



Title	膵癌におけるシグナル伝達アダプター分子CRKの役割の解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	植村, 慧子
Description	配架番号 : 2573
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14170号
Issue Date	2020-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78900
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Satoko_Uemura_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 植村 慧子

学 位 論 文 題 名

膵癌におけるシグナル伝達アダプター分子 CRK の役割の解析
(Analysis of role for signaling adaptor protein CRK in pancreatic cancer)

【背景と目的】

近年、様々な癌種で薬物治療の発展に伴い生存率の向上が認められているが、膵癌は依然として極めて予後不良な疾患である。膵癌治療における唯一の根治治療は外科的切除であるが、膵癌の早期診断は困難であり、外科的切除の対象となる患者は 30%程度に過ぎない。また膵癌に対して、ゲムシタビンを始め様々な薬剤や併用療法が登場し今日に至るが、十分な予後改善効果を得るには至っていない。膵癌は KRAS 変異を高頻度に認め、RAS の恒常的な活性化により下流のシグナル経路が活性化されており、上流のチロシンキナーゼ阻害剤の効果に乏しい。このような現状を踏まえ、分子標的治療による新たなアプローチが期待されている。本研究では、RAS に依存しないシグナル伝達経路として、アダプター分子 Crk (CT10-regulated kinase) に着目した。

Crk はニワトリの肉腫誘導レトロウイルス CT10 がコードする癌遺伝子産物から分離された癌遺伝子であり、チロシンキナーゼ Src の酵素活性調節領域である SH2、SH3 を有し、SH2-SH3 からなる Crk-I、SH2-nSH3-cSH3 からなる Crk-II、Crk-II と同様の SH 領域から成る Crk-L が Crk のアイソフォームとして知られている。Crk はチロシンキナーゼとグアニンヌクレオチド交換因子である C3G や Dock180 を連結し、低分子量 G 蛋白質である Rap、Rac、Ras を活性化する。北海道大学腫瘍病理学教室での先行研究において、Crk は細胞の増殖、運動、接着を制御し、滑膜肉腫、膠芽腫、肺癌、膀胱癌等において癌の浸潤・転移に寄与することが判明しているが、膵癌と Crk との関連は未だ不明である。本研究では、膵癌における Crk の役割を解明し、新たな治療標的となり得るか検討することを目的とした。

【材料と方法】

ヒト膵癌手術検体 51 症例を用いて Crk の免疫組織化学染色を行い、染色強度と生命予後との関連を評価した。次に、膵癌の 95%で検出される KRAS 変異を有する 4 種類のヒト膵癌細胞株 (PANC-1、AsPC-1、MIA PaCa-2、Capan-2) を用いて、以下の検討を行った。1) Crk および関連蛋白質の発現量、また Crk の上流および下流分子や関連シグナル伝達経路のリン酸化状態をウエスタンブロッティング法により検討した。2) 免疫沈降法により、Crk と下流分子である Dock180 および C3G との結合比率を解析した。3) shRNA を用いて Crk 安定ノックダウン細胞株の樹立を試みた。Crk と Crk-L の各ノックダウン細胞、およびそれぞれのコントロール細胞を樹立するため、腫瘍病理学教室でこれまで使用実績のある 4 つの shRNA 生成用プラスミドを使用した (pSuper-empty, pSper-Crki, pLenti6.4-Nega, pLenti-Crk-Li(1205))。ピューロマイシン耐性細胞株を樹立し、Western blotting において Crk の発現量を解析した。4) 樹立した Crk ノックダウン細胞株を用いて、足場依存적および非依存적増殖能、運動能、接着能をコントロール細胞と比較検討した。5) *In vivo* 実験として、 5×10^5 個の PANC-1 細胞 (コントロールおよび Crk ノックダウン細胞) を 6 週齢の雌ヌードマウスの膵臓に被膜下注射して同所性異種移植モデルマウスを作製し、マウスの生存率を比較検討した。6) 形成された腫瘍において、壊死領域および MIB-1 インデックスを計測し、コントロールおよび Crk ノックダウン細胞間での差異を解析した。

