

## 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 宮崎 将也

### 学 位 論 文 題 名

CRK-DOCK 関連シグナル伝達分子の分子病理学的解析  
(Molecular pathological analyses of CRK-DOCK related signaling molecules)

【背景と目的】 CRK (CT10 regulator of kinase)は、その起源としてニワトリの肉腫細胞 CT10 (chicken tumor No.10)より分離されたレトロウイルスがコードする癌遺伝子 v-CRK として発見された、SH2 ドメインと 2 つの SH3 ドメインからなる分子である。この CRK は、細胞接着刺激や成長因子などの上流から入ったシグナルを DOCK180 (downstream of CRK 180 kDa protein)などの下流のタンパク質に伝達するシグナルアダプター分子としての機能を有する。また、CRK には、異なる遺伝子にコードされるが構造的・機能的に類似する分子 CRKL (CRK-like)が存在する。

DOCK (Downstream of CRK)ファミリータンパク質は Rho ファミリー低分子量 G タンパク質(Rho GTPase)の GDP を GTP に変換して活性型とするグアニンヌクレオチド変換酵素(guanine-nucleotide exchange factor, GEF)の一つであり、上流から来るシグナルを下流に伝える律速段階となる重要な分子である。DOCK ファミリーの代表的な分子である DOCK180 (DOCK1)は SH3 ドメイン、DHR-1 ドメインおよび DHR-2 ドメインからなる Rac 特異的な GEF で、細胞の形態変化や運動などに寄与する。

これら CRK-DOCK ファミリータンパク質は細胞のシグナル伝達系を構成する重要な要素の 1 つで、実際にこれまで脳腫瘍をはじめとしたいくつかの腫瘍で高発現しその悪性化、浸潤、転移に寄与するといった報告がなされており、バイオマーカーのとしての価値が期待できる。また近年、インフルエンザ A ウイルス関連タンパク質 NS1 が CRK/CRKL の SH3 ドメイン結合タンパク質としてその機能が報告されたが、現在のところ報告数は少なく、より詳細な解析は CRK タンパク質およびインフルエンザ A ウイルスへの理解を深めることにも繋がる。この CRK-DOCK ファミリータンパク質の機能解析を目的として、第一章で病理学的手法、第二章では分子生物学的手法をそれぞれ用いて分子病理学的に研究を行った。

第一章：

【対象と方法】北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学講座で 2005 年から 2011 年に診断された初発のグリオブラストーマ 117 症例のパラフィン包埋ブロックを用い、CRK-DOCK ファミリータンパク質を中心として種々のタンパク質 (CRK, CRKL, DOCK180, EGFR, PDGFR $\alpha$ , MET, MGMT) の免疫染色を行い、臨床情報との相関関係を検討した。免疫染色は、腫瘍細胞の染色割合(proportion score, PS)および染色強度(intensity score, IS)をそれぞれ 0~3 の 4 段階で評価し、その合計点(total score, TS)を算出することにより評価した。

【結果】 DOCK180、CRK および CRKL は、染色強陽性群が弱～中陽性群に対して良好な予後を示し、特に CRKL では統計学的な有意差を得た。また、EGFR、PDGFRa、MET の各受容体型チロシンキナーゼは、染色強陽性群が弱～中陽性群に対して予後が不良な傾向を示し、特に MET では統計学的な有意差を得た。MGMT は、わずかな染色陽性(TS2)の群でも染色陰性(TS0)の群に対して統計学的に有意に予後不良となり、多変量解析の結果、それは独立した予後因子であることが示された。

【考察】 EGFR、PDGFRa、MET の各受容体型チロシンキナーゼの免疫染色結果と予後の相関がいくつか報告されているが、染色割合および染色強度の2つの観点から評価を行っている報告はない。今回我々が行った解析の結果からも EGFR、PDGFRa、MET の各免疫染色強陽性群が予後不良な傾向を示し、これまでの報告を確かなものとするものである。一方、DOCK180、CRK、CRKL の免疫染色でも同様に染色強度および染色割合にて陽性率を評価し、予後との相関関係を検討したところ、これら3つのタンパク質は全て染色陽性が予後良好となる傾向を示した。これまで報告されている研究では DOCK180、CRK および CRKL はグリオーマの悪性化に寄与するとされており、今回の我々の免疫染色における検討はこれと反対の結果となった。これは、グリオブラストーマの悪性度を促進する受容体からのシグナル伝達経路で最も亢進している重要な経路 (driver pathway) は CRK-DOCK 経路とは別の経路であり、結果として CRK-DOCK 経路は負のフィードバックを受け、相対的に発現が低いと考えられる。しかし、これら3つのタンパク質はベアスラインの発現が非常に高く、腫瘍の形成そのものには重要な因子であることが推察できる。MGMT 発現は、免疫染色にて定量的に評価することで TMZ 治療に対する効果との統計学的な相関関係を見出し、日常診療での MGMT 免疫染色評価の臨床病理学的意義を確認した。

## 第二章：

【材料と方法】 HEK293T 細胞に CRKL、インフルエンザ A ウイルス由来タンパク質 NS1 (nonstructural protein 1)、ヒト細胞内タンパク質 NS1-BP (NS1-binding protein) の各タンパク質を種々の組み合わせで一過性に過剰発現させ、ウエスタンブロット法、MTT アッセイ、プルダウンアッセイ等を用いて解析した。

【結果】 HEK293T 細胞内で CRKL、NS1 および NS1-BP の三者が複合体を形成することを確認し、さらに NS1-BP との結合に重要な CRKL 側のドメインを SH3(N) と同定した。また、これらの生化学的な機能として、NS1 が CRKL と協調して ERK のリン酸化を亢進させることにより細胞の生存活性を上昇させ、NS1-BP はそれに抑制的に働くことを見出した。

【考察】 CRKL、NS1 および NS1-BP の細胞内での相互作用を解析し、これらの分子がインフルエンザ A ウイルス感染細胞で果たす役割について検討した。ERK 活性および細胞活性の制御におけるウイルス由来タンパク NS1 との関係という観点で、宿主タンパク質 NS1-BP の新たな機能を見出した。さらに、インフルエンザ A ウイルス感染における NS1 および NS1-BP の相互作用における CRKL の関与を確認し、新知見を得た。