



Interaction of Necl-4/CADM4 with ErbB3 and integrin $\alpha 6 \beta 4$ and inhibition of ErbB2/ErbB3 signaling and hemidesmosome disassembly

杉山, 宏和

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2013-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5910

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005910>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Interaction of Necl-4/CADM4 with ErbB3 and integrin $\alpha_6\beta_4$ and inhibition of ErbB2/ErbB3 signaling and hemidesmosome disassembly

Necl-4/CADM4 は ErbB3 とインテグリン $\alpha_6\beta_4$ と結合し
ErbB2/ErbB3 シグナル伝達とヘミデスモソームの崩壊を抑制する。

杉山 宏和、水谷 清人、栗田 宗一、沖元 斉正、下野 洋平、高井 義美

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

肝胆膵外科学

(指導教員：具 英成教授)

杉山 宏和

Key words: Necl-4, ErbB3, hemidesmosome, integrin, CADM4

はじめに

ネクチン様分子-4 (Necl-4) は TSLL2、IGSF4C、SynCAM4、CADM4 とよばれ、5つのメンバー (Necl-1, -2, -3, -4, -5) からなる Necl ファミリーに属し、3つの免疫グロブリン様構造をもつ細胞外領域、膜貫通領域、細胞内領域を有する膜貫通型タンパク質である。Necl-4 は隣接する細胞の Necl-1 や Necl-3 とヘテロフィリックにトランス結合する。他の Necl ファミリーメンバーが細胞内領域を介し、細胞膜辺縁タンパクと結合するのと同様に、Necl-4 もアクチン結合タンパク質の 4.1B や 4.1G と結合する。

Necl-4 は前立腺や脳、腎臓、膀胱、精巣に広く発現している。神経膠腫や前立腺がん、大腸がん、腎細胞がん由来の多くのヒト培養細胞株では Necl-4 の発現が減少している。Necl-4 は大腸がんの腫瘍原性を抑制し、アポトーシスを亢進しうることが示唆されている。Necl-4 は、細胞接着部位に局在し、様々な腫瘍において腫瘍抑制因子として機能する。しかし、Necl-4 の腫瘍抑制の分子機構は未だ解明されていない。

その一方で Necl-2 の役割や作用機序は、広範に研究されている。Necl-2 は ErbB3 とインテグリン $\alpha_6\beta_4$ とシス結合し、脱リン酸化酵素で腫瘍抑制機能をもつ PTPN13 を介し、ErbB2/ErbB3 シグナル伝達を抑制する。

ErbB2、ErbB3 は ErbB 受容体チロシンキナーゼファミリーである。ErbB2 は腫瘍原性タンパク質として作用し、ErbB2 遺伝子の増幅は様々ながんでは認められている。また ErbB3 の過剰発現は種々の腫瘍で認められ、腫瘍の悪性度との関連が示唆されている。これらの ErbB タンパク質の過剰発現や遺伝子増幅はがん細胞の細胞運動や生存を亢進させ、結果的には腫瘍の発生、浸潤、転移につながる。

インテグリン $\alpha_6\beta_4$ は正常上皮細胞で豊富に発現しており、細胞-基質間接着のヘミデスモソームを形成している。ヘミデスモソームにより上皮細胞の形態が維持され細胞運動は抑制されている。種々のがん細胞では、インテグリン $\alpha_6\beta_4$ の発現は上昇し、ヘミデスモソームは崩壊し、その結果、がん細胞の細胞運動が亢進し、浸潤につながる。

これらの知見を踏まえ、Necl-4 の腫瘍抑制の分子機構として、Necl-4 が ErbB3 とシス結合し、ErbB2/ErbB3 シグナル伝達を抑制し、ホルボールエステルにより誘導されるヘミデスモソームの崩壊を抑制するかを検証した。

