

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 近藤俊輔

本研究は肺癌細胞における Crk associated substrate lymphocyte type (Cas-L) の役割を解明するために、非小細胞肺癌の重要な増殖因子である epidermal growth factor receptor (EGFR) との相互作用を検証し、さらに、in vivo で Cas-L 発現が非小細胞肺癌の浸潤に関与し、ヒト検体を用いた臨床的意義の検証を試み、下記の結果を得ている。

1. 肺癌細胞株である PC-9 と A549 を用いて EGF 刺激、gefitinib による EGFR のリン酸化阻害での Cas-L のチロシンリン酸化を免疫沈降およびウェスタンブロットで検出した。これにより肺癌細胞株では EGF 刺激により Cas-L のチロシンリン酸化が亢進することが示され、gefitinib の添加により Cas-L のチロシンリン酸化が抑制され、EGFR シグナルに Cas-L が直接あるいは間接的に制御されることが示された。
2. EGF 刺激による肺癌細胞株の遊走・浸潤への Cas-L の関与を検証するために Borden chamber を用いた migration assay と invasion assay を実施した。PC-9 と A549 の Cas-L を RNAi で抑制したものと、Cas-L をトランスフェクションした過剰発現株を作成し assay した。Cas-L の発現抑制は EGF 刺激による細胞の遊走・浸潤能を低下させ、過剰発現は亢進させることが示された。このことは肺癌細胞の遊走・浸潤に Cas-L が強く関与することを示したものである。
3. Cas-L の deletion mutant を A549 に導入し EGF 刺激による遊走能を検証した結果、Cas-L の SD、SH3、SR ドメインの欠損は細胞遊走の亢進が起こらないことから、これらのドメインが EGF 刺激による細胞遊走に重要な役割を果たしている可能性が示唆され、これまでの報告から FAK や Src などとの相互作用による Cas-L のリン酸化が重要である可能性が示された。
4. マウス移植モデルによる肺癌細胞の転移能を BLI 法で可視化し、Cas-L の過剰発現させた PC-14 は腰部皮下注射部位から胸部への転移が促進されることが示された。
5. ヒトの原発性肺腺癌の切除検体を用い、免疫組織学的に Cas-L の発現とリン

パ節への転移、リンパ管と静脈への浸潤の相関と再発までの期間を解析し臨床的意義を検証した。臨床的にも Cas-L の発現は浸潤を亢進し、さらに、再発までの期間が短いことが示された。Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析では原発巣での Cas-L の発現が临床上重要な N2 リンパ節浸潤やリンパ管への浸潤と共に再発予測因子となり得ることが示された。

以上、本論文は非小細胞肺癌における Cas-L の役割を示した。非小細胞肺癌の重要な増殖因子である EGFR を刺激すると 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、非小細胞肺癌の遊走・浸潤に Cas-L が関与することを示唆された。in vivo マウス移植モデルで、Cas-L の過剰発現により非小細胞肺癌の遊走・浸潤、転移が促進することを証明し、ヒトの検体を用いて Cas-L の発現が非小細胞肺癌の再発予測因子となり得ることを示し、非小細胞肺癌の臨床に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。