【結果】

ヒト膵癌切除検体を用いた Crk の免疫組織化学染色では発現レベルに差異が認められ、Crk 高発現群の患者は低発現群と比較して有意に生存期間が短縮した。

4 種類の膵癌細胞株について Crk および Crk 関連分子の発現量をウエスタンブロッティング法で解析したところ、Crk、Crk-L、p130^{Cas}、パキシリン、Dock180 は細胞株間で有意な差は検出されず、C3G は PANC-1 および MIA PaCa-2 細胞で発現量の増加を認めた。免疫沈降法による解析では、Dock180 は Crk と Crk-L の両方に結合したが、C3G は Crk よりも Crk-L に対して高い結合能力を示した。Crk に対する shRNA を使用して Crk-I および Crk-II 共に発現量が効果的に減少した PANC-1、AsPC-1、MIA PaCa-2 細胞を樹立した。形態的には、Crk ノックダウン細胞は、コントロール細胞と比較して伸展度が低く、円形に近い形態を示した。Crk ノックダウン細胞は、コントロール細胞と比較して増殖能が低下し、特に AsPC-1 および MIA PaCa-2 細胞でその抑制効果は顕著であった（足場依存性増殖）。またコロニー形成アッセイでは、Crk をノックダウンした PANC-1 および AsPC-1 細胞では大型コロニーの数が減少し、足場非依存性増殖能の低下を示した。創傷治癒アッセイにより、PANC-1 細胞で Crk ノックダウンにより細胞運動性が有意に低下した。接着アッセイにおいて、フィブロネクチンへの接着は Crk ノックダウン PANC-1 細胞で減少し、AsPC-1 細胞ではコラーゲンへの接着が減少した。また血清刺激条件下での c-Met のリン酸化は、PANC-1 および AsPC-1 細胞において Crk ノックダウンにより抑制される傾向が認められた。

In vivo 同所性異種移植モデルマウスでは、コントロール群と Crk ノックダウン群の両者で膵臓に腫瘍が形成されたが、壊死領域と MIB-1 インデックスは共に、Crk ノックダウン群で有意に減少した。さらに、Crk ノックダウン群ではマウスの生存期間が有意に延長した。

【考察】

本研究により、ヒト膵癌組織における Crk 発現量が患者予後と関連していたことから、Crk の免疫染色強度の評価は膵癌患者の予後予測の一助となる可能性が示唆された。樹立した Crk ノックダウン膵癌細胞において c-Met のリン酸化が減少し、同時に細胞の増殖能、運動能、接着能の低下を認めた。また *in vivo* マウス実験において、Crk ノックダウン細胞によって形成された腫瘍では、急速な細胞増殖の結果生じる壊死領域の減少と細胞の増殖能力を示す MIB-1 インデックスの低下が認められ、コントロール群に比較してマウスの生存期間の延長が示された。

膵癌では KRAS 変異が高頻度に検出されるため、シグナル伝達経路の上流に位置する EGFR や VEGFR などのチロシンキナーゼ阻害剤は、基本的には効果が認められない一方で、本研究により、チロシンキナーゼ下流の Crk は膵癌において次の治療標的となり得ることが示唆された。HGF/c-Met シグナルの活性化は細胞の浸潤・増殖を促進し腫瘍形成に寄与していると報告されており、HGF/c-Met/Crk シグナル経路において Crk が c-Met 蛋白質の安定化に関与していることや Crk が *HGF* の転写を制御している可能性も示唆される。現在、膵癌の分子標的治療においては、エルロチニブが唯一ゲムシタビンとの併用で標準治療の適応となっているが、その効果は十分ではなく、新たな分子標的治療薬が切望されている。このような現状において、Crk および HGF/c-Met/Crk シグナル経路に着目した新規治療法の確立が期待される。

【結論】

ヒト膵癌組織における Crk 発現量と予後との関連、Crk ノックダウン膵癌細胞における c-Met のリン酸化低下に関連した細胞の増殖能、運動能、接着能の低下と *in vivo* 同所異種移植モデルマウスにおける検討により、Crk とその関連蛋白質は膵癌治療において抗腫瘍効果が期待できる新たな分子標的となることが期待された。