

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 石 濱海

印環細胞癌は低分化型腺癌の一種である。腺癌はその組織形態の違いにより、高分化型腺癌と低分化型腺癌に分類される。高分化型腺癌に対し、印環細胞癌は脱分化した癌で、細胞極性、細胞接着能が失われており、足場非依存的に増殖する 경우가多く、浸潤転移能の高い、より悪性の癌である。印環細胞癌は外科手術による治療は困難であり、化学療法も確立されていないため、実際上治療法のない癌といえる。印環細胞癌の特徴としては細胞同士の相互作用の欠失と分泌系の亢進が知られている。これまでの研究結果により、印環細胞癌において、**receptor tyrosine kinase** である **ErbB2/3** が恒常的に活性化していることが示されている。さらに、その下流シグナル経路として **p38MAPK pathway** が印環細胞癌の細胞同士の相互作用を制御することも分かっている。しかし、分泌系の亢進についてはまだ分かっていなかった。本研究は印環細胞癌の分泌系の亢進の解明を目的としておこなわれた。

序論で、これまでの背景をおべたの後、第一章では **Gab1** が **NUGC4** 細胞のムチン分泌系を制御することを述べている。これまで、印環細胞癌細胞株では **PI3-kinase-p38MAPK** カスケードが活性化されていることが示されていたが、**p38MAPK** を阻害しても分泌系の亢進が抑えられない。これにより、印環細胞癌の分泌系の亢進は **PI3K-p38MAPK** 以外のシグナル伝達経路に制御されることが考えられた。これを明らかにするために、**PI3-kinase** の結合蛋白質を検索した。**PI3-kinase** の **p85 subunit** を認識する抗体を用いて免疫沈降と銀染色を行った結果、印環細胞癌細胞 **NUGC4** から、**PI3-kinase** と結合する **Gab1** (**Grb2-associated binder 1**) 蛋白質が検出された。さらに、**NUGC4** 細胞において、**Gab1** が恒常的にチロシンリン酸化されていることが分かった。**NUGC4** 以外の印環細胞癌株についても調べたところ、**HSC39** 細胞では同様に **Gab1** が **PI3-kinase** と結合し、恒常的にチロシンリン酸化されていた。一方、**KATOIII** 細胞では **Gab1** がチロシンリン酸化されていなかったが、**Gab2** がリン酸化され、**PI3-kinase** と結合していた。これらの結果は、印環細胞癌のシグナル伝達において、**Gab** ファミリーが何らかの機能を果しているを示している。**Gab1** の機能を解析するために、**pSUPER RNAi system** を用いて、**Gab1** 発現を **knock down** させた **NUGC4** 細胞の **Gab1 RNAi** 細胞株 (**Gab1\_i** 細胞) を作成した。この細胞株は野生型と比べて、形態変化が見られなかったが、ムチン蛋白質である **Muc1** と **Muc4** を指標に分泌系を調べた結果、分泌亢進が著しく抑えられていた。この結果により、**Gab1** が印環細胞癌細胞 **NUGC4** の分泌系を制御することが示唆された。

第二章では **ErbB2/3-Gab1** のシグナル伝達について解析している。293 細胞に **ErbB2**,

ErbB3 と Gab1 の遺伝子を過剰発現させた。活性型の ErbB2 を発現させた場合は野生型の ErbB2 と比べて、ErbB3 及び Gab1 のチロシンリン酸化の亢進が見られ、ErbB2/3-Gab1 のシグナル経路があることが示唆された。この結果は ErbB2/3 のリガンドである Heregulin で野生型の ErbB2/3 を刺激した場合も同様であった。これらの結果が過剰発現系でなくても正しいことは乳がんの MCF7 細胞を用いて heregulin 刺激実験を行うことにより確認した。これらの結果により、Gab1 が細胞外からの刺激に対して ErbB2/3 複合体の ErbB3 と結合し ErbB2/3 複合体によりチロシンリン酸化されることが示された。

第三章では Gab1 がいかに膜タンパク質の輸送に関与しているかを解析している。Gab1 のムチン分泌の制御を調べるために、糖鎖を特異的に認識結合、架橋形成するタンパク質であるレクチンを用いて免疫染色を行った。レクチン MAL2 は Muc1 のシアル酸付加後の糖鎖 Gal $\beta$ 1,3GalNAc と SA $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc を認識する。MAL2 の染色の結果、野生型 NUGC4 細胞はムチンがシアル酸付加されてから細胞膜へ輸送されるが、Gab1<sub>i</sub> 細胞ではムチンがシアル酸付加されるにも関わらず細胞内に留まって細胞膜には輸送されないことが分かった。これらの結果により、Gab1 がトランスゴルジネットワーク (TGN) において分泌系を制御することが示唆された。次に、Gab1 の局在を検討した。TGN タンパク質である TGN38 と Gab1 免疫染色により、NUGC4 細胞では Gab1 と TGN38 が共局在が見られた。また、MCF7 細胞に heregulin 刺激を加えると、Gab1 が TGN への移行が観察された。これらの結果により、Gab1 は活性化に伴って TGN に移行し分泌系を制御することが示唆された。NUGC4 細胞では Gab1 が恒常的に活性化されているために刺激によらず TGN に局在したものと思われた。

以上、要するに本研究は、アダプタータンパク質である Gab1 が細胞の分泌系を制御することを初めて見出し、これまで不明であった PI3-kinase の小胞輸送への関与を具体的なものとした。本研究は印環細胞がんの生化学的知見を供給するとともに、その治療法の開発へのシーズをも供給したものであり、学術上応用上貢献するところが大きい。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。