結果

1. Necl-4 と ErbB3 の結合

Necl-4 と ErbB ファミリータンパク質との結合を調べた。FLAG で標識した Necl-4 (FLAG-Necl-4) や FLAG 単体と、ErbB ファミリーメンバーを HEK293 細胞に共発現させ懸濁培養した。FLAG-Necl-4 と ErbB1 や ErbB 2、ErbB 3、ErbB 4 を発現させた細胞溶解液に対し抗 FLAG モノクローナル抗体を用い免疫沈降を行った。ErbB3 のみが FLAG-Necl-4 と共沈し、ErbB1、ErbB2、ErbB4 は共沈しなかった。FLAG 単体ではどの ErbB ファミリータンパク質も FLAG-Necl-4 とは共沈しなかった。この結果より Necl-4 は ErbB ファミリータンパク質のうち、特異的に ErbB3 とシス結合することが分かった。これは ErbB3 と ErbB 4 に結合する Necl-2 とは異なる性質であった。

次に Necl-4 の細胞外領域および細胞内領域のどちらが ErbB3 との結合に必要なかを調べた。細胞内領域欠損 FLAG-Necl-4 (FLAG-Necl-4-ACP) や細胞外領域欠損 FLAG-Necl-4 (FLAG-Necl-4-ΔEC) を HEK293 細胞で ErbB3 と共に発現させ、抗 FLAG モノクローナル抗体を用い免疫沈降を行った。FLAG-Necl-4-ACP は ErbB3 と共沈し、FLAG-Necl-4-ΔEC は共沈しなかった。この結果、Necl-4 は自身の細胞外領域を介し ErbB3 とシス結合することが分かった。

2. Caco-2 細胞における Necl-4 ノックダウンによるヘレグリン刺激依存的な ErbB2/ErbB3 シグナル伝達の亢進

ErbB2/ErbB3 シグナル伝達における Necl-4 の役割を検討した。Necl-4 や ErbB2、ErbB3 を発現する、ヒト大腸がんの培養細胞株 Caco-2 細胞において、Necl-4 ノックダウンを行い、ヘレグリン刺激依存的な ErbB3 のチロシンリン酸化や Akt の活性化を調べた。Caco-2 細胞に、Necl-4 に対する低分子干渉 RNA (siRNA) を遺伝子導入し Necl-4 をノックダウンし (Necl-4-KD-Caco-2 細胞)、対照としてネガティブコントロール siRNA を遺伝子導入した (Control-Caco-2 細胞)。Necl-4-KD-Caco-2 細胞では、対照の Control-Caco-2 細胞と比べ、Necl-4 の発現量が 4% 以下に減少した。これらの培養細胞を血清飢餓状態にしたのちにヘレグリン刺激を行った。ヘレグリン刺激依存的な ErbB3 チロシン 1289 残基、Akt トレオニン 308 残基のリン酸化を経時的に比較したところ、Necl-4-KD-Caco-2 細胞では Control-Caco-2 細胞に比べ、ErbB3 と Akt のリ

ン酸化がいずれも上昇していた。この結果、Necl-4 はヘレグリン刺激依存的な ErbB3 のリン酸化や Akt の活性化を抑制することが分かった。

3. MCF-7 細胞における Necl-4 過剰発現によるヘレグリン刺激依存的な ErbB2/ErbB3 シグナル伝達の抑制

Necl-4 を内在性に発現しない細胞において、Necl-4 過剰発現の ErbB2/ErbB3 シグナル伝達に対する効果を検討した。ヒト乳がん細胞株の MCF-7 細胞は、ErbB2 や ErbB3 を発現し、Necl-4 を発現していない。MCF-7 細胞に、FLAG-Necl-4 を遺伝子導入し、Necl-4 を過剰発現させ (Necl-4-MCF-7 細胞)、対照として FLAG 単体を遺伝子導入した (Control-MCF-7 細胞)。これらの培養細胞を血清飢餓状態にしたのちにヘレグリン刺激を行った。ヘレグリン刺激依存的な ErbB3 チロシン 1289 残基、Akt トレオニン 308 残基のリン酸化を経時的に比較したところ、Control-MCF-7 細胞では Necl-4-MCF-7 細胞に比べ、ErbB3 と Akt のリン酸化がいずれも上昇していた。この結果からも Necl-4 はヘレグリン刺激依存的な ErbB3 のリン酸化や Akt の活性化を抑制することが分かった。

