




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 号	氏 名	森重真毅
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	濱 田 文 彦	
	副査氏名	橋 邊 誠	
	副査氏名	舟 山 正 胤	
<p>論文題目 GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion (GEP100はEGFRシグナルとArf6活性を結びつけることで乳癌浸潤を誘導する)</p> <p>論文掲載誌名 Nature Cell Biology 10 (1), 85-92</p> <p>論文要旨</p> <p>【緒言】 epidermal growth factor receptor (EGFR) シグナルは、癌浸潤や転移に関与しているが、その具体的な機構については不明な点が多い。一方乳癌では、低分子量 G 蛋白質の一つである Arf (ADP-ribosylation factor) 6 の活性化が、浸潤活性に根幹的役割を果たしていることが知られている。本研究では、Arf6 に対する GEF (guanine-nucleotide exchange factor) 活性をもつ GEP100 に注目し、EGFR シグナルを介する浸潤能獲得シグナルが、この分子によってどのように制御されているか、そのメカニズムを解析した。</p> <p>【結果】</p> <p>① Arf6 に対する GEF のうち、GEP100 の発現を抑制した場合にのみ、乳癌細胞の浸潤が阻害された。 ② GEP100 及び Arf6 を knock-down した乳癌細胞群で、EGF 刺激に依存した浸潤活性が抑制された。また、GEP100 の PH domain が、活性化 EGFR の pY1068 と pY1086 と直接結合した。 ③ GEP100 の発現は乳癌の病理学的悪性度と相関して増加した。 ④ 殆ど浸潤性を示さない乳癌細胞株において、Arf6 と GEP100 を同時に強発現させると、EGF 刺激に依存した浸潤活性が誘導された。また、E-cadherin を介した細胞間接着の破綻による形態変化も観察された。 ⑤ マウスを用いた in vivo の実験において、GEP100 knock-down 細胞群では、乳癌細胞の血管内への intravasation の効率が低下し、肺への転移が抑制されることが観察された。一方、乳癌を注入した部位に形成される原発巣の大きさには、GEP100 knock-down は変化を与えなかった。</p> <p>【考察】 これまで、EGFR を介したシグナル伝達のいくつかの経路が癌細胞の運動性・浸潤性に関与することが示唆されていたが、癌浸潤に特異的なシグナル伝達経路については不明であった。本研究から、GEP100 が EGFR を介したシグナル伝達経路と、乳癌の浸潤形質誘導に必須な Arf6 の活性化とを結び付ける特異的な分子であることが示された。また、GEP100 の発現量と乳癌の悪性度との関連が示唆されたことから、GEP100 の発現量が癌浸潤形質獲得の良いバイオマーカーとなる可能性が示された。さらに、GEP100 と活性化 EGFR との結合が、GEP100 の PH ドメインを介した EGFR のチロシンリン酸化部位との直接結合という非典型的な結合様式であることから、GEP100 と EGFR との結合インターフェースが新たな癌浸潤阻害の分子標的なる可能性が示唆された。</p> <p>本研究は、EGFR を介したシグナル伝達経路と、乳癌の浸潤形質誘導に必須な Arf6 の活性化とを結び付ける特異的な分子 GEP100 を発見した秀逸な研究であり、癌の浸潤メカニズムの解明に貢献するものである。よって、審査委員は、本論文を学位論文に値するものと判定した。</p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 森重 真毅

論 文 題 目

GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion

(GEP100はEGFRシグナルとArf6活性を結びつけることで乳癌浸潤を誘導する)

要 旨

【緒言】

epidermal growth factor receptor(EGFR)シグナルは、癌浸潤や転移に関与しているが、その具体的な機構については不明な点が多い。乳癌を例とした解析の中で、低分子量G蛋白質の一つである Arf (ADP-ribosylation factor)6の活性が、浸潤活性に根幹的役割を果たしているという知見が得られている。Arf6は、その他の低分子量G蛋白質と同様に、GEF(guanine-nucleotide exchange factor)によってGTP結合型に、GAP(GTPase activating protein)によりGDP型に変換され機能する。本研究ではArfに対するGEF活性をもつGEP100がEGFRと結合することを同定し、EGFRシグナルを介した浸潤機構獲得のシグナル伝達経路について解析した。

【方法】

- 1) ヒト浸潤性乳癌細胞であるMDA-MB-231で発現している10種類のGEFを、siRNA法によりそれらの遺伝子発現を抑制することで、浸潤活性に与える影響を検討した。
- 2) MDA-MB-231細胞は、EGF刺激によって浸潤性が活性化されることが知られている。siRNA法によりGEP100とArf6の遺伝子発現を抑制した場合に、EGF刺激によって誘導される浸潤性について検討した。また、GEP100とEGFRの結合について、再構成系や変異体を用いた共免疫沈降法で検討した。
- 3) 乳癌の摘出検体を免疫染色し、GEP100とEGFRの発現と病理学的悪性度との関連を検討した。
- 4) 浸潤活性が非常に低いヒト乳癌細胞株であるMCF7にArf6とGEP100を強発現させ、浸潤活性や形態変化を観察した。
- 5) マウス乳癌細胞株の移植による肺転移モデルマウスを用いて、shRNA法でGEP100の発現を抑制した場合に、転移に与える影響を検討した。

【結果】

- 1) Arf に対し GEF 活性をもつ 10 種類の分子の中で、GEP100 の発現を抑制した場合にのみ、特異的に浸潤活性が阻害された。
- 2) GEP100 及び Arf6 を siRNA 処理した MDA-MB-231 細胞群で EGF 刺激に依存した浸潤活性が抑制された。また、GEP100 の PH domain と活性化 EGFR の pY1068 と pY1086 との間での直接的結合が観察された。
- 3) GEP100 の発現率は病理学的悪性度と相関して増加し、原発性乳管癌では約 70% に GEP100 の発現が認められた。
- 4) ヒト乳癌細胞 MCF7 は、殆ど浸潤性を示さないが、Arf6 と GEP100 を同時に強発現させると、EGF 刺激に依存した浸潤活性が誘導された。また、E-cadherin を介した細胞-細胞間接着の破綻による形態変化も観察された。
- 5) GEP100 knock-down 細胞群では、乳癌細胞の血管内への intravasation の効率が低下し、肺への転移が抑制されることが観察された。一方、乳癌を注入した部位に形成される原発巣の大きさには変化を与えなかった。

【考察・結語】

これまでに、EGFR を介したシグナル伝達のいくつかの経路、例えば、MAPK や PI3K の活性化が癌細胞の運動性・浸潤性に関与することが示唆されていたが、癌浸潤に特異的なシグナル伝達経路があるか否かについては、不明のままであった。本研究結果から、GEP100 が EGFR を介したシグナル伝達経路と、乳癌の浸潤形質誘導に必須な Arf6 の活性化とを結び付ける特異的な分子であることが示された。また、GEP100 の発現と乳癌の悪性度の亢進との関連が示唆されたことから、これらの蛋白質発現量が癌浸潤形質獲得の良いバイオマーカーとなる可能性が持たれた。さらに、GEP100 と活性化 EGFR との結合が、標準的な SH2 domain あるいは、PTB domain などを介したものと異なり、GEP100 の PH domain を介した EGFR のチロシンリン酸化部位との直接結合という非典型的な結合様式であることから、GEP100 と EGFR との結合インターフェースが新たな癌浸潤阻害の分子標的なる可能性も考えられた。