

神経芽腫における部分欠損型ALK変異の解析

著者	大久保 淳
学位授与年月日	2014-03-24
URL	http://doi.org/10.15083/00007001

審査の結果の要旨

氏名 大久保 淳

本研究は神経芽腫細胞株 NB-1 においてみられた短縮型 ALK の発現に対して、その分子機構と、同定された変異に対して変異ベクターを作製し導入した系を用いて造腫瘍性、チロシンキナーゼの活性の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 神経芽腫細胞株 NB-1 において短縮型 ALK が確認されたことから、その分子機構のため RT-PCR にて転写産物の解析を行ったところ、エクソン 2,3 の欠損したインフレームシフトが確認された。ALK タンパクの一次構造として細胞外領域の MAM 領域の部分欠損が示された。
2. 高密度 SNP アレイ、genomic qPCR、サザンブロット解析にてゲノム構造の解析を行ったところ、ALK のエクソン 2,3 に比べ、エクソン 1,4 においてゲノムのコピー数が高度増幅していることが確認され、ゲノムにおける細胞外領域の部分欠損型の変異が示された。
3. 部分欠損型の変異を強制発現させたマウスの正常繊維芽細胞株である NIH3T3 細胞を用いて、軟寒天培地によるコロニー形成能の解析を行ったところ、ALK の部分欠損型変異ベクターを導入した細胞で有意にコロニー増生が確認された。同様にヌードマウスへの接種により腫瘍の形成が認められた。部分欠損型の変異に対して、*in vitro* および *in vivo* における造腫瘍性が示された。
4. NB-1 細胞株におけるウェスタンブロット解析において、内在性の ALK のリン酸化が亢進していることが示された。部分欠損型 ALK 変異を導入した NIH3T3 細胞を用いた解析により、部分欠損型変異を導入した細胞の酵素活性が上昇していることが示された。また、下流分子の解析を行ったところ、部分欠損型 ALK 変異を導入した細胞では、STAT 経路の選択的な活性化が示された。

5. 共免疫染色と糖鎖切断酵素を用いた解析により、NB-1 細胞株において ALK は小胞体に局在していることが示された。このことから部分欠損型の ALK が小胞体に局在を変化させていることにより JAK/STAT 経路を選択的に活性化している機構が考えられた。

6. ALK 阻害剤である低分子化合物 TAE684 と ALK 特異的な siRNA によるノックダウンを施行し増殖抑制の評価を行ったところ、NB-1 細胞株では明らかな細胞増殖の抑制が確認された。部分欠損型の ALK 変異の分子標的療法への可能性が示された。

以上、本論文は神経芽細胞腫細胞株 NB-1 において、細胞外領域の部分欠損型の変異を同定し、その機能解析から、部分欠損型の変異が機能獲得型の変異であることを明らかにした。また、下流シグナルの解析結果から、局在の変化による、選択的なシグナルの活性化が示された。本研究は、癌における *ALK* の悪性化の新たな機構の解明に寄与すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。