

論文の内容の要旨

論文題目 ショウジョウバエ癌抑制蛋白 Lgl のヒトホモログ
である Hugl-1 の子宮体癌への関与とその機能解析

指導教員 矢野 哲准教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入(進)学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 鶴賀 哲史

ショウジョウバエ異形成性癌抑制蛋白 Lgl のヒトホモログである Hugl-1 の発現は、大腸癌組織や悪性黒色腫組織において低下している。しかも遠隔転移やリンパ節転移を伴う症例で Hugl-1 の発現低下が高頻度であることから、Hugl-1 は癌の進行とくに転移に関わると考えられている。Lgl の哺乳類ホモログである mLgl は数個の WD40 (tryptophan-aspartic acid)ドメインと、細胞極性決定因子である aPKC (atypical Protein Kinase C)により修飾されるリン酸化ドメインを持つことがわかっているが、機能については細胞極性形成に関わると考えられているものの十分には解明されていない。

近年 Hugl-1 と同様にショウジョウバエ異形成性癌抑制蛋白である hDlg と hScrib が、子宮頸癌の原因ウイルスであるハイリスク HPV (16 型, 18 型) の E6 蛋白により、ユビキチン-プロテアソーム経路を介して分解されていることがわかり、同じく分解の標的となっている p53 とともにそれらの機能が注目されている。Hugl-1, hDlg, hScrib の 3 つ

の蛋白は細胞内で Scribble 複合体として存在し細胞極性に関わる機能を果たしていることがわかっているが、その詳細は未だ不明である。癌細胞の特徴である無秩序な増殖と他臓器への浸潤・転移は、正常細胞で通常みられるコンタクトインヒビション(運動している細胞どうしが接触すると細胞間接着が形成され、運動と増殖を停止すること)機構が破綻していることによるという説がある。そのため細胞間接着装置の構造、細胞間接着が極性を形成する分子機構、接着と運動・増殖の相互作用についての研究は癌研究における重要なテーマであり、Scribble 複合体についても研究が進められている。

本研究では、近年日本で増加傾向にある子宮体癌における Hugl-1 の発現について臨床検体を用いて検討した。さらにその発現低下が癌の進展に関与すると考えられている Hugl-1 の機能について、細胞間接着に着目し、分子細胞生物学的な手法を用いて解析した。

まず 86 例の子宮体癌組織を用いた RT-PCR 法により、子宮体癌における Hugl-1 の発現の有無を検討した。癌組織中の Hugl-1 の mRNA の発現の有無により 2 群 (Hugl-1 消失群と Hugl-1 発現群) に分類した。全体の 10.5% にあたる 9 例で Hugl-1 の発現が消失していた。Hugl-1 消失群ではリンパ節転移陽性例が 54.5% と Hugl-1 発現群の 17.3% と比較して有意に高頻度であった ($p = 0.012$)。

このことは大腸癌や悪性黒色腫で既に報告されている癌組織内での Hugl-1 の発現低下を支持する結果であった。正常細胞における Hugl-1 の機能や、癌化する過程で Hugl-1 の発現が低下する機構がいまだ解明されていないため、Hugl-1 を癌抑制蛋白であると断定することはできないが、さまざまな癌種において Hugl-1 が低下しているという事実は、Lgl のヒトホモログである Hugl-1 がヒトにおいて癌抑制蛋白として機能している可能性を示唆する。

次に Hugl-1 と複合体を形成する蛋白を新規に検索するために、培養細胞から得た蛋白抽出液と抗 Hugl-1 抗体を用いて免疫沈降をおこない、結合した蛋白を PMF 解

析により同定した。Hugl-1 と複合体を形成する蛋白として LMO7 を同定した。LMO7 は 13 番染色体上に遺伝子がある LIM ドメインをもつ蛋白として 1998 年に報告され、その後 LMO7 が乳癌発癌の関連遺伝子であること、リンパ節転移を伴う乳癌組織や大腸癌組織で過剰に発現していることが分かっている。さまざまな組み換え蛋白を発現させ、免疫沈降法と GST プルダウン法を用いて、Hugl-1 と LMO7 の結合や結合部位を確認した。その結果 Hugl-1 と LMO7 の結合は LMO7 の C 末端側にある LIM ドメインを介していることがわかった。さらに、培養細胞を用いた蛍光免疫染色法により細胞内での Hugl-1 と LMO7 の局在を検討した。両者は細胞間接着部位とくにアドヘレンスジャンクションで共局在していることがわかった。また LMO7 が Hugl-1 と結合する際に必要であるとわかった LIM ドメインに変異をおこすと、LMO7 の局在が変化し細胞質に集積することがわかった。

LMO7 は上皮細胞の細胞間接着部位のアドヘレンスジャンクションに局在することがわかっている。LMO7 はアファディン介してネクチン複合体と、 α アクチニン介してカドヘリン複合体とそれぞれ結合し、アドヘレンスジャンクションを安定させる機能をしていると考えられている。Hugl-1 の細胞間接着における機能に関しては不明であったが、Hugl-1 が LMO7 と結合することがわかったことにより、LMO7 とともにアドヘレンスジャンクションで細胞間接着の安定に関わっている可能性が示された。癌の転移は、①癌細胞の原発巣での無秩序な増殖、②癌細胞の原発巣からの離脱、③周辺組織への破壊的な浸潤、④血管やリンパ管への侵入と管内での移動、⑤血管およびリンパ管の内皮細胞との接着、⑥血管およびリンパ管からの脱出、⑦遠隔組織での生着と再増殖、といった過程を経てはじめて成立する。Hugl-1 の発現の低下は、既に報告されている接着能の低下と運動能の亢進、MMP の亢進に加えて、今回検討したアドヘレンスジャンクションにおける役割など、いくつかのプロセスに関与してリンパ節転移を促すと考えられる。