

学位論文題名

Adaptor molecule Crk is required for sustained phosphorylation of Grb2-associated binder 1 and hepatocyte growth factor-induced cell motility of human synovial sarcoma cell lines

(ヒト滑膜肉腫細胞株における Gab1 チロシンリン酸化維持と HGF 誘導性細胞運動に必要とされるアダプター分子 Crk)

学位論文内容の要旨

I. 緒言

細胞運動は、胚発生・血管新生・器官形成などを含む生物学的および生理学的過程において必須である。一方、無秩序な運動能亢進は、癌細胞の浸潤や転移において報告されている。いくつかの成長因子は運動に関与しており、HGF (Hepatocyte Growth Factor) はそのうちの一つである。HGF は細胞の増殖・運動・接着に広く関与し、器官形成や組織の発達などに影響を及ぼす。HGF はその受容体である c-Met のキナーゼドメイン内に存在する Y1234/Y1235 の自己リン酸化を促し、これにより c-Met のキナーゼ活性が亢進する。その後さらに、C 末側 1349/1356 のチロシン残基が自己リン酸化され、ここに SH2 (Src Homology 2) ドメインを有する分子が結合することにより、HGF/c-Met からのシグナル伝達が細胞内へと伝達される。HGF/c-Met シグナル経路は、様々な腫瘍において増幅されている事が報告されている。

Gab1 (Grb2-associated binder 1) は HGF 刺激下で c-Met に結合する蛋白質の一つである。Gab1 は、PI3K、SHP-2、Shc、Grb2 など様々な蛋白質と結合することが報告されており、また Gab1 内に 6 箇所存在する YXXP 配列のチロシンがリン酸化されると、ここに Crk が結合すると考えられている。Crk は SH2、SH3 ドメインのみから構成されるアダプター分子であり、Crk の SH2 ドメインには細胞接着斑構成蛋白質である paxillin や p130^{Cas} が、SH3 ドメインには細胞運動や接着に関与する Dock180 や C3G が結合する事が報告されている。最近の研究により、Crk はヒトの癌の発生や進行に関与することが示唆されているが、その詳細は未だ不明である。

滑膜肉腫は、染色体転座 t(X, 18) に由来するキメラ遺伝子 SYT-SSX に特徴付けられる悪性軟部肉腫の一つである。この肉腫は青年期に四肢関節近傍に発生することが多く、しばしば肺転移を認める。興味深いのは、この肉腫において HGF および c-Met がともに高発現していることである。HGF/c-Met シグナル経路は滑膜肉腫細胞の増殖や上皮-間葉移行に関与することが示唆されているが、運動能への関与はほとんど研究されていない。

本研究では、滑膜肉腫の細胞運動制御機構を解明し、最終的に滑膜肉腫の転移・浸潤を抑制させ得ることを目的とした。

II. 結果

1. ヒト滑膜肉腫細胞株において、c-Met ならびに Gab1 のチロシンは HGF 刺激によってリン酸化される。

3 種類のヒト滑膜肉腫細胞株 SYO-1、HS-SYII、Fuji において c-Met は高発現しており、HGF 刺激により Y1234/Y1235 のリン酸化亢進が認められた。また、Y1349 のリン酸化も亢進し、これに一致して

c-Met と Gab1 の結合が確認された。一方、Gab1 も HGF 依存的にチロシンのリン酸化が亢進した。Gab1 に 6 箇所存在する YXXP 配列の一つである Y307 も HGF 依存的にリン酸化され、これに伴い Gab1 と Crk の結合が確認された。一方、paxillin や p130^{Cas} のリン酸化は HGF 刺激によって影響を受けなかった。

2. Gab1 のチロシンリン酸化は Crk の SH2 によって制御されている。

滑膜肉腫細胞への HGF 刺激は、Gab1 のチロシンリン酸化依存的に Gab1 と Crk の結合を亢進させることから、次に Gab1 のリン酸化機構を詳細に検討した。293T 細胞内で Crk と Gab1 を過剰発現させると、Gab1 のチロシンリン酸化が誘導された。SH2 ドメイン変異型 Crk は Gab1 のリン酸化を誘導できないことから、Crk は SH2 ドメインを介して何らかのチロシンキナーゼを活性化し、Gab1 をリン酸化している可能性が示唆された。

3. Crk は Gab1 のチロシンリン酸化を持続させる。

Crk によって誘導される Gab1 のチロシンリン酸化が、滑膜肉腫の細胞運動能にどのような影響を与えているのかを検討する為に、RNA 干渉技術により Crk ノックダウン滑膜肉腫細胞株を樹立した。野生型 SYO-1 細胞では、HGF 刺激後の Gab1 のリン酸化は 3 時間以上持続し、それに伴い Gab1 と Crk との結合も持続した。一方、Crk ノックダウン SYO-1 細胞では、HGF 刺激後の c-Met のキナーゼ活性に関しては野生型細胞との差異を認めなかったが、Gab1 のチロシンリン酸化は野生型に比べて早期に減弱した。この結果は、Crk の欠乏が Gab1 のリン酸化の低下と早期減衰を引き起こしている事を示唆する。

