

論文の内容の要旨

論文題目 上皮細胞の形態制御機構と疾患発症への関与の解析

氏名 梶保 祐子

上皮細胞は生体の恒常性を保つために必須であり、細胞骨格に支持されることによって固有の形態を維持しているが、刺激や環境変化によって細胞骨格を再編し形態を変化させる。蛋白尿、がんや線維症など種々の疾患においては特殊な細胞の形態が観察され、上皮細胞の正常な形態からの逸脱は疾患と関連があると考えられる。本研究では、上皮細胞の形態変化が特徴的な病態として、(1)腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）の足突起の癒合を伴うネフローゼ症候群、および(2)浸潤性のがんの2つに焦点をあて、それらの形態制御に関与する機構について研究を行った。

(1)ポドサイトの形態変化を伴うネフローゼ症候群におけるスリット膜構成因子 $\text{SIRP } \alpha$ の研究

ネフローゼ症候群は、腎糸球体の濾過障壁の障害により蛋白尿を来し、ポドサイトの平坦化ならびに足突起の癒合を伴う。足突起はアクチン線維に支持され、形態変化にはアクチン細胞骨格の再編成が必要である。これまで同定されたネフローゼ症候群の原因タンパク質の多くはポドサイトに局在しているが、中でも最初に同定された **Nephrin** は、ポドサイト間の接着構造であるスリット膜に存在し、**Src** ファミリーチロシンキナーゼの **Fyn** によりチロシンリン酸化され **Nck** と結合し細胞骨格を変化させることが報告され、蛋白尿において重要な役割を果たすと考えられている。また同じくスリット膜に局在し **Nephrin** と複合体を形成する **Neph1** は、チロシンリン酸化により **Grb2** をリクルートしアクチンの重合化に関わる。このようにスリット膜はシグナル伝達のプラットフォームとして機能し、ポドサイトの形態変化を伴うネフローゼ症候群と密接な関わりを持つと考えられている。

近年スリット膜の新規構成因子として **signal regulatory protein (SIRP) α** が同定された。これまで **SIRP α** は、免疫細胞ではチロシンリン酸化を受けることで、脱リン酸化酵素の **SHP1/2** をリクルートし負のシグナル伝達に関与する

ことが知られてきたが、スリット膜における機能はまだ明らかになっていない。そのため SIRP α はスリット膜においてポドサイトの形態制御に関わるシグナル伝達に関与しているという仮説を立て研究を行った。

スリット膜では構成因子が複合体を形成しシグナル伝達に寄与するため、まず既知のスリット膜因子との結合を調べた。HEK293T 細胞に SIRP α と種々のスリット膜構成因子を発現させ免疫沈降実験を行い、SIRP α が Nephrin と結合することを見出した。ラット単離糸球体を用いた免疫沈降実験においても SIRP α と Nephrin は結合を確認した。また、それぞれの非リン酸化変異体を用いた結合実験を行ったところ、SIRP α と Nephrin は互いのリン酸化状態に関わらず結合した。さらに、SIRP α 、Nephrin および Neph1 の 3 者を HEK293T 細胞に共発現させると 3 量体を形成した。さらに免疫組織染色を行ったところ、SIRP α はヒト糸球体およびラットの新生仔の糸球体において Nephrin と共局在を示したことから、発達段階から両者は密接な関係にあることが示唆された。

Nephrin を先天的に欠損する先天性ネフローゼ症候群 (CNS) 症例の糸球体では、SIRP α および Neph1 の発現はほぼ消失し、SIRP α の発現に Nephrin が必要であることが分かった。しかし、後天的にポドサイトが傷害されたネフローゼ症候群モデルである puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症ラットの糸球体では、Nephrin の発現は低下したが SIRP α の発現は変化しなかったことから、正常に形成されたスリット膜ではその後のポドサイトの傷害によっても SIRP α は保持されることが分かった。

また、ラットの正常糸球体においては高度にリン酸化を受けた SIRP α が存在していたが、ポドサイトが傷害を受けポドサイトの形態変化を来たしたラットの糸球体では SIRP α のリン酸化は蛋白尿の発症と共に減少していた。

最後に Nephrin および SIRP α のリン酸化の役割について検討を行った。Nephrin は HEK293T 細胞に発現させると一部チロシンリン酸化したシグナルを検出するが、SIRP α の共発現によりそのリン酸化は減少した。この減少は SIRP α をリン酸化部位の変異体に変更すると認められず、*in vitro* の系では SIRP α のリン酸化が Nephrin のリン酸化を抑制する可能性を示唆した。

