

論文の内容の要旨

肺がんにおける

Crk associated substrate lymphocyte type の役割

指導教員 森本 幾夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成18年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

近藤 俊輔

肺癌は世界の悪性腫瘍の死亡原因の第一位である。約 135 万人が罹患し、約 118 万人が毎年死亡している。肺癌の大半は非小細胞肺癌 (NSCLC : non small cell lung cancer) である。NSCLC の外科切除患者の約 40%が再発し、極めて予後不良である。外科切除患者に対しては再発を予測し、その予後を推定することは重要である。

Epidermal growth factor receptor (EGFR) は悪性腫瘍の増殖、アポトーシスの抑制、浸潤に関与する。NSCLC の 40~80%で EGFR の過剰発現が報告され、予後因子と相関から EGFR のリン酸化を抑制する阻害剤が開発されている。EGFR 阻害薬である gefitinib の奏効患者

から検出された EGFR の遺伝子変異は NSCLC 患者の個別化治療の標的として検証が行われている。

当研究室において $\beta 1$ インテグリン刺激でチロシンリン酸化される 105kDa の蛋白を発見し、Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L) と命名した。Cas-L は、リンパ球のみならず種々のがん細胞においてもその発現が認められ、HEF1 や NEDD9 と同一遺伝子であることが判明し、p130Cas、Efs/Sin や HEPL 共に Cas ファミリーとされる。Cas-L の機能は多岐にわたり、増殖因子やインテグリンにより活性化され細胞の増殖、遊走・浸潤制御、アポトーシス制御、細胞周期制御にかかわる。

癌細胞でも Cas-L は遊走・浸潤に重要な役割を果たしている。LKB1 を欠失したマウスで誘発される肺線癌細胞で Cas-L 発現が増強し、逆に、LKB1 の発現により Cas-L の発現が抑制される。A549 細胞株への SHP-2 の導入により内在する Cas-L のチロシンリン酸化が制御され、fibronectin (FN) 刺激による細胞の遊走が低下することが示されている。

本研究では NSCLC の重要な増殖因子である EGFR による Cas-L の制御機構を解明し、ヒト検体を用いて Cas-L 発現の臨床的意義について検証することを目的とした。

PC-9 (EGFR DE746-A750) と A549 (EGFR Wt) を用いた EGF 刺激により、Cas-L のチロシンリン酸化が著明に認められ、gefitinib 投与では Cas-L のチロシンリン酸化レベルの低下が認められた。Gefitinib により PC-9 の EGFR 発現、Cas-L、p-FAK、p130Cas が 24 時間後に強く抑制された。RNAi で Cas-L と p130Cas タンパクの発現を抑制した PC-9 と A549 を EGF 刺激し遊走・浸潤能を評価し、いずれの細胞株も Cas-L 抑制で遊走・浸潤能の低下を認め、FN 刺激でも同様の結果であった。Cas-L 過剰で遊走・浸潤の亢進が認められ、EGF、

FN 刺激においても同様であった。Cas-L ドメイン欠損モデルを用い EGF 刺激による A549 の遊走能を評価した。SH3、SD と SR を欠損した Cas-L では EGF 刺激による細胞遊走能の亢進を認めなかった。

PC-14 に pGL3-luciferase と Cas-L を導入した stable transformant を作成し、免疫不全マウスの皮下に注入し、bioluminescence imaging (BLI) を用いて解析したところ、注入後 28 日目に Cas-L 過剰発現 PC-14 を注入したマウス両側の胸部に検出された。

1999 年から 2001 年の間に切除された患者標本と Cas-L ポリクローナル抗体を用いて、免疫組織学的に評価した。検体の判定は 3 人の判定者が行い、30%以上の癌細胞で検出されたものを Cas-L 陽性とした。Cas-L の陽性率は 46.6% (28/60 人) で Cas-L 陽性ではリンパ節浸潤 (P=0.02)、病理組織学的なリンパ管浸潤 (P=0.01) や静脈浸潤 (P=0.001) との相関が認められた。切除後の観察期間中央値は 58.5 カ月 (range, 7-91 カ月) で 60 例のうち Cas-L 群では 20/28 例、Cas-L 陰性群では 6/32 例で再発を認めた。Recurrence free survival (RFS) の中央値は Cas-L 群に比較し有意に短く ($p < 0.001$)、OS の中央値も Cas-L 群で有意に短かった ($p < 0.001$)。Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析でも、RFS では Cas-L 陽性ハザード比は 4.11 (95%信頼区間、1.64-10.53、 $p = 0.003$)、OS での Cas-L 陽性ハザード比は 4.15 (95%信頼区間、1.35-12.82、 $p = 0.01$) であった。

