

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 我妻 智博

### 学位論文題名

不死化ヒトアストロサイトの腫瘍化におけるアダプター分子 Crk の機能解析

【背景と目的】 アダプター分子 Crk は、スプライシングバリエーションとして CrkI (SH2-SH3) および CrkII (SH2-SH3-SH3) が存在し、脳腫瘍においては双方が過剰発現していることが報告されているが、それぞれが細胞の癌化にもたらす機能の相違については不明である。本研究では、不死化正常ヒトアストロサイト (Normal Human Astrocyte; NHA、星状細胞) を用いて、分子生物学的手法により Crk の過剰発現がヒトアストロサイトの悪性化に与える影響を解析した。

【材料と方法】 本研究には、NHA-TS (Normal Human Astrocytes immortalized by hTERT and SV40ER, earlyregion) 細胞を使用した。この細胞に CrkI および CrkII 発現用レトロウイルス (pCX4-puroFlag-CrkI および pCX4-puroFlag-CrkII) を感染させ、CrkI 過剰発現株 NHA-TS-C1 および CrkII 過剰発現株 NHA-TS-C2、およびその陰性コントロール細胞を作製した。

- ① 細胞増殖能： $1 \times 10^5$  個の細胞を 10% ウシ胎児血清含有 DMEM に懸濁し、直径 60 mm の細胞培養皿またはタイプ I コラーゲン塗布培養皿上に播種し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  環境下にて培養した。翌日より連続 4 日間、血球計算盤 (Fisher Scientific, USA) を用いて細胞数を計測した。
- ② 細胞運動能 (創傷治癒試験)：タイプ I コラーゲンを塗布した 35 mm 培養皿に、 $1.0 \times 10^5$  個の CrkI および CrkII 過剰発現細胞を播種した。24 時間後、100% コンフルエントになった各種細胞株表面にイエローチップを用いて一直線を引き、PBS で洗浄後、新しい培養液に交換した。 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  環境下で培養し、0、5、7 時間後の細胞の移動度を測定した。細胞の移動距離の測定は、3 回の実験において培養皿上の 4 視野をランダムに選び、傷害面間隙を測定し、それらの平均値と標準偏差を算出した。
- ③ 足場非依存性増殖能 (コロニーフォメーションアッセイ)：直径 60 mm の培養皿に 0.7% bacto agar 含有培地 (5 ml) を添加し、固化させた。その後、0.36% noble agar (3 ml) に  $2 \times 10^4$  個の細胞を懸濁し、作製した bacto agar 上に分注した。冷却後培地が固まったことを確認後、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下で 3~4 週間培養し、ゲル内のコロニー数を計測した。
- ④ Rac-1 及び Ras のプルダウンアッセイ：Rac-1 及び Ras の活性化は、プルダウンアッセイにて解析した。CrkI および CrkII 過剰発現細胞は、100 mm コラーゲン塗布培養皿上で約 80% の細胞密度で培養後、lysis buffer で可溶化し、14,000 g、 $4^{\circ}\text{C}$ 、1 分間遠心後、上

清を細胞抽出液とした。活性化 Rac-1 の測定には、2 mg のタンパク質に GST-Pak1 10  $\mu$ g 及び Glutathione Sepharose 4B を 20  $\mu$ L 添加した。一方、活性化 Ras の測定には、1 mg のタンパク質に Raf-1 RBD agarose (Millipore) を 10  $\mu$ L 添加した。4  $^{\circ}$ C で 1 時間回転後、遠心し、沈降したビーズを lysis buffer で 3 回洗浄し、2 $\times$ Laemli Buffer を 20  $\mu$ L 加え、95  $^{\circ}$ C で 5 分間処理後に遠心沈殿し、それぞれの上清を 20  $\mu$ L 泳動した。

**【結果】** CrkI 過剰発現ヒトアストロサイトにおけるチロシンリン酸化状態を検討したところ、CrkI 過剰発現株である NHA-TS-C1 細胞においては、p130Cas 及び paxillin と思われる 130 kDa と 70 kDa 付近のタンパク質のチロシンリン酸化が検出された。一方、CrkII 過剰発現株である NHA-TS-C2 細胞においては、CrkII と推測される 37 kDa 付近のタンパク質のリン酸化が有意に亢進していた。

NHA-TS-C1 細胞において Crk は p130Cas と直接結合し、親株と比べて結合量も増加した。細胞増殖能は NHA-TS-C1 細胞が優位に亢進したが、細胞運動能は CrkII 過剰発現株である NHA-TS-C2 細胞が有意に亢進した。これらの結果より、NHA-TS-C1 細胞は増殖シグナルを、NHA-TS-C2 細胞は運動能を亢進していることが示唆されたため、次に Crk の下流因子である Rac-1 および Ras の活性化を解析した。NHA-TS-C1 細胞においては Ras が、NHA-TS-C2 細胞においては Rac-1 がそれぞれ活性化していた。この結果から、CrkI は Ras の活性化を通じて増殖シグナルを、CrkII は Rac の活性化を通じて運動性を活性化していることが示唆された。さらに、正常ヒトアストロサイトにおいて、CrkI は足場非依存性増殖能を促進するが、一方 CrkII はこれを抑制することが明らかとなった。

**【考察】** CrkI 過剰発現ヒトアストロサイトにおいて、CrkI はリン酸化 p130Cas と直接結合していることが明らかとなった。チロシンのリン酸化が検出された 70 kDa のタンパクに関しては、分子量の増大が認められなかったため、リン酸化パキシリンである可能性と、Crk との結合量が非常に少ないことから、別のリン酸化タンパク質 (Zap70 等) である可能性が示唆された。

CrkI の過剰発現は、通常ヒトアストロサイトにおいて足場非依存性増殖能を促進するが、CrkII は逆にこれを抑制することが明らかとなった。従来 CrkI および CrkII は、過剰発現により双方が細胞の悪性度を亢進すると考えられていたが、正常ヒトアストロサイトにおいては、CrkII の過剰発現は悪性度を亢進させなかった。これらの結果から、CrkII が細胞の悪性度亢進に寄与する為には、細胞に何らかの遺伝子変異(増殖シグナルの活性化等)が必要である可能性が示唆された。本研究における一連の実験から、過剰発現された CrkI および CrkII は、明確に異なる機能を有していることが示された。

**【結論】** 正常ヒトアストロサイトにおいて、CrkI の過剰発現は足場依存性および非依存性増殖能の両方を促進し、CrkII の過剰発現は細胞運動能を亢進するが、足場非依存性増殖能は抑制することが明らかとなった。以上から、CrkI および CrkII は、正常ヒトアストロサイトにおいて明確に異なる機能を有していることが明らかとなった。