

学 位 論 文 題 名

頭頸部扁平上皮癌におけるシグナル伝達アダプター分子 CRKLの機能に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】頭頸部悪性腫瘍は、口腔、咽頭、喉頭、鼻副鼻腔、唾液腺、甲状腺などを含み、最も頻度の高い組織型は扁平上皮癌である。多くは局所再発、リンパ節転移、遠隔転移をおこし、その予後は不良であり、頭頸部扁平上皮癌の発癌に関与する分子機構を解明し、新規治療薬の発見をすることはいまだ重要である。一方シグナル伝達アダプター分子 CRK (CT10 regulator of kinase)は、様々なヒト悪性腫瘍において悪性化に関与する重要な分子であることがすでに知られている。CRK-like (CRKL)は、CRK の血球系細胞優位の相合体であり、慢性骨髄性白血病において BCR-ABL チロシンキナーゼによりリン酸化されることが報告されている。しかし、その非血球系腫瘍における役割はいまだ明らかにされていない。本研究においては頭頸部扁平上皮癌における CRKL の腫瘍悪性化に関する役割を検討した。

【材料と方法】北海道大学病院耳鼻咽喉科にて 2000 年から 2005 年に手術された舌癌 35 症例において、CRKL および CRK の発現と、臨床データとの相関を評価した。免疫組織染色を評価するために、染色強度を 0 から 3 までの 4 段階評価 (negative=0, weak=1, moderate=2, strong=3)とし、0-1 を low level、2-3 を high level とした。陽性細胞率は 0 から 3 まで 4 段階評価 (0%=0, 1-25%=1, 26-50%=2, >50%=3) とした。染色強度と陽性細胞率の合計を total score (0-6)とし、染色強度 0-1 または total score 0-3 を low level、total score 4-6 を high level と解釈した。頭頸部扁平上皮癌細胞株として HSC-2、HSC-3、HSC-4、Ca9-22、OSC20 および SAS を使用した。タンパクの発現を、ウエスタンブロット法を用いて解析し、次に CRKL または CRK と標的分子の結合の有無について免疫沈降法で確認した。HSC-3 または HSC-4 細胞株において、レンチウイルスを用いた RNA interference (RNAi)により、CRKL、CRKII または CRKI/II が恒常的にノックダウンされた細胞株 (CRKLi1019, CRKLi1064, CRKLi1205, CRKIIi847, CRKI/IIi550)を作成した。表現型を評価するために、細胞運動能、細胞接着能、細胞増殖能、蛍光免疫染色による細胞接着斑およびヌードマウスを用いた *in vivo* で腫瘍形成能の検討を行った。また、増殖関連因子のリン酸化と、プルダウンアッセイを用いた活性化型 Ras、Rap1、Rac1 の解析を行った。さらに、CRKL、CRKII または CRKI/II ノックダウンにおける細胞増殖能および細胞接着能と、CRKII ノックダウンにおける活性化型 Rap1 の解析を行った。

【結果】1) 頭頸部扁平上皮癌組織では正常舌組織と比べて CRKL および CRK の高発現を認めた。CRKL・CRK の染色強度および total score は、臨床病期・T 分類・リンパ節転移・生存率などの臨床データとは相関しなかった。2) 6 つの頭頸部扁平上皮癌細胞株において、ウエスタンブロット法にて CRKL、CRK およびその関連分子の発現を認めた。特に、HSC-3、HSC-4 細胞株において、C3G と DOCK180 の発現の増加がみられた。3) 免疫沈降法にて、CRKL と C3G および p130^{Cas}、CRK と p130^{Cas} の結合を認めた。しかし、CRKL と DOCK180、CRK と C3G および DOCK180 との結合はみられなかった。4) CRKL ノックダウン細胞(HSC-3, HSC-4)は、I 型コラーゲンおよびフィブロネクチンに対して有

