

## 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 柳 紘子

### 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

**【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同体であり、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<sup>Cas</sup>、CRK と p130<sup>Cas</sup> 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、ポリエル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) ノ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<sup>Cas</sup>-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。