



Title	CRK-DOCK関連シグナル伝達分子の分子病理学的解析
Author(s)	宮崎, 将也
Description	配架番号 : 2109
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11237号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11237
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58200
Type	doctoral thesis
File Information	Masaya_Miyazaki.pdf



学位論文

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)

2014 年 3 月

北海道大学

宮崎 将也

学位論文

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)

2014 年 3 月

北海道大学

宮崎 将也

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	6 頁
第一章 腫瘍における CRK-DOCK ファミリータンパク質の解析	8 頁
緒言	9 頁
方法	12 頁
結果	15 頁
考察	33 頁
第二章 非腫瘍性疾患における CRK-DOCK ファミリータンパク質の解析	36 頁
緒言	37 頁
方法	39 頁
結果	42 頁
考察	50 頁
総括および結論	52 頁
謝辞	53 頁
引用文献	54 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Masaya Miyazaki, Hiroshi Nishihara, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro, Lei Wang, Taichi Kimura, Mishie Tanino, Masumi Tsuda, Shinya Tanaka
NS1-binding protein abrogates the elevation of cell viability by the influenza A virus NS1 protein in association with CRKL
Biochem Biophys Res Commun. 2013 Nov 29;441(4):953-7.
2. Masaya Miyazaki, Hiroshi Nishihara, Shunsuke Terasaka, Hiroyuki Kobayashi, Shigeru Yamaguchi, Tamio Ito, Yuuta Kamoshima, Shin Fujimoto, Sadao Kaneko, Masahito Katoh, Nobuaki Ishii, Hiromi Mohri, Mishie Tanino, Taichi Kimura, Shinya Tanaka
Immunohistochemical evaluation of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) expression in 117 cases of glioblastoma
Neuropathology. 2013. in press.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 宮崎 将也、王 磊、長谷川 秀樹、津田 真寿美、西原 広史、田中 伸哉
ヒト細胞内蛋白質 NS1BP の機能解析
第 102 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 6-8 日 札幌
2. 宮崎 将也、西原 広史、藤本 真、加藤 正仁、伊東 民雄、木村 太一、谷野 美智枝、田中 伸哉
膠芽腫における MGMT 発現の臨床病理学的解析
第 93 回北海道医学大会病理分科会（第 46 回北海道病理談話会）
2013 年 10 月 12 日 札幌

3. Masaya Miyazaki, Hiroshi Nishihara, Tamio Ito, Yuuta Kamoshima, Shin Fujimoto, Masahito Katoh, Mishie Tanino, Taichi Kimura, Shinya Tanaka

Immunohistochemical evaluation of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) expression in 117 cases of glioblastoma
4th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology
November 21-24, 2013, San Francisco, California

緒言

CRK-DOCK ファミリータンパク質

シグナルアダプター分子 CRK は SH2 ドメインと 2 つの SH3 ドメインを有する分子で、元来は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 (CT10 regulator of kinase) として発見された¹⁻³。そののちに、哺乳類の野生型癌遺伝子 c-CRK が同定され、さらにはスプライシングの違いによるアイソフォームである CRKI および CRKII の存在が示された⁴。また、CRKII に類似するが異なった遺伝子にコードされる分子 CRKL (CRK-like) が、慢性骨髄性白血病の原因遺伝子 BCR-ABL 融合遺伝子の基質蛋白質として同定された^{5,6}。

CRKII は p130^{Cas} や paxillin と SH2 ドメインを介して相互作用し、下流の C3G や DOCK180 などの SH3 ドメイン結合タンパク質にシグナルを伝達し、CRKL は前述の通り CRKII の SH2 ドメインおよび SH3 ドメインと高い相同性を有している⁷⁻⁹。これら CRK ファミリータンパク質は、乳癌、口腔癌、胃癌、膵癌、肺癌、脳腫瘍など、様々なヒト腫瘍で高発現していることが報告されており、腫瘍の増殖能を亢進させ悪性化に寄与することが示唆されている¹⁰⁻¹⁵。また、非腫瘍性疾患においてはマクロファージや T 細胞などの免疫系への関与^{16,17} や、神経細胞の軸索伸長といった神経分化への関与^{18,19}、いくつかの感染症との関与²⁰⁻²⁷ などが報告されている。

グアニンヌクレオチド変換酵素(guanine-nucleotide exchange factor, GEF)の一つである DOCK180 (downstream of CRK 180 kDa protein)は、1996 年に c-CRK の下流で働く 180 kDa のがん原遺伝子として同定され、アクチン骨格の制御に関与することが示された⁸。二年後には、放射性同位体を使用した生化学的検討にて DOCK180 が Rac 特異的な GEF 活性を有することが判明した²⁸。

DOCK180 は N 末端側から順に SH3 ドメイン、Dock homology region (DHR) -1 ドメインおよび DHR-2 ドメインからなり²⁹⁻³¹、C 末端側に複数の proline-rich motif を有している。このうち DHR-2 ドメインが Rac に対する触媒活性を有しており、DHR-1 ドメインに関しては phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃) と結合することが示されている^{32,33}。また、CRK アダプタータンパク質は自身の SH3 ドメ

インを介して DOCK180 の C 末端側の proline-rich 配列と相互作用を持つことが知られている³⁴。さらに、DOCK180 の SH3 ドメインに対しては、ELMO(engulment and cell motility proteins)が自身の proline-rich 配列を介して結合することが知られている。しかしながら、DOCK180 は非常に大きなタンパク質であるため、その機能は不明な点が依然として多いと考えられ、特に DHR-1 および DHR-2 ドメイン以外の部位の機能に関しては解明が待たれるところである。

DOCK180 はシグナルアダプター分子 CRKII と複合体を形成し、CRKII-DOCK180 複合体は種々の細胞内シグナル伝達経路に関与する^{35,36}。CRKII の SH2 ドメインはリン酸化した p130Cas や paxillin などのアダプタータンパク質と結合する^{37,38}。細胞接着シグナルや成長因子によるシグナルが入ると、チロシンリン酸化した p130Cas や paxillin が CRKII-DOCK180 複合体を接着斑など特定の細胞辺縁領域にリクルートし^{39,40}、そこで DOCK180 は下流の Rac1 シグナルを活性化する。Rac1 は低分子量 G タンパク質(small GTPase)、特に Rho ファミリー低分子量 G タンパク質(Rho GTPase)の 1 つであり、細胞外からのシグナルを伝達し細胞形態の変化を引き起こす細胞内機能を有する^{41,42}。この Rho ファミリー低分子量 G タンパク質は多くの基本的な細胞機能制御に関与しており、細胞周期の制御、分化、アクチン重合の制御による細胞形態変化の制御が主に挙げられる^{41,42}。Rac1 のような GTPase の役割は分子スイッチとしての機能であり、GTP と結合している活性化型あるいは GDP と結合している非活性化型の二つの形態がある。この二つの形態の移行に主に寄与しているのが、DOCK180 などのグアニンヌクレオチド変換酵素(guanine-nucleotide exchange factor, GEF)および GTPase 活性化タンパク質(GTPase-activating protein, GAP)である。GEF は GDP を GTP に変換し活性化型の GTPase を産生するため、この作用が、上流から来るシグナルを下流に伝える律速段階となり、非常に重要な要素となる^{35,36,41,42}。

DOCK180 はいくつかの腫瘍で高発現しその浸潤・転移に関与する⁴³⁻⁴⁷ことが報告されており、特に近年、グリオブラストーマにおける DOCK180 の重要性が報告されている^{43,44}。また、同じく CRK もグリオブラストーマにおいて高発現していることが報告されており⁴⁸⁻⁵¹、これら CRK-DOCK ファミリータンパク質がグリオーマの悪性化に大きく寄与していることが示唆される。

本研究論文では、これまで報告の多い CRK-DOCK ファミリータンパク質と腫瘍に関連して、バイオマーカーとして臨床応用することを目的として

その意義を検討するとともに、CRK-DOCK ファミリータンパク質の機能の更なる理解のために、これまで報告の少ない非腫瘍性疾患の代表としてインフルエンザウイルス感染における意義について検討を行ったので報告する。

第一章の腫瘍における CRK-DOCK ファミリータンパク質の解析では、免疫染色により CRK-DOCK ファミリータンパク質のグリオブラストーマにおける予後との相関を臨床病理学的に検討し、CRK-DOCK ファミリータンパク質の高発現が予後不良因子となる結果を得た。

第二章の非腫瘍性疾患における CRK-DOCK ファミリータンパク質の解析では、CRKL のインフルエンザウイルス増殖における新たな役割として、ウイルスタンパク質 NS1 と協調して ERK のリン酸化を亢進させウイルス増殖に有利になるように働くという結果を分子生物学的手法を用いて得た。また、宿主タンパク質 NS1-BP はそれに抑制的に働くということを明らかにした。

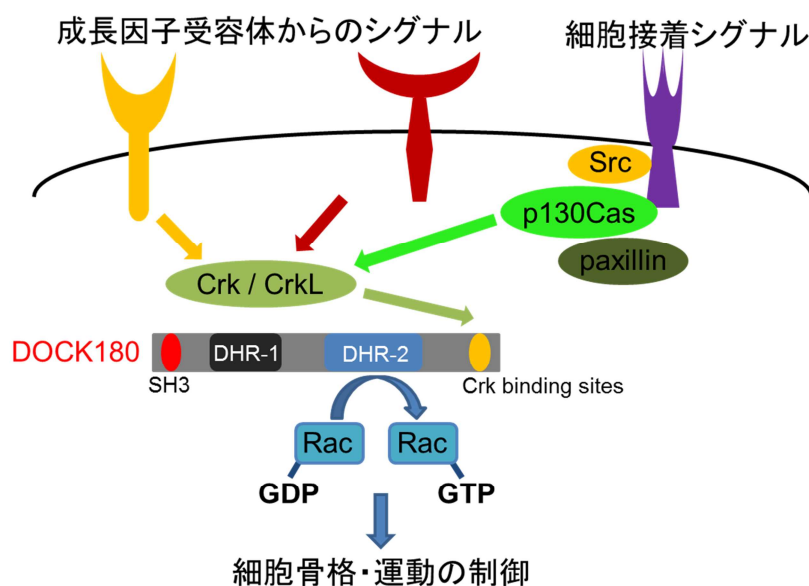


図1 CRK-DOCK ファミリータンパク質の細胞内シグナル伝達の模式図

略語表

本文および図中で使用した略語は以下の通りである。

BJ: Beijing

Bx: biopsy

CRK: CT10 regulator of kinase

CRKL: CRK-like

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

DOCK180: downstream of CRK 180 kDa protein

DOCK2: downstream of CRK 2

FBS: fetal bovine serum

GAP: GTPase-activating protein

GBM: glioblastoma multiforme

GBMO: glioblastoma with oligodendroglioma component

GEF: guanine nucleotide exchange factor

GST: glutathione S-transferase

GTR: gross total resection

H&E: Hematoxylin & Eosin

IB: Immunoblot

ID: Indonesia

MGMT: O6-methylguanine-DNA methyltransferase

NS1: Nonstructural protein 1

NS1-BP: NS1-binding protein

OS: overall survival

PBS: phosphate-buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PDGFR: platelet-derived growth factor receptor

PFS: progression-free survival

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

PR: partial resection

PVDF: polyvinylidene difluoride

RNAi: RNA interference

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

SDS: sodium dodecyl sulfate

SH: Src homology

TBS-T: Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20

TCL: total cell lysate

TMZ: temozolomide

WHO: World Health Organization

第一章

腫瘍における

CRK-DOCK ファミリータンパク質の解析

(グリオブラストーマにおける CRK-DOCK ファミリー
タンパク質を中心としたバイオマーカーの探索)

緒言

これまでの研究から、CRK-DOCK ファミリータンパク質は肺癌、乳癌、胃癌、肉腫、脳腫瘍など様々な腫瘍で高発現していることが報告されており⁵²、特に脳腫瘍は当研究室からも以前に報告している⁴⁹ように、CRK-DOCK ファミリータンパク質の重要性が最も示唆されている悪性腫瘍の1つである。

脳腫瘍は、中枢神経系細胞に起源を有する原発性脳腫瘍と、他臓器の悪性腫瘍の転移からなる転移性脳腫瘍に大別される。原発性脳腫瘍の発生頻度は人口 10 万人に対して年間約 10 人とされており、グリオーマ (glioma) はその中でも最も頻度の高い悪性腫瘍の1つで、およそ 4 分の 1 を占める。グリオーマは WHO 分類では悪性度に応じて Grade I から IV に分類されており、中でも Grade IV のグリオブラストーマ (Glioblastoma multiforme, GBM) の 5 年生存率は 7% と極めて予後不良な腫瘍である⁵³。グリオブラストーマ治療の第一選択は外科的切除であり、予後と最も相関することが知られているのは切除率であるが、発生部位によっては機能温存の観点から完全切除することが困難な症例も少なくない。残念ながら完全切除とならなかった症例に関しては術後の放射線療法および化学療法がより重要となっており、現在ではグリオブラストーマの標準的化学療法としてテモゾロマイド (temozolomide, TMZ) が使用されている。これらの組み合わせで個々の症例の最善な治療法が選択されるが、その過不足ない正しい選択のため、予後予測あるいは治療効果予測因子の検討が重要となってくる。

TMZ はアルキル化剤の一種で、グリオブラストーマに対する化学療法として使われる薬剤である⁵⁴。TMZ は DNA のグアニンの 6 位の酸素原子をメチル化し、それにより新生 DNA 鎖には誤ってチミンが取り込まれる。その結果、ミスマッチ修復系による認識及び修復過程が誘導することにより DNA 損傷を引き起こし、細胞周期の停止及びアポトーシスを誘導することにより細胞増殖抑制作用を示す^{55,56}。

O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) は最もよく知られた DNA 修復能を持つタンパク質の1つである^{57,58}。MGMT は TMZ が引き起こしたグアニン O⁶ 位のメチル化を解除することにより、腫瘍の TMZ 耐性を引き起こす⁵⁹。実際に、TMZ を用いた放射線化学療法において、MGMT プロモーターがメチル化されることにより MGMT タンパク質発現が抑制

されている症例では、そうでない症例に比して 2 年の生存延長が報告されている⁶⁰。このため、グリオブラストーマの初発時に MGMT 陽性症例とそうでない症例を判定することは、TMZ の治療効果を予測する上で非常に重要である。

MGMT の発現は主に、プロモーター領域の CpG 配列のメチル化により制御されている⁶¹。メチル化特異的 PCR (MSP) による MGMT の状態の解析は以前より多くなされており、グリオブラストーマ患者の予後と関連することが示されている^{60,62-70}。その一方で、免疫組織化学的手法によるグリオブラストーマの MGMT 発現レベルの評価に関しては、いくつかの報告があるものの、その評価方法については確立しておらず、日常診断への適用を目指した基準の策定が待たれるところである⁶⁸⁻⁷²。

グリオブラストーマ (GBM) は発生的にはアストロサイト (astrocyte) に由来する腫瘍であるが、オリゴデンドロサイト (oligodendrocyte) に由来する腫瘍成分を混じるものがあり、Glioblastoma with oligodendroglioma component (GBMO) と診断される。組織学的には、アストロサイト系腫瘍成分は好酸性細胞質を有するアストロサイト類似の腫瘍細胞からなり、壊死や腎糸球体係蹄類似構造を示す血管増殖 (glomeruloid vessels) を特徴としている。一方、オリゴデンドロサイト系腫瘍成分は目玉焼き像と称される核周囲明暈 (perinuclear halo) を有する腫瘍細胞に加え、鶏小屋の金網像 (chicken wire pattern) と称される分岐と吻合を示す毛細血管網が特徴とされる。近年の報告で、先に述べた予後予測因子の確立の重要性をふまえ、病理診断的予後予測因子の候補の 1 つとして GBM と GBMO の間での予後の差が検討されているが、両者に有意な差を認めないとする報告^{73,74} と、GBM に比して GBMO では良好な予後を認めるとする報告⁷⁵⁻⁷⁸ があり、この点に関しては依然として議論となるところである⁷⁹。

前述のようにグリオブラストーマでは予後予測や治療、治療効果予想等に応用することのできる因子の検討が急務であり、CRK-DOCK ファミリータンパク質との関連については当研究室からもその重要性を報告している⁴⁹。また、DOCK180 関してもいくつかの報告で腫瘍の悪性化における関与が示唆されており⁴³⁻⁴⁷、特に近年はそのリン酸化がグリオブラストーマの悪性化、浸潤に重要であることが示されている⁸⁰⁻⁸²。また、各種シグナル伝達分子は上流の受容体からの刺激を下流に伝える役割を有するが、代表的な受容体型チロシンキナーゼである EGFR、PDGFR α 、MET などはグリオブラストーマにおいてその高発現が報告されている⁸³⁻⁸⁶。これらのタンパク質の発現を免疫組織化学的な報告はいくつか示されているが、その多くは染色割合にて

染色陽性あるいは陰性を決定しており、染色強度を評価材料として使用していない。しかしながら **HER2** の免疫染色に代表されるように、染色強度もしばしば臨床病理学的意義を有する。そこで我々は、グリオブラストーマにおけるこれらのタンパク質の発現を免疫組織化学的に検討することとし、その手法として染色割合および染色強度の両者を用いて定量的、客観的な評価方法を用いることとして解析を行った。

