

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	河口まどか
論文題目	CD44 を介する乳癌細胞のクラスター形成機構の解明		
(論文内容の要旨)			
<p>癌は世界第2位の死因であり、癌患者の死亡の90%は転移による。そのため、癌の転移に至る前の、転移過程の癌細胞を標的とした治療法の開発が期待されている。転移の過程において、血中に存在する循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cells: CTCs) は、単一細胞で存在するシングル CTCs と、二細胞以上が集まってクラスターを形成するクラスターCTCs がある。クラスターCTCs は、シングル CTCs の 23-50 倍の転移能を有することから、癌細胞のクラスター形成を抑制できれば、転移の抑制に貢献できる可能性がある。しかし、クラスターCTCs の形成機構は不明であった。CD44 は、クラスターCTCs を構成している約 80%の細胞で発現している。また、CD44 を高発現している癌細胞は、転移性が高く少数の細胞でも腫瘍を形成する能力を有している。そこで、本研究は CD44 を標的としたクラスターの形成機構の解明を目的とした。CD44 は一回膜貫通型のタンパク質であることから、NOTCH など、他の細胞膜貫通型タンパク質と同様に、細胞間で二量体を形成することがクラスターの形成に重要である可能性がある。そこで、クラスターの形成機構として、「CD44 が細胞間で二量体を形成する」ことを仮説とし、その検証を行った。</p> <p>本研究では初めに、クラスターを形成した乳癌細胞内に二量体化した CD44 が存在するかを、細胞表面で発現しているタンパク質間の相互作用を安定化するクロスリンカーを用いたウエスタンブロットにより確認した。次に、CD44 の二量体化が、細胞間で形成される可能性を検証するため、CD44 に FLAG または HA を融合したプラスミド DNA (CD44-FLAG および CD44-HA) を用いた共免疫沈降を行なった。内在性の CD44 の発現がない HEK293 細胞に、CD44-FLAG を強制発現し、CD44-HA を強制発現させた HEK293 細胞と共培養することでクラスターを作製した。その結果、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行なったサンプルの中から CD44-HA が検出された。この結果は、CD44 が細胞間で結合することを示唆する。また、二量体化に必要なアミノ酸を同定するため、共同研究者による計算機シミュレーション結果を基に変異型 CD44 を作製し、共免疫沈降法により二量体化形性能を評価した。結果、CD44 の二量体化には細胞外ドメイン I 内に存在する 10 個のアミノ酸および細胞外ドメイン II 内に存在する 5 個のアミノ酸がカバーする領域が必要であることが明らかとなった。さらに、変異型 CD44 を用いてクラスターアッセイを行なった結果、クラスターの形成が阻害された。これらの結果は、CD44 の二量体化の形成によりクラスターが形成されることを示唆する。次に、二量体化形成の下流で変化のある蛋白質を、CD44 に対するノックダウン法を用いて探索した結果、細胞死抑制効果を持つ p21-activated kinase 2 (PAK2) を同定した。また、CD44 の二量体形成能を失った変異型 CD44 では、PAK2 の Ser20 のリン酸化が抑制された。これらの結果より、細胞表面で CD44 が多量体化した結果、細胞内での PAK2 が接近することとなり、PAK2 間での相互リン酸化が引き起こされた可能性が考えられる。最後に、CD44 の二量体形成の阻害により転移抑制効果があるかを in vivo の実験系を用いて検証した。結果、CD44 のドメイン II の 5 つのアミノ酸をアラニンに置換した変異型 CD44 において、肺への転移抑制効果が示された。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

我が国や欧米など、先進国における5年生存率は多くの癌で改善傾向にある一方で、転移を伴う進行癌に対しては、有効な治療法が少なく、予後の改善も限定的である。したがって、転移に至る前の、転移過程の癌細胞を標的とした治療法が期待されている。癌患者の血中に存在するクラスターCTCsは、シングルCTCsと比較し転移能が23-50倍高く、CD44の高発現が認められる。申請者は、CD44が一回膜貫通型のタンパク質であることから、NOTCHなど、他の細胞膜貫通型タンパク質と同様に、CD44が細胞間で二量体を形成することがクラスターの形成に重要である可能性があると考えた。そこで、CD44を介する癌細胞のクラスター形成機構の解明に取り組んだ。

申請者はまず、転移性の高いMDA-MB-231乳癌細胞株内に二量体化したCD44が存在することを確認した。次に、CD44が細胞間で二量体を形成すること、また、細胞外ドメインを介して二量体を形成することを、プラスミドDNAを用いた共免疫沈降法およびsolid-phase self-interactionアッセイにより明らかにした。さらに、計算機シミュレーション結果を基に変異型CD44を作製することで、CD44の二量体化には、細胞外ドメインI内に存在する10個のアミノ酸および細胞外ドメインII内に存在する5個のアミノ酸がカバーする領域が必要であることを見出した。次に、CD44の二量体形成を阻害する変異型CD44を用いて、クラスター形成能を評価することで、CD44の二量体化の形成によりクラスターが形成されることを明らかにした。さらに、二量体形成が阻害される変異型CD44では、野生型のCD44と比較し、細胞死抑制効果を持つPAK2のSer20に対するリン酸化が抑制されることも明らかにした。そして最後に、CD44の二量体化の阻害による転移の抑制効果を免疫不全マウスに尾静脈注射を行うことで評価した結果、変異型CD44では野生型のCD44を強制発現させた癌細胞と比較し肺での検出が有意に減少することを示した。

以上のとおり、本論文は、CD44による細胞間での二量体を形成することが癌細胞のクラスター形成に寄与することを初めて示し、さらに、本研究で同定したCD44の二量体形成に必要なアミノ酸部位を標的・阻害することにより、癌転移を抑制する治療法への応用に発展する可能性を示したものである。これら一連の研究は、申請者が本研究科で修得した生命科学に関する高度で幅広い学識と分子細胞生物学分野における優れた研究遂行能力によって達成されたものであり、生命科学の理解・発展に大きく寄与する内容であると判断できる。また、本論文は、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。更に、令和2年8月6日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日