

論文の内容の要旨

論文題目 「Reduced C-terminal Src kinase (Csk) Activity is inversely correlated with pp60^{c-src} activity in Colorectal Cancer」
(大腸癌における C-terminal Src Kinase (Csk)活性と pp60^{c-src} 活性の逆相関)

指導教官： 小俣政男教授
東京大学大学院医学系研究科
平成9年4月1日 入(進)学
医学博士課程
消化器内科学専攻
氏名： William Rengifo Cam

はじめに

Src ファミリータンパクのキナーゼ活性はチロシンキナーゼ残基のリン酸化と脱リン酸化によって調節されている。このチロシンキナーゼ残基は C 末端の近くにあり、human の pp60^{c-src} の場合はチロシン 530 に相当する。

最近の知見では、Csk(C-terminal Src kinase)は細胞室のチロシンキナーゼタンパクであり、in vitro で Src ファミリーゼをチロシンキナーゼ不活性化する。Csk は特異的に pp60^{c-src} のチロシン 530 をリン酸化することにより、キナーゼ活性を抑制する。

大腸癌では pp60^{c-src} のキナーゼ活性が高いということが示されているが、チロシンキナーゼ活性が高い理由は明らかではない。

対象

大腸癌患者と cell line における Csk と pp60^{c-src} の活性の状況を決

定する。

方法

臨床検体は手術中に得られた 24 検体（男性 11 検体、女性 13 検体で平均年齢は 66 ± 9 歳で 47 歳から 79 歳であった。）

大腸癌の cell line、LoVo, LS-174-T, HCT 116, HT 29, HCT 15, SW 48, SW 837 と WiDr を検討して、正常の CCD 841CoN と比較した。

pp60^{c-src}, pp60^{c-src} [pY⁵³⁰] と Csk の Western blot を特異的な抗体を用いて行った。

キナーゼ活性の測定

a) pp60^{c-src} 活性。免疫沈降の pp60^{c-src} キナーゼの phosphotransferase 活性をアッセイキットを用いて測定した。そのキットは pp60^{c-src} の特異的な substrate peptide (KVEKIGEGTYGVVYK) のリン酸化を測定する。

b) Csk 活性。免疫沈降されたタンパクは polyamino acids, poly(Glu, Tyr) と incubation して、SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) で電気泳動し、レントゲンまたは BAS2000 で解析した。

結果

大腸癌の臨床検体

-pp60^{c-src} タンパク：24 検体の pp60^{c-src} タンパクの平均レベルは、近くの正常粘膜と比較して 2.6 ± 0.13 倍に上昇した。

-pp60^{c-src} 活性：大腸癌の pp60^{c-src} 活性は、近くの正常粘膜と比較して 7.8 ± 0.55 倍に上昇した。

ヒト大腸癌の特異的な pp60^{c-src} キナーゼ活性（全 pp60^{c-src} キナーゼ活性 / pp60^{c-src} タンパク量）は正常粘膜と比較して 3.04 倍高かった。

-pp60^{c-src} のリン酸化：癌組織における pp60^{c-src} のリン酸化の平均値は、正常粘膜と比較して低かった（relative ratio 0.50 ± 0.08 ）。

-Csk タンパク：腫瘍組織の Csk タンパクの平均レベルは、近くの正常粘膜と比較して低かった（ 0.53 ± 0.08 倍）。

-Csk 活性：腫瘍における P³² の poly(Glu, Tyr) への取り込み率は、近くの正常粘膜と比較して低かった（ 0.53 ± 0.09 倍）。

Csk 活性は 8 検体（33%）では著しい低下（正常粘膜と比較して 20%

以下)が見られ、7 検体 (29%) では低下 (正常粘膜と比較して 20% から 60%) が見られた。9 検体 (38%) では正常粘膜と比較して有意な変化はなかった。

Csk と pp60^{c-src} の相関: Csk 活性は Csk タンパク量と相関して ($r=0.96$, $P<0.0001$)、pp60^{c-src} のリン酸化レベルにも相関した ($r=0.96$, $P<0.0001$)。しかし、臨床検体の大腸癌の Csk キナーゼ活性と pp60^{c-src} キナーゼ活性は逆相関した ($r=-0.71$, $P<0.0001$)。

臨床ステージの評価: Dukes C の臨床検体の Csk 活性は Dukes B と比較して有意差はなかった。または、lympho-meta “+” の臨床検体の Csk 活性は lympho-meta “-” と比較して有意差もなかった。

大腸癌の cell line

-pp60^{c-src} タンパク: pp60^{c-src} タンパクの平均レベルは CCD 841 CoN と比較して 1.86 ± 0.28 倍に上昇した。

-pp60^{c-src} 活性: pp60^{c-src} 活性は、正常の大腸上皮の cell line である CCD 841 CoN と比較して、すべての大腸癌の cell line では 7.39 ± 1.22 倍に上昇していた。

-pp60^{c-src} のリン酸化: 大腸癌の cell line における pp60^{c-src} のリン酸化においては、正常の大腸上皮の cell line である CCD 841 CoN と比較して、 0.41 ± 0.15 倍と低かった。

-Csk タンパク: Csk タンパクの平均レベルは、正常の大腸上皮の cell line である CCD 841 CoN と比較して、 0.54 ± 0.13 倍と低かった。

-Csk 活性: Csk 活性の平均レベルは、正常の大腸上皮の cell line である CCD 841 CoN と比較して、 0.52 ± 0.11 倍と低かった。

考察

これまで大腸癌では pp60^{c-src} キナーゼ活性の上昇が報告されている。これらの組織で pp60^{c-src} キナーゼ活性が上昇するメカニズムはいまだ分かっていない。ヒトの大腸癌では、pp60^{c-src} の特異的な活性の平均値が、正常の大腸粘膜組織と比較して 3 倍高値であった。大腸癌における pp60^{c-src} のキナーゼ活性は、pp60^{c-src} タンパクの発現増加だけでなく、pp60^{c-src} 固有の活性増加でも説明できる。

また、ヒトの癌に関して、我々が報告した肝細胞癌以外では、Csk の役割が明らかになっていない。

我々の実験では、大腸癌の 60% で Csk のチロシンキナーゼ活性が減少していた。さらに Csk タンパク発現は、大腸癌の cell lines においても減少していた (LoVo, LS174-T, HCT 116, HCT 15, と WiDr)。これまで Csk 活性がどのように調節されているか明らかではなかった。ヒト大腸癌組織を用いた実験の結果は、Csk 活性は、Csk 蛋白量と相関していた。一方、Csk キナーゼ活性は、pp60^{c-src} リン酸化と相関していた。しかし pp60^{c-src} のキナーゼ活性は、Csk キナーゼ活性と逆相関していた。Csk 活性減少は pp60^{c-src} 活性を増加させ、大腸癌の発癌過程と深く関与している可能性がある。

このことは、pp60^{c-src} の活性を制御するうえで、Csk が重要な役割を果たしていることを示している。

結論

Csk タンパクとそのキナーゼ活性は 60% の大腸癌で低下しており、pp60^{c-src} キナーゼ活性のレベルとは逆相関があることが分かった。