SIRP α がシグナル伝達を通じ細胞骨格を制御する Nephrin や Neph1 と複合体を形成することは、SIRP α がポドサイトの形態制御システムに関わる可能性があることを示唆する。近年、SIRP α がチロシンリン酸化を受けうる細胞内領域を欠損したマウスではポドサイトが形態変化を来たし蛋白尿を呈することが

報告された。これは **SIRP α** がチロシンリン酸化を通じポドサイトの形態変化に関わるという本研究の仮説を支持する。**SIRP α** は **SHP1/2** をリクルートし自身のリン酸化に伴い他の基質を脱リン酸化することが知られており、本研究では蛋白尿の出現に伴い **SIRP α** のチロシンリン酸化が変化し、他の基質に影響を与えている可能性が示唆される。**SIRP α** のシグナル伝達のターゲットを明らかにすることは、ポドサイトの形態制御および蛋白尿の発症機構の一端の解明につながると思われる。

(2) 浸潤性乳がんに関与する **Rab** ファミリーのスクリーニング

浸潤性の上皮がん細胞は上皮間葉転換をきたすと、その形態を変化させながら細胞外基質内を浸潤する。その際基底面に形成される浸潤突起の中心構造はアクチン繊維であり、様々なアクチン細胞骨格制御タンパク質が局在するのみならず、細胞外基質の分解に必須なメタロプロテアーゼに富んでいる。これら浸潤突起に必要な因子が局所的に集積するためには細胞内の様々な小器官からの小胞輸送が必要であり、その中心的な制御を担う低分子量 G タンパク質 **Rab** ファミリーの同定は上皮細胞の形態制御の解明に重要な役割を果たすと考えられる。現在まで **Rab5** など一部の **Rab** ファミリーが浸潤に関与するという報告があるが、全ての **Rab** ファミリーについて浸潤に対する影響を網羅的に検討した報告はない。

本研究において、全 **Rab** ファミリーに対する siRNA ライブラリーを用い、乳がん由来の **MDA-MB-231** 細胞において細胞外基質であるゼラチン分解能の変化を指標にスクリーニングを行い、浸潤に寄与する可能性のある **Rab** を新規に多数同定した。続けて 2 次スクリーニングとしてこれらの新規因子に対し別の乳がん様細胞である **MCF10.DCIS.com** 細胞におけるゼラチン分解能への関与を評価した。さらに **MDA-MB-231** 細胞を用いて 3 次元方向への細胞外基質への浸潤への関与、および公開されたデータベース上の乳がんにおけるゲノムの増幅を検討し、**Rab2A** を乳がんの浸潤に関わる因子として同定した。

Rab2A を過剰発現させると乳がん細胞のゼラチン分解能は亢進し、また **Rab2A** の過剰発現により siRNA の導入によるゼラチン分解能の低下はレスキューされた。より生体内に近い細胞培養条件である 3 次元スフェロイドにおいても **Rab2A** の発現低下は周囲への浸潤を低下させ、**Rab2A** が 3 次元への浸潤においても重要である可能性が示唆された。

また、Rab2A の発現低下ならびに過剰発現によってゴルジ体の局在は変化し、Rab2A のエフェクターでありゴルジ体の形態維持に関わる Golgi reassembly stacking protein of 55 kDa (GRASP55)、および homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS) ファミリーに属する vacuolar protein sorting (VPS) 39 の発現低下によっても細胞のゼラチン分解能は低下した。これらから Rab2A の下流でこれらの因子が機能して浸潤に関わる可能性が示された。

本スクリーニングにおいて乳がんの浸潤に関与する可能性のある Rab ファミリーを新たに多数同定し、小胞輸送が浸潤に深く関連することを明らかにした。また、Rab2A が浸潤に関わる重要な因子であると同定した。Rab2A が浸潤を制御する分子機序は現時点では解明できていないが、Rab2A 自身またはエフェクターの作用を通じて、浸潤突起の形成または膜貫通型メタロプロテアーゼの輸送や活性化に関与している可能性が考えられる。

以上の研究から、蛋白尿や乳がんなどの上皮細胞が正常形態から逸脱する病態に関わる複数の因子を同定し、分子機構の一端を明らかにすることができた。これら分子は、それぞれの疾患における役割にとどまらず広範な側面を有し多様な病態に関連するため、個々に応じた制御機構の解析が必要である。