

学位論文題名

脳腫瘍におけるシグナル伝達アダプター分子 Crk の 役割の解析と新規シグナル阻害剤 スクリーニングシステムの開発

学位論文内容の要旨

【背景と目的】シグナル伝達アダプター分子 Crk は 1988 年にニワトリの肉腫誘導レトロウイルス CT10 (chicken tumor 10) から分離された癌遺伝子であり、癌化した細胞においてはチロシンキナーゼ活性が上昇していることから、Crk (CT10 regulator of kinase) と命名された。Crk は、代表的なチロシンキナーゼである Src の酵素活性調節領域である Src homology domain, SH2 および SH3 領域からなるシグナル伝達アダプター分子であり、チロシンキナーゼと低分子量 G 蛋白をリンクする。

グリオーマ(神経膠腫)は悪性度の高い腫瘍で、現在効果的な治療法が見いだされていない。特に最も悪性度の高いグリオブラストーマ(神経膠芽腫; WHO 分類 Grade-IV)の5年生存率は極めて低く、新規治療薬の早急な開発が求められている。

Crk とヒト腫瘍との関連については、これまでの研究で免疫染色法にて様々なヒトの腫瘍組織が検討され、多くの癌および肉腫で過剰発現が認められている。しかしながら脳腫瘍と Crk の関連については、Crk-I の悪性脳腫瘍での過剰発現が報告されているものの不明な点が多い。本研究では、まず Crk が脳腫瘍においても、その悪性化に必須な分子であるのか否かを検討し、さらに、Crk が悪性化能に必須の分子であることを明らかにした後は、Crk シグナル阻害剤を得るための新規薬剤スクリーニング法の開発を目指した。

新規治療薬をスクリーニングで同定する際には、(1)分子標的が的確であること、(2)標的の分子構造または標的分子を介するシグナル伝達経路が明らかになっていること、(3)ハイスループット・スクリーニングを可能にする評価系を有すること、が重要であると考えられる。申請者らは、正常ヒトアストロサイトに、hTERT, SV40T 抗原を導入することで不死化させた細胞株を用いて、そこに 1 つの遺伝子をさらに加えることで悪性化能を獲得させた細胞株と比較することで、効率的に 1 つの遺伝子発現の有無に基づく増殖抑制効果を示す、シグナル阻害剤スクリーニング系の開発を目指した。

本研究は、グリオブラストーマ細胞株を用いて、シグナル伝達アダプター分子 Crk が脳腫瘍の悪性化に必須であるか否かを検討し Crk シグナル阻害剤を得る前段階として、1 つの分子に起因する増殖シグナルのみを抑制する新規薬剤スクリーニング法の開発を目指したものである。

【研究材料と方法】

1. Crk Knockdown 細胞の樹立: 3 μg pSUPER-Crki と 0.6 μg pBabe-puro の plasmid を同時に細胞に導入し、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin を含む medium で 2-3 週間培養し、コロニーを単離した。Crk の発現量はウエスタンブロットにて解析した。

2. *In vivo* における造腫瘍能の測定: 6 週齢の BALB/cA Jcl-nu (nu/nu), CLEA (Jpan INC) のヌードマウスを用いて、細胞を 0.5~1x10⁷ 個/0.3 ml マトリゲル/匹を皮下注射し 3 週間

後、腫瘍を摘出しサイズ、重さを測定し MIB1 (Ki-67) に対する免疫染色を施行した。

3. 阻害剤スクリーニングシステム: SCADS inhibitor kit (標準阻害剤キット)は文部科学省がん特定・統合がん(化学療法基盤情報支援班,代表癌研究所・矢守博士)から提供されたものを使用した。

