



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Possible role of a septin, SEPT1, in spreading in squamous cell carcinoma DJM-1 cells(要約版(Digest))
Author(s)	水谷, 陽子
Report No.(Doctoral Degree)	博士(医学) 甲第973号
Issue Date	2015-03-25
Type	博士論文
Version	none
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/51047

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

学位論文要約
Extended Summary in Lieu of the Full Text of a Doctoral Thesis

甲第 973 号

氏名: 水谷陽子
Full Name Yoko Mizutani

学位論文題目: 有棘細胞癌系 DJM-1 細胞の遊走における septin1 の役割
Thesis Title Possible role of a septin, SEPT1, in spreading in squamous cell carcinoma DJM-1 cells

学位論文要約:
Summary of Thesis

septin は重合性 GTP タンパク質であり、酵母における細胞の分裂、極性および形態に関連するタンパク質として初めて同定された。哺乳類では 13 種類が同定されており、4 つのグループすなわち SEPT2 group (SEPT1, 2, 4, 5), SEPT3 group (SEPT3, 9, 12), SEPT6 group (SEPT6, 8, 10, 11, 14), SEPT7 group (SEPT7) に分類されている。septin は細胞分裂や細胞周期において重要な役割を果たしているため、悪性腫瘍においてもその重要性が報告されている。しかし皮膚科領域では septin に関する報告はない。本研究では SEPT1 に注目し、ヒト正常皮膚、皮膚悪性腫瘍組織およびヒト有棘細胞癌由来培養細胞である DJM-1 細胞を使用して、SEPT1 の局在や役割について解析を行った。

【対象と方法】

実験で必要となる抗 SEPT1 抗体はウサギに免疫を行い、血清をアフィニティーカラムで精製作成した。

- ① 培養 DJM-1 細胞、ヒト正常皮膚組織および皮膚悪性腫瘍組織切片を用いて、抗 SEPT1 抗体で ウェスタンブロット法、免疫蛍光染色、免疫組織染色を行い、SEPT1 の発現と局在を検討した。
- ② さらに SEPT4 および SEPT5 についても、DJM-1 細胞を用いて各抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、それぞれの局在を検討した。また myc-SEPT1, 2, 4, 5 を DJM-1 細胞に過剰発現させて、抗 myc 抗体で免疫蛍光染色を行い、上記の局在を確認した。
- ③ 次に septin 間の細胞内における相互作用を調べるために、免疫沈降法によって SEPT1 と他の septin との複合体形成の有無を検討した。
- ④ SEPT1 の局在が cortical actin に依存しているかを明らかにするために、cytochalasin B 処理を行い actin を脱重合させ、抗 SEPT1 抗体で免疫蛍光染色を行った。
- ⑤ SEPT1 の細胞遊走への関与を検討するため、cell migration assay を行い、免疫蛍光染色でその局在を確認した。
- ⑥ SEPT1 の細胞接着への関与を検討するため、DJM-1 細胞に SEPT1 を標的にした RNAi vector (pSUPER-SEPT1) と pEGFP-C1 を導入し、GFP を発現した細胞のうち lamellipodia のある細胞 (spread) とない細胞 (round) を測定した。

【結果】

- ① ウェスタンブロット法で、SEPT1 はヒト正常皮膚、ヒト有棘細胞癌と培養 DJM-1 細胞で発現していることを確認した。さらに免疫蛍光染色で SEPT1 は、ヒト正常皮膚では表皮角化細胞とエクリン汗腺の細胞質にびまん性に発現していた。免疫組織染色において各種皮膚悪性腫瘍 (有棘細胞癌、悪性黒色腫、乳房外パジェット病) の腫瘍細胞は抗 SEPT1 抗体で染色され、SEPT1 は腫瘍細胞の細胞質に強く発現していた。
- ② DJM-1 細胞では SEPT1, 4, 5 は lamellipodia に強く発現し、cortical actin と共局在していた。過剰発現させた SEPT1, 2, 4, 5 は同様に lamellipodia で強く集積していたが細胞の形態には影響を与えなかった。

- ③ 免疫沈降法では SEPT1 と 5 が複合体を形成していることが証明された。一方 SEPT4 は免疫蛍光染色では lamellipodia に局在していたが、SEPT1 とともに沈降することはなく複合体形成は確認できなかった。
- ④ SEPT1 は cytochalasin B 処理にて行った cortical actin の破壊によって局在が不明瞭となった。
- ⑤ cell migration assay では SEPT1 は遊走細胞の lamellipodia に集積していることが明らかとなった。
- ⑥ pSUPER-SEPT1 導入により SEPT1 の発現が低下した DJM-1 細胞では、round cell の割合が多く接着能が低下していることが明らかとなった。

【考察】

septin は actin や微小管と同様、細胞骨格タンパク質の一つであり、細胞分裂や細胞周期に関与していることが報告されてきた。そのため腫瘍発生においても重要な因子となることが予想されてきたが、実際の生体内での役割や作用機序、septin 同士の相互作用などまだ不明な点も多い。本研究ではヒト皮膚組織とヒト有棘細胞癌由来 DJM-1 細胞を使用して、septin、特に SEPT1 の局在と役割を明らかにした。SEPT1 は正常では表皮角化細胞とエクリン汗腺に存在しており、腫瘍細胞ではさらに強く発現していることから、細胞分裂や細胞周期に関与している可能性が考えられた。DJM-1 細胞では SEPT1, 2, 4, 5 が細胞遊走において重要な役割を果たす細胞仮足の lamellipodia で cortical actin と共局在していたが、そのうちの 1, 5 が複合体を形成することが証明され、これにより 1, 5 が相互作用して lamellipodia の形成、運動に関与していることが推察された。実際に cell migration assay では細胞遊走が始まる時に SEPT1 は lamellipodia に集積し始め、前述の仮説を支持するものであった。さらに SEPT1 の発現を抑制すると細胞の接着や広がりや抑えられることから、細胞の遊走とともに接着にも関与している可能性が示された。また SEPT1 は各種ヒト皮膚悪性腫瘍の腫瘍細胞の細胞質で強く発現していたことから、腫瘍細胞の浸潤・転移に重要な役割を担っている可能性が考えられた。

【結論】

SEPT1 は正常皮膚では表皮角化細胞と汗腺に存在し、悪性腫瘍では腫瘍細胞の細胞質に強く発現していることが示された。また培養腫瘍細胞では lamellipodia で SEPT5 と協調しながら、細胞の接着や遊走に関与していることが明らかになった。

