

博士論文

論文題目 神経芽腫における部分欠損型*ALK*変異の解析

氏 名 大久保 淳

目次

1. 要旨	4
2. 序文	5
3. 方法	14
1) 細胞	
2) タンパク質抽出	
3) ウェスタンブロット(WB)	
4) 免疫沈降	
5) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	
6) サザンブロット解析	
7) SNP array 解析	
8) ALK 変異の強制導入	
9) 軟寒天培地によるコロニー増殖能の確認	
10) nude マウスへの皮下移植	
11) 細胞免疫染色	
12) 糖鎖切断酵素による解析	
13) siRNA による増殖アッセイ	
14) ALK キナーゼ阻害剤による増殖抑制効果の検討	
15) 統計解析	

4. 結果	28
1) 神経芽腫細胞株 NB-1 における短縮型 ALK の解析	
2) NB-1 細胞株における部分欠損型変異のゲノム構造の解析	
3) 部分欠損型 ALK 変異の造腫瘍性	
4) 部分欠損型 ALK 変異の発現誘導によるリン酸化の解析	
5) 部分欠損型変異 ALK の小胞体局在	
6) ALK の発現抑制による細胞増殖の変化	
5. 考察	58
6. 結論	64
7. 引用文献	67
8. 謝辞	76

1. 要旨

*ALK*は膜貫通型のチロシンキナーゼであり、悪性リンパ腫において融合遺伝子として同定され、神経芽腫において点突然変異による活性型変異が確認された。

今回、短縮型の *ALK* を発現する神経芽腫細胞株の分子機構の解析を行い、細胞外領域の部分欠損型の変異を同定した。部分欠損型変異を導入した細胞が軟寒天培地でのコロニー形成などの造腫瘍性をもち、チロシンキナーゼとして過剰な酵素活性がみられていることを確認した。下流分子として *STAT* 経路の活性化がみられ、その機序として小胞体への局在の変化が関与している可能性が示された。

これらの結果から癌における *ALK*の悪性化の新たな機構を解明し、治療標的の可能性が示唆された。

2. 序 文

1. *ALK* 融合型遺伝子について

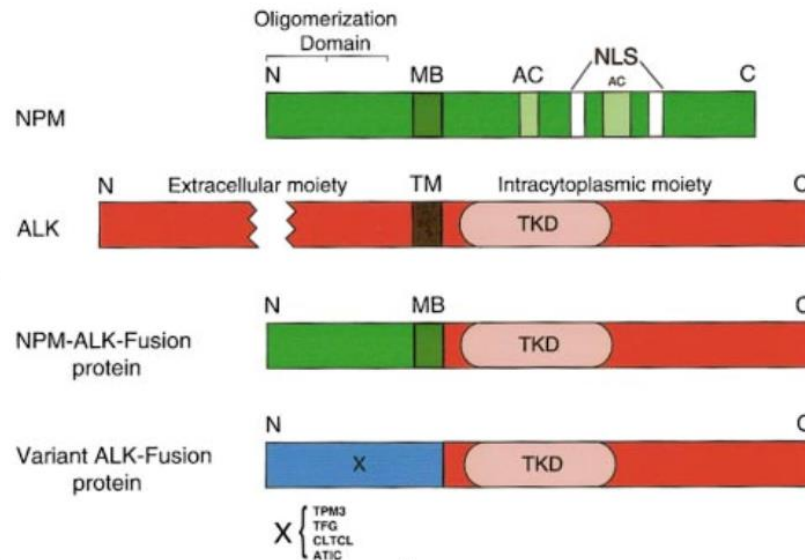
Anaplastic lymphoma kinase (*ALK*)は、インスリン受容体ファミリーに属する膜貫通型チロシンキナーゼであり、成人の未分化大細胞性リンパ腫において2;5 転座により生じる融合遺伝子として同定されたがん遺伝子である[1-2]。5q35上の *NPM1*(nucleophosmin1)と融合することにより、チロシンキナーゼの恒常的な活性化をきたし、その下流である *RAS/ERK*, *PI3K/AKT* または *JAK/STAT* 経路を活性化して細胞増殖を促進する(Figure 1)。また、まれな固形腫瘍である inflammatory myofibroblastic tumor でも *TPM3*, *TPM4*, *CARS* および *CLTC* といった複数の相手遺伝子と転座が確認されている[3-6]。

