

# 論文内容の要旨

申請者氏名 Sarmoko

乳癌細胞は原発巣で増殖するのみならず、周囲の組織へ浸潤し、さらに血管やリンパ管を介して他の組織や器官へと転移することもある。浸潤の過程では原発巣からの細胞の離脱、細胞と細胞外マトリクス (Extracellular matrix, ECM) の接着、ECM の分解、細胞移動が起こる。ECM は細胞や組織の支持体として働くとともに、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) のファミリーの一つである adhesion-GPCR は特徴として長い細胞外ドメインを持ち、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、その多くは機能が不明である。当研究室において 3 次元培養を用いて乳癌細胞の浸潤に関与する adhesion-GPCR のスクリーニングが行われ、候補分子として adhesion GPCR に属し機能がほとんど不明の latrophilin 2 (LPHN2) が同定された。本研究では LPHN2 の乳癌細胞における機能解析を行なった。

LPHN2 の発現レベルを qPCR 法で調べたところ、正常乳腺細胞 MCF-10A、低浸潤性乳癌細胞 MCF-7 に比べ高浸潤性乳癌細胞 MDA-MB-231 で最も高く発現していることが明らかとなった。次に CRISPR/Cas9 システムを用いて MDA-MB-231 細胞のゲノム編集を行い LPHN2 のノックアウト (KO) 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、KO 細胞では浸潤様構造の形成が顕著に減少していた。またフィブロネクチンとコラーゲンに対する細胞接着能を調べたところ、KO 細胞とコントロール細胞でフィブロネクチンに対する接着能は差が認められなかったがコラーゲンとの接着能は KO 細胞で大きく低下していた。次に細胞移動における LPHN2 の関与を Boyden chamber 法および Wound healing アッセイにより検討したところ、LPHN2 のノックアウトおよびノックダウンにより、細胞移動が遅れることが判明した。さらにコラーゲンゲル上での一つずつの細胞の移動を解析したところ、KO 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った。この低下が LPHN2 の活性型変異体 LPHN2-CTF の発現により回復された。さらに、コントロール細胞および KO 細胞へ LPHN2-CTF を発現された時の細胞移動は、ROCK 阻害剤と PKA 阻害剤により抑制された。以上の結果から、LPHN2 は ROCK および PKA の活性化を介して細胞移動を促進すること、そしてコラーゲンとの細胞接着に関係することが明らかとなり、LPHN2 が乳癌細胞 MDA-MB-231 の浸潤をポジティブに制御する可能性が示唆された。

やむを得ない事由[ 図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ( ) ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 Sarmoko

細胞膜を 7 回貫通するという特徴的な構造を有し、細胞外の色々な情報を受け取る G タンパク質共役受容体 (GPCR) はヒトゲノム上 800 種類以上存在する。latrophilin 2 (LPHN2) は adhesion-GPCR ファミリーに属し、様々な細胞や組織において発現しているが、その機能やシグナル伝達機構についてはほとんど不明の GPCR である。

申請者は高浸潤性のヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 と正常乳腺上皮細胞 MCF-10A および低浸潤性乳癌細胞 MCF7 を比較して LPHN2 が MDA-MB-231 細胞で高発現していることを明らかにした。次に CRISPR/Cas9 法により LPHN2 ノックアウト (KO) 細胞を作成した。コラーゲンを有した 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、LPHN2 を KO した MDA-MB-231 細胞では浸潤様構造の形成が著しく低下していた。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、細胞接着、細胞増殖および細胞移動における LPHN2 の役割をコントロール細胞と KO 細胞を用いて検討した。その結果、LPHN2 がコラーゲンとの細胞接着に関与すること、また細胞増殖と細胞移動にも関与する可能性を見出した。細胞移動における LPHN2 の役割をさらに詳しく解析するため、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解析した。その結果、KO 細胞において移動距離がコントロール細胞よりも低下していること、コントロール細胞に活性型変異体 LPHN2-CTF を過剰発現させると細胞の移動が亢進されること、さらに KO 細胞の移動低下も LPHN2-CTF の発現によりレスキューされることを明らかにした。一方、MDA-MB-231 細胞の細胞移動は ROCK 阻害剤と、PKA 阻害剤により抑制されることを示した。LPHN2-CTF の発現による細胞移動促進も ROCK 阻害剤と、PKA 阻害剤により抑制された。以上から、LPHN2 が G12/13 と Gs という G タンパク質を活性化し、その下流で ROCK および PKA 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。本研究で提示された LPHN2 依存的な細胞移動の新たな分子機構は今後の乳癌細胞の移動、浸潤のメカニズムの解明に向けて重要な知見となる。

以上のように、本論文は LPHN2 が乳癌細胞において細胞移動をポジティブに制御するという新規の知見を提供するもので、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。

やむを得ない事由 [ 図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ( ) ] により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】