

論文の内容の要旨

論文題目 肝細胞癌における ROBO1 の機能解析

氏名 関 元昭

肝臓癌は、日本人の癌死における部位別死亡率で第三位の疾患である。患者の 5 年生存率は 17%と予後の悪い癌の一種であり、早期診断法や治療法の開発が強く要望されている。近年、マイクロアレイを利用した網羅的な遺伝子発現解析によって、ROBO1 が肝細胞癌において発現亢進することが明らかになった。

ROBO1 は元来神経細胞で研究が進められていた分子である。神経発生において軸索が伸長する時や神経前駆細胞が移動する時に、ROBO1 を発現している細胞は、反発因子である SLIT の濃度が薄い方向へと伸長、あるいは運動することが知られている。しかし、ROBO1 が肝細胞癌でどのような役割を果たしているのかについては未だ不明である。そこで、ROBO1 のタンパク質切断機構や細胞内の局在を解析することで、肝癌細胞内での ROBO1 の挙動を明らかにすることを試みた。

まず第一に ROBO1 の細胞内領域に対する抗体を作製した。ROBO1 の C 末端、1455~1580 番目のアミノ酸を GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させた。この組み換えタンパク質を抗原としてウサギに免疫し、得られた抗血清に対して抗原による精製を行い、抗 ROBO1 ポリクローナル抗体 ROBO1-CpAb とした。ROBO1-CpAb を用いてイムノブロットィングを行った結果、ROBO1 を特異的に認識するモノクローナル抗体 ROBO1-NmAb と同様に、約 260kDa の全長 ROBO1 と考えられるバンドが検出された。siRNA を使って ROBO1 の発現を抑制し、イムノブロットィングを行った結果、ROBO1-CpAb によって検出されていたバンドが検出されなくなった。免疫蛍光染色でも、ROBO1 を発現している PLC/PRF/5 細胞では染色が見られたのに対し、siRNA によって ROBO1 を抑制した細胞では染色が見られなくなった。以上のことから、ROBO1-CpAb が ROBO1 を特異的に認識することを証明した。また、ROBO1-CpAb によって、約 120kDa に特異的なバンドが検出されたことから、このバンドが ROBO1 の C 末端断片に由来する物ではないかと考えられた。

第二に、ROBO1 のタンパク質が切断される機構について検討した。ROBO1 が何らかの機構でタンパク質切断を受けることは予想されていたが、その機構は不明であった。前述のように、ROBO1-CpAb を用いたイムノブロットィングや免疫蛍光染色によって ROBO1 の C 末端断片の存在が示唆されていたが、検出が安定していなかった。そこで ROBO1 の C 末端断片がタンパク質分解を受けていると仮定し、プロテアソームの阻害剤である MG132 を添加した培地で細胞を培養し、回収したタンパ

ク質を解析した。その結果、ROBO1-CpAbを使用したイムノブロッティングによって約 120kDa のバンドを安定的に検出することができた。続いて、PMA を添加した培地で細胞を培養し、同様にタンパク質を解析した。PMA は PKC の活性化を介して各種プロテアーゼを活性化することが知られている試薬である。イムノブロッティングの結果、0.1 μ g/ml の PMA を添加することで、約 120kDa のバンドがより強く検出された。つまり、ROBO1 のタンパク質切断が促進したと考えられる。さらに、プロテアーゼ阻害剤を添加した細胞を用いてタンパク質の解析を行った結果、メタロプロテアーゼ阻害剤 GM6001 あるいは TAPI-1 を使用することで ROBO1 のタンパク質切断が抑制されることを示した。GM6001 および TAPI-1 は、MMP ファミリーや ADAM ファミリーに属するメタロプロテアーゼに対する広範な阻害剤である。すなわち、PMA によって活性化した ROBO1 の切断には、MMP ファミリーあるいは ADAM ファミリーのメタロプロテアーゼが関与していることが示唆された。

第三に、ROBO1 の細胞内局在について検討した。ROBO1 が膜型タンパク質であるため、細胞膜に存在することは知られていたが、細胞内領域の挙動については不明であった。ROBO1-CpAb を使用して肝細胞癌 PLC/PRF/5、HepG2、HuH7 細胞を免疫蛍光染色したところ、PLC/PRF/5 細胞では細胞膜、細胞核に加えて接着斑と考えられる局所的な染色が見られた。また、HepG2 および HuH7 細胞では細胞膜と細胞核に染色が見られた。PLC/PRF/5 細胞を用いて、ROBO1 を接着斑に局在するタンパク質 Paxillin あるいは Talin と共染色を行った結果、これらの染色が一部重複して検出された。従って、ROBO1 の一部は接着斑に局在すると考えられた。また、細胞核にて染色された ROBO1 について検証を行うために、まず ROBO1 の細胞内領域を COS7 細胞に強制発現させ、免疫蛍光染色を行った。その結果、細胞核が強く染色されたことから、ROBO1 が切断を受けて生成する C 末端断片が細胞核へ移行すると仮定した。ROBO1 が細胞核に存在することを証明するために、細胞核抽出法により細胞の分画を行い、それぞれの画分からタンパク質を抽出して解析した。イムノブロッティングの結果、細胞の全画分、細胞質画分に加えて、細胞核画分からも ROBO1 が検出された。特に約 110kDa のバンドが細胞核画分から特異的に検出された。Notch や CD44 など、一部の膜タンパク質は二段階切断を受け、断片の一部が細胞核へと移行して転写の調節を行うことが知られている。ROBO1 も一部が細胞核へと移行すると考えられ、二段階切断によって局在の調節を受けているのかもしれない。

このように、ROBO1 は、既報のとおり細胞膜上に存在し、シグナル伝達の足場として機能するだけでなく、タンパク質切断を受けた一部が細胞核へと移行することでシグナル伝達を担っている可能性が考えられた。今後、ROBO1 のタンパク質切断の詳細や細胞核に存在する ROBO1 の役割を理解することで、肝細胞癌における ROBO1 の役割が明確になると考えられる。