本章では、まず、解析に使用した患者集団に偏りがないかを検討するとともに、免疫染色の評価方法を策定しそれに誤りはないかを確認する目的で、グリオブラストーマのよく知られている予後因子である **MGMT** を対象として免疫染色を行った。その結果、これまでの報告から予想されたように、**MGMT** 陽性群(**Total score** ≥ 2)が有意に予後不良となるという結果を得、患者集団に偏りがないことを確認した。そのうえで、**CRK-DOCK** ファミリータンパク質を含むシグナル伝達関連分子の網羅的な免疫染色を行い、患者予後との相関関係を検討した。その結果、**CRK**、**CRKL**、**DOCK180** は免疫染色弱～中陽性群(**Total score** ≤ 4)が免疫染色強陽性群(**Total score** ≥ 5)に対して予後不良になること、また、**EGFR**、**PDGFR α** 、**MET** は免疫染色強陽性群が免疫染色弱～中陽性群に対して予後不良になるという結果を得た。

方法

1) 対象

本研究は、北海道大学病院および北海道大学医学部医学研究科の倫理委員会による承認のもと行われた。

対象症例は、北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野で 2005 年から 2011 年の間に GBM あるいは GBMO と初回診断された 117 症例とした。これらの症例の病理標本、パラフィン包埋ブロックおよび臨床経過は、後ろ向きに収集、調査した。組織診断においては、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを 3 μ m に薄切の後、ヘマトキシリンエオジン染色を施行し、診断した。

詳細な患者背景としては以下の通りである。前述の通り、当講座で 2005 年から 2011 年の間に診断された初発の GBM あるいは GBMO 患者 117 症例が検討の対象である。男性 73 人、女性 44 人、年齢中央値は 64 歳 (26 ~ 86 歳) であった。対象となった症例は初回治療として手術、後療法として放射線療法および化学療法を受けている。手術の内訳としては、生検 (biopsy, Bx) が 12 人 (10.3%)、部分切除 (partial resection, PR) が 50 人 (42.7%)、全摘出 (gross total resection, GTR) が 55 人 (47.0%) であった。対象となった 117 症例全員が後療法に放射線療法を施行されており、うち 115 名は 60 Gy/30 fr、1 名が 54 Gy/27 fr の照射量で、残りの 1 名は 40 Gy/20 fr で全脳照射を受けている。TMZ による術後化学療法は、117 名全員に行われている。(表 1)

表 1 117 症例の患者背景

患者特性	症例数 (%)	
Total	117	
Median age [range]	64 [28-86]	
Gender		
Male	73	(62.4%)
Female	44	(37.6%)
Pathological diagnosis		
GBM, not GBMO	98	(83.8%)
GBMO	19	(16.2%)
Extent of surgery		
Gross total resection	55	(47.0%)
Partial resection	50	(42.7%)
Biopsy	12	(10.3%)

2) 免疫組織化学

免疫組織化学的染色は、パラフィン包埋切片を 5 μm に薄切、スライドガラスに固定した後、脱パラフィンを実施、さらに抗原賦活化処理を抗原賦活化用プレッシャークーラーを用いて 3 分間実施した。その後、処理したスライドガラスを 3%過酸化水素を用いて 5 分間反応させた。一次抗体として使用した抗体は以下の通りである；抗 MGMT モノクローナル抗体 (Clone MT3.1, in dilution 1:200) (CHEMICON)、抗 CRK 抗体 (1:3000) (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA)、抗 CRKL 抗体 (1:500)、抗 DOCK180 抗体 (1:75) (Santa Cruz Biotechnology)、抗 EGFR 抗体 (希釈済み) (ニチレイバイオサイエンス)、抗 PDGFR α 抗体 (1:400) (Santa Cruz Biotechnology)、抗 MET 抗体 (1:200) (abcam)。発色には EnVision kit (DAKO) を用いた。

3) 免疫染色の評価

各標本の評価は臨床データ情報を持たない 3 人の病理医によって実施された。各タンパク質の発現は proportion score (PS) および intensity score (IS) の合計としての Total Score (TS) を算出することにより評価した。PS は MGMT 染色陽性の腫瘍細胞の割合を表し、0 (0%)、1 (1-10%)、

2 (10-50%)、3 (50%以上)の 4 段階に分けた。IS は MGMT 染色陽性の腫瘍細胞の染色強度を表し、0 (染色されない)、1 (弱い染色性)、2 (中等度の染色性)、3 (強い染色性)の 4 段階に分けて評価した。血管内皮細胞を内在性の陽性コントロールとして使用した。TS は PS と IS の和であり、0 から 6 までの 6 段階となる (すなわち、0、2、3、4、5、6)。

4) 統計学的解析

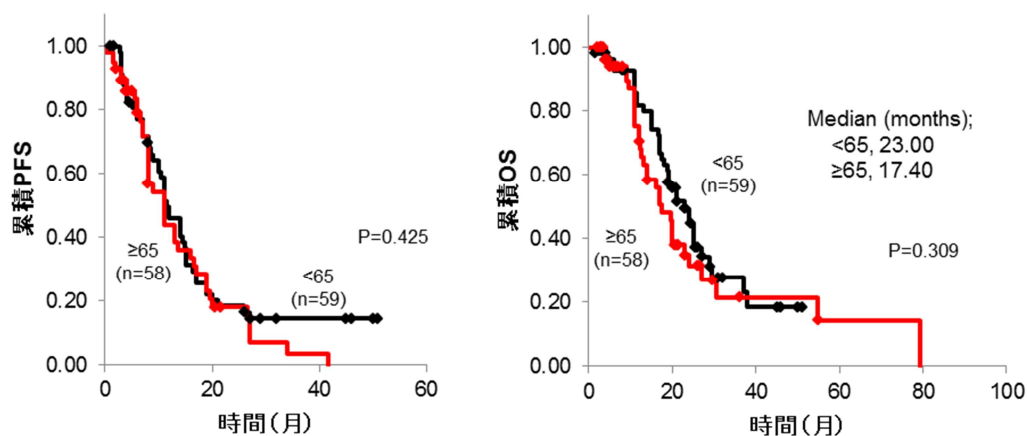
統計学的解析には Excel 統計 2012 を使用した。MGMT 発現と臨床病理学的検討に関しては χ^2 検定、もしくは Fisher exact test を使用し、Survival curve は Kaplan Meier 法を用いて描出した。P 値は 0.05 以下で有意差ありとした。

結果

1. 母集団の臨床病理学的検討

年齢（中央値）および性別といった臨床病理学的因子による、無増悪生存率(progression-free survival, PFS)および全生存率(overall survival, OS)では統計学的に有意な差を認めなかった（図2 A、B）。

A 年齢（ ≥ 65 vs. <65 ）



B 性別（Male vs. Female）

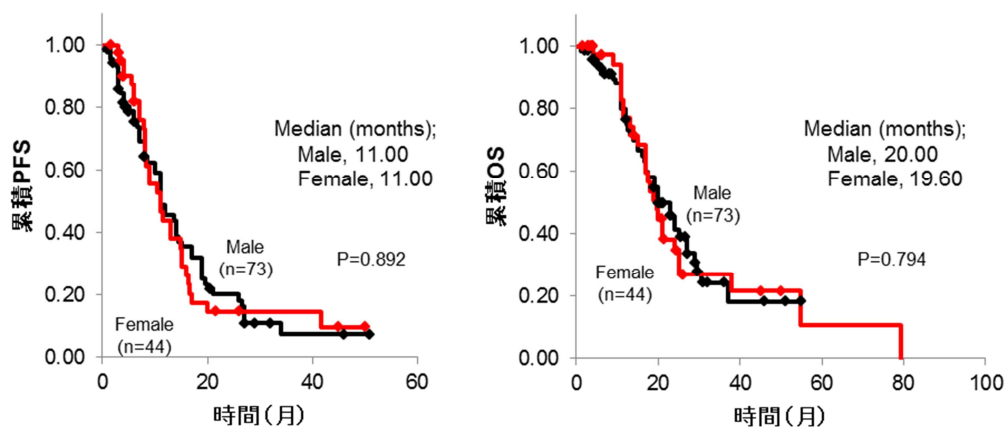


図2 カプランマイヤー法による生存曲線

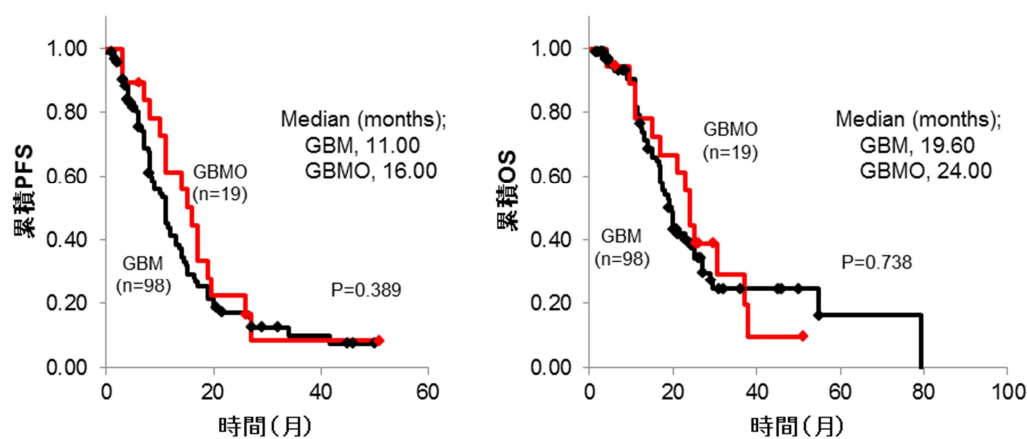
A：年齢（ ≥ 65 vs. <65 ）で比較した PFS および OS の生存曲線

B：性別（Male vs. Female）で比較した PFS および OS の生存曲線

GBM 対 GBMO での予後の差に関しては、過去の報告ではそれぞれのグループにより結果が異なるため議論の余地のあるところではあるが、我々のデータベースでは GBMO の生存中央値は GBM に比して長期であったものの、OS および PFS とともに統計学的に有意な差は認めなかった。

切除率(GTR vs. PR+Bx)でグループ分けを行ったところ、これは強く予後と相関することが示された (図 2 C、D)。

C 組織型 (GBM vs. GBMO)



D 切除率 (GTR vs. PR+Bx)

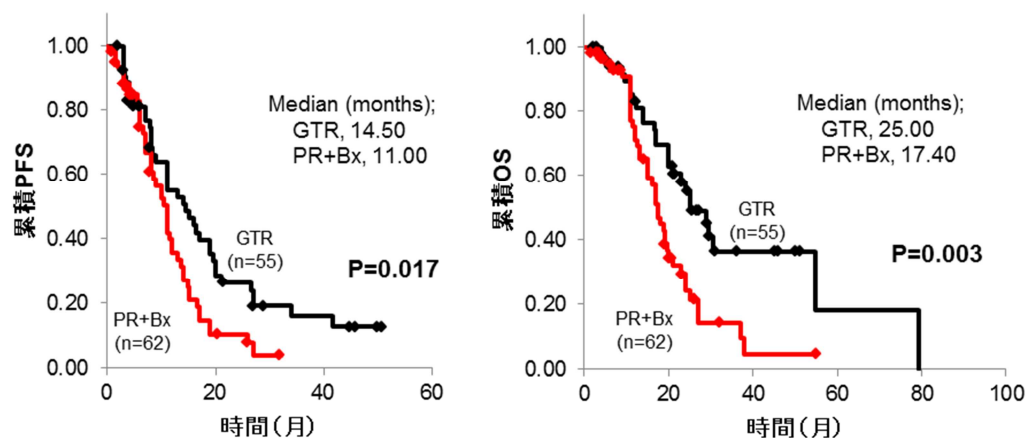


図 2 カプランマイヤー法による生存曲線

C : 組織型 (GBM vs. GBMO) で比較した PFS および OS の生存曲線

D : 切除率 (GTR vs. PR+Bx) で比較した PFS および OS の生存曲線

GTR : 全摘出、PR : 部分摘出、Bx : 生検

これらの結果はこれまでになされている報告とほぼ同じ結果^{79,87,88}となり、本検討に組み入れたグリオブラストーマ症例の母集団が、これまでに報告されている症例と比して、偏りがないことを示すと考える。

2. MGMT 免疫染色による予備的検討

次に免疫染色の評価方法を確立するために MGMT 免疫染色による臨床病理学的検討を行った。これまでの報告では MGMT の染色評価は単に“陽性”または“陰性”でのみで行われており、腫瘍細胞の染色強度や染色割合を的確に検討したものはない^{69,70}。Trastuzumab の治療時に HER2 の染色強度を評価するように⁸⁹、染色強度はしばしば薬剤の効果予測に有用である。そこで我々は、染色強度および染色割合を用いて MGMT の発現を定量的に評価するスコアリングシステムを用いて評価した。免疫染色標本上、MGMT はグリオーマ細胞の核に染色される。同時に血管内皮細胞やリンパ球にも MGMT は陽性となり、こちらは内在性の陽性コントロールとなる。代表的な染色所見を示す（図 3 および図 4）。

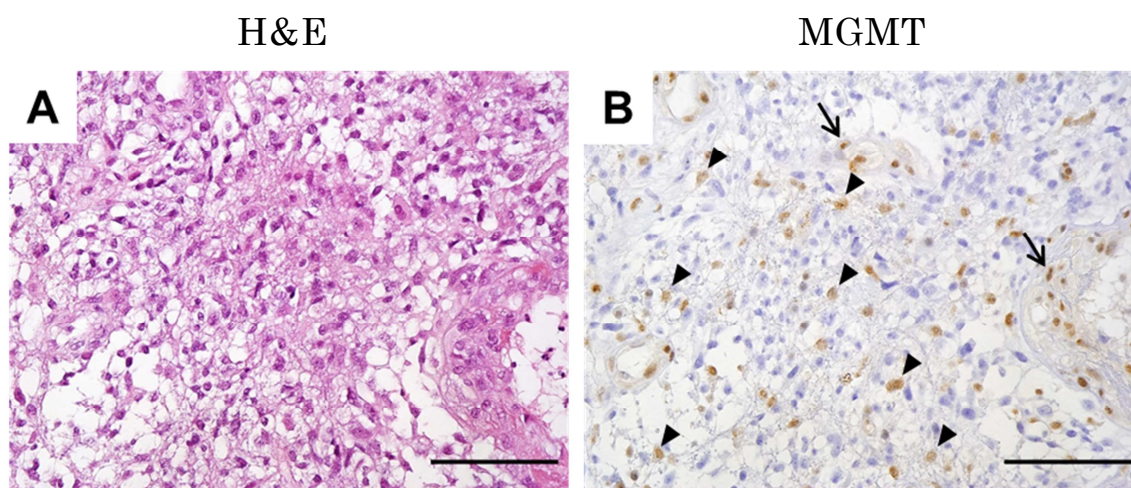


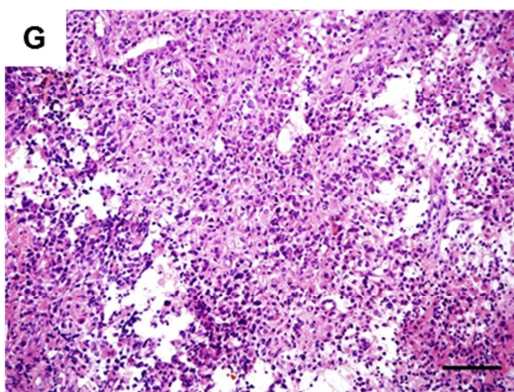
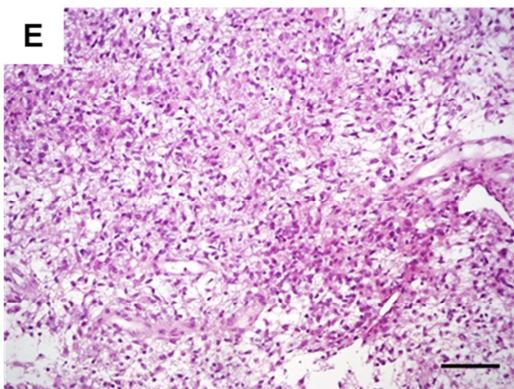
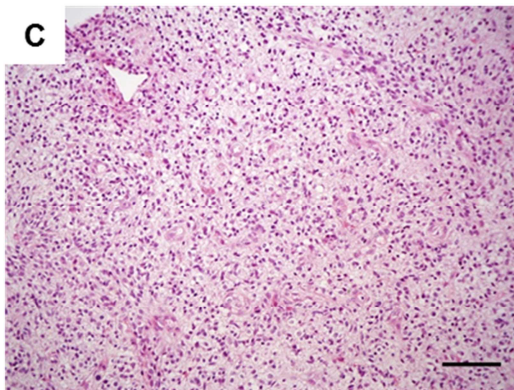
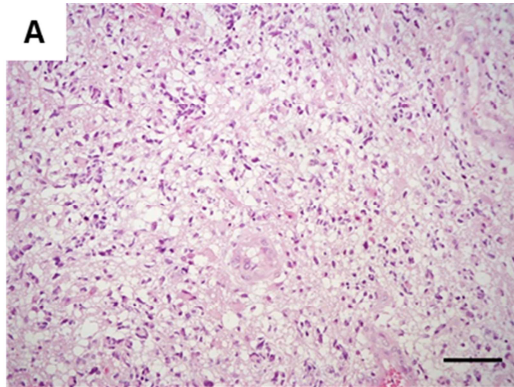
図 3 代表的な MGMT 染色例①

