



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_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 植村 慧子

審査担当者	主査	准教授	神山 俊哉
	副査	教授	松野 吉宏
	副査	教授	園下 将大
	副査	教授	近藤 亨

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)

本研究は、癌の悪性化に関わると報告されているシグナル伝達アダプター分子 Crk について、膵癌と Crk の関連を Crk ノックダウン膵癌細胞を樹立して検討し、Crk が膵癌治療において新たな分子標的となりうることを明らかにしたものである。

審査にあたり、まず副査の松野教授から、ヒト膵癌組織に対する Crk の免疫組織化学染色において染色強度を 3 群に分類した基準について記載すべきとの指摘があった。症例の Stage 分類について質問があり、申請者は、Stage Ia, Ib, II a, II b のいずれかであり Stage II b の患者が多くを占めると回答した。染色強度が High の群で Crk は間質にも強く染まる意義について質問があった。申請者は、Crk 高発現群で間質細胞での Crk の染色強度も高い傾向があり、間質に富んでいる膵癌において Crk 陽性間質細胞が多いことは悪性度が高いことと相関する可能性も考えられると回答した。

副査の園下教授からは、本文要旨の「膵癌では KRAS 変異を高頻度に認めるため、KRAS を標的とした分子標的治療は困難である」という記載は正しい表現かという質問があった。申請者は、近年 KRAS 阻害剤の開発が進んでいるが、他の分子標的治療薬のように臨床応用には至っていないためと回答した。これに対し、近年 G12C などの特定の点突然変異に対し不可逆的な共有結合を作りその活性を抑える covalent inhibitor が開発され治験が開始されており、KRAS 変異があるからこそ specific なターゲットになりうるという考え方もあるとの指摘があった。申請者は、KRAS 阻害剤の論文 (Canon et al, 2019, *Nature*) を引用し本文を適切な表現に改めることとした。次に Crk ノックダウンで標的にしたのはどのアイソフォームかという質問があり、申請者は Crk-I と Crk-II であると回答した。Crk はキナーゼドメイン、あるいはキナーゼ活性を持っているか、また Crk に活性があるのならば Crk の基質のリン酸化状態を調べ Crk の機能自体がどの程度低下しているか調べた方がよいとの指摘があった。Crk にはキナーゼドメインやキナーゼ活性は存在しないため、申請者は、Crk ノックダウンによる効果は増殖能や運動能を評価するアッセイを用いて解析するのが妥当と考えた。次に Crk はヘテロダイマーを作るのかという質問があり、申請者は形成しないと回答した。IP の結果で Dock180 のバンドの高さがわずかにずれて

いる理由について質問があり、申請者は何らかの修飾が入っている可能性があるとは回答した。

副査の近藤教授からは、KRAS 上流の Crk に焦点を当てた理由について、KRAS 阻害は容易でないため、細胞増殖以外で運動能や接着能を阻害することで悪性度を低下させるために Crk という新しい標的に着目したという文言を入れると研究を始めた理由がより明確になるとの指摘があった。さらに Rac や Rap の変異がないというデータを示すべきとの指摘があった。c-Met 阻害剤添加の実験において、20 μ M という値が Crk に対し特異性を有しているか示すべきとの指摘があり、リン酸化抗体アレイに関して、4 つの分子のリン酸化が実際に低下したかコントロールを示すべきとの指摘があった。

主査の神山准教授からは、臨床検体を用いた Crk の免疫組織化学染色について、膵癌の切除例の予後因子である R0 または R1、術後化学療法施行の有無など患者背景因子を記載すべきであるとの指摘があった。Crk ノックダウン膵癌細胞 3 種類の挙動が細胞によって異なる理由について質問があった。申請者は、PANC-1 細胞は増殖が速く Crk ノックダウンの程度も弱いと、増殖能の低下が他の細胞と比較して少ない可能性が考えられると回答した。MMP-9 などのプロテアーゼ活性の評価を行ったか、足場非依存性増殖能に MIA PaCa-2 のデータがない理由について質問があり、申請者は、それぞれ行っていないと回答した。c-Met は Crk の上流に位置しているにもかかわらず Crk ノックダウンによりリン酸化が抑制される理由について質問があった。申請者は、膀胱癌において HGF/c-Met/Crk 経路でポジティブフィードバックが働き Crk が HGF 産生を制御していることが明らかになっており、膵癌でも同様のことが言えると考えられると回答した。

園下教授から、マウスの実験において原発巣のサイズの差について質問があり、申請者は、コントロール群の方が腫瘍サイズが大きい傾向を認めたが有意差は評価していないと回答した。考察中に間質の線維化を抑制することが腫瘍抑制に働くという記載があるが、膵癌において Shh シグナル伝達阻害剤を Gemcitabine と投与し間質の増生を抑えると患者予後がかえって悪化したという報告があり、間質が抗癌剤耐性に関与していると言い切るべきではないとの指摘があった。申請者は、間質が drug delivery を阻害するとされる一方で癌の増殖を防いでいるという見方もあるため、適切な表現に改めると回答した。

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。