【研究結果】

脳腫瘍悪性化における Crk の役割の分子生物学的解析

脳腫瘍悪性化における Crk の役割を検証するために、Crk knockdown KMG4 細胞と、野生型の KMG4 細胞を用いて、細胞運動能・細胞接着能・細胞増殖能、*in vivo* における腫瘍形成能などの比較解析を行った。(i) 様々な細胞外マトリックスに対する接着能を、マトリックス・コーティング・ディッシュを用いた培養により比較した結果、Crk の発現低下によって、ラミニンに対する接着性が減弱することが明らかになった。(ii) 運動能の検討は、Wound-healing assay により行い Crk knockdown KMG4 細胞では運動能が低下することが判明した。(iii) 通常の増殖アッセイおよび Soft-agar colony formation アッセイを行った結果、Crk は、足場依存性・非依存性、双方の増殖に重要であることが判明した。(iv) ノードマウスでの xenograft モデルを用いて、*in vivo* における腫瘍形成能を比較した結果、Crk knockdown KMG4 細胞における、腫瘍形成能の低下が認められた。以上より、Crk が脳腫瘍の悪性化に重要な役割を担うことが明らかとなった。

シグナル系路特異的薬剤スクリーニングシステムの確立

有用なハイスループット・スクリーニング・システムを樹立する目的で、先ず、AKT-pathway をターゲットとした proof-of-concept study を行った。不死化したアストロサイトに活性型 AKT と firefly-luciferase を遺伝子導入した NHA-AKT(+)-FF 細胞と、不死化したアストロサイトに renilla-luciferase を導入したコントロール細胞 NHA-AKT(-)-RL 細胞を樹立した。AKT(+)-FL 細胞および AKT(-)-RL 細胞の「細胞数の変化」は、それぞれの「luciferase 活性の変化」に置き換えられることを証明した後に、混合培養に化合物ライブラリーを作用させることでスクリーニングを行い、Fumitremogin C という ABC トランスポーターの阻害剤に AKT-pathway 特異的阻害剤としての効果があることを同定した。

以上から、樹立した isogenic cell-based system は通常の Dual-Luciferase-Assay を用いて簡単に増殖アッセイが可能で、ハイスループット・スクリーニング・システムとして応用可能であることが示された。

【考察と結論】

脳腫瘍研究に限らず癌治療研究全般において、分子標的治療の有用性が認識されており、特に、特定の分子・シグナル伝達経路を標的とする阻害剤を、スクリーニングによって同定する試みが広く行われている。スクリーニングの初期段階では、腫瘍細胞株などの培養細胞が広く用いられているが、数種の細胞株を用意して行う従来型のスクリーニングでは、「適切な」対照(正常細胞など)を用意することが困難であり、単なる細胞毒性の強い化合物のみを同定してしまう傾向があった。

本研究では、脳腫瘍細胞株と、それに Crk の knockdown という単一の遺伝子変化を生じさせた細胞の2種を1組にしたスクリーニングを行うことで、上述の問題点を解決している点が独創的である。このような、isogenic cell-based system は最近、増加する傾向にあり、用いる2種の細胞を異なる蛍光蛋白質で標識することによって区別するなどの工夫が施されている。本研究では蛍光蛋白質の代わりに2種類の luciferase を用いることにより、Dual-Luciferase-Assay によるスクリーニングを可能にしているが、これは世界初のシステムである。

システムの有用性が証明され、今後のこの分野における薬剤スクリーニングシステムの技術向上に直結する効果が望まれることに加えて、Crk 阻害剤と脳腫瘍幹細胞の関連が証明されれば、最近重要性が提唱されている「脳腫瘍幹細胞を標的とする新規治療法開発」にも関与することが期待され、今後高い学術的インパクトを有する成果が期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	秋田弘俊
副査	教授	石田晋
副査	教授	佐邊壽孝
副査	教授	田中伸哉
副査	准教授	濱田淳一