A : H&E 染色、B : MGMT 免疫染色。

矢印：血管内皮細胞、矢頭：グリオーマ細胞。

Scale bars: 100 μ m

H&E



MGMT

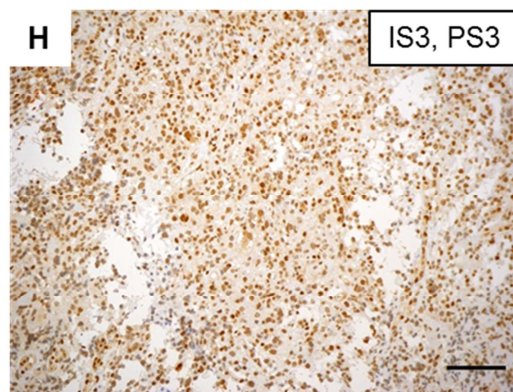
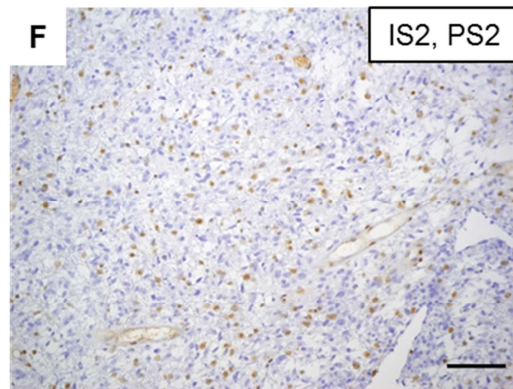
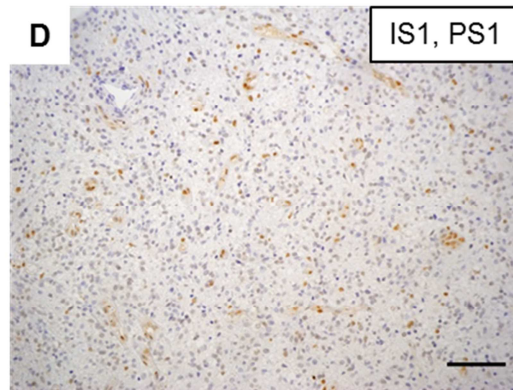
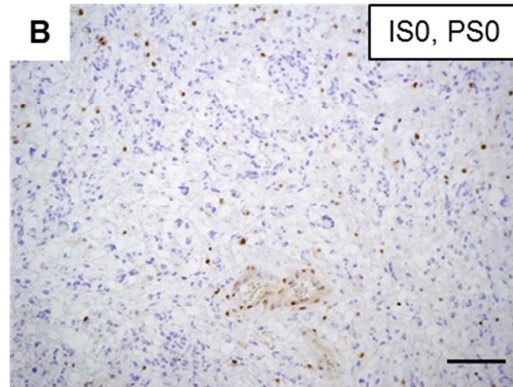


図4 代表的な MGMT 染色例②

A、C、E および G : H&E 染色

B、D、F および H : MGMT 免疫染色

A および B : IS0、PS0 の例。C および D : IS1、PS1 の例。E および F : IS2、PS2 の例。G および H : IS3、PS3 の例。

Scale bars: 100 μ m

また、MGMT の染色陽性はアストロサイト系腫瘍細胞のみでなく、核周囲明量を有するオリゴデンドロサイト系腫瘍細胞にも認められた (図5)。

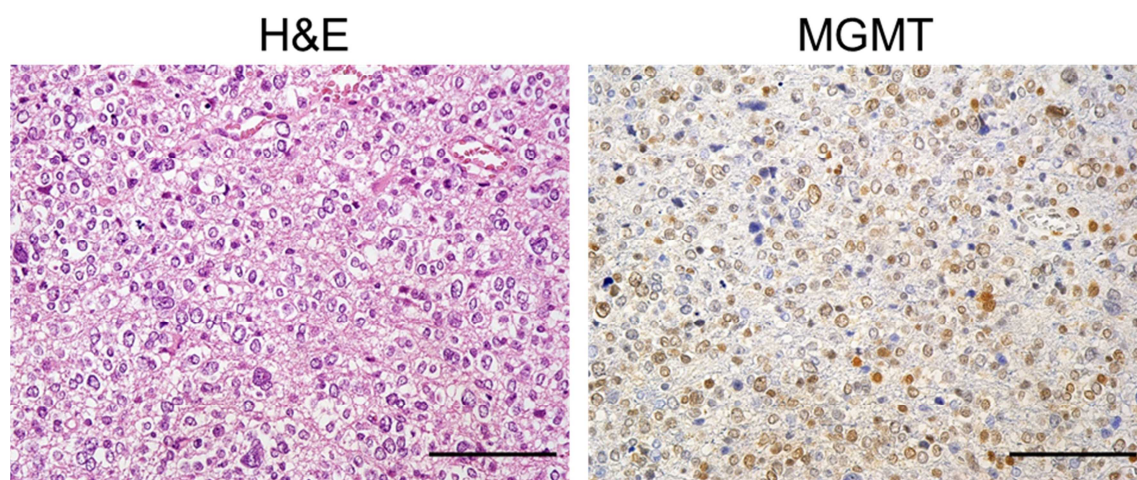


図5 オリゴデンドロサイト系腫瘍細胞の MGMT 陽性例

核周囲明量を有する腫瘍細胞にも MGMT 陽性となる。

左 : H&E 染色、右 : MGMT 免疫染色。

Scale bars: 100 μ m

免疫組織学的検討の結果を下の表 2 に示す。55 例(47%)が種々の程度に MGMT 染色陽性(TS $\geq$ 2)であり、62 例(53%)が完全に陰性(TS = 0)であった。

表 2

MGMT免疫染色結果

IS	症例数			
	PS			
	0	1	2	3
0	62 (53%)	-	-	-
1	-	22 (19%)	7 (6%)	1 (1%)
2	-	10 (9%)	7 (6%)	2 (1.5%)
3	-	0 (0%)	2 (1.5%)	4 (3%)

TS	0	2	3	4	5	6
症例数	62 (53%)	22 (19%)	17 (15%)	8 (7%)	4 (3%)	4 (3%)

これらの免疫組織化学的陽性所見は、組織診断(GBM vs. GBMO)、年齢、性別および切除率による相関関係は認めない。(表 3)

表 3

MGMT染色結果と臨床病理学的因子との相関関係

Parameter	Total (n=117)	MGMT		P-value
		TS=0 (n=62)	TS $\geq$ 2 (n=55)	
Age				
<65	59	33	26	0.520
65 $\leq$	58	29	29	
Gender				
Male	73	38	35	0.794
Female	44	24	20	
Histopathology				
GBM	98	51	47	0.640
GBMO	19	11	8	
Extent of surgery				
GTR	55	32	23	0.289
PR + Bx	62	30	32	

Abbreviations: GTR, gross total resection; PR, partial resection; Bx, biopsy

MGMT の発現レベルの予後予測における価値の評価のため、Total score の違いにより群分けし、OS および PFS を検討した。TS=0 の群はその他のほとんどの群と比較して良好な予後を示した。一方、MGMT 陽性の群(TS ≥ 2)の間では、ほとんどの群間で統計学的に有意な差は認めなかった。このことは、僅かな MGMT 染色陽性も重要な予後不良因子となり得ることを示す。(図 6)

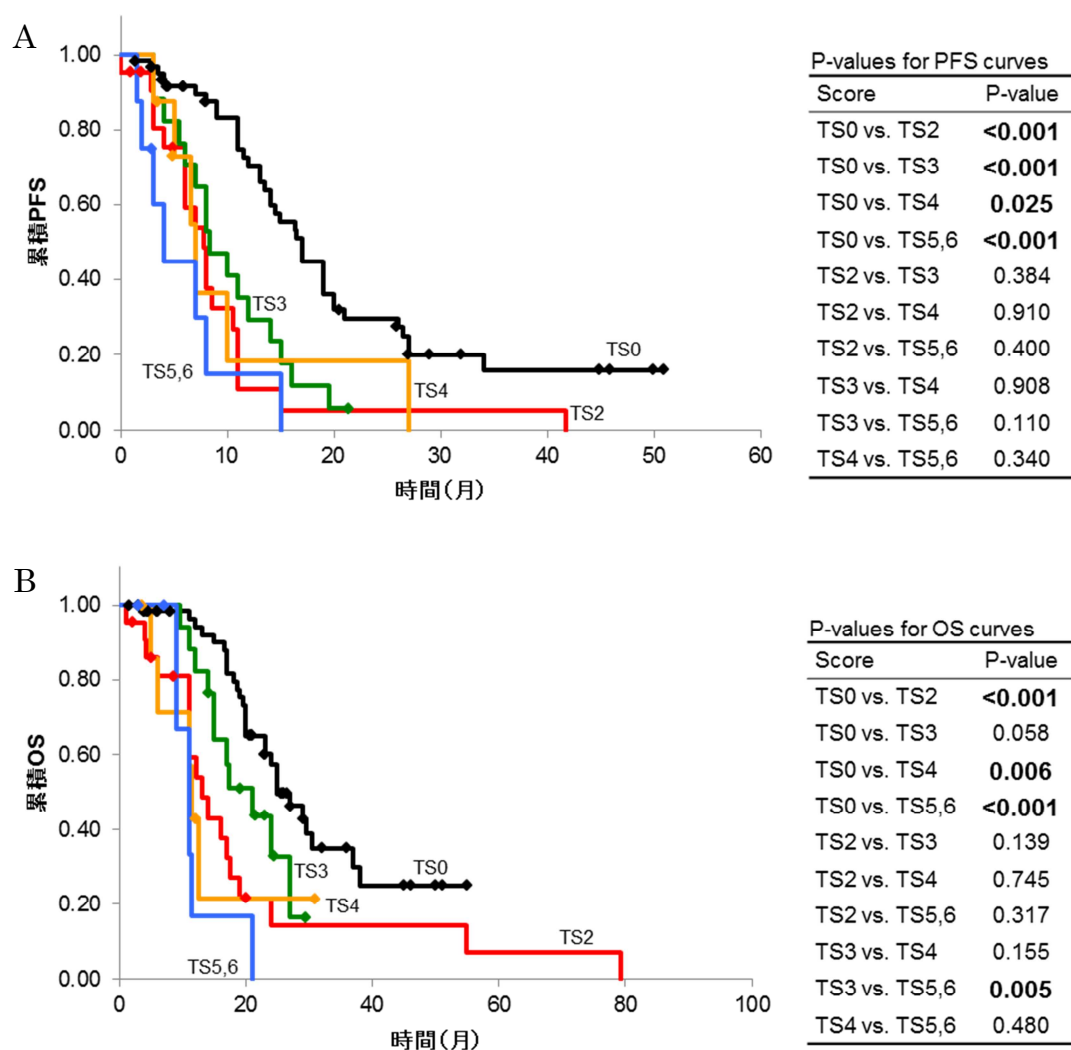


図 6 カプランマイヤー法による生存曲線

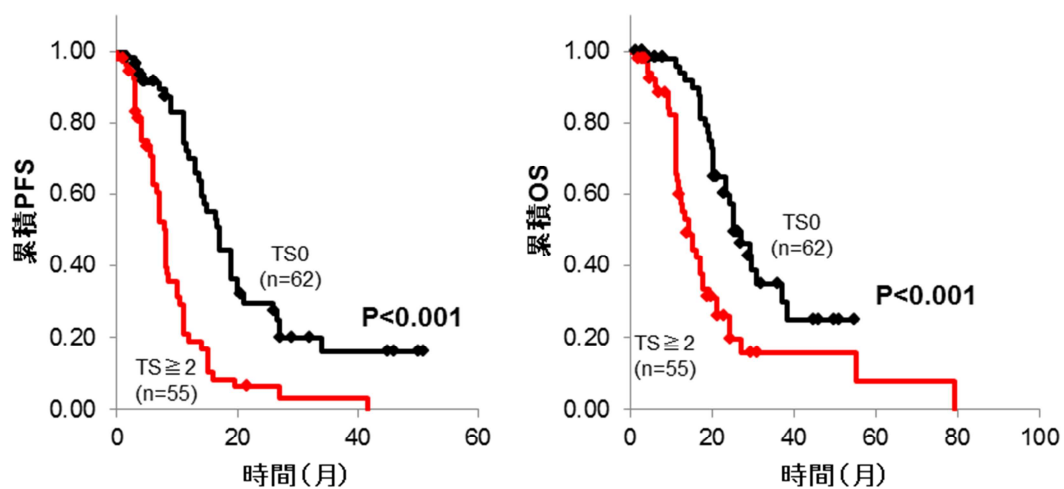
A : TS 別の PFS 生存曲線とその P 値

B : TS 別の OS 生存曲線とその P 値

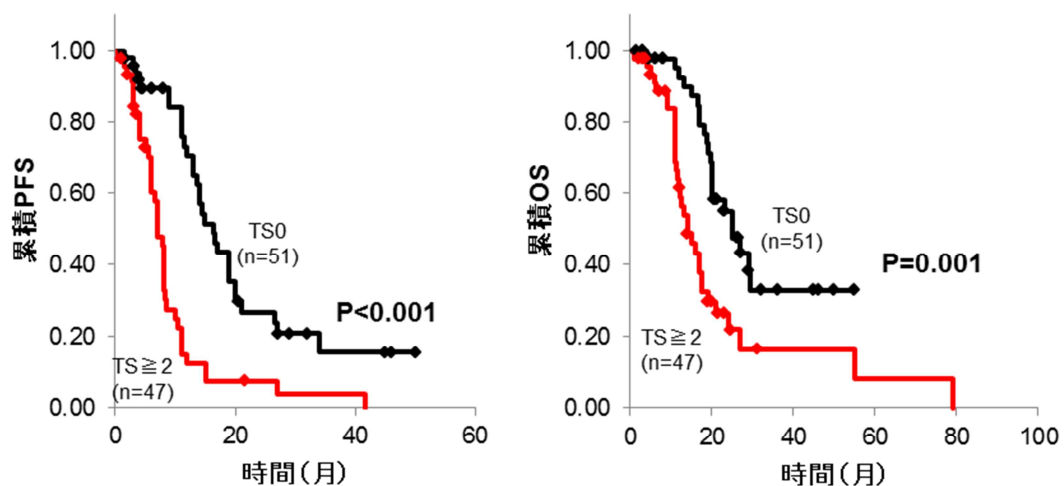
PFS、OS とともに、TS0 対 TS2 以上の各群で統計学的に有意な差を認める (OS における TS0 対 TS3 を除く)。

実際に $TS=0$ の群と $TS \geq 2$ の群の 2 群で予後を検討すると、強い有意差を持って予後と相関する。この相関は、組織学的なグループ分けを行っても維持され、組織診断によらないものであることが示される (図 7)。

A 全症例 (n=117)



B GBM のみ (n=98)



C GBMO のみ (n=19)

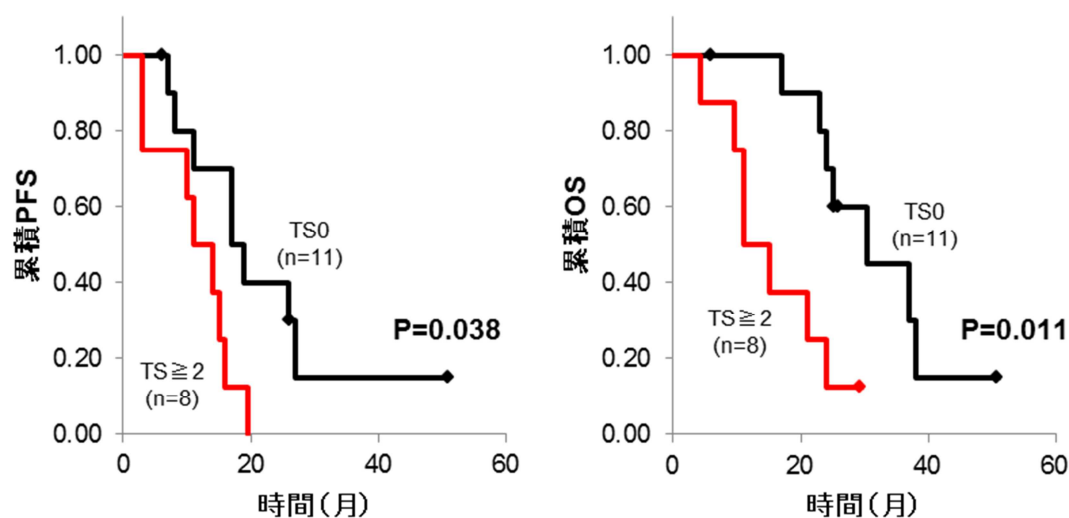


図7 カプランマイヤー法による生存曲線

A : 全症例 (n=117) での PFS および OS の生存曲線

B : GBM のみ (n=98) に限定した際の PFS および OS の生存曲線

C : GBMO のみ (n=19) に限定した際の PFS および OS の生存曲線

これまでの結果を Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量解析および多変量解析により追加解析した。単変量解析により、年齢、性別および組織型は PFS および OS とともに統計学的に有意な予後因子とはならなかったが、手術での切除率および MGMT 免疫染色の TS が統計学的に有意に PFS および OS と相関し、また、多変量解析にて MGMT の陽性所見は切除率とともに独立した予後因子であることが示された。(表 4、5)

