の LM に対する接着性が低下した悪性腫瘍細胞は、生体内においては原発巣からの離脱、及び腫瘍の転移をもたらすことが考えられる。

本研究により、H-Ras および c-Myc によりリンパ球の細胞接着分子の活性ならびに発現が制御されることが明らかとなった。Ras 分子は、低分子量 G タンパク質であり、活性された Ras（GTP 結合型）の作用は、様々なエフェクター分子（Raf キナーゼ、PI3 キナーゼ、Ral GEF など）を介して伝達されることが知られている。今後 H-Ras<sup>V12</sup> による VLA-4（及び VLA-5）あるいは、 $\alpha 6$  インテグリンの活性化が、どの Ras エフェクター分子を介するのか興味もたれる。また、本研究から、H-Ras と c-Myc の協調作用により接着をコードする遺伝子、即ち VCAM-1 遺伝子と $\alpha 6$  インテグリン遺伝子の発現が相反的に制御されることが示された。現時点では、H-Ras および c-Myc による VCAM-1 と $\alpha 6$  インテグリンの相反的遺伝子発現制御の分子機構についてはほとんど明らかになっていないのが実状であり、今後の研究の成果が待たれる。

#### 【結論】

BAF-B03 細胞を用いて H-Ras<sup>V12</sup> 及び c-Myc をそれぞれ単独で構成的に発現する細胞（BR<sup>V12</sup>, BM 細胞）、ならびに両者を構成的に発現する細胞（BMR<sup>V12</sup> 細胞）においては、これまで H-Ras<sup>V12</sup> 単独で VLA-4 を活性化し、また H-Ras<sup>V12</sup> と c-Myc が協調的に働くことにより、BAF-B03 細胞の IL-3 非依存的な細胞増殖が誘導されるとともに、VCAM-1 の発現が誘導され、その結果ホモフィリック(homophilic)な細胞接着が誘導されることが報告されていた。今回私はさらに、H-Ras<sup>V12</sup> と c-Myc が協調的に働くことにより癌抑制遺伝子産物である $\alpha 6$  インテグリンの顕著な down-regulation（発現抑制）が引き起こすことを明らかとした。このような実験結果から、従来より細胞増殖・トランスホーメーション（形質転換）、さらには生物個体における腫瘍形成、腫瘍の浸潤・転移の

過程において協調的に機能（作用）する事が知られていた癌遺伝子産物 H-Ras<sup>V12</sup> と c-Myc が細胞の接着性をも制御することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1560 号	氏 名	藤本 浩子
論文題目	Down-regulation of $\alpha 6$ integrin, an anti-oncogene product, by functional cooperation of H-Ras and c-Myc (H-Rasとc-Mycの協調作用による癌抑制遺伝子産物 $\alpha 6$ インテグリンの発現抑制)		
審査委員	主 査 片岡 徹 副 査 寺島 俊雄 副 査 郷 場 篤		
審査終了日	平成 16 年 1 月 30 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

低分子量 G 蛋白質 H-Ras と転写因子 c-Myc は、何れも癌原遺伝子産物であり、リンパ球の活性化・増殖過程において一過性に活性化もしくは発現誘導を示す。癌原遺伝子産物の多くは細胞シグナルの伝達経路で働き、その機能亢進や発現異常により細胞の癌化を引き起こすと考えられている。Ras と c-Myc については、両者の協調的作用によりラット由来初代繊維芽細胞の形質転換を引き起こすことが知られている。本研究者の所属するグループでは、活性化型 H-Ras (H-Ras<sup>V12</sup>) と c-Myc の両者の共発現により、インターロイキン 3 (IL-3) 依存性の増殖を示すマウス・プロ B 細胞株 BAF-B03 が、IL-3 非依存的な細胞増殖能力を獲得することを発見し、「癌（原）遺伝子産物の細胞増殖過程における協調作用」を支持する結果を得ていた。また、BAF-B03 細胞において、細胞表面に発現する VLA-4 (very late antigen-4,  $\alpha 4\beta 1$ ) が H-Ras<sup>V12</sup> の発現により活性化され、c-Myc の発現により VLA-4 のリガンド VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) の発現が誘導される結果、H-Ras<sup>V12</sup> と c-Myc の両者を発現する細胞ではホモフィリックな細胞接着（凝集）を引き起こすことを見だしていた。本研究では、Ras と c-Myc の発現が細胞接着分子の発現に及ぼす影響について、さらに詳細な解析を行った。

本研究者は、BAF-B03 細胞に、H-Ras<sup>V12</sup> あるいは c-Myc を単独に発現する細胞株 (BR<sup>V12</sup>, BM 細胞) と両方を発現する細胞 (BMR<sup>V12</sup> 細胞) を用い、それらに発現する接着分子をフローサイトメトリー解析とノザンブロット解析により検索した。また細胞外基質ラミニン (LM) を用いた細胞接着実験を行い、細胞外基質への接着について検討した。

フローサイトメトリー解析の結果、BAF-B03 細胞および、BM 細胞、BR<sup>V12</sup> 細胞表面にはインテグリン  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  が高い発現を示し、やや低いレベルながら  $\alpha 5$  が発現していた。また BAF-B03 細胞と BR<sup>V12</sup>, BM 細胞では発現が見られなかった VCAM-1 が BMR<sup>V12</sup> 細胞において発現誘導された一方で、 $\alpha 6$  インテグリンの顕著な発現抑制が認められた。

次に、ノザンブロット解析を行い、VCAM-1 及び  $\alpha 6$  インテグリンの遺伝子の発

現レベルを調べたところ、BMR<sup>V12</sup>細胞においてのみ VCAM-1 mRNA が高いレベルで検出された。一方、 $\alpha 6$  インテグリン mRNA の発現レベルは、BMR<sup>V12</sup>細胞において著しく低下していた。この結果より、VCAM-1 及び  $\alpha 6$  インテグリンの発現は、転写あるいは転写後 (mRNA の安定性など) の調節機構により相反的に制御されていることが明らかとなった。

さらに、BR<sup>V12</sup>細胞は LM 接着性が亢進し、この接着性は  $\alpha 6$  インテグリンに対する特異的阻害抗体によって抑制された。BMR<sup>V12</sup>細胞においては、 $\alpha 6$  インテグリンの顕著な発現抑制がみとめられ、この結果に一致して BMR<sup>V12</sup>細胞の LM 接着性はほとんど観察されなかった。

本研究により、H-Ras<sup>V12</sup> と c-Myc の協調作用により、 $\alpha 6$  インテグリンの発現が抑制され、細胞の LM 接着性が消失することを明らかとした。 $\alpha 6$  インテグリンの発現抑制の結果 LM 接着性が低下した悪性腫瘍細胞は、生体内において原発巣からの離脱、腫瘍の転移をもたらすことが考えられた。

本研究は、癌遺伝子産物 H-Ras<sup>V12</sup> と c-Myc について、その協調作用によるマウス・プロ B 細胞株における  $\alpha 6$  インテグリンの発現抑制を通じた細胞の LM 接着性の消失を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった血球系細胞における H-Ras<sup>V12</sup> と c-Myc の協調作用について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。