4. Crk ノックダウン滑膜肉腫細胞では Rac1 活性が低下する。

Rac1 は Rho ファミリーに属する低分子量 G 蛋白質の一つであり、Crk/DOCK180 の下流でアクチン細胞骨格の形成を制御する。滑膜肉腫の細胞骨格制御における Crk の関与を検討する為に、野生型あるいは Crk ノックダウン細胞を用いて、プルダウン法にて Rac1 の活性化を検討した。野生型滑膜肉腫細胞株では、HGF 刺激後 90 分の間に 2 峰性の Rac1 の活性化が認められた。一方、Crk ノックダウン細胞では、HGF 依存的な Rac1 の明らかな活性化は認められなかった。続いて、単一細胞内での Rac1 の活性化動態を時間・空間的に解析する為、time-lapse 顕微鏡を用いて Rac1 の FRET (fluorescence resonance energy transfer) 解析を行った。野生型 SYO-1 細胞では、HGF 刺激によって細胞膜で著明な Rac1 の活性化が認められた。また、野生型 Fuji 細胞においては、細胞膜近傍での Rac1 の活性化に引き続いて細胞膜のダイナミックな形態変化が認められた。一方、Crk ノックダウン Fuji 細胞では、HGF 依存的な Rac1 の活性亢進は認められなかった。

5. Crk は滑膜肉腫細胞のアクチン細胞骨格再構築を制御する。

次に、滑膜肉腫細胞のアクチン細胞骨格制御における Crk の影響を検討した。野生型滑膜肉腫細胞株は HGF 刺激により糸状仮足 (filopodia) 形成と膜の波状運動 (ruffling) を促進した。一方、Crk ノックダウン細胞では細胞内のアクチンの走行が無秩序であり、HGF 依存的な filopodia や ruffling も認められなかった。

6. Crk は滑膜肉腫細胞の運動能を亢進する。

滑膜肉腫細胞の運動能における Crk の作用を検討する為に、野生型あるいは Crk ノックダウン Fuji 細胞を用いて wound-healing アッセイを行った。Crk 抑制細胞では、HGF 非存在下で運動能の低下が認められた。HGF 刺激は、野生型滑膜肉腫細胞の運動能を約 1.5 倍に増強させたが、Crk 抑制細胞では HGF による増強作用は認められなかった。また、野生型 Fuji 細胞では HGF 刺激によって細胞の scattering が著明に亢進したが、Crk 抑制細胞では認められなかった。

7. Crk ノックダウン滑膜肉腫細胞は *in vivo* での腫瘍形成を抑制する。

ヌードマウスの皮下に野生型あるいは Crk 抑制 Fuji 細胞を注入し、それらの腫瘍形成能を比較検討した。Crk 抑制細胞では、野生型細胞に比べて腫瘍最大長径が有意に低下し、細胞の核分裂像も著明に減少した。また、野生型 Fuji 細胞は周辺組織への浸潤が認められたが、Crk 抑制細胞では認められなかった。

III. 結語

本研究により、滑膜肉腫細胞への HGF 刺激下で、Crk は Gab1 のチロシンリン酸化を持続させることにより、Rac1 の活性化、アクチン細胞骨格のダイナミックな再構築を引き起こし、細胞運動能を亢進させていることが明らかとなった。RNA 干渉法で Crk を抑制すると、Gab1 のリン酸化、及び Rac1 の活性化が抑制され、アクチン細胞骨格の構築障害や細胞運動能の抑制が認められた。さらに、ヌードマウスを用いた解析により、Crk 抑制滑膜肉腫細胞は *in vivo* での腫瘍形成、及び周囲組織への浸潤を抑制した。これらにより、滑膜肉腫の細胞運動能制御機構において Crk が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。今後、Crk を分子標的とした滑膜肉腫の転移・浸潤能抑制の新規治療法の確立が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 近 藤 哲
副 査 教 授 笠 原 正 典
副 査 教 授 三 浪 明 男

学位論文題名

Adaptor molecule Crk is required for sustained phosphorylation of Grb2-associated binder 1 and hepatocyte growth factor-induced cell motility of human synovial sarcoma cell lines

(ヒト滑膜肉腫細胞株における Gab1 チロシンリン酸化維持と HGF 誘導性細胞運動に必要とされるアダプター分子 Crk)