表 4

PFSと臨床病理学的因子との単変量解析および多変量解析

Factor	n=117	Univariate analysis		Multivariate analysis	
		P-value	RR (95% CI)	P-value	RR (95% CI)
Age					
<65	59		1		
65≤	58	0.423	1.189 (0.778-1.817)	NC	
Gender					
Male	73		1		
Female	44	0.893	1.031 (0.663-1.604)	NC	
Histopathology					
GBM	98		1		
GBMO	19	0.369	0.779 (0.452-1.343)	NC	
Surgery					
GTR	55		1		1
PR + Bx	62	0.015	1.721 (1.110-2.667)	0.007	1.878 (1.187-2.971)
TS					
0	62		1		1
≥2	55	<0.001	3.106 (2.004-4.815)	<0.001	2.986 (1.904-4.685)

Abbreviations: PFS, progression-free survival; RR, relative risk/hazard ratio;
CI, confidence interval; GTR, gross total resection; PR, partial resection; Bx, biopsy;
NC, not calculable

表 5

OSと臨床病理学的因子との単変量解析および多変量解析

Factor	n=117	Univariate analysis		Multivariate analysis	
		P-value	RR (95% CI)	P-value	RR (95% CI)
Age					
<65	59		1		
65≤	58	0.297	1.293 (0.797-2.097)	NC	
Gender					
Male	73		1		
Female	44	0.790	1.069 (0.653-1.751)	NC	
Histopathology					
GBM	98		1		
GBMO	19	0.735	0.903 (0.499-1.633)	NC	
Surgery					
GTR	55		1		1
PR + Bx	62	0.003	2.130 (1.296-3.501)	0.003	2.178 (1.312-3.614)
TS					
0	62		1		1
≥2	55	<0.001	2.614 (1.599-4.273)	<0.001	2.654 (1.615-4.361)

Abbreviations: OS, overall survival; RR, relative risk/hazard ratio;
CI, confidence interval; GTR, gross total resection; PR, partial resection; Bx, biopsy;
NC, not calculable

これらの結果から、グリオブラストーマにおける MGMT 発現を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。

また、本検討の結果はこれまでに主にメチル化特異的 PCR を用いて報告されている MGMT 状態と患者予後と矛盾せず、MGMT タンパク質の発現が認められることが予後不良因子となるという結果となっている。これにより、今回使用しているグリオブラストーマ患者集団がこれまで報告のある患者集団と偏りのないものであることがわかり、また、今回用いている免疫染色評価方法（Proportion score、Intensity score および Total score にて行う評価）が本患者集団にも適用可能であると分かった。

以上より、本患者集団および本検討方法を CRK-DOCK ファミリータンパク質の解析に使用可能と判断した。

3. シグナル伝達分子の免疫染色によるバイオマーカー探索

そこで我々は、本患者集団で CRK-DOCK ファミリータンパク質を含むシグナル伝達関連分子の網羅的な免疫染色を行った。

対象とした症例は、当講座で 2005 年から 2011 年の間に診断された初発の GBM あるいは GBMO 患者 117 症例のうち、パラフィン包埋ブロックを収集し新たに免疫染色を施行できた 63 症例で検討を行った。男性 39 人、女性 24 人、年齢中央値は 66 歳 (30~86 歳) であった。対象となった症例は初回治療として手術、後療法として放射線療法および化学療法を受けている。手術の内訳としては、生検(biopsy, Bx)が 5 人(7.9%)、部分切除(partial resection, PR)が 24 人(38.1%)、全摘出(gross total resection, GTR)が 34 人(54.0%)であった。対象となった 63 症例全員が後療法に放射線療法を施行されている。TMZ による術後化学療法は、63 名全員に行われている。以上は表 6 に示している。

表 6 63 症例の患者背景

患者特性	症例数 (%)
Total	63
Median age [range]	66 [30-86]
Gender	
Male	39 (61.9%)
Female	24 (38.1%)
Pathological diagnosis	
GBM, not GBMO	52 (82.5%)
GBMO	11 (17.5%)
Extent of surgery	
Gross total resection	34 (54.0%)
Partial resection	24 (38.1%)
Biopsy	5 (7.9%)

免疫組織化学所見としては、EGFR および MET は細胞質に優位に陽性所見を認め、一部細胞膜にも陽性所見を認める。PDGFR α は細胞質の陽性所見が優位で、一部細胞膜に陽性を示す。部位により染色強度および染色割合に多寡がみられた場合は、標本内の全ての部位を検討したうえで平均化し、スコア化した。(図 8)

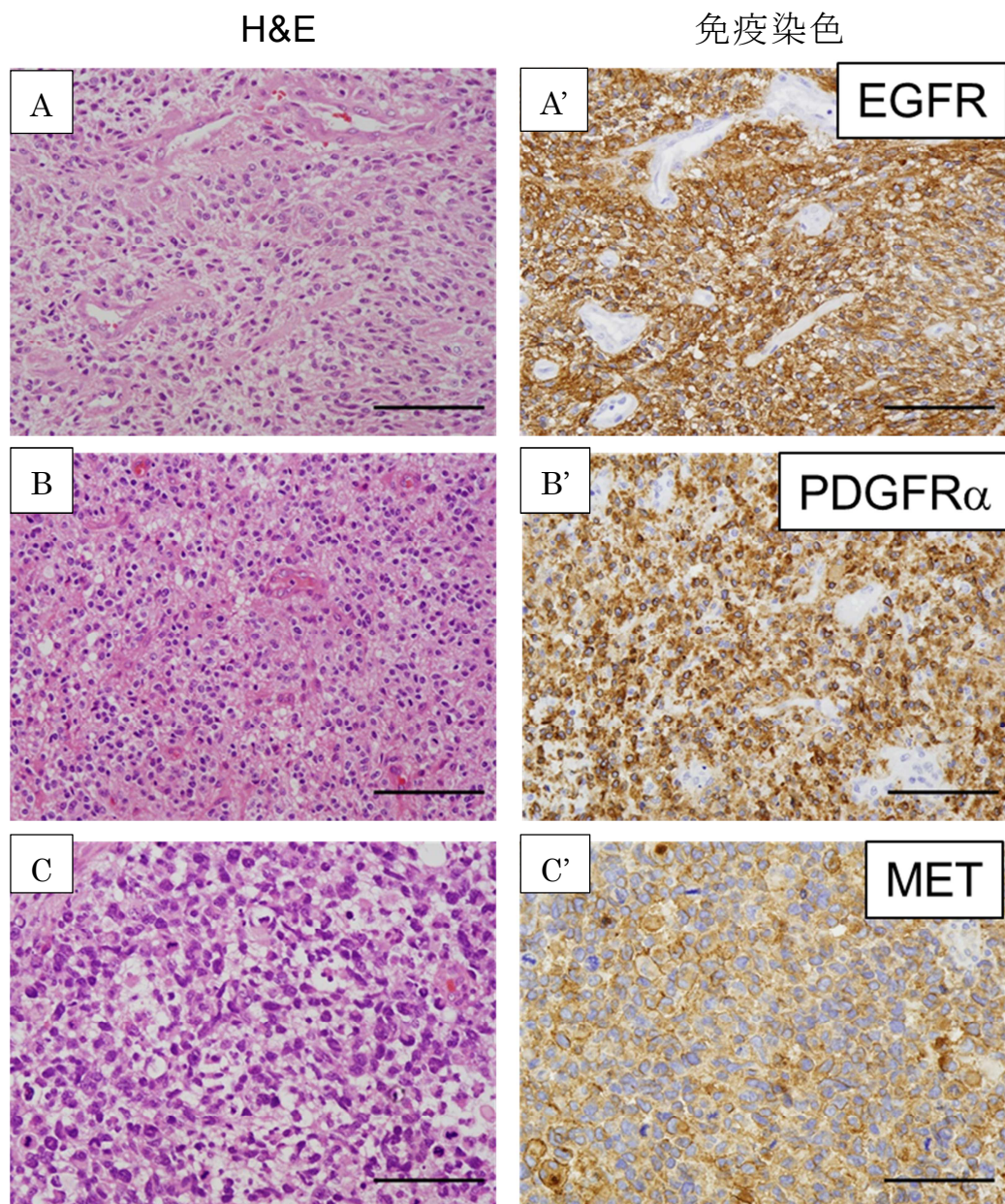


図 8 代表的な免疫染色所見

A、B および C : H&E 染色、A' : EGFR 免疫染色、B' : PDGFR α 免疫染色
C' : MET 免疫染色。A'、B'および C' : IS3、PS3 の例。

Scale bars: 50 μ m

DOCK180、CRK、CRKL はそれぞれ細胞質に染色を認める。これらも同様に、部位により染色強度および染色割合に多寡がみられた場合は、標本内の全ての部位を検討したうえで平均化し、スコア化した。(図 9)

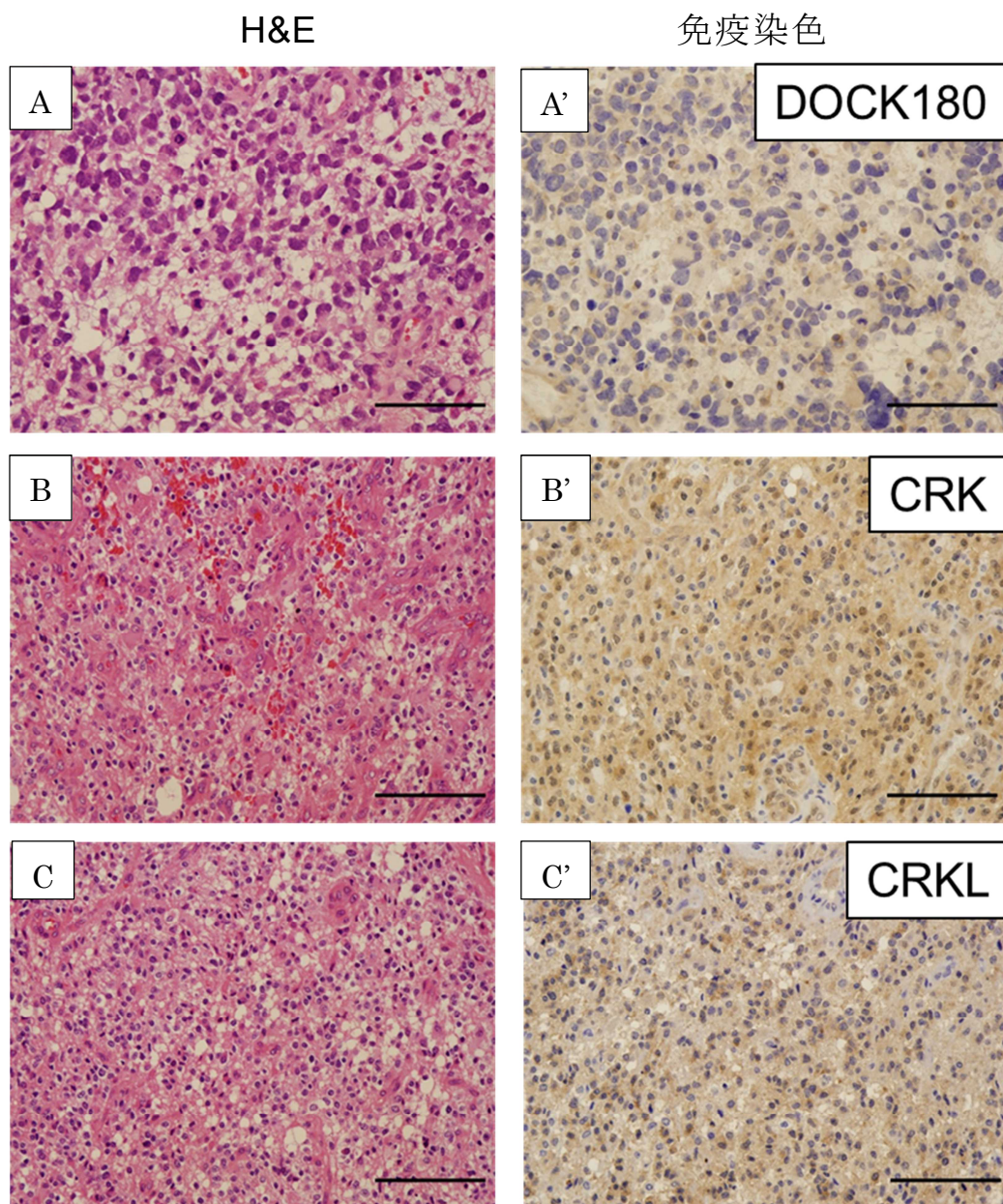


図 9 代表的な免疫染色所見

A、B および C : H&E 染色、A' : DOCK180 免疫染色、B' : CRK 免疫染色
C' : CRKL 免疫染色。A'、B' および C' : IS2、PS3 の例。

Scale bars: 50 μ m

スコア化した結果、DOCK180、CRK、CRKL および MET は半数以上の症例で染色陽性(TS $\geq$ 2)であるのに対して、EGFR および PDGFR α は約半数の症例で染色陰性(TS=0)となる特徴を得た。

染色結果を詳細にまとめた表を作成したので、下に示す。(表 7 : DOCK180 免疫染色結果のまとめ、表 8 : CRK 免疫染色結果のまとめ、表 9 : CRKL 免疫染色結果のまとめ、表 10 : EGFR 免疫染色結果のまとめ、表 11 : PDGFR α 免疫染色結果のまとめ、表 12 : MET 免疫染色結果のまとめ。)

表 7

DOCK180免疫染色結果

IS	症例数			
	PS			
	0	1	2	3
0	16 (25%)	-	-	-
1	-	0 (0%)	1 (2%)	32 (51%)
2	-	0 (0%)	2 (3%)	11 (17%)
3	-	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)

TS	0	2	3	4	5	6
症例数	16 (25%)	0 (0%)	2 (3%)	33 (52%)	11 (17%)	1 (2%)

Abbreviations: PS, proportion score; IS, intensity score; TS, total score

表 8

CRK免疫染色結果

IS	症例数			
	PS			
	0	1	2	3
0	3 (5%)	-	-	-
1	-	0 (0%)	1 (2%)	24 (38%)
2	-	0 (0%)	1 (2%)	34 (54%)
3	-	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

TS	0	2	3	4	5	6
症例数	3 (5%)	0 (0%)	1 (2%)	25 (40%)	34 (54%)	0 (0%)

Abbreviations: PS, proportion score; IS, intensity score; TS, total score

表 9

CRKL免疫染色結果

IS	症例数			
	PS			
	0	1	2	3
0	17 (27%)	-	-	-
1	-	3 (5%)	12 (19%)	10 (16%)
2	-	2 (3%)	3 (5%)	16 (25%)
3	-	0 (0%)	1 (2%)	1 (2%)

TS	0	2	3	4	5	6
症例数	17 (27%)	3 (5%)	14 (22%)	13 (21%)	16 (25%)	0 (0%)

Abbreviations: PS, proportion score; IS, intensity score; TS, total score

表 1 0

EGFR免疫染色結果

IS	症例数			
	PS			
	0	1	2	3
0	32 (51%)	-	-	-
1	-	3 (5%)	4 (6%)	3 (5%)
2	-	0 (0%)	2 (3%)	12 (19%)
3	-	0 (0%)	0 (0%)	7 (11%)

TS	0	2	3	4	5	6
症例数	32 (51%)	3 (5%)	4 (6%)	5 (8%)	12 (19%)	7 (11%)

Abbreviations: PS, proportion score; IS, intensity score; TS, total score

表 1 1

PDGFR α 免疫染色結果

IS	症例数			
	PS			
	0	1	2	3
0	30 (48%)	-	-	-
1	-	6 (10%)	11 (17%)	4 (6%)
2	-	0 (0%)	3 (5%)	4 (6%)
3	-	1 (2%)	0 (0%)	4 (6%)

TS	0	2	3	4	5	6
症例数	30 (48%)	6 (10%)	11 (17%)	8 (13%)	4 (6%)	4 (6%)

Abbreviations: PS, proportion score; IS, intensity score; TS, total score

表 1 2

MET免疫染色結果

IS	症例数			
	PS			
	0	1	2	3
0	9 (14%)	-	-	-
1	-	6 (10%)	5 (8%)	8 (13%)
2	-	0 (%)	8 (13%)	25 (39%)
3	-	0 (%)	1 (2%)	1 (2%)

TS	0	2	3	4	5	6
症例数	9 (14%)	6 (10%)	5 (8%)	16 (25%)	26 (41%)	1 (2%)

Abbreviations: PS, proportion score; IS, intensity score; TS, total score

これらの免疫染色結果および患者の予後データから **Survival curve** を得た。結果を示す。**DOCK180**、**CRK** および **CRKL** は、染色強陽性群(**high**; **TS=5, 6**)が弱陽性群(**low**; **TS=0, 2**)および中陽性群(**mid**; **TS=3, 4**)に対して **PFS**、**OS** ともに良好な予後を示し、特に **CRKL** の検討では統計学的な有意差を得た。(図 1 0)

