

Title	リン酸化したClathrin heavy chain (CHC) は扁平上皮癌の増殖に重要な働きを担う
Author(s)	藪野, 佑介
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69488
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (藪野 佑 介)

論文題名

リン酸化したClathrin heavy chain (CHC) は
扁平上皮癌の増殖に重要な働きを担う

論文内容の要旨

【緒言】

GAK (Cyclin G associated kinase)はCyclin Gと結合するセリン/スレオニンキナーゼであり、様々な組織や細胞で普遍的に発現している。その役割として、細胞質ではクラスリン被覆小胞を介した小胞輸送の制御や中心体の成熟に関与し、核では増殖関連遺伝子の転写を制御することにより、細胞分裂に必須の機能も有していることが報告されている。前立腺がんにおいて、悪性度の指標の1つであるグリソンスコアが高い患者検体において、**GAK**が高発現していると報告されており、がんの悪性度と**GAK**の正の相関関係が注目されている。また、**GAK**は様々な癌細胞株で修飾、過剰発現しており、これらの結果は細胞周期において**GAK**の制御が細胞増殖の調節に重要であることを示唆するが、その分子制御機構については未だに不明な点が多い。本研究では新規の**GAK**のリン酸化標的タンパクとしてクラスリン被覆小胞の構成因子である**Clathrin heavy chain (CHC)**を見出し、その分子制御機構について検討を行うとともに、舌扁平上皮癌患者の組織での過剰発現を検証した。

【方法】

- 1) **GAK**がC末端に**Clathrin**結合ドメインを有し、クラスリン被覆小胞を介した小胞輸送の制御に関与していることから、**CHC**に着目し、*In vitro* kinase assayを行い、**CHC**の**T606** (606番目のスレオニン)を特異的にリン酸化することを見出した。**CHC_T606**リン酸化安定株を作製し、細胞増殖に与える影響を*in vitro*、*in vivo*において検討した。
- 2) anti-**CHC-pT606**抗体を作製した。その抗体がリン酸化ペプチドを特異的に標的にしていることをpeptide competition assayにて確認した後、ヒト子宮頸部癌細胞株**HeLa S3**において、蛍光免疫染色を行い、**CHC-pT606**の細胞内局在について検証した。次に、siRNAを用いて、**GAK**をノックダウンさせた状態で**CHC-pT606**の局在の変化、ウエスタンブロッティングにて発現量を検証した。
- 3) anti-**CHC-pT606**抗体を新規腫瘍マーカーとして有用か検討するため、当科にて舌扁平上皮癌の診断がなされた切除検体を用い、組織免疫染色を行った。

【結果】

1) 細胞増殖速度を*in vitro*で検討したところ、**CHC_T606**リン酸化安定株は非リン酸化安定株と比較し、増殖速度の有意な上昇を認めた。また、マウス皮下腫瘍モデル実験においても、同様に有意な増殖傾向が見られた。この結果より*in vitro*、*in vivo*において、**CHC_T606**のリン酸化は細胞増殖に深く関与していることが示唆された。

2) **HeLa S3**において蛍光免疫染色では、間期では核内に、分裂期では細胞質全体および中心体に発現することを確認した。**CHC-pT606**はM期において中心体に発現し、非リン酸化**CHC**は主に微小管で発現していたが、興味深いことにこの2つは微小管の端で共局在していた。次に**GAK**をノックダウンさせると、ウエスタンブロッティングにて非リン酸化**CHC**のタンパク量は変化がなかったが、**CHC-pT606**のタンパク量は低下した。これにより、**GAK**は**CHC-pT606**のタンパクキナーゼとして、重要なことを確認できた。また、si**CHC**で**CHC**をノックダウンさせても、**CHC-pT606**の発現量は減少しなかったことから、ごく少量の**CHC_T606**がリン酸化していることが示唆された。

次に、中心体における**CHC-pT606**の役割を調べるため、まず免疫染色にて中心体に関連するタンパク**PLK1**との共局在を確認した上で、免疫沈降を行った。以前の報告で**GAK**と**CHC**は直接関連があることが示されているため、さらなる探索を行うため、中心体の成熟に関与しているキナーゼである**PLK1**のリン酸化標的である**Kiz**と**PLK1**、**GAK**、**CHC**をそれぞれ免疫沈降したところ、各々で関連を認め、

GAK,CHC,PLK1とKizは複合体を形成することが示唆された。

3) 臨床検体のanti-CHC-pT606抗体を用いた組織免疫染色では細胞株の免疫染色と同様に間期では核内に、分裂期では中心体における発現を特定するとはできなかったが細胞質全体に発現を認めた。また、癌細胞だけでなく、異形性を有する細胞においても同様に染色された。また、興味深いことに安全域を設けて切除した切除断端の正常な上皮細胞は基底細胞に一部CHC-pT606の発現を認めるのみで、あまり発現を認めなかった。

【考察】

ヒトの癌細胞において、ClathrinとGAKの膜輸送と有糸分裂の機能は独立しており、M期に入り膜輸送が行われなくなると報告されており、本研究では、M期にてCHC-pT606とGAKは染色体から中心体に移動し、GAK_CHC-pT606_PLK1_Kiz複合体を形成し、有糸分裂において重要な役割を担っていることを見出した。

さらに、今回作製したanti-CHC-pT606抗体は単純に癌細胞のみを認識するマーカーではなく、切除後の断端組織の細胞の増殖能の診断として有用であると考えられる。また、HE染色では診断が不可能な分子レベルでの細胞の増殖能を確認できる可能性があり、本抗体は再発、転移のリスクを調べることができる臨床的指標となり得ると考えられた。

【結語】

本研究にて、GAKの新規のリン酸化標的として、CHC_T606を見出し、細胞増殖にCHC_T606のリン酸化が重要であることが示された。そして、扁平上皮癌の新規腫瘍マーカーとしてanti-CHC-pT606抗体は有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (藪 野 佑 介)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 古郷 幹彦
	副 査	教授 豊澤 悟
	副 査	准教授 中澤 敬信
	副 査	講師 岩井 聡一
論文審査の結果の要旨 <p>本研究は Cyclin G-associated kinase (GAK) のリン酸化標的である Clathrin heavy chain (CHC) の分子機構の解明を目的として、GAK により、リン酸化された CHC の細胞分裂への影響や細胞内局在、タンパク発現の検討を行ったものである。</p> <p>本研究の結果、GAK によりリン酸化された CHC は細胞分裂に関与しており、中心体に発現する PLK1 や Kiz との関連を明らかにした。さらに、舌扁平上皮癌組織の免疫染色により、このリン酸化が舌扁平上皮癌において過剰に起こり、癌細胞の分裂が促進していることが認められた。</p> <p>これらの結果より、本研究で作製した CHC のリン酸化抗体が舌扁平上皮癌の診断に有用であることが示唆された。</p> <p>よって、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。</p>		