

| | | | |
|---|----------------------------------|----|-----------|
| 京都大学 | 博士（薬科学） | 氏名 | 田村（濱岡） 裕穂 |
| 論文題目 | EphA2によるグリオブラストーマの細胞増殖制御機構に関する研究 | | |
| <p>（論文内容の要旨）</p> <p>受容体チロシンキナーゼであるEph受容体は、細胞同士の接触により、細胞膜上のリガンドであるephrinと結合することによって活性化され、発生過程での細胞の移動や位置決定において重要な役割を担っている。一方、Eph受容体、ephrinの発現の異常が様々ながんで報告されている。特にEph受容体の中でもEphA2は、様々な悪性度の高いがんで高発現し、EphA2の発現量ががんの悪性化と相関関係にある例が数多く報告されていることから、EphA2の機能とがんの悪性化との関連が注目されている。EphA2は、リガンドであるephrinA1との結合によりチロシンキナーゼ活性が上昇する。一方で、がん細胞におけるEphA2は、細胞内領域に存在する897番目のセリン（S897）がリガンド非依存的にリン酸化される。しかしながら、どのようにEphA2のS897がリン酸化され、さらにはリン酸化されたEphA2がどのようにがんの悪性化と関わっているのかについては不明な部分が数多く残されていた。グリオブラストーマは悪性脳腫瘍の中で最も頻度が高く、またその悪性度は最も高いグレード4に分類される。正常な脳組織と比較してグリオブラストーマではEphA2の発現が上昇していることが報告されている。本研究では、グリオブラストーマにおいて高発現しているEphA2の機能とシグナル伝達機構に着目し、以下の検証を行った。</p> <p>第一章では、申請者はグリオブラストーマの細胞株であるU251、A172細胞を用いて、EphA2の発現と細胞増殖との関連について検証を行った。その結果、EGF刺激による細胞増殖の促進が、EphA2の発現抑制により阻害された。また、EGF刺激を加えるとEphA2のS897がリン酸化され、このリン酸化はMEKあるいはRSK阻害剤により抑制された。さらには、EGF刺激による細胞増殖の促進が、RSKの阻害剤あるいはRSKの発現抑制により阻害された。一方、野生型EphA2、S897をアラニンに置換したリン酸化を受けないEphA2-S897A変異体をU251細胞に過剰発現させたところ、野生型EphA2の過剰発現ではEGF刺激が無い状態でも細胞増殖が促進され、EphA2-S897A変異体の過剰発現ではEGF刺激による細胞増殖の促進が阻害された。以上の結果から、EGF刺激によりRaf/MEK/ERK/RSKシグナル経路が活性化され、EphA2のS897がリン酸化されることでグリオブラストーマの増殖が促進されることが明らかになった。</p> <p>第二章では、申請者はEphA2の過剰発現とがんの悪性化との関連を調べるため、EphA2のチロシンキナーゼ活性とS897リン酸化の関わりに着目した。HEK293T細胞への野生型EphA2の過剰発現によって、EphA2のS897、及びERKのリン酸化が引き起こされた。ところが、チロシンキナーゼ活性を持たないEphA2-K646M変異体の過剰発現では、野生型EphA2と比較してこれらのリン酸化レベルが低かった。野生型EphA2の過剰発現によるEphA2 S897リン酸化は、ERK阻害剤により抑制された。一方、A172細胞への野生型EphA2の過剰</p> | | | |

発現により細胞増殖は促進されたが、EphA2-K646M変異体の過剰発現では野生型と比較して細胞増殖の促進が有意に低かった。これらの結果から、EphA2が過剰に発現することによって、EphA2のチロシンキナーゼ活性を介してERKが活性化され、その下流でEphA2のS897リン酸化が引き起こされることで細胞増殖が促進されることが示唆された。