また、**EGFR**、**PDGFR α** 、**MET** の各受容体型チロシンキナーゼでの検討では、染色強陽性群(**high**; **TS=5, 6**)が弱陽性群(**low**; **TS=0, 2**)および中陽性群(**mid**; **TS=3, 4**)に対して **PFS** および **OS** の両方で予後不良な傾向を示した。特に **MET** の検討では統計学的な有意差を得た。(図 1 1)

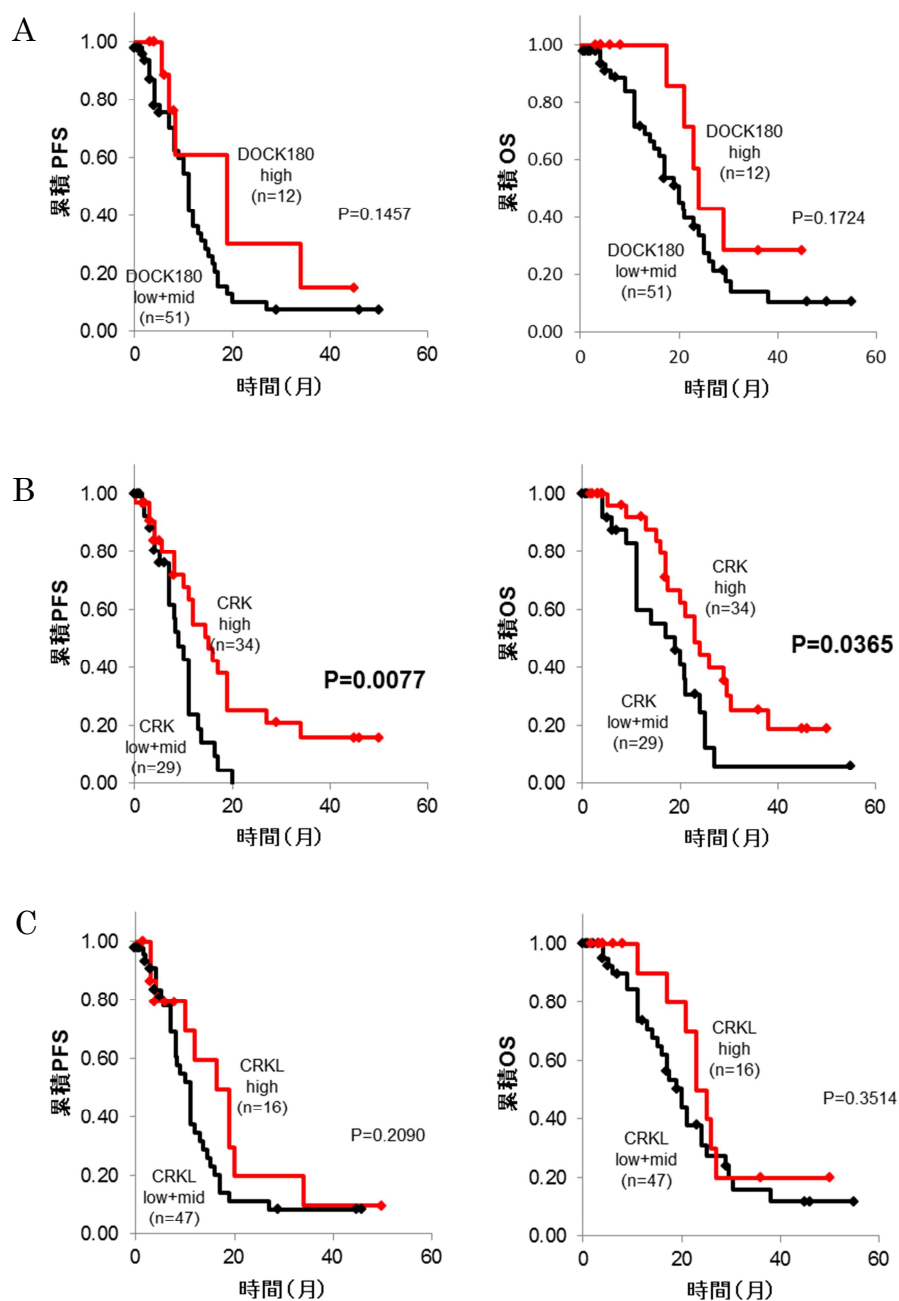


図 10 カプランマイヤー法による生存曲線

A : DOCK180 免疫染色強度(high vs. low+mid)で比較した PFS および OS の生存曲線

B : CRK 免疫染色強度(high vs. low+mid)で比較した PFS および OS の生存曲線

C : CRKL 免疫染色強度(high vs. low+mid)で比較した PFS および OS の生存曲線

(high, TS=5, 6; mid, TS=3, 4; low, TS=0, 2)

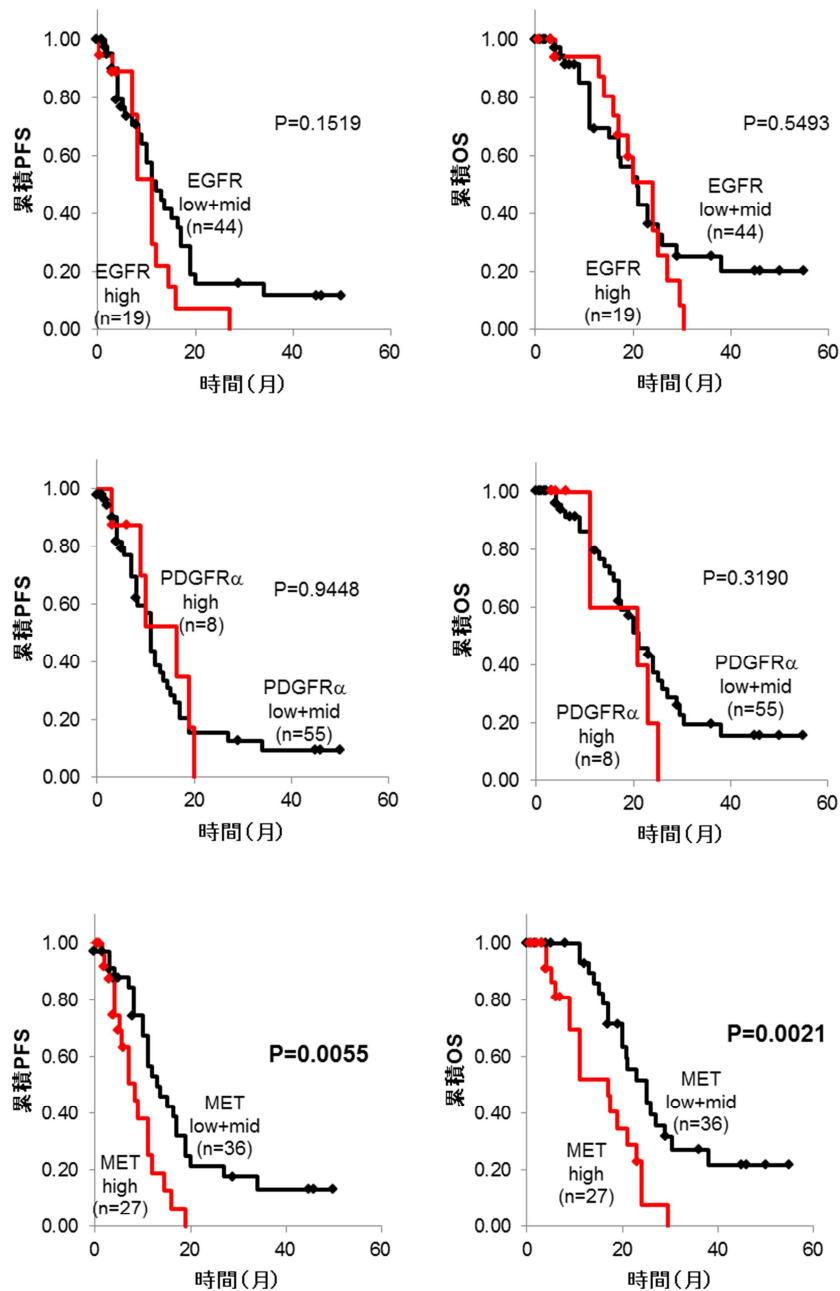


図 1 1 カプランマイヤー法による生存曲線

A : EGFR 免疫染色強度(high vs. low+mid)で比較した PFS および OS の生存曲線

B : PDGFR α 免疫染色強度(high vs. low+mid)で比較した PFS および OS の生存曲線

C : MET 免疫染色強度(high vs. low+mid)で比較した PFS および OS の生存曲線

(high, TS=5, 6; mid, TS=3, 4; low, TS=0, 2)

考察

グリオブラストーマは WHO 分類で Grade IV に分類される脳腫瘍で、最も悪性度の高い腫瘍の 1 つである。治療の第一選択は手術療法であるが、機能温存の観点から完全切除することが困難な症例も少なくない。そのような症例に対しては放射線療法や化学療法が重要な治療方法となり、治療標的となり得る新知見の発見は医療者・研究者の興味の一つとなっている。

本章で最初に我々は、解析に使用する患者集団に偏りがないかを検討するとともに、免疫染色の評価方法を策定しそれに誤りはないかを確認する目的で、グリオブラストーマのよく知られている予後因子である MGMT を対象として免疫染色を行った。まずそこで得られた知見であるが、今日、グリオブラストーマの標準的治療としては手術療法、放射線療法とともに TMZ が広く使用されており、MGMT の発現を日常診療において的確に評価することは神経病理医や脳神経外科医にとって TMZ の治療反応性を予測する上で大変重要である。MSP などは、プロモーターのメチル化のようなエピジェネティックな変化を解析する手法としては非常に有用で確立されたものであり^{61,70}、MGMT プロモーターのメチル化状態はグリオブラストーマの患者の予後と相関を示す^{60,62-70}。しかしながら、MSP などの手法は一般病院の日常診療では必ずしもルーチンとはなり得ず、また、新鮮でない検体や長期間固定されてしまった検体はしばしばこの解析には不向きとなる。グリオブラストーマにおいて免疫組織化学的に MGMT の発現レベルを定量化することは、免疫染色が広くどこの施設でも施行可能なことや簡便であることより、最も有用な手法の 1 つとなると考えられるが、免疫染色における MGMT 発現の評価基準は依然として確立していない。MGMT 免疫染色の予後予測的価値に関して一致した見解が得られていない理由として考えられることは、対象となる患者集団の数が少ないこと^{67,90-93}、染色評価の基準が一定していないこと^{65,67,91,94}、複数のグリオーマ亜型を解析対象に含めてしまっていること⁹⁵、治療方法が一定していないこと^{91,92,94,96}などが挙げられる。このことに対して、我々の検討では 100 例を超える新規に診断された GBM、GBMO 症例を用い、症例も TMZ および放射線療法を行っているものとした。また、我々は腫瘍細胞の染色強度および染色割合を検討することによって、客観的および定量的に評価できる手法を採用した。その結果、我々は極めて明確な結果を

得ることができ、それは免疫組織化学的にほんの少量のでも MGMT の発現が見られれば(TS $\geq$ 2)、統計学的に独立した予後不良因子となるというものであった。これは症例を GBMO に限定しても同様の結果が得られた。

この結果より推察されることは、ほんの僅かに、あるいは部分的にでも染色陽性が認められれば、染色陰性に見える腫瘍細胞でも実際は TMZ 耐性を示すのに十分な MGMT タンパク質を発現しているということである。これは、抗 MGMT 抗体の感度が低いことや、ホルマリン過固定のような検体の不備が理由として考えられる。

次に本来の目的である CRK-DOCK ファミリータンパク質を含むシグナル伝達関連分子の網羅的な解析であるが、まず、グリオブラストーマは EGFR、PDGFR α 、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。今回我々は、当講座で診断したグリオブラストーマ症例のパラフィン包埋ブロックから上記受容体型チロシンキナーゼの免疫染色を行い、染色割合および染色強度の両者の観点から解析を行った。その結果、この評価方法を用いてもこれまでの報告にあるように、EGFR、PDGFR α 、MET の各免疫染色はそれぞれ強陽性群が予後不良な傾向を示し、特に MET では統計学的に有意な差を得た。

CRK-DOCK ファミリータンパク質もグリオブラストーマでは悪性度に関与する重要な分子であることが当講座からの報告を含む過去の報告から示唆されているが、実際にヒトのグリオブラストーマで免疫組織化学的に検討した報告は少なく、また、予後に与える影響について統一した見解も得られていない。そこで我々はこのファミリータンパク質である DOCK180、CRK、CRKL の免疫染色を施行し、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。その結果、予想に反してこれら 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、CRKL では統計学的な有意差も示した。この理由としては、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 (例えば Sos-Ras) であり、結果として負のフィードバックを受ける CRK-DOCK 経路は発現が低いほど (つまり driver pathway が亢進しているほど) 予後が良いという結果になったと考えられる。しかしながら免疫染色の結果から示されるようにグリオブラストーマにおいては DOCK180、CRK、CRKL のそもそも全体的に発現量が高く、また、これらのタンパク質がグリオブラストーマの悪性度に関与するというこれまでの報告と併せて、これらの CRK-DOCK

ファミリータンパク質はグリオブラストーマの腫瘍形成そのものには重要な因子であることが推察できる。今回得た結果は、直ちに **CRK-DOCK** ファミリータンパク質が臨床応用できるというものではないが、この結果に加え、他のシグナル伝達関連分子と組み合わせで相関関係を検討することや、腫瘍の **Grade** 別あるいはサブタイプ別に分類して検討し直すなどの解析をすることで、**CRK-DOCK** ファミリータンパク質がバイオマーカーとして応用できる可能性は十分にあると考えられる。これが今後の検討課題であり、臨床応用に向けて研究を行いたい。

第二章

非腫瘍性疾患における CRK-DOCK ファミリータンパク質の解析

(インフルエンザウイルス増殖における
CRKL、NS1 および NS1-BP の関与)

緒言

CRK-DOCK ファミリータンパク質は、非腫瘍性疾患においてもこれまでにいくつか報告がなされている。CRK-DOCK ファミリータンパク質の非腫瘍での機能として、Fc ガンマ受容体依存性のマクロファージの貪食能への関与¹⁶、T 細胞における抗原刺激に対する反応性の低下の調節¹⁷といった免疫系への関与や、神経細胞の軸索伸長といった神経分化への関与^{18,19}などが報告されている。また、CRK-DOCK ファミリータンパク質と感染症の関与も報告されており、近年、シグナルアダプター分子 CRK および CRKL がトリインフルエンザウイルス由来のタンパク質である Non-structural protein 1 (NS1) と相互作用を有するということが示された²⁶。しかしながら、その機能解析はあまり進んでおらず、我々は診断および治療法の開発には更なる研究が必要であると考え、本章の研究を行うこととした。

インフルエンザ A ウイルスはオルソミクソウイルス科 (Orthomyxoviridae) に属するウイルスで、分節状のマイナス鎖 RNA を遺伝子としている。遺伝子は 8 分節に分かれており、10 または 11 のタンパク質をコードしている。NS1 はインフルエンザ A ウイルスの遺伝子の第 8 分節に NS2 とともにコードされている⁹⁷。NS1 はウイルス粒子の非構成タンパクで、主な機能としては宿主細胞の免疫反応を抑制するというものであり、特にインターフェロン産生およびそれにより誘導されるタンパク質の抗ウイルス活性を抑制すると言われている。また、NS1 はその他の点でもウイルス増殖に関与すると報告されており、ウイルス RNA の複製、ウイルスタンパクの合成、宿主細胞の生理活性の制御などが挙げられる^{97,98}。NS1 は RNA 結合ドメインといくつかのタンパク質間相互作用を有するモチーフからなる、多くの機能を有するタンパク質であり、具体的には 1 つの SH2 結合モチーフや 2 つの SH3 結合モチーフを有する⁹⁹。インフルエンザ A ウイルスの感染時には、NS1 は phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) シグナル経路を活性化させ、宿主細胞の生存活性を上昇させる¹⁰⁰⁻¹⁰³。PI3K 経路の活性化を抑制するとインフルエンザ A ウイルスの産生が強く抑制されたことより、この経路がインフルエンザ A ウイルスの複製に重要であることが伺える^{101,103,104}。

NS1 と宿主細胞内で相互作用する分子として、70 kDa の宿主由来タンパクである NS1-binding protein (NS1-BP) があり、初めて報告された機能は

pre-mRNA のスプライシングを抑制するというものであった¹⁰⁵。それ以来 NS1-BP の機能に関する報告はほとんどされてこなかったが、近年では NS1-BP は heterogenous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) K と相互作用し、ウイルス RNA の NS1 分節から NS2 mRNA を産生することが報告され¹⁰⁶、NS1-BP および hnRNP K がインフルエンザ A ウイルスの増殖に重要であると分かった。しかしながら、NS1-BP の機能には依然として不明な点が多く、特に NS1 との相互作用が宿主細胞に及ぼす影響は報告がなされていない^{97,105}。

