

学 位 論 文 要 旨

氏 名 村上 朱里

論 文 名 HER2 陽性乳癌細胞における Cullin-3/KCTD10/RhoB ユビキチン E3 複合体が制御する新規 Rac1 活性化機構に関する研究

学位論文要旨

【緒言】

Cullin-RING 型ユビキチン (Ub) リガーゼ複合体足場タンパク質である Cullin-3 (CUL3) は、BTBP と呼ばれるアダプター分子と基質タンパク質と三者複合体を形成し、標的基質タンパク質を Ub 化する。Ub 化されたタンパク質は分解されるか、新規機能を獲得する。CUL3 は個体の生存及び、発生に必須であり、様々な細胞機能 (膜輸送、シグナル伝達、細胞骨格制御等) に関わる。最近、我々は血管内皮細胞において、BTBP の一つである KCTD10 が CUL3 と複合体を形成し、Rho GTPase の一つである RhoB を Ub 化し、分解に導く事を報告した (Kovacevic, Sakaue et al., J. Cell. Biol. 2018)。また、別の Rho GTPase である Rac1 の細胞内小胞エンドソームから細胞膜への輸送とその後の活性化が、RhoB により負に制御される事が知られている。従って、CUL3/KCTD10 が RhoB を常に分解して低いタンパク質発現レベルに保つ事が、Rac1 の活性化に必要である事が示唆される。Rac1 は様々な癌種で oncogenic に機能する。乳癌では、luminal type で Rac1 を活性化する GEF が高発現し、乳管癌で Rac1 を不活性化する GAP が低発現している事が知られている。更に、HER2 陽性乳癌治療薬である抗 HER2 抗体トラスツズマブに対する耐性化に Rac1 の活性化が必要である事も知られている。本研究において我々は、HER2 陽性乳癌において Rac1 の高発現が予後不良を呈する事を見出し、CUL3/KCTD10/RhoB 軸が Rac1 の活性化を制御すると考え、HER2 陽性乳癌細胞における Rac1 活性化の新しい分子機構の導出を試みた。

【方法】

ヒト乳癌細胞株として、MCF-7 cells (luminal type)、MDA-MB-231 cells (triple-negative type)、SKBR-3 cells と MDA-MB-453 cells (共に HER2-positive type) を使用した。各タンパク質の発現抑制には siRNA を用いた。各タンパク質の発現と細胞内局在は western blotting 法及び、免疫組織染色法により調べた。EGF 刺激下での Rac1 の活性化は Rac1-FRET、走査型電子顕微鏡、ファロイジン染色により解析した。細胞増殖試験では増殖した細胞数を計測した。予後解析には METABRIC database を用いた。

【結果】

CUL3、KCTD10 を発現抑制した結果、HER2 陽性乳癌細胞株 (SKBR-3 cells、MDA-MB-453 cells) 特異的に、RhoB のタンパク質の蓄積を認めた。各種タンパク質分解阻害剤を処理下でも RhoB のタンパク質量が増大したので、CUL3/KCTD10 は、HER2 陽性乳癌細胞特異的に RhoB を Ub 化し、分解している事が分かった。CUL3、KCTD10 を発現抑制した SKBR-3 cells では、分解されずに蓄積した RhoB と Rac1 が細胞内小胞エンドソームで共局在していた。予後解析の結果、HER2 陽性乳癌特異的に Rac1 の発現が高い方が予後不良である事が分かった。Rac1-FRET の結果、CUL3、KCTD10 を発現抑制した SKBR-3 cells では、EGF 刺激依存的な Rac1 の活性化が著しく阻害された。この時、Rac1 活性化依存的な細胞膜形態変化 (ruffle 膜形成) も阻害された。CUL3、KCTD10 を発現抑制した SKBR-3 cells に対し、更に RhoB を発現抑制すると ruffle 膜形成阻害が回復したため、CUL3、KCTD10 の発現抑制時の Rac1 活性化阻害は RhoB のタンパク質の蓄積が原因である事が示唆された。HER2 発現抑制実験等から、EGF 刺激依存的な Rac1 活性化は HER2 シグナル依存的である事が分かった。一方、HER2 発現抑制下では CUL3、KCTD10、RhoB の発現量は変化せず、EGFR と HER2 は CUL3/KCTD10 の発現抑制をしてもコントロールと同様に細胞膜に局在していた。従って、CUL3/KCTD10/RhoB 軸と HER2 シグナルは Rac1 活性化経路において、別の作用点を有する事が分かった。CUL3、KCTD10、Rac1、HER2 を SKBR-3 cells で発現抑制すると、コントロールに比べ細胞増殖が劇的に低下した。

【考察】

Rac1 の機能阻害は HER2 陽性乳癌細胞の細胞増殖を抑制するので、CUL3/KCTD10/RhoB 複合体の形成阻害剤は RhoB のタンパク質量を増大させ、Rac1 活性化を阻害し、細胞増殖を抑制できる。当該複合体は HER2 シグナル非依存的に機能するので、HER2 陽性乳癌特異的な新規分子標的薬の HER2 以外の開発標的として期待される。

キーワード (3~5)	<ul style="list-style-type: none">• Culin3• HER2• Breast cancer• Rac1• RhoB
-------------	---