

分担研究報告書

ダイオキシン類で亢進する細胞接着とオートファジーに関する研究

研究分担者 鳥巢 剛弘 九州大学病態機能内科 助教

研究要旨 ダイオキシン類が生体に様々な影響を及ぼすことが知られているが、どのようなメカニズムで生体に影響するかはまだ不明な点が多い。ダイオキシン類は Ah 受容体のリガンドとして働き細胞接着に影響がある。Ah 受容体から Src や FAK の活性化を引き起こすことがメカニズムとして知られている。今回我々はオートファジーが細胞接着班を取り込み Src や FAK の分解に働くことを示した。その結果オートファジー不全状態であると細胞接着班の分解が抑制され細胞接着が亢進することを示した。今後類似する両者の関連を明らかにしたい。

A 研究目的

ダイオキシン類による中毒である油症が発生し 50 年経過した。ダイオキシン類の生体への重大な影響は今なお重大な課題である。ダイオキシン類は細胞質に存在する芳香族炭化水素受容体(Ah 受容体)を介すると考えられている。しかし Ah 受容体は内因性のリガンドがいまだ不明であり、またどのような分子機構がかかわるか詳細は知られていない。Ah 受容体は様々な臓器に広く存在し、ダイオキシン類が Ah 受容体に結合することで細胞質にある Ah 受容体が核内へ移行し様々な転写産物が作られ、その過程で酸化ストレスが生じ、たんぱく質や DNA に障害を与えると考えられてい

る。一方、ダイオキシン類により細胞運動が増加することが報告されている。メカニズムとして Ah 受容体に結合するとインテグリンの発現量が増加し Src や FAK のリン酸化が亢進することが報告された¹⁾。一方オートファジーは様々な不要となった小器官やタンパクを分解する機構であるが細胞接着との関連も示唆されている。そこでオートファジーがこれらのメカニズムにかかわるかを検討した²⁾。

B . 研究方法

材料として野生型マウス胎児芽細胞と Atg5 欠損マウス胎児芽細胞を用いた。免疫染色は LSM700 レーザー顕微鏡で観察した。タンパク量やリン酸化

をウエスタンブロットにより定量した。RhoA の機能は G - LISA を用いた。細胞接着能は接着アッセイで行った。

C . 研究結果

細胞外マトリクスとしてコラーゲンはインテグリンのリガンドであり最も重要な細胞外マトリクスとして知られている。FITC ラベルしたコラーゲンを細胞 dish に塗布し細胞を接着する際の取り込みと、オートファゴソームのマーカとして LC3 を細胞免疫染色し局在を評価した。LC3 でラベル下オートファゴソームに取り込まれていた。Atg5KO 細胞や Atg7KO 細胞では野生型に比べ細胞内に取り込まれたコラーゲン量が増加していた。このことはオートファジーを阻害するクロロキンでも同様の結果であった。また Atg5KO 細胞や Atg7KO 細胞に十分コラーゲンを取り込ませたのち時間経過をもって観察するとコントロールに比べコラーゲンの分解が抑制されていることが示された。細胞接着班のマーカとして FAK や Paxillin、オートファゴソームのマーカとして LC3 を細胞免疫染色した。FAK や Paxillin もオートファゴソーム内に取り込まれていた。その結果、細胞接着班は Atg5KO 細胞では細胞辺縁に増加し活性化していた。メカニズ

ムとして FAK の活性化を 397 部位でのチロシンリン酸化を評価したところ Atg5 欠損細胞では低下し、さらに FAK で抑制される RhoA の亢進がみられた。細胞機能として細胞接着を再接着アッセイで評価したところ Atg5KO 細胞では細胞接着が亢進し、上記の分子メカニズムは細胞機能として意義のあるものと考えられた。

D . 考察

本研究からダイオキシン類は Ah 受容体を介して FAK や Paxillin が活性化し細胞接着を亢進させるが、オートファジー欠損では同様に細胞接着班の分解が抑制されており FAK や Paxillin が亢進し細胞接着が亢進することが示された。ダイオキシン類は体内に取り込まれたのちどのように排泄されるか知られていない。オートファジーは細胞内にある不要な小器官やミスフォールドしたタンパクを分解する機構として知られる。ダイオキシン類は活性酸素が増加することが病因として知られているがまたオートファジー不全では活性酸素が増加することも知られている。今後ダイオキシン類とオートファジーについて関連を検討する必要があるのかもしれない。

E . 結論

ダイオキシン類の受容体と知られる

Ah 受容体のシグナルとオートファジー欠損により影響がある細胞接着の分子機構に類似性がみられた。

参考文献

Tomkiewicz C1, Herry L, Bui LC, Métayer C, Bourdeloux M, Barouki R, Coumoul X. The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway. *Oncogene*. 2013 Apr 4;32(14):1811-20. doi: 10.1038/onc.2012.197.

Kawano S, Torisu T, Esaki M, Torisu K, Matsuno Y, Kitazono T. Autophagy promotes degradation of internalized collagen and regulates distribution of focal adhesions to suppress cell adhesion. *Biol Open*. 2017 Nov 15;6(11):1644-1653.