本章で我々は、インフルエンザ A ウイルス増殖におけるこれら NS1、NS1-BP と CRK-DOCK ファミリータンパク質の機能を詳細に検討し、非腫瘍性疾患における CRK-DOCK ファミリータンパク質の役割の一部を解明することにより、同ファミリーの更なる深い理解につながり、さらには非腫瘍性疾患の治療への応用に繋がり得ると考えた。そこで、前述の通り NS1 との関与が報告されている CRK-DOCK ファミリータンパク質の 1 つである CRKL に焦点を当てることとし、ウイルスタンパク質 NS1 および宿主タンパク質 NS1-BP の細胞内での相互作用を解析、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。その結果、ウイルス由来タンパク質 NS1 が CRKL と協調して ERK のリン酸化を亢進させることでインフルエンザウイルスの増殖に有利に働き、宿主タンパク質 NS1-BP はそれに抑制的に作用することを確認したので報告する。

方法

本実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従って実施した。

1) プラスミド

ヒト NS1-BP の cDNA を HEK293T 細胞から RT-PCR 法で増幅後、pCR-Blunt II-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA)を経由して pCXN2-Flag-V5 vector へサブクローニングし、pCXN2-Flag-NS1-BP-V5 を得た。

A/Beijing/262/95 (H1N1)および A/Indonesia/6/05 (H5N1)の cDNA をウイルスが感染した Madin-Darby canine kidney (MDCK)細胞から抽出した RNA よりクローニングし、これより NS1 を pcDNA3.1/V5-His vector (Invitrogen)へサブクローニングした。

pCXN2-Flag-CrkL、pLenti6.4-CrkLi1064 および pSUPER-Crki は当講座で以前作製したものを使用した。

pEBG-CrkL、pEBG-CrkL-SH2SH3(N)、pEBG-CrkL-SH2、pEBG-CrkL-SH3(N)および pEBG-CrkL-SH3(C)は CrkL の cDNA をテンプレートとして PCR 法を用いてサブクローニングし、作製した。

pEBG-CrkL-SH3(N)W160L は pEBG-CrkL-SH3(N)を鋳型として、PCR 法により作製した。

2) HEK293T 細胞およびトランスフェクション

HEK293T 細胞は、非働化した 10%FBS、2 mM L-glutamine、100 U/ml penicillin および 100 µg/ml streptomycin が添加された Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)にて、37°C、5% CO₂ 下で維持、培養した。

また、HEK293T 細胞には、トランスフェクション試薬 FuGENE HD (Roche)を用いて上記 1)のプラスミドを一過性にトランスフェクションした。

3) ウェスタンブロット法

形質導入された HEK293T 細胞は 48 時間後に細胞溶解し、溶解液をウェ

スタンプロット法を用いて解析した。具体的には、培養細胞を氷冷 PBS で 3 回洗浄後に、トリス緩衝可溶化バッファー [0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM sodium orthovanadate (Na_3VO_4), and protease inhibitor mixture (Complete, EDTA-free®, Roche Molecular Biochemicals, Germany)] で溶解し、30 分間氷上でインキュベートした後に回収し、20,600 g、4°C で 10 分間延伸し、上清を細胞抽出液とした。細胞抽出液はプロテインアッセイ用試薬 (Bio Rad Laboratories) を用いてマイクロプレートリーダーでタンパク質濃度を測定し、一定量 (20 $\mu\text{g}/\text{lane}$) を SDS アクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にて展開した。ゲルは 4% の Stacking gel と、分子量により 8-12% の Separation gel を用いた。PVDF 膜 (Millipore, Billerica, MA, USA) 上に 100 V、70 分で転写し、5% non-fat dry milk 添加 0.1% TBS-T または 2% BSA 添加 TBS-T にてブロッキング後、3% non-fat dry milk で 1,000 倍に希釈した一時抗体を 4°C で一晩反応させた。翌日、TBS-T で 10 分間×3 回の洗浄を行い、二次抗体 (ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG またはペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG) を室温で 30 分間反応させ、再び 10 分間×3 回の洗浄を行った。ペルオキシダーゼが共役した一次抗体の使用時には、二次抗体以降の手順は行わない。Enhanced chemiluminescence (ECL) ウェスタンブロットティング検出システム (GE Healthcare Bioscience) を用いて発光させ、ルミノイメージアナライザー (LAS-1000) を用いてバンドを検出した。

抗体としては以下のものを使用した。anti-CRKL (C20) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、anti-CRK (Transduction Laboratories)、anti-V5 (Invitrogen)、anti-Actin (Millipore)、anti-Flag M2-peroxidase (HRP) (Sigma, St. Louis, MO, USA)、anti-p44/42 MAP kinase (ERK1/2) (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA) および anti-phospho-p44/42 MAPK (T202/Y204) (Cell Signaling Technologies)。抗 GST 抗体は当講座で自作した。

4) MTT アッセイ

MTT アッセイは、Cell Proliferation Kit I (Roche) を用いて行った。形質導入した HEK293T 細胞を 100 μl 中に 1.0×10^4 個になるように濃度調整し、96 well plate に 100 μl ずつ撒いた。24 時間後、MTT 標識試薬を 10 μl ずつ各 well に添加した。その後、培養細胞インキュベーター内に 4 時間静置

し、反応を停止させた。吸光度測定はマイクロプレートリーダーで行った。

5) プルダウンアッセイ

形質導入した HEK293T 細胞をトリス緩衝可溶化バッファー [0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM sodium orthovanadate (Na_3VO_4), and protease inhibitor mixture (Complete, EDTA-free®, Roche Molecular Biochemicals, Germany)] で溶解し、30 分間氷上でインキュベートした後に回収し、20,600 g、4°C で 10 分間遠心し、上清を細胞抽出液とした。プロテインアッセイ用試薬 (Bio Rad Laboratories)を用いてマイクロプレートリーダーでタンパク質濃度を測定し、1 mg のタンパク質を含むように調整した細胞抽出液 500 μl に、50% スラリーで 20 μl の glutathione-Sepharose 4B beads (GE Healthcare Biosciences)と 4°C で 1 時間、回転による転倒混和をさせながら反応させた。その後ビーズを氷冷した上記溶解緩衝液で 5 回洗浄、27 ゲージ針付注射器にて上清を完全に除去し、2 x SDS サンプルバッファーに溶解させ、ウエスタンブロット法にて検出した。

結果

NS1 過剰発現細胞における細胞生存能の検討

NS1 はインフルエンザウイルスに感染した宿主細胞内で過剰に発現し、CRK ファミリータンパクと協調して細胞生理機能に関与しているとされている。そこで我々は、今回保有する A/Beijing/262/95 (H1N1) influenza virus (BJ) and A/Indonesia/6/05 (H5N1) influenza virus (ID)型の NS1 でも同様の変化がみられるのか、あるいはその他の変化がみられるのかを検討した（図 1 2）。その結果、上記 NS1 を HEK293T 細胞に過剰発現させると、MTT アッセイにて細胞の生存能が上昇すること、また、ERK のリン酸化を上昇させることが観察された。

また、その NS1 活性への CRK ファミリータンパクの関与を検討するため、shRNA 発現プラスミドコンストラクトを用いて CRKII および CRKL のノックダウンを行った。その結果、CRKL の発現を単独でノックダウンすると、NS1 過剰発現下でも MTT アッセイにて細胞生存能の上昇は抑制され、また、ERK のリン酸化も抑制された。ここからさらに CRKII をノックダウンしてもさらなる変化は観察されなかった。これより、CRKL が NS1 活性の制御において主たる役割を担っていることが示唆される。（図 1 2）

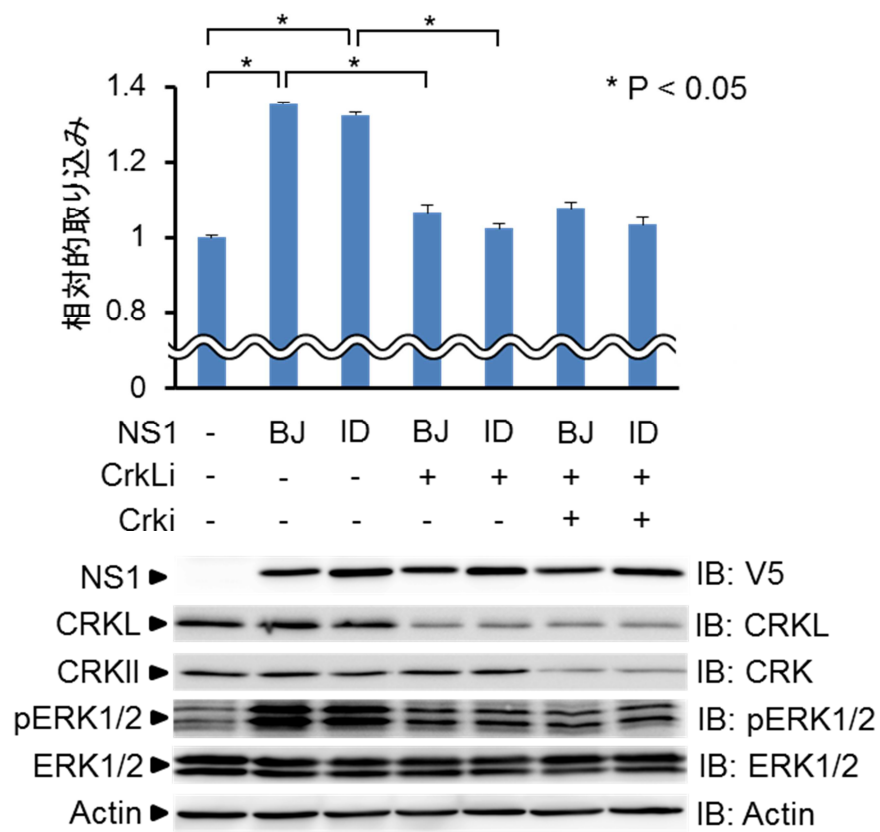


図 1 2 MTT アッセイおよびウエスタンブロット法

NS1 は ERK を介して CRKL 依存性に細胞の生存能を上昇させる。

上段：MTT アッセイ

下段：ウエスタンブロット法

また、CRKL と BJ 型 NS1 および CRKL と ID 型 NS1 の両者に関して、GST 融合タンパク質を用いたプルダウンアッセイによって HEK293T 細胞内での結合を確認した（図 1 3）。

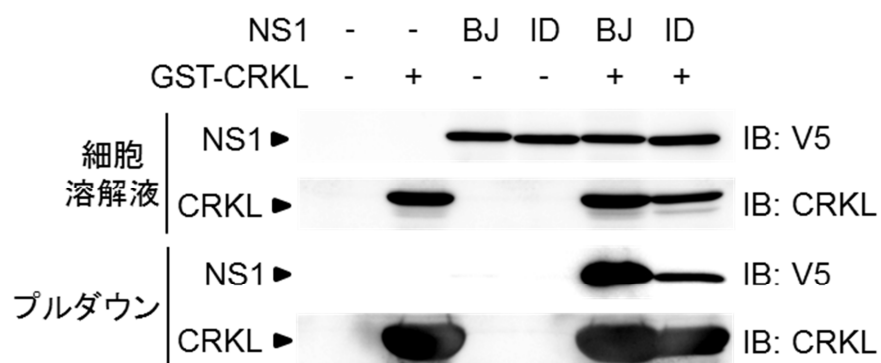


図 1 3 プルダウンアッセイ

HEK293T 細胞内で CRKL および NS1 (BJ/ID) の結合を確認した。

上段：細胞溶解液、下段：プルダウン

BJ: Beijing

ID: Indonesia

CRKL、NS1-BP および NS1 は細胞内で複合体を形成し、NS1 の細胞生存活性を制御する

次に我々は、HEK293T 内での NS1 (BJ/ID)、NS1-BP および CRKL の関連を検討した。

GST 融合 CRKL を使用したプルダウンアッセイで、CRKL、NS1、NS1BP は細胞内で三者複合体を形成していることを確認した。（図 1 4）

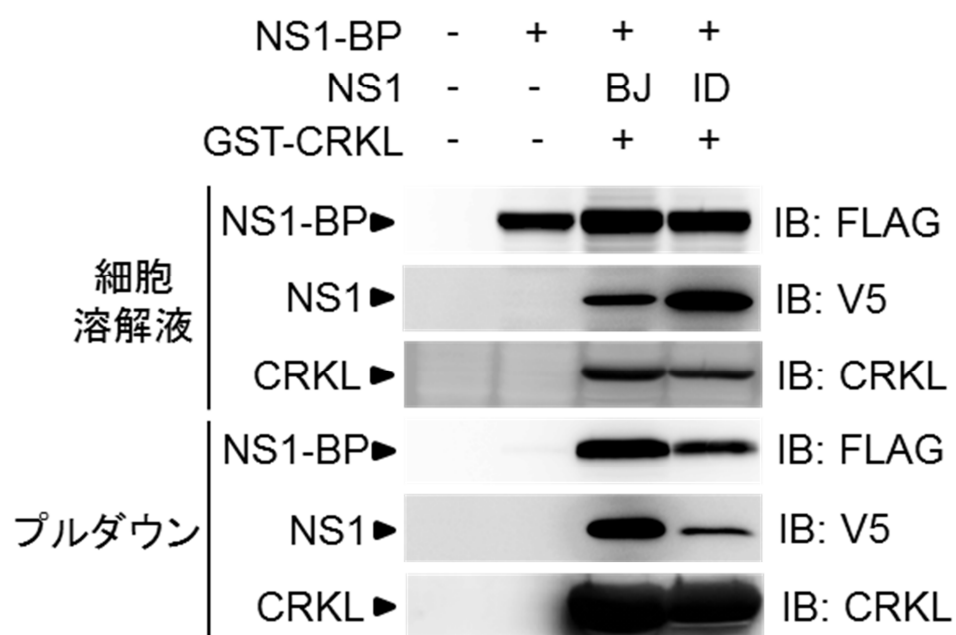


図 1 4 HEK293T 細胞でのプルダウンアッセイ

上段：細胞溶解液、下段：プルダウン

CRKL、NS1 および NS1BP は細胞内で三者複合体を形成している。

さらに、NS1-BP 過剰発現下で NS1 および CRKL が細胞内の生理活性にどのような影響を及ぼすかを MTT アッセイにて検討した。その結果、HEK293T 細胞にて、先に述べた NS1 (BJ/ID) の持つ細胞生存能上昇活性および ERK のリン酸化亢進は、NS1-BP の存在下で抑制されることが確認された。(図 1 5)

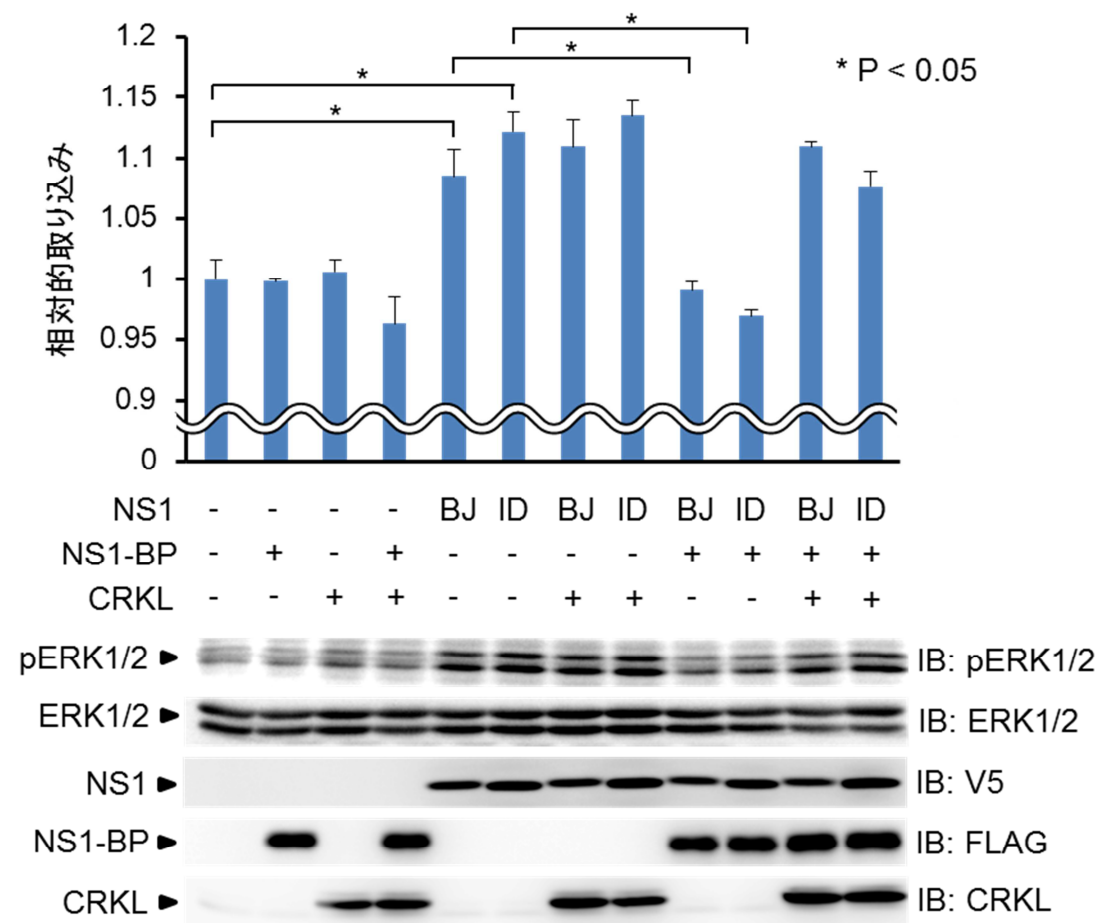


図 1 5 MTT アッセイおよびウエスタンブロット法
上段：MTT アッセイ
下段：ウエスタンブロット法

NS1-BP は CRKL の N 末端側 SH3 ドメインに結合する

次に、CRKL のどのドメインが NS1-BP との結合において重要なのかを知るため、GST 融合 CRKL の truncated mutant を使用したプルダウンアッセイを行った。その際に使用した CRKL truncated mutant は、完全長 CRKL、SH2 ドメインおよび N 末端側 SH3 ドメインから成る変異体、SH2 ドメインのみから成る変異体、N 末端側 SH3 ドメインのみから成る変異体、C 末端側 SH3 ドメインのみから成る変異体の、合計 5 種類である。使用した truncated mutant の模式図を図に示す。（図 1 6）