意な接着能の減少がみられたものの、ポリエリジンに対しては変化を認めなかった。また蛍光免疫染色法にて、上記細胞外基質に対して接着後にパキシリンを観察したところ、いずれにおいても CRKL ノックダウン細胞では細胞接着斑形成の減少を認めた。5) プルダウンアッセイにて、CRKL ノックダウン細胞において活性化型 Rap1 の減少がみられた。以上のことから、CRKL は C3G-Rap1 を介したインテグリン依存性細胞接着を制御していると考えられた。また血清刺激下のプルダウンアッセイにおいては、Rac1 では活性化型は認められず、Ras では活性化型は認められるものの、コントロールと CRKL ノックダウンにおいては差が認められなかった。6) HSC-3、HSC-4 細胞株の CRKL ノックダウン細胞において、細胞運動能、増殖能の低下を認めた。7) ヌードマウスの皮下に HSC-3 細胞株を注入したところ、CRKL ノックダウン細胞ではコントロールと比べ、腫瘍形成能の低下を認めた。8) CRKII、CRKI/II および CRKL ノックダウンにおいて、ほぼ同程度に細胞増殖能の低下を認めた。9) 細胞外基質に対し、CRKII と比べて CRKL ノックダウン細胞において接着能の低下を認めた。10) CRKII ノックダウン細胞における Rap1 のプルダウンアッセイにおいて、コントロールと比べて CRKII ノックダウンにおいては、活性化型 Rap1 の変化を認めなかった。

【考察】CRK は、免疫組織染色にて様々な癌や肉腫で過剰発現し、さらに CRK ノックダウンにより細胞接着、運動、増殖および *in vivo* の造腫瘍能を含めた複数の癌化に関わる機能が低下することが報告されている。本研究は、CRKL も CRK と同様に、細胞運動能、接着能、増殖能および *in vivo* の造腫瘍能を制御していることを明らかにした。実際、CRKL は一つの SH2 と二つの SH3 ドメインを持ち、CRKII と高い配列類似性を持つため、機能という点においても類似している可能性が考えられる。一方、免疫沈降では、HSC-3 細胞では C3G の優勢な結合タンパクは、CRK ではなく CRKL であることがわかった。これらの結果から、CRK と CRKL の機能的優位性は、組織によりまたは細胞により異なることが想定された。CRKL と CRK の遺伝子座は完全に異なっており、遺伝子レベルでは、頭頸部扁平上皮癌の癌化においては CRKL がより重要であるのかもしれない。

C3G は Rap1 のグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)であり、CRK を通して活性化されることが報告されている。また Rap1 はインテグリン依存性細胞接着に寄与しており、C3G 依存性の Rap1 活性化は細胞接着、細胞播種を制御している。本研究では、CRKL と C3G の結合が認められ、CRKL ノックダウンでは活性化型 Rap1 が減少し、細胞接着・細胞増殖も低下していることから、頭頸部扁平上皮癌においては、インテグリン-p130^{Cas}-CRKL-C3G-Rap1 シグナル経路が細胞接着を通して細胞増殖に重要な役割を果たしていると考えられた。対照的に、DOCK180 は Rac の GEF で、CRK により活性化されることが報告されているが、プルダウンアッセイにおいて活性化型 Rac1 は認められず、免疫沈降にて DOCK180 と CRKL、CRK の結合は認められなかった。これらより、HSC-3 細胞においては、CRKL に関連する癌化の機能には DOCK180 は直接関連しないことが示された。

【結論】CRKL は細胞増殖能、運動能、接着能および *in vivo* 造腫瘍能に関与し、特に細胞接着においては、C3G-Rap1 経路を介してインテグリン依存性に細胞接着を制御していると考えられた。一方、CRK は CRKL と同様に細胞増殖能を制御するものの、細胞接着においては CRKL のほうが優位であると思われた。本研究の結果から、CRKL は扁平上皮癌における抗癌剤の新規ターゲットになりえる。今後は、CRKL の細胞増殖、接着、運動などに関連するシグナル経路をさらに詳細に解析し、薬剤スクリーニングにより頭頸部扁平上皮癌に対する CRKL に関連するシグナルを特異的に阻害する新規治療薬の開発が期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	大場雄介
副査	教授	福田 諭
副査	教授	佐邊 壽孝
副査	准教授	濱田 淳一

