

審査の結果の要旨

氏名 許 淑真

本研究は肺がんのがん抑制遺伝子として同定された細胞接着分子 cell adhesion molecule 1, CADM1 による EGF 受容体 (EGFR) の分解制御機構について、解析を行い、下記の結果を得ている。

1. 非小細胞肺癌細胞株 NCI-H1838 を用いて、全長 CADM1 を強制発現した細胞の EGFR の発現量は有意に低下した。従って、CADM1 は EGFR の分解を促進することが考えられた。EGFR 遺伝子野生型非小細胞肺癌細胞株 NCI-H1993、A549 や扁平上皮がん細胞株 A431 において、NCI-H1838 と同様に、CADM1 の発現により、EGFR タンパク質の発現が低下することが示された。一方 quantitative RT-PCR による解析では、CADM1 を強制発現により、EGFR の mRNA には量の変化を認めなかった。一方、EGFR 遺伝子変異型細胞株 HCC827, PC9 では、CADM1 の発現により、EGFR タンパク質の発現は変化しなかった。以上の結果、CADM1 の導入による EGFR タンパク質の発現量の低下は、EGFR 遺伝子野生型の非小細胞肺癌 3 細胞株、扁平上皮がん 1 細胞株で共通して認められ、これに対し、EGFR 遺伝子変異型の非小細胞肺癌 2 細胞株では共に、EGFR 発現低下は認められなかった。従って、EGFR 野生型の非小細胞肺癌について、CADM1 による EGFR タンパク質低下が明らかとなり、その分子機構を解明する意義があると考えられた。
2. CADM1 により EGFR 発現低下の責任領域が、タンパク質のどの部位にあるかを明らかにする目的で、HA タグを付加した全長 CADM1 HA-full-CADM1 に加えて、細胞外ドメインを欠失させた HA-CADM1- $\Delta$ EC, 細胞内ドメインを欠失させた HA-CADM1- $\Delta$ CT、さらには C 末の PDZ 結合モチーフを含む 4 アミノ酸を欠失させた HA-CADM1- $\Delta$ PDZ を NCI-H1838 細胞に導入して、EGFR タンパク質の発現量の変化を検討した。まず、蛍光染色にて各 CADM1 欠失変異体の発現を確認したところ、HA-full-CADM1、HA-CADM1- $\Delta$ CT、HA-CADM1- $\Delta$ PDZ は、野生型 CADM1 と同様に細胞接着面に発現が認められた。しかし、HA-CADM1- $\Delta$ EC は細胞内のみ染色が認められ、細胞膜には発現が認められなかったため、以後の解析から除外した。EGFR の発現をウェスタンブロット解析にて検討したところ、全長 CADM1 発現細胞では、EGFR タンパク質の発現低下が確認されたが、HA-CADM1- $\Delta$ CT、HA-CADM1- $\Delta$ PDZ 発現細胞では、EGFR タンパク質の発現低下は認められなかった。この事実は、CADM1 による EGFR タンパク質の低下には、少なくとも CADM1 の細胞内ドメインが必須であることを示す。

3. EGFR の分解はリソソーム経路を介することがよく報告されている。CADM1 による EGFR タンパク質低下の分子機構はリソソーム経路に関与するかどうかを検討するため、リソソーム経路の阻害剤であるクロロキンを細胞に投与し、免疫蛍光染色を行った。その結果、クロロキンを前処理した後、EGF 刺激後、CADM1 と EGFR はリソソームに共局在していることを観察された。この結果より、CADM1 と EGFR はリソソーム経路で分解されることが示された。そして、CADM1 が EGFR の分解に関与することが示唆された。
  
4. EGFR の分解は clathrin 依存的と clathrin 非依存的な両種の分解経路が報告されている。NCI-H1838 細胞株における EGFR 分解は clathrin 依存的かどうかを siRNA を用いて検証した。clathrin 発現量低下に伴い、EGF 投与後 EGFR の発現が増加した。この結果より、NCI-H1838 細胞株の EGFR は clathrin 依存的な分解経路を介して、分解されることが示唆された。次に、CADM1 は EGFR の分解を制御するかどうかを siRNA を用いて検討した。EGF 投与後、CADM1 knockdown 細胞の EGFR 発現量は増加した。この結果より、CADM1 を knockdown することにより、EGFR の分解が抑制されることが示唆された。しかし、clathrin と CADM1 の siRNA を両方同時トランスフェクションした細胞と片方トランスフェクションした細胞を比べた結果、EGFR の発現量に顕著な変化はみられなかった。この結果より、CADM1 と clathrin が同様な経路で EGFR の分解を制御することが考えられた。以上の結果により、CADM1 が EGFR の分解を促進する機構としては部分的に clathrin 依存的な分解経路を介していることが示唆された。

以上、本論文は非小細胞肺癌細胞株において、がん抑制遺伝子 CADM1 ががん遺伝子 EGFR の分解を促進する機構を明らかにした。本研究は CADM1 の癌抑制機能の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。