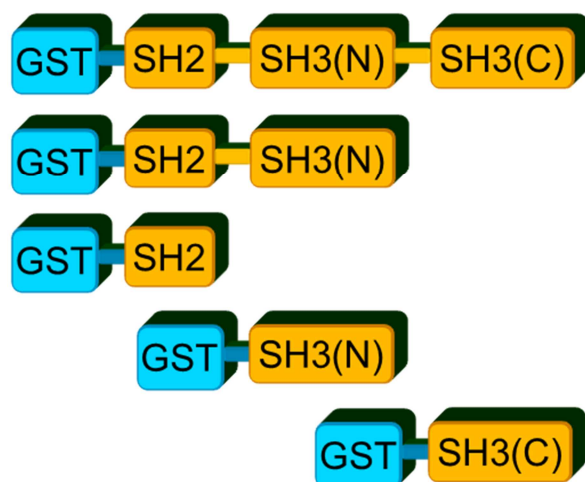


図 1 6 GST 融合 CRKL およびその truncated mutant の模式図

これらの GST 融合 CRKL truncated mutant および NS1-BP を HEK293T 細胞に共発現させ、プルダウンアッセイを行ったところ、N 末端側の SH3 ドメイン (SH3(N)) が CRKL と NS1-BP の結合に重要であることが判明した。C 末端側の SH3 ドメイン (SH3(C)) はこの結合に関与していない。
(図 1 7)

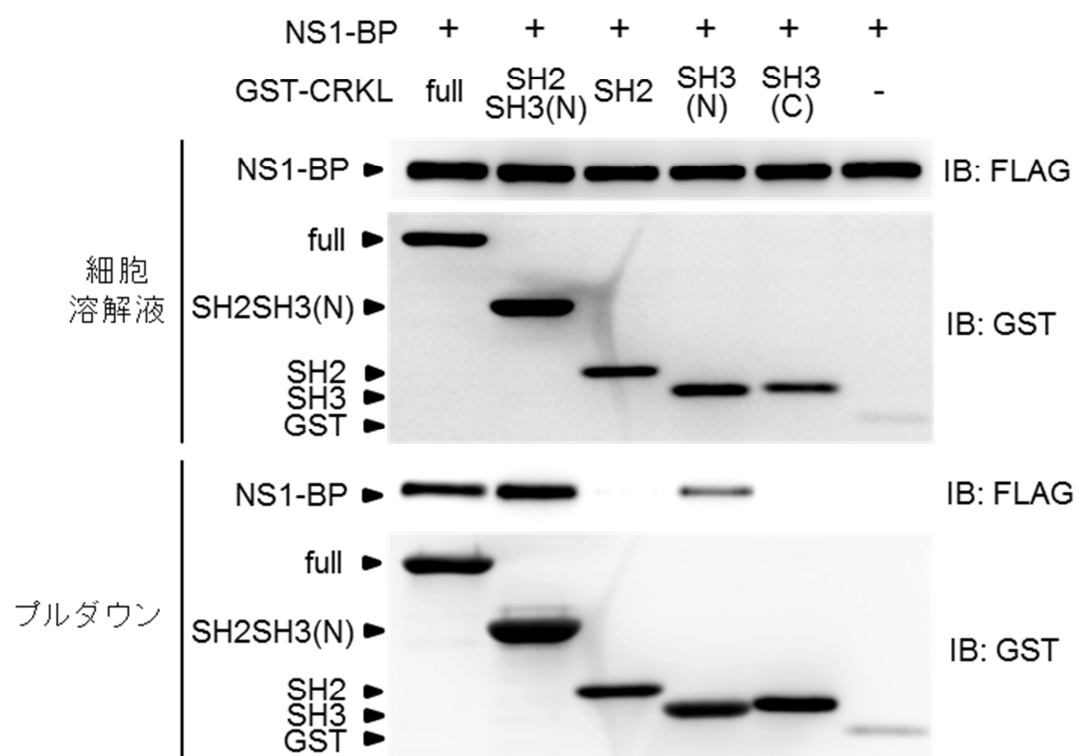


図 1 7 HEK293T 細胞でのプルダウンアッセイ
上段：細胞溶解液、下段：プルダウン

この結合が、SH3 機能依存的な結合であれば SH3(N)の機能障害型変異体である SH3(N)(W160L)を用いたプルダウンアッセイにて検出されなくなるはずである。我々は次にこの点に関して検討した。

その結果、SH3(N)(W160L)を用いても NS1-BP の結合は変わらず観察された。これは、両者の結合が PXXP 非依存性の結合であることを示唆する。
(図 1 8)

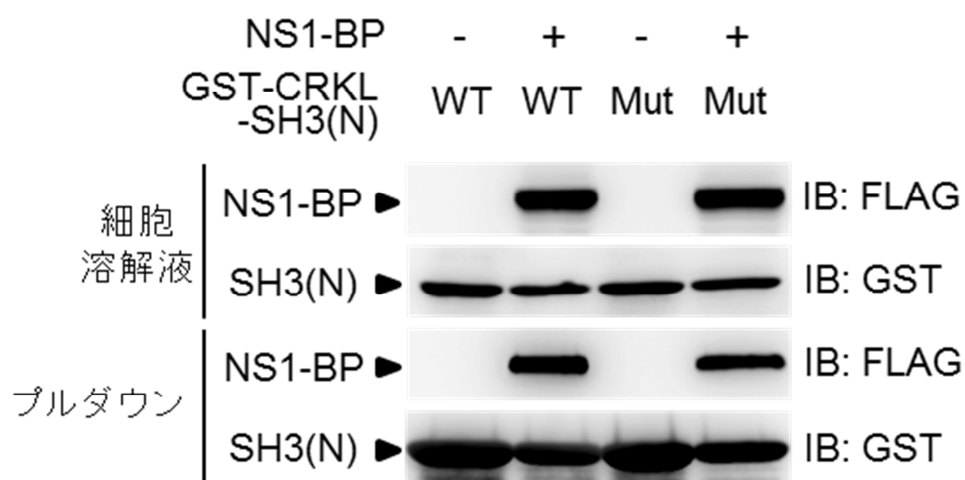


図 1 8 HEK293T 細胞でのプルダウンアッセイ

上段：細胞溶解液、下段：プルダウン

Mut: W160L

考察

NS1-BP は初め、インフルエンザ A ウイルスの細胞内結合パートナーとして同定され、pre-mRNA のスプライシングを阻害すると報告された¹⁰⁵。近年では NS1-BP は、hnRNPK との相互作用によりインフルエンザ A ウイルスの遺伝子発現や増殖の鍵となるメディエーターの 1 つであるという報告¹⁰⁶や、機能型の aryl hydrocarbon receptor の濃度を上昇させることで代謝的適応、ダイオキシン毒性、血管増生などに関与するといった報告¹⁰⁷がなされている。さらに、NS1-BP は alpha-enolase の亜型である MBP-1 が c-Myc の翻訳を抑制する作用を増強し、哺乳類細胞の恒常性の維持、細胞増殖能の制御に関わることが示唆されている¹⁰⁸。しかしながら、NS1-BP はその発見の由来でもある NS1 との相互作用における機能は詳細な報告がなされていない。本研究で我々は、NS1-BP の NS1 との相互作用における新たな機能を見出した。すなわち、NS1 が CRKL と協調して ERK のリン酸化を亢進し、細胞の生存能を上昇させる作用に対し、NS1-BP が調節的に働くというものである。NS1-BP 単独では細胞に過剰発現させても、大きな変化は見られなかった。また、CRKL との結合において、CRKL の N 末端側の SH3 ドメインが、NS1 と同様^{26,109}に NS1-BP でも重要であるということと同定した。しかしながら、CRKL-SH3(N)ドメインの SH3 ドメイン機能を欠失した変異体である SH3(N)(W160L)でも NS1-BP との結合が変わらず確認されたことより、CRKL と NS1-BP の結合は SH3 非依存的結合であることが示唆される。

インフルエンザウイルス由来タンパク NS1 は、宿主細胞へのウイルスの感染およびウイルス粒子の増殖に重要な因子であると考えられている。すなわち、NS1 はインフルエンザウイルスが宿主細胞に感染する際に宿主からの免疫反応を回避するために重要な因子であると考えられている⁹⁷。また、ウイルスが感染した宿主細胞がアポトーシスに陥るのを回避させ、生存活性を高め、ウイルス粒子が増殖するのに有利な環境を形成するとされている^{102,110}。PI3K/Akt pathway は宿主細胞のアポトーシス抑制、細胞増殖活性、サイトカイン産生などに重要である^{27,101,102,111}が、この経路がインフルエンザウイルス増殖における NS1 の重要な機能の 1 つとして挙げられている^{27,112}。一方、ERK シグナル経路は細胞接着、細胞周期進行、細胞の浸潤、細胞の生存、分化、代謝、翻訳など、多種多様の因子の制御に関与している

分子であり¹¹³、また、CRKL もまた多種多様な細胞生理活性を制御する重要なシグナル伝達分子である^{5,114}。過去の報告でインフルエンザ A ウイルス感染における ERK 活性の重要性が示唆されており、今回の我々の研究結果では、CRKL と協調的に働く NS1 依存的な ERK 活性の上昇がみられた。これより、インフルエンザ A ウイルスにとってその感染時に宿主細胞の抗ウイルス機構を回避するために、PI3K/Akt 経路の活性化に加えて ERK 経路の活性化も重要であることが示された。（図 1 9）

我々は本研究にて、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 NS1-BP の新たな機能を見出した。さらに、インフルエンザ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 の関与を確認した。また、当講座が保有している未公開データであるが、NS1-BP は DOCK ファミリータンパク質である DOCK2 と TOF-MAS データ上で結合していることが指摘されている。このことより、今回の研究結果には DOCK2 も関与する可能性があると考えられ、今回検討した CRKL 以外の CRK-DOCK ファミリータンパク質と NS1 および NS1-BP の関連の解析も今後の検討課題である。

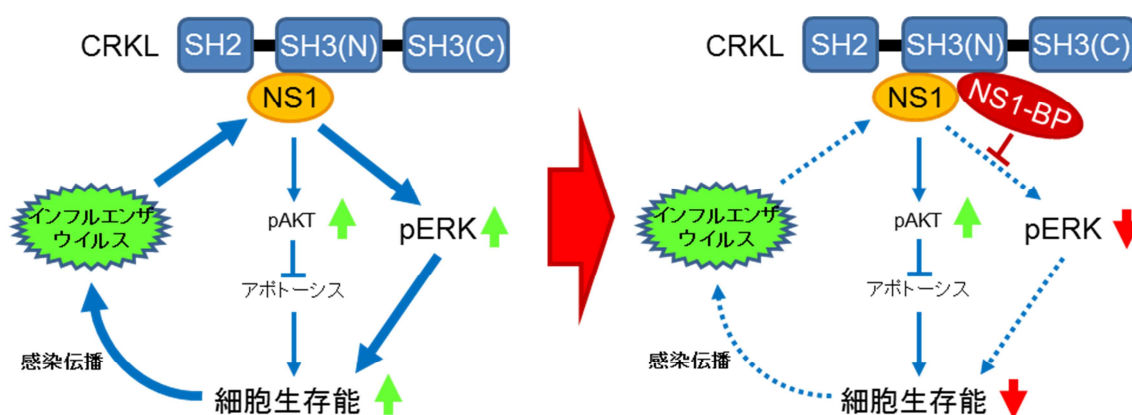


図 1 9 インフルエンザ A ウイルス感染伝播における NS1、NS1-BP および CRKL の関与の模式図

総括および結論

本研究ではシグナル伝達関連分子 **CRK-DOCK** ファミリータンパク質の解析をテーマの中心に据え、腫瘍および非腫瘍性疾患での新知見の同定を試みた。

第一章では、腫瘍における **CRK-DOCK** ファミリータンパク質の解析として、グリオブラストーマにおけるシグナル伝達関連タンパク質の発現を、免疫染色における発現強度および発現割合の両者を用いて臨床病理学的に解析し、その重要性を確認した。

第二章では、非腫瘍性疾患における **CRK-DOCK** ファミリータンパク質の解析として、分子生物学的手法を用いて、**CRKL** とインフルエンザ A ウイルス由来タンパク質 **NS1** およびその結合相手であるヒトタンパク質 **NS1-BP** の相互作用という観点で新たな知見を得た。

本研究を通して、**CRK-DOCK** ファミリータンパク質は腫瘍および非腫瘍性疾患の両者にて生理的に重要な因子の 1 つであることが再確認された。このことから、同ファミリータンパク質の研究は新しい診断法および治療法の開発に繋がる可能性があると考えられる。具体的には、免疫染色で **CRK-DOCK** ファミリータンパク質といくつかのタンパク質の発現を検討し、その多寡の組み合わせで腫瘍の **Grade** あるいはサブタイプを分類することで診断に応用できる可能性があると考ええる。また、遺伝子発現により分類することができれば、ターゲットとすべき分子が候補として挙がることになるので、薬剤、抗体等を用いた治療標的として応用することにつながり得る。このような臨床応用を目指した研究を今後も続けていきたいと考える。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた北海道大学大学院医学研究科病理学講座腫瘍病理学分野 田中伸哉教授に厚く御礼申し上げます。

また、研究において直接ご指導頂いた北海道大学大学院医学研究科探索病理学講座 西原広史特任准教授に心から感謝申し上げます。

最後に、本研究に御協力くださった北海道大学大学院病理学講座腫瘍病理学分野、探索病理学講座ならびに脳神経外科学分野の皆様心から御礼申し上げます。

引用文献

- 1 Mayer, B. J., Hamaguchi, M. & Hanafusa, H. A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature* **332**, 272-275 (1988).
- 2 Sabe, H., Okada, M., Nakagawa, H. & Hanafusa, H. Activation of c-Src in cells bearing v-Crk and its suppression by Csk. *Mol. Cell Biol.* **12**, 4706-4713 (1992).
- 3 Sabe, H., Shoelson, S. E. & Hanafusa, H. Possible v-Crk-induced transformation through activation of Src kinases. *J. Biol. Chem.* **270**, 31219-31224 (1995).
- 4 Matsuda, M. *et al.* Two species of human CRK cDNA encode proteins with distinct biological activities. *Mol. Cell Biol.* **12**, 3482-3489 (1992).
- 5 ten Hoeve, J., Morris, C., Heisterkamp, N. & Groffen, J. Isolation and chromosomal localization of CRKL, a human crk-like gene. *Oncogene* **8**, 2469-2474 (1993).
- 6 Senechal, K., Halpern, J. & Sawyers, C. L. The CRKL adaptor protein transforms fibroblasts and functions in transformation by the BCR-ABL oncogene. *J. Biol. Chem.* **271**, 23255-23261 (1996).
- 7 Feller, S. M., Knudsen, B. & Hanafusa, H. c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk. *EMBO J.* **13**, 2341-2351 (1994).
- 8 Hasegawa, H. *et al.* DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Mol. Cell Biol.* **16**, 1770-1776 (1996).
- 9 Tanaka, S. *et al.* C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 3443-3447 (1994).
- 10 Yamada, S. *et al.* Overexpression of CRKII increases migration and invasive potential in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* **303**, 84-91 (2011).

