

氏 名 (生年月日) ^{かい} ^{ぼり} ^{ゆう} ^{いち} ^{ろう}
海 堀 祐 一 郎 (1988 年 7 月 9 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 博 薬 第 177 号

学位授与の日付 2019 年 3 月 16 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 受容体型チロシンキナーゼ EphA2 による細胞分裂の制御機構

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 中 山 祐 治

(副査) 教 授 芦 原 英 司

(副査) 教 授 田 中 智 之

論 文 内 容 の 要 旨

序章

細胞は、S 期で染色体を複製し、G2 期を経て細胞分裂期に入ると、複製した染色体を均等に分配して 2 つの娘細胞へと分裂する。この DNA 複製と細胞分裂のサイクル（細胞周期）を繰り返し、細胞は増殖する。細胞周期の中でも細胞分裂は特にダイナミックな形態変化を伴うが、緻密に制御され、この制御機構の破綻は染色体不安定性を介した細胞のがん化を引き起こす。これまで、細胞分裂に関する研究が精力的に進められ、Cdk1、Aurora A、Aurora B、Plk1 などのセリン/スレオニンキナーゼの重要性が示されてきたが、未だその全貌解明には至っていない。Epidermal growth factor receptor (EGFR)、vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)、c-MET などに代表される受容体型チロシンキナーゼ (RTK) は、そのリガンドである増殖因子との結合により活性化され、下流にシグナルを伝達する。RTK には、細胞の生存や増殖、分化の制御など多くの役割が存在するが、上述したセリン/スレオニンキナーゼと異なり、細胞分裂制御における RTK の機能はほとんど全く知られていない。

RTK である EphA2 は、細胞間接着において GPI アンカー型のリガンドである ephrin-A1 と結合すると、Tyr588 のリン酸化 (EphA2 p-Tyr588) とともに活性化し、EphA2 と ephrin-A1 を発現するそれぞれの細胞にシグナルが伝達し、細胞間に反発作用が生じる。発生過程では、隣接する異なる組織の細胞の混入を防ぐことで組織の領域形成に寄与し、がん細胞では増殖抑制にも寄与する。一方、リガンド非結合時には、増殖因子の刺激は他の RTK の活性化を介し、EphA2 Ser897 のリン酸化 (EphA2 p-Ser897) を亢進し、EphA2 はがん細胞の遊走促進など悪性化に寄与する。

新規の細胞分裂制御分子を見出すため、種々の阻害剤を細胞に処理し、細胞分裂に影響する阻害剤を探索した結果、EphA2 を阻害する NVP-BHG712 が細胞分裂の進行を阻害することを見出した。そこで本研究では、細胞分裂期における EphA2 の機能解析を行った。

第 1 章 受容体型チロシンキナーゼ EphA2 の阻害による細胞分裂の遅延

阻害剤のスクリーニングにより見出した NVP-BHG712 を細胞分裂期特異的に処理すると、ヒト子宮頸がん由来 HeLa S3 細胞の細胞分裂進行が遅延した。NVP-BHG712 の標的タンパク質の一つである EphA2 をノックダウンし分裂期細胞を観察したところ、HeLa S3 細胞に加え、ヒト乳がん由来 MDA-MB-231 細胞の細胞分裂の遅延が観察されたほか、多極紡錘体を形成している細胞や、紡錘体が細胞の中央ではなく細胞膜付近に偏っている細胞が多く観察された。また、正常細胞であるヒト網膜

上皮由来 RPE-1 細胞においても EphA2 のノックダウンによる細胞分裂の遅延が観察された。これらの結果から、EphA2 による細胞分裂の制御機構が存在すること、さらに、EphA2 による細胞分裂制御機構はがん細胞のみならず、正常細胞においても保存されていることが示唆された。

