

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

| | |
|------|---|
| 氏名 | 村上朱里 |
| 審査委員 | 主査 渡部 祐司 副査 今井 祐記 副査 矢野 元 副査 菊川 忠彦 副査 木谷 彰岐 |

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、申請者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 (Kobacevic, 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 は様々の癌種で 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。本研究において申請者は 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ため、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。

本学位論文の審査会は平成 31 年 1 月 28 日に開催された。英語での発表後、本研究に対して次の質疑応答がなされた。1) Rac1, RhoB の測定および定量、2) Rho サブファミリーの cdc42 の関与、3) RhoB 発現と予後の関連、4) RhoB ユビキチン化における KCTD10 以外の可能性、5) 研究の発端になった ruffle 膜形成に気付いた経緯、6) ruffle 膜形成と転移・増殖との関連、7) ruffle の客観的評価として定量化の可能性、8) ホルモン感受性との関連、9) Her2 overexpression による再現性、10) 創薬へのアイデアとしての CUL3 と KCTD10 の結合阻害の安全性、11) 創薬・育薬へのアイデア、12) 臨床検体を用いた今後の研究へのロードマップ、などの多くの質問がなされ、申請者はこれらに的確に回答した。

申請者は、本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識および能力があることを審査員全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。