

Title	Silencing of ErbB3/ErbB2 Signaling by Immunoglobulin-like Necl-2
Author(s)	河野, 智
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/54239">https://hdl.handle.net/11094/54239</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【106】

氏 名	河 野 智 <sup>まとし</sup>
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 6 7 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Silencing of ErbB3/ErbB2 Signaling by Immunoglobulin-like Necl-2 (イムノグロブリン様分子Necl-2によるErbB3/ErbB2シグナルの抑制作用)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉川 秀樹 (副査) 教 授 宮坂 昌之 教 授 月田早智子

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [ 目 的 ]

正常細胞はがん化することで、無制限な増殖能を獲得する。さらに、細胞運動能の亢進によって浸潤・転移を起すことが知られている。しかし、この現象の分子機構は十分には解明されていない。多くのがん細胞においてNecl-2と呼ばれるイムノグロブリン様細胞間接着分子の発現が低下している。そのようながん細胞にNecl-2を高発現させ、ヌードマウスへがん細胞移植実験を行うと、腫瘍形成能と転移能が低下することが報告されている。しかしながら、Necl-2のがん抑制機構は未解明である。そこで私は、この未解明の機構を解明することが細胞のがん化機構の解明につながるのではないかと考え、Necl-2の機能解析を行った。

[ 方法ならびに成績 ]

#### ① Necl-2とErbB3の相互作用の解析

Necl-2は、細胞の増殖・運動を制御するシグナル伝達に関係するドメインを持っていないことから、何らかの分子、特にがん化に関係する増殖因子受容体と相互作用する可能性が高いと考えられた。HEK293細胞を用いた免疫沈降法によりNecl-2と相互作用している分子を探索した結果、Necl-2はがん化との関連が明らかになっている増殖因子受容体ErbB3 (HER3) と相互作用することを初めて発見した。

#### ② ErbB3とその下流のシグナル伝達の解析

Necl-2がErbB3の機能を制御することで、がん抑制因子として機能していると考えられた。その制御機構を検討するため、Necl-2の発現が低下しているヒト非小細胞肺がん細胞株A549細胞を用いた評価系を新たに構築した。Necl-2を発現させたA549細胞 (Necl-2-A549細胞) では、コントロールのA549細胞と比較して、ErbB3のリガンドである増殖因子heregulinに应答したErbB3のチロシン残基のリン酸化が抑制された。また、その下流のAkt、Racの活性化も抑制された。一方、Necl-2が発現しているヒト腸管上皮細胞株Caco-2細胞では、Necl-2のノックダウンにより、heregulinに应答したErbB3のリン酸化とその下流のAkt、Racの活性化が亢進した。これらの結果から、Necl-2はheregulinによるErbB3のリン酸化およびその下流のシグナル伝達を抑制することが明らかとなった。

#### ③ 細胞の運動、増殖、生存への影響の解析

実際に、heregulinに应答したシグナル伝達をNecl-2が抑制することにより、細胞の運動・増殖・生存が影響を受けるかどうか検討した。ボイデンチャンパー法によりheregulinに应答した細胞運動を解析したところ、Necl-2-A549細胞では細胞運動が抑制された。次に、TUNEL染色法により細胞のアポトーシスを検討したところ、通常培養条件下ではNecl-2-A549細胞とコントロールのA549細胞で差は見られなかったが、浮遊培養条件下ではNecl-2-A549細胞のアポトーシスが増加した。一方、BrdU標識法により細胞増殖能を検討したところ、Necl-2-A549細胞とコントロールのA549細胞で差は見られなかった。以上の結果よりNecl-2は、転移能を持つがん細胞の特徴である細胞運動の亢進や足場非依存的な細胞生存を抑制することが明らかとなった。

#### ④ Necl-2とPTPN13の相互作用の解析

Necl-2がErbB3のリン酸化を抑制する分子機構について検討した。ErbB3はheregulinに应答してErbB2と二量体を形成し、その結果、ErbB3はErbB2よりリン酸化を受けて活性化される。Necl-2はこの二量体の形成に影響を与えなかった。そこで、Necl-2と結合してErbB3の脱リン酸化に関与する別の因子を探索した。HEK293細胞を用いた免疫沈降法で解析した結果、脱リン酸化酵素PTPN13が、Necl-2のPDZドメイン結合モチーフを介して、Necl-2と相互作用することを見出した。さらに、Necl-2-A549細胞でPTPN13をノックダウンすると、Necl-2によるErbB3のリン酸化抑制作用が阻害されたことから、PTPN13はNecl-2によるErbB3のリン酸化抑制作用において重要な働きをしていることが明らかとなった。

[ 総括 ]

Necl-2により、heregulinに应答した細胞運動と足場非依存的な細胞生存が抑制された。その分子機構として、Necl-2はErbB3と相互作用することにより、PTPN13を介してheregulinに应答したErbB3のリン酸化を抑制し、

その下流のシグナルであるAktとRacの活性化を抑制することを見出した。このことは、がん化の進展に関わる細胞機能をNecl-2が抑制する全く新しいメカニズムである。本研究により、これまで不明であったNecl-2のがん抑制作用に関する分子機構が新たに明らかになったことから、将来、がん治療への応用における重要な知見になり得ると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

細胞のがん化の分子機構は十分には解明されていない。イムノグロブリン様分子Necl-2は、過去の報告からがん抑制因子として知られているが、がん抑制に関わる詳細な分子機構は未解明であった。Necl-2はシグナル伝達に関係するドメインを持たないことから、本論文では、他の分子との相互作用ががん抑制機能に関わるのではないかという仮説に基づいて解析を行なっている。その結果、がん化との関連が知られている増殖因子受容体ErbB3と相互作用することを見出し、さらに培養細胞を用いた評価系による解析から、Necl-2が脱リン酸化酵素PTPN13依存的にErbB3の活性化を抑制し、下流のシグナル伝達の抑制と、細胞の運動と生存の抑制に関わることを報告している。本論文は、がん化の進展に関わる細胞機能をNecl-2が抑制する、全く新しい分子機構を解明したものであり、これらはがん治療への応用における重要な知見になることが期待される成果である。よって、博士(医学)に学位授与に値すると考えられる。