第2章 Cdk1/MEK/ERK/RSK 経路依存的な EphA2 Ser897 のリン酸化による細胞分裂制御

EphA2 は、p-Tyr588 を伴うリガンド依存的なシグナルに加えて p-Ser897 に起因するリガンド非依存的なシグナル経路を活性化する。チミジンによる S 期同調から進行させた分裂期細胞や、可逆的 Cdk1 阻害剤である RO-3306 による G2/M 期停止から進行させた分裂期細胞において、興味深いことに、EphA2 p-Tyr588 がほぼ完全に消失するとともに、明らかな EphA2 p-Ser897 の亢進が観察された。細胞分裂期における EphA2 Ser897 のキナーゼを MEK、RSK、Akt および PKA の阻害剤を用い探索したところ、MEK/ERK/RSK 経路によって Ser897 がリン酸化されることを見出した。さらに、非分解型 cyclin B1 と活性抑制を受けない Cdk1 の共発現により Cdk1 を活性化すると、MEK/ERK/RSK 経路の活性化とともに、EphA2 p-Ser897 が亢進し、MEK あるいは RSK の阻害剤処理により p-Ser897 が阻害された。これらに加え、内在性 EphA2 ノックダウンによる細胞分裂進行の遅延が野生型 EphA2 の再発現により回復した一方で、Ser897 がリン酸化されない EphA2 Ser897Ala 変異体の再発現では回復しなかった。以上のことから、細胞分裂期において、Cdk1/MEK/ERK/RSK 経路による EphA2 p-Ser897 の亢進が細胞分裂進行を制御していることが明らかとなった。

第3章 EphA2 p-Ser897/Ephexin4/RhoG 経路による cortical rigidity の制御

間期では、EphA2 p-Ser897/Ephexin4/RhoG/Rac1 経路を介したアクチン骨格のリモデリングを伴うラメリポディアの形成促進が報告されているが、細胞分裂期における Ephexin4 および RhoG の機能は全く知られていない。Ephexin4、RhoG のいずれのノックダウンにおいても細胞分裂進行が遅延し、間期と同様、細胞分裂期においても p-Ser897 依存的に EphA2 が Ephexin4 と相互作用した。さらに、U0126 (MEK 阻害剤) 処理による細胞分裂期特異的な EphA2 p-Ser897 の抑制や Ephexin4 のノックダウンのいずれにおいても、分裂期細胞における RhoG の細胞膜局在が減少した。よって、Ephexin4 は EphA2 p-Ser897 の下流で、さらに RhoG は EphA2 p-Ser897/Ephexin4 の下流分子として機能していることが示唆された。そこで、EphA2 のノックダウンと同時に活性型 RhoG を誘導発現したところ、EphA2 ノックダウンによる細胞分裂進行の遅延が活性型 RhoG の発現により回復した。

細胞分裂期における EphA2/Ephexin4/RhoG 経路の役割を調べるため、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン B の低濃度存在下、U0126 処理により EphA2 p-Ser897 を抑制する、あるいは EphA2、RhoG をノックダウンすると、細胞膜の突出 (blebbing) を形成する細胞の割合が増加した。さらに、内在性 EphA2 ノックダウンによる blebbing 形成率の増加が野生型 EphA2 の誘導発現により回復したのに対し、Ser897Ala 変異体の誘導発現では回復しなかった。細胞膜やアクチン骨格の強度 (cortical rigidity) の低下により blebbing が惹起されることが知られている。よって、細胞分裂期に入ると EphA2 を足場として EphA2 p-Ser897/Ephexin4/RhoG 経路が活性化され、細胞膜直下のアクチン骨格の強度 (cortical rigidity) を維持していることが示唆された。

総括

Eph 受容体は RTK の最大のファミリーであり、Eph 受容体メンバーである EphA2 はリガンドや増殖因子の刺激により下流へとシグナルを伝達する。本研究では、細胞周期依存的に Cdk1/MEK/ERK/RSK 経路が活性化し、リガンドや増殖因子に依存せず EphA2 Ser897 がリン酸化されることを明らかにした。さらにその下流では Ephexin4/RhoG 経路が活性化され、細胞分裂期における cortical rigidity の維持に寄与していることを見出した。つまり、EphA2 のノックダウンによる EphA2

p-Ser897/Ephexin4/RhoG 経路の抑制は cortical rigidity の低下を介して多極紡錘体の形成や紡錘体の位置の偏りを引き起こし、細胞分裂を遅延させたと考えられる。一般的に、EphA2 p-Ser897 の抑制ががんの抑制に貢献すると考えられている。しかし、上記の結果から、EphA2 p-Ser897 の抑制は、細胞分裂の異常による染色体不安定性を引き起こし、細胞をがん化、あるいは、がんを悪性化させることが推測される。それ故、EphA2 をターゲットとした抗がん治療の開発はこの点も踏まえて検討するべきであろう。

