

論文内容の要旨

申請者氏名 Endah Puji Septisetyani

乳がん細胞は、原発巣で無秩序に増殖し、さらに周囲の組織に浸潤することで他の組織や器官へと転移する。乳がん細胞の浸潤過程において、細胞と細胞外マトリクス (Extracellular matrix, ECM) の接着、ECM の分解、細胞移動が関与する。ECM は細胞や組織の支持体として働くのみでなく、細胞膜表面の受容体を介して細胞内へシグナルを伝達し、細胞の増殖、接着、移動、分化など様々な細胞機能を制御する。Gタンパク質共役受容体 (GPCR, G protein-coupled receptor) サブファミリーの一つである Adhesion-GPCR (接着性 GPCR) は長い細胞外ドメイン (Extracellular domain, ECD) を持つことを特徴とし、細胞-細胞間接着や細胞-ECM 間接着に関与すると考えられているが、その機能には不明な部分が多い。当研究室において、乳がん細胞の浸潤に関与する Adhesion-GPCR の siRNA を用いた網羅的スクリーニングが行われ、候補分子の 1 つとして GPR56 が同定された。本研究では GPR56 の乳がん細胞における機能解析を行なった。

まず、CRISPR/Cas9 システムを用いて高転移性ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 のゲノム編集を行い GPR56 のノックアウト細胞を樹立した。MDA-MB-231 細胞をコラーゲンゲル中で 3 次元培養すると、もとの親株 (コントロール細胞) ではゲル中に突起を伸ばす浸潤様構造をもつ細胞塊が形成されたが、GPR56 ノックアウト細胞では浸潤様構造の形成が顕著に低下した。また、GPR56 ノックアウトによる浸潤様構造形成の低下は、GPR56 の過剰発現により回復した。また MDA-MB-231 細胞の増殖を MTT アッセイにより調べたところ、2 種類の GPR56 ノックアウト細胞でコントロール細胞と比較して細胞増殖が低下していることが明らかとなった。一方、コラーゲンに対する細胞接着能は、ノックアウト細胞とコントロール細胞で大きな差は見られないことが明らかとなった。また ECM 分解能における GPR56 の役割をゼラチン分解アッセイにより解析したところ、2 種類のノックアウト細胞で異なる結果となり、GPR56 はゼラチンの分解に関与しないことが示唆された。次に細胞移動における GPR56 の役割を Wound healing アッセイにより検討したところ、GPR56 ノックアウトにより、細胞移動が遅れが生じることが明らかとなった。さらにコラーゲンゲル上での細胞移動を解析したところ、ノックアウト細胞ではコントロール細胞に比べ、移動距離が短くなることが明らかとなり、この表現型は GPR56 Δ ECD の過剰発現により回復した。さらに、コントロール細胞の移動は Gq 阻害剤と ROCK 阻害剤により抑制された。以上の結果から、GPR56 は Gq 及び ROCK の活性化を介して細胞移動を促進することにより、乳がん細胞 MDA-MB-231 の浸潤を制御する可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Endah Puji Septisetyani

G タンパク質共役受容体 (GPCR) は 7 回膜貫通型の受容体であり、細胞外からのシグナルを受容し、細胞内で共役している三量体 G タンパク質を介して細胞内にシグナルを伝達する。Adhesion-GPCR サブファミリーに属する GPR56 は、いくつかの癌においてその発現量が変化していることが知られており、2 次元培養下において GPR56 は癌細胞の細胞増殖や細胞接着、細胞遊走を制御することが明らかにされつつあるが、3 次元培養下での乳がん細胞における GPR56 の機能については未だ不明である。

申請者は高転移能をもつヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞を用いて CRISPR/Cas9 法により GPR56 ノックアウト細胞を樹立し、乳がん細胞の細胞移動における GPR56 の役割を明らかにした。コラーゲンゲルを用いた 3 次元培養下で MDA-MB-231 細胞を培養すると、細胞が突起をゲル中に伸展させる浸潤様構造の形成が誘導されるが、GPR56 ノックアウト細胞では浸潤様構造の形成が低下していた。このノックアウトの効果は GPR56 の過剰発現によりレスキューされた。このような浸潤様構造の形成がどのように制御されているのかを調べるため、細胞増殖、細胞接着、細胞移動、および細胞外マトリックスの分解における GPR56 の役割を親株 (コントロール細胞) とノックアウト細胞を用いて MTT アッセイ、Spreading アッセイ、Wound healing アッセイ、ゼラチン分解アッセイによりそれぞれ検討した。その結果、GPR56 が細胞増殖と細胞移動に関与する可能性が見出された。細胞移動における GPR56 の役割を解析するため、コラーゲンゲル上での細胞移動をタイムラプスイメージングにより詳細に解析した結果、GPR56 ノックアウト細胞において細胞移動がコントロール細胞よりも低下すること、またノックアウト細胞の細胞移動が活性型変異体 GPR56 Δ ECD の過剰発現によりレスキューされることを明らかにした。さらに、MDA-MB-231 細胞の細胞移動は Gq 阻害剤と、ROCK 阻害剤により抑制されたが、GPR56 Δ ECD の発現による細胞移動は ROCK 阻害剤でのみ抑制された。これらの結果から、GPR56 が Gq のみならず他の G タンパク質とも共役し、その下流で ROCK が働くことにより細胞移動を正に制御する可能性が示唆された。以上の結果から GPR56 は Gq および ROCK の活性化を介して細胞移動を促進することにより乳がん細胞 MDA-MB-231 の浸潤に関与する可能性が明らかとなった。

以上のように、本論文は乳がん細胞の移動における GPR56 の新たな役割を示すもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。