4. Necl-4 の細胞内領域と PTPN13 との結合

Necl-2 は細胞内領域において、タンパク質チロシン脱リン酸化酵素 PTPN13 と結合し、ヘレグリン刺激依存的な ErbB2/ErbB3 シグナル伝達を抑制することが知られているが、Necl-4 については不明であった。HEK293 細胞に FLAG-Necl-4 や FLAG 単体を発現させ、この細胞溶解液に対し抗 FLAG モノクローナル抗体を用い免疫沈降を行った。内在性 PTPN13 は FLAG-Necl-4 と共沈したが、FLAG 単体ではなかった。この結果より、Necl-4 は Necl-2 と同様に PTPN13 と結合することが分かった。

5. Caco-2 細胞における Necl-4 による TPA 刺激依存的なヘミデスモソーム様構造の崩壊の抑制

A431 細胞のヘミデスモソームのインテグリン $\alpha_6\beta_4$ は 12-O-テトラデカノイルホルボール 13-アセテート (TPA) 刺激により崩壊することが知られている。Necl-4 はインテグリン $\alpha_6\beta_4$ と結合するので、Caco-2 細胞における TPA 刺激依存的なヘミデスモソーム様構造の崩壊に対する Necl-4 の影響を検討した。イン

テグリン β_4 をノックダウンした Caco-2 細胞の基底領域ではインテグリン α_6 が消失することから、インテグリン $\alpha_6\beta_4$ 依存的な構造はほぼヘミデスモソームに一致すると考えられる。そこで、ヘミデスモソーム崩壊の様子は、TPA 処理した Caco-2 細胞におけるインテグリン α_6 の局在を指標に、経時的に観察した。

Necl-4 をノックダウンした Necl-4-KD-Caco-2 細胞、Necl-4 を過剰発現させた Necl-4-Caco-2 細胞、対照の Control-Caco-2 細胞、いずれの細胞でも TPA 刺激のない状態ではヘミデスモソーム陽性細胞の割合はほぼ同等であり、このことは Necl-4 の発現量がヘミデスモソーム構造に影響を与えないことを示している。しかし、TPA 刺激下では Control-Caco-2 細胞に比べると、Necl-4-KD-Caco-2 細胞では有意にヘミデスモソームの崩壊が早く、Necl-4-Caco-2 細胞では明らかに遅かった。また、Necl-4 の発現量は Necl-4-KD-Caco-2 細胞で減少し、Necl-4-Caco-2 細胞では増加していた。

これらの結果から、Necl-4 は TPA 刺激依存的なヘミデスモソームの崩壊を抑制することが分かった。

まとめ

本研究により、Necl-4 は PTPN13 を介し、ヘレグリン刺激依存的な ErbB2/ErbB3 シグナル伝達の活性化を抑制することが示された。また、細胞外領域がインテグリン $\alpha_6\beta_4$ とシス結合する以前の報告に加えて、ホルボールエステルにより引き起こされるヘミデスモソームの崩壊を抑制することも分かった。

これらの結果により、Necl-4 は ErbB2/ErbB3 シグナル伝達の活性化を抑制し、TPA 刺激依存的なヘミデスモソームの崩壊を抑制することで、腫瘍抑制因子として機能することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2356 号	氏 名	杉山 宏和
論文題目 Title of Dissertation	Interaction of Necl-4/CADM4 with ErbB3 and integrin $\alpha_6\beta_4$ and inhibition of ErbB2/ErbB3 signaling and hemidesmosome disassembly Necl-4/CADM4 は ErbB3 とインテグリン $\alpha_6\beta_4$ と結合し ErbB2/ErbB3 シグナル伝達とヘミデスモソームの崩壊を抑制する。		
審査委員 Examiner	主 査 的 崎 尚 Chief Examiner 副 査 匂 坂 敏 朗 Vice-examiner 副 査 古 瀬 幹 夫 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

