

論文の内容の要旨

申請者 氏名 澤山 忠司

論文題目

CDCP1 細胞外ドメインを介した癌の浸潤・転移機構に関する研究

人体の細胞は、厳密な制御の元で恒常性を維持し、生命活動をおこなっている。一方、癌細胞は、増殖シグナルの亢進やアポトーシス回避による異常増殖など、制御機構に異常が生じ、最終的に癌の浸潤・転移を引き起こして患者を死に至らしめる。癌の浸潤・転移は、細胞運動能と細胞外基質の分解による周辺組織への移動である「浸潤」と、細胞が浮遊した状態でも生存できる「足場非依存性能」から成り立っている。この中の足場非依存性能を制御する因子として、CUB domain-containing protein 1 (CDCP1)が同定された。CDCP1 は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインで構成されている。細胞外ドメインには、補体 C1s/C1r、ウニ増殖因子、骨形成タンパク質 1 のアミノ酸配列と相同性のある CUB ドメインが三つ存在する。膜貫通ドメインは、細胞膜に存在する部分であり、細胞内ドメインには、癌転移のシグナルに関わるチロシン残基が存在する。また、CDCP1 の分子量は、理論上 90 kDa であるが、糖鎖修飾により実際は 135 kDa であることが分かっている。細胞内ドメインは、チロシン残基を介して Src 型キナーゼ (SFK)や PKC δ と複合体を形成して下流にシグナルを伝達し、足場非依存性能や細胞運動能の制御に関与することが報告されている。一方、細胞外ドメインは、タンパク質間結合に関与するとされる CUB ドメインを保有していること、プロテアーゼで切断されること以外は明らかではなく、足場非依存性能や細胞運動能の制御に関与することも未解明であった。

本研究では、CDCP1 の細胞外ドメインに着目し、CDCP1 変異体による同種多量体形成の検討をおこなった。さらに CUB ドメインの遺伝子組換えタンパク質による、同種多量体形成部位の同定、SFK-CDCP1-PKC δ シグナルの制御および足場非依存性能と細胞運動能の制御の解析をおこなった。

まず、CDCP1 が同種多量体を形成する可能性を検討するため、内在性の CDCP1 の発現を抑制させた A549 肺癌細胞株(A549 miCDCP1)に、FLAG 標識または HA 標識付の CDCP1 同士、または FLAG 標識付の細胞外ドメイン欠失変異体(Δ ECD)と HA 標識付の CDCP1 を同時に発現させ、FLAG 抗体ゲルによる免疫沈降(IP)をおこなった。その結果、CDCP1 同士での結合が見られたが、細胞外ドメイン欠失体である Δ ECD と CDCP1 との結合は減少していた。免疫染色による共局在で同種多量体形成を検証すると、IP と同様に、CDCP1 同士で見られた共局在が、 Δ ECD と CDCP1 では減少していた。これら二つの結果から、CDCP1 の細胞外ドメインが、同種多量体形成に関与する可能性が示された。

さらに細かく同種多量体形成部位を探索するため、マルトース結合タンパク質 (MBP)に CDCP1 の CUB2 または CUB3 ドメインを融合した rMBP-CUB2、rMBP-CUB3 を用いて、ファーウェスタンブロットをおこなった。その結果、CDCP1 は主に rMBP-CUB2 と結合することが分かった。また、免疫染色から rMBP-CUB2 が細胞に発現させた CDCP1 に結合すること、また IP により同種多量体形成を阻害することが示された。そこで、FLAG 標識付の CUB2 ドメインを欠失させた変異体(Δ CUB2)を用いて、IP をしたところ、 Δ ECD と同様に Δ CUB2 と CDCP1 で結合が減少していた。以上の結果から、CDCP1 は細胞外 CUB2 ドメインを介して同種多量体を形成していることが示された。

これまで、CDCP1 の同種多量体が、どのような機能を制御しているかは未知であった。本研究におい

て、rMBP-CUB2が、SFKの活性化とその下流因子であるPKC δ のリン酸化の抑制をすることを発見した。さらに、足場非依存性能と細胞運動能が抑制されることが分かった。これまでの全ての結果をまとめると、CDCP1は、細胞外ドメイン内のCUB2ドメインを介して同種多量体を形成し、SFKを活性化することで細胞内のSFK-CDCP1-PKC δ シグナルを増強し、癌の浸潤・転移関与することが示された。

近年、癌細胞が浸潤する際、個別の細胞の運動ではなく、細胞間接着を保持した集団的細胞運動の存在が報告されている。BxPC3膵癌細胞株でCDCP1発現を抑制したところ、細胞間接着が抑制されることを発見した。さらに、CDCP1の細胞局在は、細胞間接着部位で観察された。そこで、集団的細胞運動にCDCP1が関与するかを検証するため、CDCP1変異体を用いて細胞間接着、運動能および細胞内シグナルへの影響を調べた。結果、CDCP1の細胞外ドメインが、リン酸化非依存的に細胞間接着を制御すること、細胞間接着と細胞運動能との間に正の相関が見られたことから、CDCP1の細胞外ドメインが、癌細胞の集団的細胞運動能を制御している可能性が示された。

本研究は、CDCP1の細胞外CUB2ドメインが同種多量体形成部位であることを同定し、細胞内のSFK-CDCP1-PKC δ シグナルを制御することを示したものであり、CUBドメインが、足場非依存性能、細胞運動能および集団的細胞運動能を制御するという癌の浸潤・転移機構の一端を明らかにしたものである。