- 11 Fathers, K. E. *et al.* Crk adaptor proteins act as key signaling integrators for breast tumorigenesis. *Breast cancer research : BCR* **14**, R74 (2012).
- 12 Sriram, G. & Birge, R. B. Emerging roles for crk in human cancer. *Genes Cancer* **1**, 1132-1139 (2010).
- 13 Jiao, L. R. *et al.* MicroRNAs targeting oncogenes are down-regulated in pancreatic malignant transformation from benign tumors. *PLoS One* **7**, e32068 (2012).
- 14 Wang, J. *et al.* Crk and CrkL present with different expression and significance in epithelial ovarian carcinoma. *Molecular carcinogenesis* **50**, 506-515 (2011).
- 15 Miller, C. T. *et al.* Increased C-CRK proto-oncogene expression is associated with an aggressive phenotype in lung adenocarcinomas. *Oncogene* **22**, 7950-7957 (2003).
- 16 Lee, W. L., Cosio, G., Ireton, K. & Grinstein, S. Role of CrkII in Fcγ receptor-mediated phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **282**, 11135-11143 (2007).
- 17 Boussiotis, V. A., Freeman, G. J., Berezovskaya, A., Barber, D. L. & Nadler, L. M. Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* **278**, 124-128 (1997).
- 18 Tanaka, S. *et al.* Both the SH2 and SH3 domains of human CRK protein are required for neuronal differentiation of PC12 cells. *Mol. Cell Biol.* **13**, 4409-4415 (1993).
- 19 Weinstein, D. E., Dobrenis, K. & Birge, R. B. Targeted expression of an oncogenic adaptor protein v-Crk potentiates axonal growth in dorsal root ganglia and motor neurons in vivo. *Brain research. Developmental brain research* **116**, 29-39 (1999).
- 20 Sun, J. & Barbieri, J. T. Pseudomonas aeruginosa ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 32794-32800 (2003).
- 21 Deng, Q., Sun, J. & Barbieri, J. T. Uncoupling Crk signal transduction by Pseudomonas exoenzyme T. *J. Biol. Chem.* **280**, 35953-35960 (2005).
- 22 Weidow, C. L., Black, D. S., Bliska, J. B. & Bouton, A. H. CAS/Crk

- signalling mediates uptake of Yersinia into human epithelial cells. *Cell Microbiol.* **2**, 549-560 (2000).
- 23 Burton, E. A., Plattner, R. & Pendergast, A. M. Abl tyrosine kinases are required for infection by *Shigella flexneri*. *EMBO J.* **22**, 5471-5479 (2003).
 - 24 Bougneres, L. *et al.* Cortactin and Crk cooperate to trigger actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells. *The Journal of cell biology* **166**, 225-235 (2004).
 - 25 Suzuki, M. *et al.* Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *J. Exp. Med.* **202**, 1235-1247 (2005).
 - 26 Heikkinen, L. S. *et al.* Avian and 1918 Spanish influenza A virus NS1 proteins bind to Crk/CrkL Src homology 3 domains to activate host cell signaling. *J. Biol. Chem.* **283**, 5719-5727 (2008).
 - 27 Hale, B. G., Batty, I. H., Downes, C. P. & Randall, R. E. Binding of influenza A virus NS1 protein to the inter-SH2 domain of p85 suggests a novel mechanism for phosphoinositide 3-kinase activation. *J. Biol. Chem.* **283**, 1372-1380 (2008).
 - 28 Kiyokawa, E. *et al.* Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* **12**, 3331-3336 (1998).
 - 29 Cote, J. F. & Vuori, K. Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J. Cell Sci.* **115**, 4901-4913 (2002).
 - 30 Meller, N., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W. B., Del Pozo, M. A. & Schwartz, M. A. Zizimin1, a novel Cdc42 activator, reveals a new GEF domain for Rho proteins. *Nature cell biology* **4**, 639-647 (2002).
 - 31 Brugnera, E. *et al.* Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nature cell biology* **4**, 574-582 (2002).
 - 32 Cote, J. F., Motoyama, A. B., Bush, J. A. & Vuori, K. A novel and evolutionarily conserved PtdIns(3,4,5)P3-binding domain is necessary for DOCK180 signalling. *Nature cell biology* **7**, 797-807 (2005).
 - 33 Kanai, A. *et al.* Identification of DOCK4 and its splicing variant as

- PIP3 binding proteins. *IUBMB life* **60**, 467-472 (2008).
- 34 Feller, S. M. & Lewitzky, M. Potential disease targets for drugs that disrupt protein-- protein interactions of Grb2 and Crk family adaptors. *Curr. Pharm. Des.* **12**, 529-548 (2006).
- 35 Bar-Sagi, D. & Hall, A. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* **103**, 227-238 (2000).
- 36 Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. Small GTP-binding proteins. *Physiological reviews* **81**, 153-208 (2001).
- 37 Defilippi, P., Di Stefano, P. & Cabodi, S. p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks. *Trends in cell biology* **16**, 257-263 (2006).
- 38 Brown, M. C. & Turner, C. E. Paxillin: adapting to change. *Physiological reviews* **84**, 1315-1339 (2004).
- 39 Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kurata, T., Sugimura, H. & Matsuda, M. Evidence that DOCK180 up-regulates signals from the CrkII-p130(Cas) complex. *J. Biol. Chem.* **273**, 24479-24484 (1998).
- 40 Valles, A. M., Beuvin, M. & Boyer, B. Activation of Rac1 by paxillin-Crk-DOCK180 signaling complex is antagonized by Rap1 in migrating NBT-II cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 44490-44496 (2004).
- 41 Hall, A. G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. *Science* **280**, 2074-2075 (1998).
- 42 Kaibuchi, K., Kuroda, S. & Amano, M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annual review of biochemistry* **68**, 459-486 (1999).
- 43 Jarzynka, M. J. *et al.* ELMO1 and Dock180, a bipartite Rac1 guanine nucleotide exchange factor, promote human glioma cell invasion. *Cancer Res.* **67**, 7203-7211 (2007).
- 44 Smith, H. W., Marra, P. & Marshall, C. J. uPAR promotes formation of the p130Cas-Crk complex to activate Rac through DOCK180. *The Journal of cell biology* **182**, 777-790 (2008).
- 45 Wang, H. *et al.* The role of Crk/Dock180/Rac1 pathway in the malignant behavior of human ovarian cancer cell SKOV3. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **31**, 59-67 (2010).

- 46 Zhao, F. *et al.* Overexpression of dedicator of cytokinesis I (Dock180) in ovarian cancer correlated with aggressive phenotype and poor patient survival. *Histopathology* **59**, 1163-1172 (2011).
- 47 Li, H. *et al.* Association between Galphai2 and ELMO1/Dock180 connects chemokine signalling with Rac activation and metastasis. *Nature communications* **4**, 1706 (2013).
- 48 Takino, T. *et al.* CrkI adapter protein modulates cell migration and invasion in glioblastoma. *Cancer Res.* **63**, 2335-2337 (2003).
- 49 Wang, L. *et al.* Signaling adaptor protein Crk is indispensable for malignant feature of glioblastoma cell line KMG4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 976-981 (2007).
- 50 Nomura, N., Nomura, M., Sugiyama, K. & Hamada, J. Src regulates phorbol 12-myristate 13-acetate-activated PKC-induced migration via Cas/Crk/Rac1 signaling pathway in glioblastoma cells. *Int. J. Mol. Med.* **20**, 511-519 (2007).
- 51 Lv, S. *et al.* Crkl Efficiently Mediates Cell Proliferation, Migration, and Invasion Induced by TGF-beta Pathway in Glioblastoma. *Journal of molecular neuroscience : MN* (2013).
- 52 Tsuda, M. & Tanaka, S. Roles for crk in cancer metastasis and invasion. *Genes Cancer* **3**, 334-340 (2012).
- 53 Louis, D. N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**, 97-109 (2007).
- 54 Mrugala, M. M. & Chamberlain, M. C. Mechanisms of disease: temozolomide and glioblastoma--look to the future. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **5**, 476-486 (2008).
- 55 Cheng, C. L. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition reverses temozolomide resistance in a DNA mismatch repair-deficient malignant glioma xenograft. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 1364-1368 (2005).
- 56 Trivedi, R. N., Almeida, K. H., Fornsaglio, J. L., Schamus, S. & Sobol, R. W. The role of base excision repair in the sensitivity and resistance to temozolomide-mediated cell death. *Cancer Res.* **65**, 6394-6400 (2005).
- 57 Mitra, S. MGMT: a personal perspective. *DNA Repair (Amst)* **6**, 1064-1070 (2007).

- 58 Tubbs, J. L., Pegg, A. E. & Tainer, J. A. DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy. *DNA Repair (Amst)* **6**, 1100-1115 (2007).
- 59 Kokkinakis, D. M., Bocangel, D. B., Schold, S. C., Moschel, R. C. & Pegg, A. E. Thresholds of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase which confer significant resistance of human glial tumor xenografts to treatment with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea or temozolomide. *Clin. Cancer Res.* **7**, 421-428 (2001).
- 60 Hegi, M. E. *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 997-1003 (2005).
- 61 Everhard, S. *et al.* Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro Oncol.* **11**, 348-356 (2009).
- 62 Stupp, R. *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* **10**, 459-466 (2009).
- 63 Stupp, R. *et al.* Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2712-2718 (2010).
- 64 Esteller, M. *et al.* Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1350-1354 (2000).
- 65 Felsberg, J. *et al.* Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res.* **15**, 6683-6693 (2009).
- 66 Hegi, M. E. *et al.* Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin. Cancer Res.* **10**, 1871-1874 (2004).
- 67 Karayan-Tapon, L. *et al.* Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma

- patients, assessed by five different methods. *J. Neurooncol.* **97**, 311-322 (2010).
- 68 Lechapt-Zalcman, E. *et al.* O(6) -methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation and low MGMT-encoded protein expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with biodegradable carmustine wafer implants after initial surgery followed by radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide. *Cancer* **118**, 4545-4554 (2012).
- 69 Hsu, C. Y. *et al.* Exclusion of histiocytes/endothelial cells and using endothelial cells as internal reference are crucial for interpretation of MGMT immunohistochemistry in glioblastoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **37**, 264-271 (2013).
- 70 Lalezari, S. *et al.* Combined analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression and promoter methylation provides optimized prognostication of glioblastoma outcome. *Neuro Oncol.* **15**, 370-381 (2013).
- 71 Anda, T. *et al.* Relationship between expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, glutathione-S-transferase pi in glioblastoma and the survival of the patients treated with nimustine hydrochloride: an immunohistochemical analysis. *Neurol. Res.* **25**, 241-248 (2003).
- 72 Chinot, O. L. *et al.* Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in inoperable newly diagnosed glioblastoma patients treated with neoadjuvant temozolomide. *J. Clin. Oncol.* **25**, 1470-1475 (2007).
- 73 Pinto, L. W. *et al.* Glioblastomas: correlation between oligodendroglial components, genetic abnormalities, and prognosis. *Virchows Arch.* **452**, 481-490 (2008).
- 74 Homma, T. *et al.* Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **65**, 846-854 (2006).
- 75 Hilton, D. A., Penney, M., Pobereskin, L., Sanders, H. & Love, S. Histological indicators of prognosis in glioblastomas: retinoblastoma protein expression and oligodendroglial

- differentiation indicate improved survival. *Histopathology* **44**, 555-560 (2004).
- 76 Kraus, J. A. *et al.* Molecular genetic alterations in glioblastomas with oligodendroglial component. *Acta Neuropathol.* **101**, 311-320 (2001).
- 77 Salvati, M. *et al.* Cerebral glioblastoma with oligodendroglial component: analysis of 36 cases. *J. Neurooncol.* **94**, 129-134 (2009).
- 78 Miller, C. R., Dunham, C. P., Scheithauer, B. W. & Perry, A. Significance of necrosis in grading of oligodendroglial neoplasms: a clinicopathologic and genetic study of newly diagnosed high-grade gliomas. *J. Clin. Oncol.* **24**, 5419-5426 (2006).
- 79 Kanno, H. *et al.* Prognostic implication of histological oligodendroglial tumor component: clinicopathological analysis of 111 cases of malignant gliomas. *PLoS One* **7**, e41669 (2012).
- 80 Feng, H. *et al.* Activation of Rac1 by Src-dependent phosphorylation of Dock180(Y1811) mediates PDGFRalpha-stimulated glioma tumorigenesis in mice and humans. *The Journal of clinical investigation* **121**, 4670-4684 (2011).
- 81 Feng, H. *et al.* Phosphorylation of dedicator of cytokinesis 1 (Dock180) at tyrosine residue Y722 by Src family kinases mediates EGFRvIII-driven glioblastoma tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **109**, 3018-3023 (2012).
- 82 Feng, H. *et al.* EGFRvIII stimulates glioma growth and invasion through PKA-dependent serine phosphorylation of Dock180. *Oncogene* (2013).
- 83 Hegi, M. E., Rajakannu, P. & Weller, M. Epidermal growth factor receptor: a re-emerging target in glioblastoma. *Current opinion in neurology* **25**, 774-779 (2012).
- 84 Nazarenko, I. *et al.* PDGF and PDGF receptors in glioma. *Uppsala journal of medical sciences* **117**, 99-112 (2012).
- 85 Moriyama, T., Kataoka, H., Kono, M. & Wakisaka, S. Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor c-Met in brain tumors: evidence for a role in progression of astrocytic tumors (Review). *Int. J. Mol. Med.* **3**, 531-536 (1999).

- 86 Snuderl, M. *et al.* Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer cell* **20**, 810-817 (2011).
- 87 Laws, E. R. *et al.* Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *Journal of neurosurgery* **99**, 467-473 (2003).
- 88 Salminen, E., Nuutinen, J. M. & Huhtala, S. Multivariate analysis of prognostic factors in 106 patients with malignant glioma. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **32A**, 1918-1923 (1996).
- 89 Jacobs, T. W., Gown, A. M., Yaziji, H., Barnes, M. J. & Schnitt, S. J. Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J. Clin. Oncol.* **17**, 1983-1987 (1999).
- 90 Cao, V. T. *et al.* The correlation and prognostic significance of MGMT promoter methylation and MGMT protein in glioblastomas. *Neurosurgery* **65**, 866-875; discussion 875 (2009).
- 91 Rodriguez, F. J. *et al.* MGMT immunohistochemical expression and promoter methylation in human glioblastoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **16**, 59-65 (2008).
- 92 Yachi, K. *et al.* Relevance of MSP assay for the detection of MGMT promoter hypermethylation in glioblastomas. *International journal of oncology* **33**, 469-475 (2008).
- 93 Sonoda, Y. *et al.* O(6)-Methylguanine DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression is correlated with progression-free survival in patients with glioblastoma. *International journal of clinical oncology* **15**, 352-358 (2010).
- 94 Preusser, M. *et al.* Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain Pathol.* **18**, 520-532 (2008).
- 95 Friedman, H. S. *et al.* DNA mismatch repair and

- O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *J. Clin. Oncol.* **16**, 3851-3857 (1998).
- 96 Cao, Y. *et al.* Use of magnetic resonance imaging to assess blood-brain/blood-glioma barrier opening during conformal radiotherapy. *J. Clin. Oncol.* **23**, 4127-4136 (2005).
 - 97 Hale, B. G., Randall, R. E., Ortin, J. & Jackson, D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* **89**, 2359-2376 (2008).
 - 98 Fernandez-Sesma, A. The influenza virus NS1 protein: inhibitor of innate and adaptive immunity. *Infect. Disord. Drug Targets* **7**, 336-343 (2007).
 - 99 Ehrhardt, C. & Ludwig, S. A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell Microbiol.* **11**, 863-871 (2009).
 - 100 Shin, Y. K., Liu, Q., Tikoo, S. K., Babiuk, L. A. & Zhou, Y. Influenza A virus NS1 protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway by direct interaction with the p85 subunit of PI3K. *J. Gen. Virol.* **88**, 13-18 (2007).
 - 101 Ehrhardt, C. *et al.* Bivalent role of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) during influenza virus infection and host cell defence. *Cell Microbiol.* **8**, 1336-1348 (2006).
 - 102 Ehrhardt, C. *et al.* Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J. Virol.* **81**, 3058-3067 (2007).
 - 103 Hale, B. G., Jackson, D., Chen, Y. H., Lamb, R. A. & Randall, R. E. Influenza A virus NS1 protein binds p85beta and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 14194-14199 (2006).
 - 104 Shin, Y. K. *et al.* SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/Akt signaling pathway activation. *J. Virol.* **81**, 12730-12739 (2007).
 - 105 Wolff, T., O'Neill, R. E. & Palese, P. NS1-Binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of

- infected cells. *J. Virol.* **72**, 7170-7180 (1998).
- 106 Tsai, P. L. *et al.* Cellular RNA Binding Proteins NS1-BP and hnRNP K Regulate Influenza A Virus RNA Splicing. *PLoS Pathog.* **9**, e1003460 (2013).
 - 107 Dunham, E. E., Stevens, E. A., Glover, E. & Bradfield, C. A. The aryl hydrocarbon receptor signaling pathway is modified through interactions with a Kelch protein. *Mol. Pharmacol.* **70**, 8-15 (2006).
 - 108 Perconti, G. *et al.* The kelch protein NS1-BP interacts with alpha-enolase/MBP-1 and is involved in c-Myc gene transcriptional control. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1774-1785 (2007).
 - 109 Hrinčius, E. R. *et al.* CRK adaptor protein expression is required for efficient replication of avian influenza A viruses and controls JNK-mediated apoptotic responses. *Cell Microbiol.* **12**, 831-843 (2010).
 - 110 Kurokawa, M., Koyama, A. H., Yasuoka, S. & Adachi, A. Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication. *Int. J. Mol. Med.* **3**, 527-530 (1999).
 - 111 Matsuda, M. *et al.* Characterization of the interaction of influenza virus NS1 with Akt. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **395**, 312-317 (2010).
 - 112 Li, Y., Anderson, D. H., Liu, Q. & Zhou, Y. Mechanism of influenza A virus NS1 protein interaction with the p85beta, but not the p85alpha, subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and up-regulation of PI3K activity. *J. Biol. Chem.* **283**, 23397-23409 (2008).
 - 113 Roskoski, R., Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.* **66**, 105-143 (2012).
 - 114 de Jong, R., ten Hoeve, J., Heisterkamp, N. & Groffen, J. Tyrosine 207 in CRKL is the BCR/ABL phosphorylation site. *Oncogene* **14**, 507-513 (1997).