



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Analysis of mechanism of adaptor protein Crk-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) and its implication to human cancer metastasis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Elmansuri, Aiman Zidan Ahmed
Description	配架番号 : 2067
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11195号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55573
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Aiman_Zidan_Ahmed_Elmansuri_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 アイマン ジダーン アハメド エルマンソリ

	主査	教 授	秋田 弘俊
審査担当者	副査	教 授	松野 吉宏
	副査	教 授	白土 博樹
	副査	教 授	近藤 亨

学 位 論 文 題 名

Analysis of mechanism of adaptor protein Crk-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) and its implication to human cancer metastasis
(アダプター分子 Crk による上皮間葉移行機構とヒト癌転移誘導におけるその役割の解明)

Crk はチロシンキナーゼと低分子量 G タンパク質をリンクするアダプター分子である。哺乳類の野生型の Crk 分子はスプライシングの違いにより Crk-I と Crk-II の 2 つのフォームが存在する。Crk はチロシンリン酸化を受けた増殖因子受容体や細胞接着斑の構成分子と SH2 で結合する。Crk の nSH3 と結合した C3G や Dock180 などのグアニンヌクレオチド交換因子が膜近傍に局在することで、低分子量 G タンパク質 Rap、R-Ras、Rac などが活性化され、細胞の接着、運動、増殖、分化など様々な反応が制御される。Crk は肺癌を含む多くの悪性腫瘍で発現が高く立体構造の異なる Crk-I と Crk-II はそれぞれ異なるシグナル調節を行うことが示唆されているが、肺癌及びその転移におけるそれぞれの分子の役割は不明である。

今回の研究では以下の 6 つのストラテジーを用いて肺癌及びその転移における Crk-I と Crk-II の役割を検討した。①肺癌細胞株における Crk-I、Crk-II 及び Crk 結合蛋白の発現解析、②サイトカインや成長因子による Crk-I/-II の発現誘導、③Crk-I/-II それぞれの高発現肺癌細胞株における表現型の解析、④Crk-I/-II それぞれの高発現肺癌細胞株における上皮間葉移行関連分子の発現解析、⑤Crk-I/-II それぞれの高発現肺癌細胞株における TGF- β 1 誘導上皮間葉移行(epithelial-mesenchymal transition; EMT)調節解析、⑥ヒト肺癌手術検体における Crk-I/-II の発現と患者予後の解析。

肺腺癌細胞株(A549, LCMS, LOCK, PC9)及び肺扁平上皮癌細胞株(H226, PC10)において Crk-I、Crk-II 及びその結合蛋白である C3G、Dock180 の高発現を認めた。Epidermal growth factor (EGF)、platelet-derived growth factor-A (PDGF-A)、Transforming growth factor- β 1(TGF- β 1)、Interleukin-2(IL-2)、Lipopolysaccharide(LPS)刺激により Crk-I/-II のプロモーター活性は亢進し TGF- β 1 刺激によりは CrkI 及び CrkII のいずれの蛋白も発現が亢進した。Crk-I 及び Crk-II 過剰発現 A549 細胞ではいずれにおいても運動能、浸潤能が亢進したがマウス尾静脈注入での肺転移モデル実験では Crk-I 過剰発現細胞で Crk-II 過剰発現細胞よりも有意な転移能の亢進を認めた。Crk-I、Crk-II いずれの高発現細胞株でも EMT 関連分子である Snail、Slug の発現は亢進し上皮性マーカーである E-cadherin の発現低下、間葉系マーカーである Fibronectin、N-cadherin、Matrix Metalloproteinase-2

(MMP-2)の発現亢進を認めた。Rac 阻害剤により Snail、E-cadherin の発現低下と Fibronectin、MMP-2 発現上昇、RhoA 阻害剤により Slug、N-cadherin、MMP-2 発現低下を認めたことより Rac1-Snail-E-cadherin/Fibronectin のシグナルと RhoA-Slug-N-cadherin のシグナルが相互排他的に存在している可能性が示唆された。さらに Crk-I、Crk-II いずれの高発現細胞株においても TGF- β 1及び TGF- β 1R の発現が上昇し、その下流の SMAD2/3 のリン酸化は亢進した。この現象は TGF- β R 阻害剤により抑制された。またこの現象は Crk-II 高発現細胞株と比較して Crk-I 高発現細胞株で優位であった。最後に 111 人の肺浸潤癌患者の手術検体を用いて抗 Crk-I/-II 抗体を用いて肺癌における発現度をその割合及び強度をスコア化して調べた。腫瘍全体ではその発現と予後に関連を認めなかったが、浸潤部位において Crk-I/-II 高発現患者では Crk-I/-II 低発現患者と比べて有意に予後は不良だった。

過去の研究を合わせ、申請者は肺癌では浸潤部位において癌周囲環境における TGF- β 1 が Crk-I/II 発現を誘導し Rac1 及び RhoA の活性亢進を介して Snail、Slug の発現亢進を介した EMT 誘導により転移巣が形成されるというメカニズムを推測した。また、癌細胞自身もオートクラインのメカニズムにより TGF- β 1、TGF- β 1R の発現亢進を介して転移能を上昇させる可能性を推測した。本研究によって、肺癌細胞における Crk 発現とその周囲環境に存在する TGF- β 1を含むサイトカインや成長因子との相互作用を阻害することにより転移を含む癌の悪性化を制御できる可能性があることを示唆した。

発表後、副査の近藤教授から Crk-I よりも Crk-II の発現が肺癌細胞株で亢進しているがサイトカインや成長因子と Crk-II のリン酸化のメカニズム、Crk による TGF- β 1、TGF- β 1R 発現制御メカニズムなどについて質問があった。副査の松野教授から肺癌標本における浸潤部位の定義や E-cadherin との関連に関して質問があった。また副査の白土教授から TNM 分類や病期との相関に関して質問があった。最後に、主査の秋田教授から Crk-I 及び Crk-II の発現を免疫染色で区別することは可能かなどに関して質問があった。申請者はこれらの質問に対して自らの研究結果や先行研究の研究成果に基づいて概ね妥当な回答を行った。

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。