学位論文はヒト滑膜肉腫細胞株における Gab1 のチロシンリン酸化維持と HGF 誘導性細胞運動に必要とされるアダプター分子 Crk に関するものである。

細胞運動は胚発生を含む生物学的および生理学的過程において必須である。一方、無秩序な運動能亢進は癌細胞の浸潤や転移において報告されている。HGF (Hepatocyte Growth Factor) は細胞の増殖・運動・接着に広く関与し器官形成や組織の発達などに影響を及ぼす成長因子であり、HGF/c-Met シグナル経路は様々な腫瘍において増幅されている事が報告されている。滑膜肉腫はキメラ遺伝子 SYT-SSX に特徴付けられる悪性軟部肉腫の一つである。興味深いのは、この肉腫において HGF・c-Met とともに高発現していることである。HGF/c-Met シグナル経路は滑膜肉腫細胞の増殖や上皮-間葉移行への関与は示唆されているが、運動能への関与はほとんど研究されていない。本研究では、滑膜肉腫の細胞運動制御機構を解明し、最終的に滑膜肉腫の転移・浸潤を抑制させ得ることを目的とした。

ヒト滑膜肉腫細胞株において、HGF 刺激により c-Met と Gab1 のリン酸化が亢進し、これに一致して両者の結合が確認された。また Gab1 の YXXP 配列の一つである Y307 も HGF 依存的にリン酸化され、これに伴い Gab1 と Crk の結合が確認された。次に Gab1 のリン酸化機構を検討した。Crk と Gab1 を過剰発現させると Gab1 のチロシンリン酸化が誘導された。SH2 ドメイン変異型 Crk は Gab1 のリン酸化を誘導できないことから、Crk は SH2 ドメインを介して Gab1 をリン酸化している可能性が示唆された。Crk 誘導性の Gab1 のチロシンリン酸化が細胞運動能に対して及ぼす影響を検討する為に、Crk ノックダウン滑膜肉腫細胞株 (以下 Crki) を RNA 干渉技術により樹立した。野生型滑膜肉腫細胞株(以下 parent) では、HGF 刺激後の Gab1 のリン酸化は長時間持続し、Gab1 と Crk との結合も持続した。一方、Crki では、Gab1 のチロシンリン酸化は parent に比べて早期に減弱した。この結果は、Crk の欠乏が Gab1 のリン酸化の低下と早期減衰を引き起こしている事を示唆する。次に Crk の下流でアクチン細胞骨格形成を制御する Rac1 の活性化をブルダウン法にて検討した。parent では HGF 刺激後に 2 峰性の活性化亢進が認められたが、Crki では HGF 刺激後の活性化亢進は認められなかった。単一細胞内での Rac1 の活性化動態を解析する為、time-lapse

顕微鏡を用いて FRET (fluorescence resonance energy transfer) 解析を行った。HGF 刺激によって parent では細胞膜近傍で著明な Rac1 の活性化とそれに引き続く細胞膜のダイナミックな形態変化を認めたが、Crki では HGF 依存的な Rac1 の活性化亢進は認められなかった。次に滑膜肉腫細胞のアクチン細胞骨格制御における Crk の影響を検討した。Crki では細胞内のアクチンの走行が無秩序であり、parent でみられるような糸状仮足 (filopodia) 形成と膜の波状運動 (ruffling) の HGF 依存的な促進は認められなかった。滑膜肉腫細胞の運動能における Crk の作用を検討する為に wound-healing アッセイを行った。Crki では HGF 非存在下での運動能が低下し、parent のような HGF 依存性の運動能亢進は認められなかった。また、parent では HGF 刺激によって細胞の scattering が著明に亢進したが、Crki では認められなかった。ヌードマウスの皮下に parent あるいは Crki 細胞を注入し、腫瘍形成能を比較検討した。Crki では、parent に比べて腫瘍最大長径が有意に低下し細胞の核分裂像も著明に減少した。また、parent では周辺組織への浸潤が認められたが、Crki では認められなかった。

学位論文公开发表では、副査の三浪教授より、滑膜肉腫細胞における Crk の下流の分子への影響、他大学における SYT-SSX を標的としたペプチド治療の進捗状況、Crk を分子標的とする治療における正常組織への影響に関する質問があった。また副査の笠原教授より、滑膜肉腫における Crk の発現量、FRET での二峰性の Rac1 活性化という結果に対するメカニズムの解釈、CrkL と本研究対象との関連に関する質問があった。最後に主査の近藤教授より、ヌードマウスを用いた in vivo 実験でのコントロールとした材料、同実験でのコントロールおよび野生型細胞株間における有意差の有無、臨床応用における材料開発に関する考察、定常発現株を樹立する際の考慮点に関する質問があった。これらの質問に対して申請者は自験データや過去に発表された論文を引用し適切に回答した。

この論文は、滑膜肉腫の細胞運動能制御機構における Crk の重要な役割を明らかにし、臨床応用につながる重要な研究である点で評価に値すると考えられた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、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。