我々の研究により、NSCLC における Cas-L の役割が示された。まず、NSCLC での発現が認められ、その重要な増殖因子である EGFR 刺激により Cas-L のリン酸化が直接的あるいは間接的に制御されることが示され、NSCLC の遊走・浸潤に Cas-L が関与することが示された。

in vivo マウス移植モデルで、Cas-L の過剰発現により NSCLC の遊走・浸潤、転移が促進す

ることが証明された。Cas-L の発現と患者の生命予後との関連をヒト NSCLC の切除検体を用いて検証し、臨床的に Cas-L の発現がリンパ管、静脈やリンパ節への浸潤を示すだけでなく、NSCLC の再発予測因子となり得ることが示唆された。

EGFR や PDGFR などはさまざまなインテグリンと相補的役割を有し細胞の遊走・浸潤に寄与している。β1 インテグリンの活性により FAK や Src ファミリーキナーゼが Cas-L をチロシンリン酸化させること、また、EGFR とインテグリンの相互作用の報告と考え合わせると、EGF 刺激による Cas-L のリン酸化が直接的な作用以外に、EGFR と相互作用したインテグリンを介した間接的な作用も考慮できる。PC-9 は EGFR のシグナル経路が優位であり、gefitinib でこのシグナルを遮断したことにより Cas-L のリン酸化が抑制されたことは EGFR シグナルの抑制によるものと考えられる。Gefitinib による PC-9 の EGFR シグナル伝達の持続的遮断により、FAK、Cas-L や p130Cas の減少もみられ、Cas ファミリー蛋白質が EGFR シグナル経路に関与することが見出された。

Cas-L の過剰発現により EGF 刺激下で遊走能、浸潤能が上昇することが示された。RNAi で Cas-L の発現を抑制し EGF 刺激での細胞遊走・浸潤能が低下したことから、Cas-L の発現が FN による β1 インテグリン刺激のみならず、EGFR シグナルにおいても生物学的に重要な役割を担うことが示された。Cas-L の SH3、SD、セリンリッチドメイン欠損変異体において、その遊走能の亢進がないことが示された。SH3 ドメインは FAK の poly-proline モチーフを介した相互作用から、EGF 刺激による Cas-L と FAK の相互作用が考えられ、SD ドメイン欠損による遊走抑制はリン酸化阻害や Src ファミリーキナーゼとの相互作用の障害が関与したものと思われる。p130Cas では Crk との相互作用が細胞遊走に重要であることから

SD ドメインへの Crk の相互作用が重要である可能性も考えられる。セリンリッチドメインに認められる、four-helix bundle は、接着斑に局在する蛋白に共通する構造であり、EGF 刺激による細胞遊走能亢進においても、重要な役割を担っている可能性が考えられる。

In vivo モデルでは転移巣での Cas-L の発現レベルの上昇が、種々の腫瘍転移モデルにおいて報告されている。BLI での腫瘍分布の可視化により、Cas-L の過剰発現株が転移を誘発されることが明らかとなった。皮下注入部では取り込みと腫瘍径ともに Cas-L 過剰発現とコントロールでは差がなく、肺癌の増殖シグナル伝達過程での Cas-L の役割は浸潤・転移シグナルに比べて小さいものと考えられた。

原発性肺腺癌患者検体の Cas-L 発現とリンパ節への浸潤や病理学的な予後因子として報告されているリンパ管、静脈内浸潤、更に外科切除患者の転移再発性と予後との相関を解析し、Cas-L の発現はリンパ管や静脈内浸潤やリンパ節浸潤とも相関し、臨床的な浸潤因子であることが示された。Cas-L の発現は転移・再発の危険性の増大を有意に示し、予後に関与することが示され、再発予測因子として臨床的な意義が示唆された。Cox 回帰モデルによる多変量解析においても有意な因子であることが示されたことは、Cas-L が単独で再発を予測する因子となる可能性を示したものである。NSCLC の治療において外科切除は治癒可能な治療法であるが再発した患者では完全治癒は困難であるため再発の防止は重要であり、外科切除患者に対する術後補助療法の開発が進められてきたが、未だ満足いく治療法ではない。これと並行して、再発に関する遺伝子プロファイルも報告されているが未だ確立したものはない。

これまで、癌の転移過程で挙げられた①基底膜や基質への接着、分解・破壊、②脈管内

への浸潤、③遊走、④tumorigenesisに基づく『seed and soil』説の分子機構の一端としての、Cas-L分子の役割が当研究により示された。Cas-Lの肺癌における臨床的意義を検証することにより、再発を予測する因子の一つとして提案することが可能となった。

今後、prospectiveな患者集積により、臨床的な意義を検証し、患者の選別による術後補助化学療法の実施あるいはCas-Lを新たな分子標的とする薬剤の開発を行うことにより、NSCLC患者の再発予防と転移抑制が可能になることが将来的に期待される。