学位論文題名

脳腫瘍におけるシグナル伝達アダプター分子 Crk の 役割の解析と新規シグナル阻害剤 スクリーニングシステムの開発

グリオーマ（神経膠腫）は最も頻度の高い脳腫瘍であり、中でも最も悪性度の高いグリオブラストーマ（神経膠芽腫；WHO 分類 Grade IV）の5年生存率は極めて低く、新規治療薬の早急な開発が求められている。本研究は、グリオブラストーマ細胞株を用いて、シグナル伝達アダプター分子 Crk が脳腫瘍の悪性化に必須であるか否かを検討し、Crk シグナル阻害薬を得る前段階として、1つの分子に起因する増殖シグナルのみを抑制する新規薬剤スクリーニング法の開発を目指したものである。

脳腫瘍悪性化におけるCrkの役割の分子生物学的解析

脳腫瘍悪性化における Crk の役割を検証するために、Crk knockdown KMG4 細胞と、野生型の KMG4 細胞を用いて、細胞運動能・細胞接着能・細胞増殖能、*in vivo* における腫瘍形成能などの比較解析を行い以下4つの知見を得た。(i) 様々な細胞外マトリックスに対する接着能を、マトリックス・コーティング・ディッシュを用いた培養により比較した結果、Crk の発現低下によって、ラミニンに対する接着性が減弱することが明らかになった。(ii) 運動能の検討は、Wound-healing assay により行い、Crk knockdown KMG4 細胞では運動能が低下することが判明した。(iii) 通常増殖アッセイおよび soft-agar colony formation assay を行った結果、Crk は、足場依存性・非依存性、双方の増殖に重要であることが判明した。(iv) ノードマウスでの xenograft モデルを用いて、*in vivo* における腫瘍形成能を比較した結果、Crk knockdown KMG4 細胞において、腫瘍形成能の低下が認められた。以上より、Crk が脳腫瘍の悪性化に重要な役割を担うことが明らかとなった。

シグナル系路特異的薬剤スクリーニングシステムの確立

有用なハイスループット・スクリーニング・システムを樹立する目的で、先ず AKT-pathway

をターゲットとしたモデル実験を行った。不死化したアストロサイトに活性型 AKT と Firefly-luciferase を遺伝子導入した NHA-AKT(+)-FF 細胞と、不死化したアストロサイトに Renilla-luciferase を導入したコントロール細胞 NHA-AKT(-)-RL 細胞を樹立した。AKT(+)-FL 細胞および AKT(-)-RL 細胞の「細胞数の変化」は、それぞれの「luciferase 活性の変化」に置き換えられることを証明した後に、混合培養に化合物ライブラリーを作用させ、スクリーニングを行い、Fumitremogin C という ABC トランスポーター阻害剤に AKT-pathway 特異的阻害剤としての効果があることを同定した。

以上から、樹立した阻害剤スクリーニング系は通常の Dual-Luciferase-Assay を用いて簡便に増殖アッセイが可能で、ハイスループット・スクリーニング・システムとして応用可能であることが示された。本システムの有用性が証明され、今後薬剤スクリーニングの分野における技術向上に直結する効果が望まれることに加えて、Crk 阻害剤と脳腫瘍幹細胞の関連が証明されれば、最近重要性が提唱されている「脳腫瘍幹細胞を標的とする新規治療法開発」にも貢献することが期待され、今後高い学術的インパクトを有する成果が期待された。

審査会での発表における質疑応答では、石田晋教授より、一般に腫瘍治療の標的分子を決定するための戦略についての質問があった。次に佐邊壽孝教授からは、正常脳でも Crk の発現が見られたが、Crk は分子標的治療薬の標的となるかどうかについての質問があった。濱田淳一准教授から Crk-I と Crk-II の機能の違いについての質問があった。秋田弘俊教授から他の腫瘍において Crk の変異や過剰発現の有無についての質問があった。最後に田中伸哉教授から Fumitremogin C (FTC) の標的分子であるトランスポーターBCRP と AKT の関与の有無について、また細胞内での FTC 作用メカニズムについての質問があった。いずれの質問に対しても申請者は自ら行った研究やその過程で得られた知見、参考とした文献の引用をもとに的確に回答した。

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。