第三章では、EphA2のS897リン酸化による細胞増殖の促進に関わる分子メカニズムについて調べるため、EphA2と結合するタンパク質に着目した。そこで申請者は、EphA2のC末端にFLAGタグを付加したEphA2-FLAGを子宮頸癌由来のHeLa細胞に発現させ、タグ抗体を用いた免疫沈降法によって結合タンパク質を精製した後、質量分析法を用いて網羅的にEphA2結合タンパク質の解析を行った。その結果、EphA2の結合タンパク質としてアクチン結合タンパク質Filamin Aが同定された。免疫沈降法により、EphA2とFilamin Aの結合が確認され、免疫染色法によりEphA2とFilamin Aの細胞膜近傍における共局在が観察された。EGF刺激、及びEphA2の過剰発現による細胞増殖の促進は、Filamin Aの発現抑制により阻害された。また、Filamin Aの発現抑制により、EGF刺激によるEphA2 S897リン酸化が抑制された。以上の結果から、Filamin AがEphA2と複合体を形成し、EphA2のS897リン酸化を促進することによって、細胞増殖が促進されることが示唆された。

本研究で得られた、EphA2によるグリオブラストーマの細胞増殖制御に関わるシグナル伝達機構に関する知見は、新たな治療薬の開発に有用な基礎的情報を提供するものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

エフリンは、受容体であるEphを活性化することにより、発生過程における細胞の位置や数を制御する重要な働きがある一方、このシグナルの異常が様々な疾患の発症と深く関わっていることが知られている。中でもエフリン受容体の1つEphA2は、神経膠芽腫を含め様々な組織由来のがんにおいて過剰に発現しており、EphA2の発現量と、がんの進行や患者の生存率との相関関係について数多く報告されている。ところが、過剰発現されたEphA2が、異常なシグナル伝達を引き起こすことによって、どのようにがんの悪性化に寄与しているかについては不明な点が数多く残されている。申請者は、脳腫瘍の中でも最も予後が悪いとされる神経膠芽腫細胞を用いて、過剰発現されたEphA2受容体によって引き起こされるシグナル伝達、及び細胞機能への影響について解明することを目的に研究を行った。その結果、神経膠芽腫細胞をEGFで刺激することによりMEK/ERK/RSK経路が活性化され、その下流でEphA2の897番目のセリン残基がリン酸化されること、さらには神経膠芽腫の細胞増殖が促進されることを申請者は見出した。次に申請者は、EphA2の過剰発現が細胞内シグナル伝達に与える影響について解析を行った。その結果、過剰発現されたEphA2は、それ自身が持つチロシンキナーゼ活性によってMEK/ERK/RSK経路を活性化し、EphA2の897番目のセリンのリン酸化の亢進、さらには神経膠芽腫の細胞増殖を促進することを申請者は新たに見出した。この結果は、神経膠芽腫細胞においてEphA2の発現上昇が引き起こすがん悪性化の分子メカニズムの一端を明らかにした研究成果であると考えられる。一方、EphA2の897番目のセリンのリン酸化の下流でどのような分子が働き、細胞増殖を促進させているかについては現在のところ明らかにされていない。そこで申請者は、細胞内でEphA2と結合する分子に着目し、EphA2の897番目のセリンのリン酸化による細胞増殖の促進に関わる分子メカニズムについて解明することを試みた。具体的には、C末端にFlagタグを付加したEphA2-Flagを作製し、抗Flag抗体を用いた免疫沈降によってEphA2と結合するタンパク質を精製した。その後、質量分析法を用いたプロテオーム解析によって網羅的にその結合タンパク質を同定し、解析を進めた。その結果、アクチン結合タンパク質として知られているFilaminAがEphA2結合タンパク質として同定された。申請者はさらに解析を行い、神経膠芽腫細胞においてEphA2とFilaminAが結合していること、EphA2による神経膠芽腫細胞の細胞増殖の促進にFilaminAが関与していることを明らかにした。

本研究において申請者は、実験で用いたEphA2変異体の作製から細胞増殖の解析、さらにはEphA2受容体のシグナル伝達の解析を行い、EphA2の細胞増殖促進作用に関わるEphA2結合タンパク質の同定まで行った。がん細胞におけるEphA2の役割については非常に数多くの研究が行われ、競争の激しい研究分野である。その中で申請者は、1) 神経膠芽腫細胞におけるEphA2の897番目のセリン残基がリン酸化される分子メカニズムについて、2) 過剰発現されたEphA2が引き起こすシグナル伝達について、3) 細胞増殖の促進に関わるEphA2結合タンパク質の同定について行い、それぞれの研究成果を査読付き論文として発表することができた。申請者は本研究を通じて、優れた研究者になるための多くの資質を身に付けたと言える。

以上のように、本論文には薬学に関する高度で幅広い学識、細胞生物学分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見や概念が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和4年8月29日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。