審査の結果の要旨

《緒言》

細胞分裂は、複製した DNA を二つの娘細胞に分配する過程である。単細胞生物においては細胞の増殖、多細胞生物においては受精卵から個体への分化に必須のプロセスであり、その制御の破綻は染色体不安定性を介し細胞死や癌などの病態を引き起こす。細胞分裂を制御するタンパク質は抗がん剤の標的分子になりうることから、細胞分裂制御に関与する分子を見出すことは重要である。多くのセリン/スレオニンキナーゼによる細胞分裂制御は良く知られているが、チロシンキナーゼ、特に受容体型チロシンキナーゼによる制御はほとんど研究されていない。本研究では、受容体型チロシンキナーゼである EphA2 の細胞分裂における役割及び細胞分裂制御機構について解析した。

《審査結果の要旨》

(1) 細胞分裂における EphA2 の役割

Eph ファミリーの阻害剤が細胞分裂遅延を引き起こしたことから、RNA 干渉により EphA2 をノックダウンし細胞分裂への関与を調べた。その結果、紡錘体の形成異常を伴い細胞分裂が遅延した。子宮頸癌由来 HeLa S3 細胞、乳がん由来 MDA-MB-231 細胞、網膜上皮由来 hTERT RPE-1 細胞において同様な結果が得られ、EphA2 の役割ががん細胞及び正常細胞に広く保存されていることを示唆した。

(2) EphA2 の Ser897 をリン酸化するシグナル経路と EphA2 リン酸化の必要性

細胞分裂期において EphA2 を活性化するシグナル経路を検討するため、キナーゼ特異的な阻害剤を用いた細胞周期の同調実験、Cdk1 と cyclinB1 遺伝子の導入実験などを行った。その結果、Cdk1/MEK/ERK/RSK シグナル経路により EphA2 Ser897 が細胞分裂期特異的にリン酸化されることを見出した。さらに、内在性 EphA2 のノックダウンによる細胞分裂遅延が、野生型 EphA2 の遺伝子導入により解除されるのに対し、リン酸化部位の Ala 変異体では解除されなかった。以上より、EphA2 の Ser897 は Cdk1/MEK/ERK/RSK シグナル経路によりリン酸化され、このリン酸化が細胞分裂進行に必要なであることを明らかにした。

(3) EphA2 の下流シグナルによる細胞膜強度の制御

EphA2 の下流シグナルを解析するため、細胞分裂期に同調した細胞を用い免疫沈降を行った結果、Ser897 のリン酸化に依存して RhoG の GEF である Ephexin4 が EphA2 と共沈した。また、Ephexin4 のノックダウンにより RhoG の細胞膜局在が減弱して細胞分裂が遅延し、EphA2 のノックダウンによる細胞分裂遅延が活性型 RhoG 変異体遺伝子の導入により部分的に解除された。以上より、Ser897 のリン酸化の下流で Ephexin4 および活性型 RhoG が細胞分裂に関与することを明らかにした。さらに、Ephexin4/RhoG 経路の抑制に加えてアクチン繊維を部分的に壊すと細胞膜の突出が観察されたことか

ら、このシグナル経路は細胞膜強度の制御を介し、細胞分裂進行に寄与することが示唆された。

《結論》

本研究により、受容体型チロシンキナーゼ EphA2 が Cdk1/MEK/ERK/RSK 経路によりリン酸化されることで、Ephexin4 と結合して RhoG を活性化し、細胞膜強度の制御を介して細胞分裂進行に寄与することが示唆された。本研究成果は、細胞増殖、発生などにおける EphA2 の新たな機能を見出しただけでなく、細胞のがん化、がん悪性化における EphA2 が関与する新規の機構、すなわち、EphA2 遺伝子の欠失が細胞分裂異常による染色体不安定性を介してがん化やがん悪性化に関与する可能性を示唆する。さらに、これまで例のない、受容体型チロシンキナーゼによる細胞分裂制御機構を示すものである。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。