ネクチン様分子-4 (Necl-4) は5つのメンバー (Necl-1, -2, -3, -4, -5) からなる Necl ファミリーに属し、3つの免疫グロブリン様構造をもつ細胞外領域、膜貫通領域および細胞内領域を有する膜貫通型タンパク質である。Necl-4 は前立腺や脳、腎臓、膀胱、精巣に広く発現し、逆に神経膠腫や前立腺がん、大腸がん、腎細胞がん由来の多くのヒト培養細胞株では発現が減少している。Necl-4 は大腸がんの腫瘍原性を抑制し、アポトーシスを亢進することが示唆されている。Necl-4 は、細胞接着部位に局在し、様々な腫瘍において腫瘍抑制因子として機能する。しかし、Necl-4 の腫瘍抑制の分子機構は未だ解明されていない。今回、広く研究されている Necl-2 の知見をもとに、Necl-4 の腫瘍抑制の分子メカニズムを ErbB2/ErbB3 シグナル伝達の抑制およびヘミデスモソームの崩壊抑制という観点から検討した。

まず、Necl-4 と各 ErbB ファミリーメンバーとの結合を免疫沈降実験にて評価した。FLAG で標識した Necl-4 (FLAG-Necl-4) と、各 ErbB ファミリーメンバーを HEK293 細胞に共発現させ、免疫沈降実験したところ、ErbB3 のみが FLAG-Necl-4 と共沈した。したがって、Necl-4 は ErbB ファミリータンパク質のうち、特異的に ErbB3 とシス結合することが分かった。さらに、Necl-4 の細胞内領域欠損である FLAG-Necl-4- Δ CP や細胞外領域欠損である FLAG-Necl-4- Δ EC と、ErbB3 との共免疫沈降実験を行った。FLAG-Necl-4- Δ CP のみ ErbB3 と共沈したことから Necl-4 は自身の細胞外領域を介し ErbB3 とシス結合することが分かった。

次に、ヒト大腸がんの培養細胞株 Caco-2 細胞に、siRNA を用い Necl-4 をノックダウンした Necl-4-KD-Caco-2 細胞を作製した。これを血清飢餓状態にしたのちに、ヘレグリン刺激依存的な ErbB3 チロシン 1289 残基、Akt トレオニン 308 残基のリン酸化を経時的に比較した。Necl-4-KD-Caco-2 細胞は対照と比べ、ErbB3 と Akt のリン酸化がいずれも上昇していた。また、内在性に ErbB2 や ErbB3 を発現し Necl-4 を発現しないヒト乳がん細胞株 MCF-7 細胞に Necl-4 を過剰発現させた Necl-4-MCF-7 細胞では、対照と比べ、ErbB3 と Akt のリン酸化がいずれも低下していた。これらの結果より Necl-4 はヘレグリン刺激依存的な ErbB3 のリン酸化や Akt の活性化を抑制することが分かった。

Necl-4 による ErbB2/ErbB3 シグナル伝達の抑制の分子機構を解析するため FLAG-Necl-4 と内在性のタンパク質チロシン脱リン酸化酵素 PTPN13 の免疫沈降実験を行った。Necl-2 は PTPN13 と結合するが Necl-4 との結合については不明であった。結果、PTPN13 は FLAG-Necl-4 と共沈し、Necl-4 は Necl-2 と同様に PTPN13 と結合することが分かった。

最後に Necl-4 はインテグリン $\alpha_6\beta_4$ と結合するので、ホルボールエステルである TPA 刺激依存的なヘミデスモソーム様構造の崩壊に対する Necl-4 の影響を Caco-2 細胞においてインテグリン α_6 の局在を指標として検討した。Necl-4-KD-Caco-2 細胞、Necl-4 を過剰発現した Necl-4 -Caco-2 細胞、および対照細胞は TPA 刺激のない状態ではヘミデ

スモソーム陽性細胞の割合はほぼ同等であったが、TPA刺激下ではNec1-4-KD-Caco-2 細胞のヘミデスモソームの崩壊は対照に比べ有意に早く、逆にNec1-4 -Caco-2 細胞では有意に遅かった。これらの結果から、Nec1-4はTPA刺激依存的なヘミデスモソームの崩壊を抑制することが分かった。

本研究は、細胞接着因子がもたらす腫瘍抑制メカニズムの解明を考える上で重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。