Osaka University Knowledge Archive

Title	The role of CUB domain-containing protein 1 and MET interaction in invasion of breast cancer cells
Author(s)	河瀬, 直之
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/87839
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　河 瀬　直之　　）	
論文題名	The role of CUB domain-containing protein 1 and MET interaction in invasion of breast cancer cells（乳がん細胞の浸潤におけるCUB domain-containing protein 1とMETの相互作用の役割について）

論文内容の要旨

がんは日本人の死因として最も多く、５人に１人はがんで死亡する。がんは一般的に初期原発巣を形成したのち、周囲へ浸潤し他の臓器へ転移する悪性化の機序を辿る。この浸潤転移を制御する仕組みに関して、周囲の間葉系の細胞などから放出される成長因子が重要な役割を果たしていることが知られているが、そのシグナル経路がどのようにがん浸潤に作用しているかについては明らかになっていない部分が多い。本研究では成長因子の中でもHepatocyte Growth Factor: HGFに注目した研究を行なった。HGFはMETと呼ばれる受容体型チロシンキナーゼと結合し細胞内にシグナルを伝え運動や生存を促進する。このHGF-METが異常に活性化する現象はがんによく見られ、乳がんや食道がん、肝細胞がん、非小細胞肺がんなど、様々ながんで遺伝子増幅や活性化変異が報告されている。このMETに対してCUB Domain Containing Protein 1 (CDCP1)と呼ばれる膜貫通型タンパク質が相互作用し、シグナル伝達の制御に重要であることを示す結果が報告されている。しかしこの相互作用ががん細胞の浸潤に与える影響については明らかになっていない。この点について詳しい検討をすべく、浸潤性の高いMDA-MB-23(MM231)と浸潤性の低いT47Dの２種類の乳がん細胞株を用いて実験を行なった。まずMM231を用いた実験により、CDCP1をノックダウンすると、 HGFによる浸潤が抑制されることを明らかにした。またこの時のF-actinの様子を観察したところ、HGF刺激によってラメリポディアが活発に形成され、CDCP1のノックダウンによってこれが抑制されることが明らかになった。一方T47DではMET、CDCP1の発現は確認されていない。そこでこの細胞に両者を発現させたときに同様の現象が確認できるのかを確かめた。METを発現させたものとMETとCDCP1の両方を発現する細胞株をそれぞれ作製し、HGF刺激した際の浸潤能について比較したところ、CDCP1を発現している条件ではより多くの細胞が浸潤する様子が観察された。またこの時の細胞の様子についても観察したところ、CDCP1を同時に発現させた細胞では、METのみを発現させた細胞に比べて細胞骨格が波打つruffling と呼ばれる現象がコントロールと比べてより激しく起きている様子が確認された。これらの観察結果から、HGFシグナルによるがん浸潤に対しCDCP1が重要な役割を果たしており、さらにアクチン骨格の再編成が活発に起きている様子を確認した。この結果を受けてCDCP1がアクチン骨格を制御するRhoファミリーを活性化している可能性が考えられるが、CDCP1はRhoファミリーを活性化するGuanine nucleotide Exchange Factor (GEF)としての活性は持たない。そのため、CDCP1とRhoファミリーを仲介するGEFが存在すると考えられた。この可能性ついてさらに検証するためにMET下流で形態変化に寄与すると報告されている代表的な４つのGEF（ARHGEF7, VAV2, TIAM1, DOCK1）との関係について検証を行なった。それぞれのGEFをノックダウンした時の浸潤能についてそれぞれの細胞株で検証したところ、ARHGEF7をノックダウンした時にCDCP1の効果を特異的に打ち消す様子が観察された。さらにT47Dにおいて、ノックダウンに使用したshRNAに対し耐性変異を持つARHGEF7を導入したところ、CDCP1による浸潤能の上昇が再度観察された。またこの時RAC1の活性についてもsh*ARHGEF7*の導入で低下し、復帰変異体で回復する様子が観察された。また蛍光免疫染色によってCDCP1とARHGEF7の局在についても観察したところ、HGF刺激後に両者がruffling している領域で共局在する様子が確認された。さらに蛍光免疫染色による観察でARHGEF7が集積していた領域は、PI3K下流のPIP3を可視化するバイオセンサーが集積する領域とも重なっている様子が確認された。この結果からシグナル伝達が活発に行われている領域でこれらのタンパク質が相互作用している可能性が示唆された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　河瀬 直之　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	岡田　雅人
	副 査　教授	三木　裕明
	副 査　教授	岡田　眞里子

論文審査の結果の要旨

申請者は、がんの悪性化に伴う浸潤・転移現象に注目し、特に増殖因子 Hepatocyte growth factor (HGF)によるがん細胞の浸潤促進効果の分子機序解明を目指した研究を行った。まず、ヒト乳がん培養細胞株（MDA-MB-231 と T47D）を用いた実験により、CDCP1 と呼ばれる SRC チロシンキナーゼの活性化因子の発現によって、HGF 依存性の細胞形態の変化を伴うがん細胞の浸潤が促進されることを明らかにした。また、その過程において、SRC チロシンキナーゼの活性化と ARHGEF7 と呼ばれる Guanine nucleotide exchange factor (GEF)を介した RAC1 の活性化が重要であることを初めて明らかにした。さらに、HGF 刺激に応答して、CDCP1-SRC と ARHGEF7 がアクチン骨格の構造変化の起点となる膜ミクロドメインに集積することを見出し、浸潤を誘導する RAC1 活性化の新しいメカニズムを提唱した。以上の研究成果は、乳がん細胞の浸潤・転移機構の理解に大きく貢献するものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認められる。