学位論文題名

頭頸部扁平上皮癌におけるシグナル伝達アダプター分子 CRKLの機能に関する研究

頭頸部扁平上皮癌の進行期の予後は不良であり、人が生きる上で重要な機能が集中する部位に発生する腫瘍という特異性から、外科的切除にも限界がある。また扁平上皮癌に対する有効な化学療法、分子標的治療薬は限られているため、頭頸部扁平上皮癌の発癌や悪性化に関与する分子機構を解明し、新規治療法を開発することは本疾患に立ち向かう上で重要な課題である。一方、シグナル伝達アダプター分子 CRK (CT10 regulator of kinase)は、様々なヒト悪性腫瘍の悪性化に関与する重要な分子であることが知られている。CRK ファミリーには血球系細胞での発現が有意な CRK の相同体である CRK-like (CRKL)があり、慢性骨髄性白血病細胞において BCR-ABL チロシンリン酸化キナーゼの基質となるなど血球系での機能が注目されているが、非血球系腫瘍での役割はいまだ明らかにされていない。本研究においては頭頸部扁平上皮癌の悪性化における CRKL の役割を検討した。

発表者は、ヒト頭頸部扁平上皮癌組織において CRKL および CRK が高発現し、かつそれらの高発現群では有意差はないものの粗生存率が低い傾向にあることを示した。また、CRKL が細胞増殖能、運動能、インテグリン依存性接着能および *in vivo* 造腫瘍能を制御していることを明らかにした。免疫沈降では CRKL が C3G および p130^{Cas} と結合していること、さらに CRKL ノックダウンによって細胞接着依存性 Rap1 活性化が抑制されることから、インテグリン-p130Cas-CRKL-C3G-Rap1 シグナル経路が細胞接着を制御することを明らかにした。以上から、頭頸部扁平上皮癌において CRKL は腫瘍の悪性化に重要な役割を持つ可能性があると考えられた。

発表後、副査の福田教授から、進行期の頭頸部扁平上皮癌では治療成績が低いいため、その悪性化に関わる研究が重要であるとのコメントがあった。また、用いた頭頸部扁平上皮

癌組織の亜部位および治療の統一性について、免疫染色において核・細胞質の両方が染色されている点に関しても質問があった。さらに、CRKL が予後因子、治療標的分子のどちらと考えているのかという質問と、免疫染色と臨床データについて有意差を認めなかったにもかかわらず新規治療標的となりうると断言してよいものかとのコメントがあった。次に副査の佐邊教授から、CRKL および CRK の発現プロファイルについて質問があった。また本研究の出口は何か、生存率に差がないのに本研究を継続するのは何故か、現在は一因子で癌を治療することは困難で複数の因子が絡むものであると考えられ、本研究では CRKL の一因子について検討しているが、本研究の最終目標は何か、など現在の癌研究に対する基本的な考え方や姿勢についての意見があった。続いて副査の濱田准教授からは、正常組織における CRKL および CRK の発現パターンの違い・機能の違いについて、免疫染色でリン酸化 CRKL の染色性についても検討したかという質問とともに、リン酸化 CRKL だけの発現と生存率を検討したら生存率に差がでるのではないかとのコメントがあった。また、CRKL 陽性かつ CRK 陽性症例の粗生存率についての質問と CRKL および CRK の細胞内での局在と核内での機能についての質問があった。最後に主査の大場教授から、インテグリン-CRKL-C3G-Rap1 が頭頸部扁平上皮癌におけるメインのシグナル伝達経路であると考えてもよいかという質問があり、その上で C3G、Rap1、CRK のホモ欠失マウスの表現形に関する質問があった。さらにそれらノックアウトマウスの表現形に基づいて、CRK の機能を抑制するような治療法の是非に関する議論がなされた。また、正常と違う癌細胞特異的なシグナル伝達経路があり、そのような違いを治療標的として研究対象としてはどうかなど、研究に対する考え方について意見があった。発表者はいずれの質問に対しても自身が持つ予備的データや過去の文献を引用しつつ適切に回答し、また提起されたコメントや意見に対しても真摯に議論した。

この論文は、頭頸部扁平上皮癌において CRKL が悪性化に重要な役割を果たしていることを示しており、今後の頭頸部扁平上皮癌の予後因子、治療方針決定要素、あるいは新規治療標的探索の基盤になるものと期待される。

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。