

## 学位論文題名

Involvement of adaptor protein Crk in malignant feature  
of human ovarian cancer cell line MCAS

(ヒト卵巣癌細胞 MCAS におけるアダプター分子 Crk の役割検討)

## 学位論文内容の要旨

## 背景と目的

前癌遺伝子 c-Crk はニワトリに肉腫を誘導するレトロウイルス CT10(chicken tumor10)のコードする癌遺伝子産物 v-Crk の哺乳類細胞内相同蛋白質である。Crk は SH2 領域と SH3 領域からなる細胞内シグナル伝達アダプター分子であり, alternative splicing により 28 kDa の c-Crk-I と 40 kDa の c-Crk-II とが存在する。Crk の SH2 領域は細胞接着斑に局在する p130Cas やパキシリンのチロシンリン酸化部位に特異的に結合し、Crk の SH3 領域は C3G や Dock180 等の低分子量 G 蛋白質の活性化因子(GEF: Guanin nucleotide exchange factor)と結合し、細胞増殖や細胞骨格の運動を制御し、細胞の様々な反応を誘導することが知られている。

ヒトの腫瘍と Crk の関連については、Crk は様々な癌腫や肉腫において過剰発現している事が知られている。特に CrkI は肺癌や脳腫瘍に過剰発現が報告されている。しかしながら、Crk の過剰発現が、腫瘍化の結果として起こっているのか、本質的に Crk がヒトの癌化に関与するのか否かについては、明確な結論が得られていない。そこで、本研究においては、ヒト卵巣癌における Crk の役割の検討を行った。

卵巣癌は原発巣において直接浸潤による腫瘍の進展とともに、広く腹腔内に播種することが特徴の1つである。卵巣癌による死亡原因は他の悪性腫瘍と同様に90%以上は浸潤、転移、再発であるが、新しい化学療法や放射線療法が相次いで開発されており、総合的な予後は、FIGO による5年生存率としては、1970年代は37%、1980年代は39%、1990年代は41%と改善がみられる。完全に改善するために、腫瘍浸潤と転移機構の解明することは分子標的療法の開発を含め、新しい治療法の開発にとって必要である。以上の理由により、今回ヒト卵巣癌由来の MCAS 細胞を用いて、卵巣癌におけるアダプター分子 Crk の役割について解析を行った。

## 材料と方法

ヒト卵巣癌細胞 MCAS において、免疫沈降にて、既に同定されている Crk と標的分子の結合の有無を確認した。次に、Crk に対する siRNA を産生するベクター pSUPER を用いて、Crk が恒常的にノックダウンされた3つの細胞株を作成した。これら作成された細胞の Phenotype として細胞運動能、細胞接着能、浸潤能および増殖能の検討を行った。さらに Crk ノックダウン細

胞に Crk を再発現させることで、Phenotype が抑制されるか否かを検討した。最後に、Crk ノックダウン細胞の in vivo で腫瘍形成性能をヌードマウスを用いて病理組織学的に検討を行った。

### 結果

1) MCAS 細胞においては、Crk と p130Cas など SH2 の標的分子との結合が認められた。2) 次にこの細胞を用いて Crk のノックダウン細胞 Crki-1、Crki-2、Crki-3 を樹立した。Immunoblotting の結果では CrkI は完全に発現が消失し、CrkII はおよそ 50-70% 程度の発現の低下がみられた。樹立した細胞においては Crk に結合する標的蛋白質の発現には変化がみられなかった。3) Crk ノックダウン細胞では細胞膜のラップリングの低下が認められた。また、細胞の運動能と浸潤能が Crk をノックダウンさせることによって低下することが判明した。この運動能の低下した Crk ノックダウン細胞においては、focal adhesion complex の数が減少することが明らかとなり、また、低分子量 G 蛋白の 1 つである Rac1 の活性の低下が認められた。4) Crk ノックダウン細胞に外因性 Crk を再発現させると、細胞膜のラップリングが回復することが観察された。5) Crk ノックダウン細胞をヌードマウスの皮下に注入すると、形成された腫瘍径は縮小していた。また腹腔内に注入した場合には、コントロール細胞では著明な腹膜播種が認められたが、Crk ノックダウン細胞では、腫瘍形成はほとんど認めなかった。

### 考察

卵巣癌細胞 MCAS においては、Crk をノックダウンさせることで、腫瘍細胞の運動能、浸潤能、増殖能などの悪性化の指標において、顕著な抑制効果がみられたことから、アダプター分子 Crk 細胞の悪性化において重要な機能を担っている可能性が示唆された。今回の結果より Crk とその標的分子である Dock180、C3G との結合が癌化にとって重要であると考えられるため、今後はこれらの結合を阻害する特異的な分子標的薬剤の開発を目指したい。Crk はヒト卵巣癌のみならず肺癌や脳腫瘍などにおいても高発現がみられるため、Crk を標的として抗癌剤の開発は多くの癌に応用可能となることが期待される。

