

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	岡田 なぎさ
論文審査担当者	主 査 竹下 敏一 副 査 伊藤 研一・石塚 修
論文題目	Novel role of ASC as a regulator of metastatic phenotype (癌細胞の転移形質制御における ASC の役割)
<p>(論文の内容の要旨)</p> <p>〔背景と目的〕 Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD (ASC) は、抗がん剤でアポトーシスを誘導した白血病細胞で凝集塊を形成する細胞質たんぱく質として発見され、カスパーゼ 1 の活性化に必須の因子であることが明らかにされた。ASC は N 末端側に Pypin と相同な領域 PYD と C 末端側に CARD を有し、PYD と LRR を有する細胞質病原体センサー NOD-like receptors (NLRs) とカスパーゼ 1 をリクルートし、インフラマゾームを形成する。これによりカスパーゼ 1 が活性化され、活性 IL-18、IL-1<math>\beta</math> が産生される。一方、種々の悪性腫瘍細胞において ASC 遺伝子はメチル化され、がんの進展との関連が示唆されているが、浸潤転移における ASC の役割については不明である。我々は、マウス悪性黒色腫の細胞株の ASC 発現を抑制し、ASC ががんの進展にどのように働いているのかを調べた。</p> <p>〔材料および方法〕 マウス悪性黒色腫 BL16BL6 細胞に shASC を導入し ASC ノックダウン細胞 (以下 shASC 細胞) を作成し、細胞増殖アッセイ及び実験的肺転移モデルによる転移実験を行った。転移形質を調べるために、スクラッチアッセイ、マトリゲルを用いた浸潤アッセイ、ECM 接着アッセイ、浸潤突起形成アッセイを行った。マウス悪性黒色腫の別の細胞株である B16F10 細胞、チオグリコレート誘導マウス腹腔マクロファージでも同様の実験を行った。また、細胞の形態を調べるために F-アクチン染色を行った。細胞運動、浸潤での重要なシグナル伝達分子である Src との関係について調べた。また、Src によりカスパーゼ 8 の Tyr380 がリン酸化されると細胞運動に関与するとされること、カスパーゼ 8 の DED 領域は PYD を介して ASC と結合するということが報告されているので、カスパーゼ 8 との関係性を調べた。Src、カスパーゼ 8 のリン酸化を調べ、それぞれの阻害剤を使い同様の実験を行った。</p> <p>〔結果〕 shASC 細胞は、コントロール細胞と比較し、増殖には差が見られなかったが、肺転移能は亢進した。スクラッチアッセイでは、コントロール細胞に比べ、shASC 細胞の運動性が亢進した。浸潤アッセイでも、shASC 細胞は浸潤能が亢進していた。ECM 細胞接着アッセイでは、接着能に差は見られなかった。shASC 細胞はコントロール細胞とは細胞形態が異なっており、F-アクチン染色でラメラポディア様構造やアクチンのドット様構造が目立って見られた。浸潤突起形成アッセイでは、shASC 細胞で浸潤突起が多く観察された。B16F10 細胞、チオグリコレート誘導マウス腹腔マクロファージにおいても同様に、shASC 細胞で浸潤突起/ポドソーム形成が亢進していた。shASC 細胞では、Src のリン酸化が増強しており、下流のシグナル分子である FAK、Erk1/2 のリン酸化も増強していた。Src 阻害剤であるダサチニブを作用させると、shASC 細胞で細胞運動能、浸潤突起形成がより強く阻害された。カスパーゼ 8 の阻害剤である z-VAD-fmk、z-IETD-fmk は shASC 細胞の細胞運動を阻害した。また、shASC 細胞では、カスパーゼ 8 の Tyr380 のリン酸化がコントロール細胞に比べ増強したが、阻害剤を用いるとリン酸化が抑制された。</p> <p>〔結論〕 ASC 発現が抑制されると、細胞骨格が変化し、Src、FAK、Erk、カスパーゼ 8 を介し、細胞運動能、浸潤突起形成、浸潤能が亢進し、その結果、転移性が増強しがんの悪性度が増すということが分かった。ASC の発現抑制はがんの予後因子として重要であると考えた。</p>	

