

氏名	Arun Vaidyanath
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博甲第 4274 号
学位授与の日付	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	自然科学研究科 機能分子化学専攻 (学位規則第 5 条第 1 項該当)
学位論文の題目	Studies on the ErbB family receptors in mammary epithelial cell differentiation and cancer (乳腺上皮細胞の分化とがんにおける ErbB ファミリー受容体に関する研究)
論文審査委員	教授 妹尾 昌治 教授 尾坂 明義 教授 大槻 高史

学位論文内容の要旨

Background: Mammary gland development is characterized by dynamic changes in the expression and functions of protein kinases. Perturbations in the regulated expression or function of protein kinases or their associated signaling pathways can lead to malignant transformation of the breast. Since receptor-tyrosine kinases regulate several essential processes such as mitogenesis, motility, invasion, cell survival, and angiogenesis, targeting receptor tyrosine kinases may have important implications in designing strategies against breast cancer. The susceptibility of the mammary gland to tumorigenesis is influenced by its normal development, particularly during puberty and pregnancy stages that are characterized by marked alterations in cell proliferation and differentiation. The nature of these changes suggests that tumorigenesis is closely related to normal developmental pathways in the breast.

Methods:

Regarding the involvement of the ErbB2 in breast cancer, we targeted the ErbB2 overexpressing cell line with an artificial ligand of 20 amino acid peptide, EC-1 fused with Fc portion of the human IgG molecule(EC-Fc). Utilizing the ZZ-tag we displayed the ligand on the surface of bionanocapsule for efficient targeting of the receptor. By confocal and live cell imaging techniques we tried to analyse the mechanism of the internalization and the quantification of the internalization in SK-BR-3 cells were calculated using flow cytometric assay.

To analyze the differentiation of the mammary differentiation we used two different mutants of betacellulin (BTC) which bind only to the ErbB4 and have low binding affinity to ErbB1. The cells were induced with BTC, both wild type and mutants and the proliferation and differentiation capability was assessed with MTT assay, RT PCR and quantitative RT-PCR. Furthermore, we employed the molecular basis of the differentiation with analyzing the signaling aspects in HC11 cells after the induction with BTC.

Results and Conclusion:

The artificial ligand EC-Fc proved to be one of the useful ligand for the targeting of ErbB2 over expressing cancer cell line SK-BR-3. The multivalent display enhanced internalization of ErbB2 much more than that of the ligand alone. The ligand displayed on the surface of the bionanocapsule utilizes the ErbB2 internalization mechanism for its internalization involving the GEEC pathway. The potential of EC-Fc proves to be one of the promising ligand in the downregulation of the surface ErbB2 in cancer cell lines. Further works would employ the delivery of the drugs to the cancer cells using liposomes and efficient targeting of the cancer cells.

EIA assay showed that the BTC mutants E88K and E88R, bind only to ErbB4, not ErbB1. BTC and its mutants induced the upregulation of Erk1/2 in normal mammary epithelial cell line, HC11. The mutants did not induce cell proliferation while the expression of the marker for differentiation- β -casein protein was found to be lower. The induction of the milk gene expression was suppressed with the induction with BTC. The results indicate the involvement of the post receptor signaling of the BTC, which suppresses the mammary epithelial differentiation. Deciphering the signaling mechanism by BTC will help in understanding the molecular aspects of the differentiation capability of the protein.

論文審査結果の要旨

疾患との関連性がよく知られている上皮成長因子受容体 (ErbB1、2、3 および 4) ファミリーの中でも、ErbB2 は乳がんとの関連性が深い。ErbB2 については特異的に結合するリガンドが存在しないため、その研究を遅らせる一因ともなっている。本論文では、ErbB2 に親和性を持つ人工ペプチド EC-1 を利用して、ErbB2 を過剰に発現する細胞の解析を行っている。まず、ErbB2 を過剰に発現する細胞として、その細胞内移行において差を示す二つのがん細胞株 SK-BR3 と SK-OV3 を取り上げ、その細胞内移行のメカニズムをリガンド刺激という形で解析している。リガンドとしては、EC-1 を緑色蛍光タンパク質に融合した EC-GFP、ヒト抗体分子 IgG の定常領域に EC-1 を融合した EC-Fc、EC-Fc を多分子提示するナノ粒子 EC/BNC を調製した。EC-GFP は単量体で 1 価の結合を分子、EC-Fc は二量体をデザインした二価の結合分子、EC/BNC は EC-Fc を約 20 分子提示する多価の結合分子となっている。EC-Fc は ErbB2 への親和性が EC-GFP の 100 倍強いが EC/BNC は EC-Fc と同程度であった。一方、SK-BR3 における ErbB2 の細胞内移行は EC-GFP では誘起されず、EC-Fc で誘起されるが EC/BNC の方がより強い効果を示した。SK-OV3 細胞ではこれら 3 種類のいずれのリガンドを用いても ErbB2 の細胞内移行が観察できるためこの 2 種類の細胞間での違いが想定された。独自の細胞表面マーカー DNA マイクロアレイを用いて精査したところ SK-BR3 細胞にはカベオリンの発現が低く、カベオラを介した細胞内移行経路が脆弱である事がわかった。その結果、多価のリガンドにより誘起される細胞内移行は初期エンドソームの GEEC 経路を介することが示された。これらの事からドラッグデリバリーシステムでは多価のリガンドを利用して分子標的を行うと同時に GEEC 経路を利用する細胞内移行経路を利用する事で薬剤を細胞内に導入して大きな効果が期待できることが示された。さらに、ErbB1 も ErbB2 と並んでがんとの関連性が深い、ErbB1 は ErbB2 と異なりリガンド刺激に対する感受性が高い点で直接標的することには問題が残る。そこで、ErbB4 のみを認識するベータセルリンの変異体を調製して乳腺上皮細胞への影響がほとんどないことを示している。これは、ErbB1 を回避し、がん細胞の増殖を刺激しないで、分子標的を行うリガンドがデザインできる可能性があることを示しており、今後の分子標的技術の応用範囲を拡大したことは有望であると認め、審査委員の全員が本論文を学位にふさわしい論文であると評価した。