### 結語

- 1) 卵巣癌細胞 MCAS おいて Crk とリン酸化された p130Cas と paxillin が同定された。
- 2) Crk を恒常的にノックダウンした細胞株を樹立した。作成された細胞は細胞膜のラップリングが低下し、focal adhesion complex 形成が抑制され、細胞運動能、浸潤能、増殖能も顕著に低下した。
- 3) Crk ノックダウン細胞に Crk を戻すと、細胞膜のラップリングが回復した。
- 4) Crk ノックダウン細胞は、in vivo で腫瘍形成能低下を示した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 笠 原 正 典  
副 査 教 授 畠 山 鎮 次  
副 査 教 授 田 中 一 馬  
副 査 助 教 授 田 中 伸 哉

## 学 位 論 文 題 名

### Involvement of adaptor protein Crk in malignant feature of human ovarian cancer cell line MCAS

(ヒト卵巣癌細胞 MCAS におけるアダプター分子 Crk の役割検討)

本研究は、ヒト卵巣癌における、シグナル伝達アダプター分子 Crk の役割を検討したものである。まず、ヒト卵巣癌細胞 MCAS において、免疫沈降にて、既に同定されている Crk と標的分子の結合の有無を確認した。次に、Crk に対する siRNA を産生するベクター pSUPER を用いて、Crk が恒常的にノックダウンされた3つの細胞株を作成した。これら作成された細胞の Phenotype として細胞運動能、細胞接着能、浸潤能および増殖能の検討を行った。さらに Crk ノックダウン細胞に Crk を再発現させることで、Phenotype が抑制されるか否かを検討した。最後に、Crk ノックダウン細胞の in vivo で腫瘍形成性能をヌードマウスを用いて病理組織学的に検討を行った。MCAS 細胞においては、Crk と p130Cas など SH2 の標的分子との結合が認められた。次にこの細胞を用いて Crk のノックダウン細胞 Crki-1、Crki-2、Crki-3 を樹立した。Immunoblotting の結果では CrkI は完全に発現が消失し、CrkII はおよそ 50-70% 程度の発現の低下がみられた。樹立した細胞においては Crk に結合する標的蛋白質の発現には変化がみられなかった。Crk ノックダウン細胞では細胞膜のラフリングの低下が認められた。また、細胞の運動能と浸潤能が Crk をノックダウンさせることによって低下することが判明した。この運動能の低下した Crk ノックダウン細胞においては、focal adhesion complex の数が減少することが明らかとなり、また、低分子量 G 蛋白質の1つである Rac1 の活性の低下が認められた。Crk ノックダウン細胞に外因性 Crk を再発現させると、細胞膜のラフリングが回復することが観察された。Crk ノックダウン細胞をヌードマウスの皮下に注入すると、形成された腫瘍径は縮小していた。また腹腔内に注入した場合には、コントロール細胞では著明な腹膜播種が認められたが、Crk ノックダウン細胞では、腫瘍形成はほとんど認めなかった。

審査委員からの質疑については、次のように回答した：副査の畠山教授から卵巣癌を研究の題材として選択する理由について質問を受け、卵巣癌は腹腔内播種が再発、予

後不良の主因であるため、研究材料として用いた旨を回答した。次に副査の田中一馬教授より、Crk の発現レベルは細胞内でどのように調節されているかについて質問を受け、重要な点ではあるが、現在 Crk のプロモーターについては不明な点が多い旨回答した。さらに、副査の田中伸哉助教授から、Rap の活性化制御について質問を受け、Crk は C3G も結合するので、これに関する実験について、Rap assay や細胞接着能両方も検討したが、有意的な結果が出てなかった旨回答した。また、本研究の結果が悪性腫瘍の治療に応用可能か否かについて質問をうけ、Crk と標的蛋白質を阻害する analogue を開発するのが重要である旨回答した。最後に主査の笠原教授より、CrkI と CrkII の細胞内での機能の違いについて質問を受け、Dock180 や C3G との結合については Crk I と Dock180 の結合が CrkII より強いが、C3G の結合は同様である旨回答した。この論文は、Crk がヒトの腫瘍の悪性化に必要であることを初めて証明した研究である点で高く評価され、今後の悪性腫瘍の治療法開発にとって、分子標的治療薬剤の開発の応用が期待された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。