また、間野らは肺非小細胞がんにおいて新規の *ALK* 融合遺伝子が存在することを報告した。cDNA 発現レトロウィルスライブラリーの技術を用いて、肺非小細胞がんの約 4~5%で 2p23 逆位により微小管会合タンパク *EML4* (echinoderm microtubule associated protein-like 4)とチロシンキナーゼ領域を含む細胞内領域とが融合した *EML4-ALK* 融合遺伝子が生じていることが見いだされた(Figure 2) [7]。

正常の ALK キナーゼはその細胞外領域でなんらかのリガンドと結合して活性化され細胞の増殖を誘導すると考えられているが、EML4-ALK は EML4 内の二量体化領域 coiled-coil ドメインにより恒常的に二量体化されることで、常にチロシンキナーゼの酵素活性が亢進し発癌を誘導することが報告されている [7-8]。

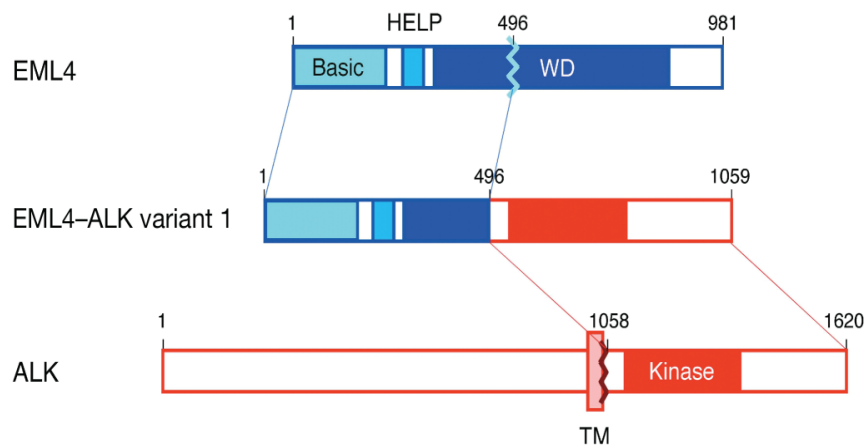
そして *EML4-ALK* を導入したトランスジェニックマウスは生後数週で肺がんを形成し、同マウスに ALK 阻害剤を投与したところ、肺がんは速やかに消失し肺がんの新しい分子標的療法になる可能性が示された [9]。その後、ALK 阻害剤である crizotinib による臨床試験にて良好な効果が報告され、臨床に治療採用薬として短期間のうちに認可をうけたことが知られる [10]。

Figure 1 NPM, ALK ならびに NPM-ALK 融合遺伝子のタンパク構造



未分化大細胞性リンパ腫において 2;5 転座により 5q35 の *NPM1* と融合遺伝子を生じる[8]。NPM1 : nucleophosmin1。

Figure 2 EML4, ALK ならびに EML4-ALK 融合遺伝子のタンパク構造



2p23 逆位により微小管会合タンパク *EML4* と *ALK* のチロシンキナーゼ領域を含む細胞内領域とが融合した *EML4-ALK* 融合遺伝子が生じている[7-8]。

EML4 : echinoderm microtubule associated protein-like 4。

2. 神経芽腫における *ALK* 活性化型変異の同定

ヒト悪性腫瘍におけるがん遺伝子 *ALK* については融合遺伝子型の変化が報告されていたが、その後、滝田らは神経芽腫の解析を行い *ALK* においてはじめて点突然変異による活性化型変異を報告した(Figure 3) [11]。

神経芽腫は、胎生期の神経堤に由来する交感神経系や副腎から発生する小児期の代表的な固形腫瘍である[12]。小児悪性腫瘍のなかでは、白血病、脳腫瘍について頻度が高く、約 90% が 4 歳以下で発症する。発症年齢が 1 歳未満の症例は予後良好で自然消退する例もある一方で、発症年齢が 1 歳以上の症例はほとんどが進行例であり、現在の集学的な治療を行っても予後は不良である[13-15]。

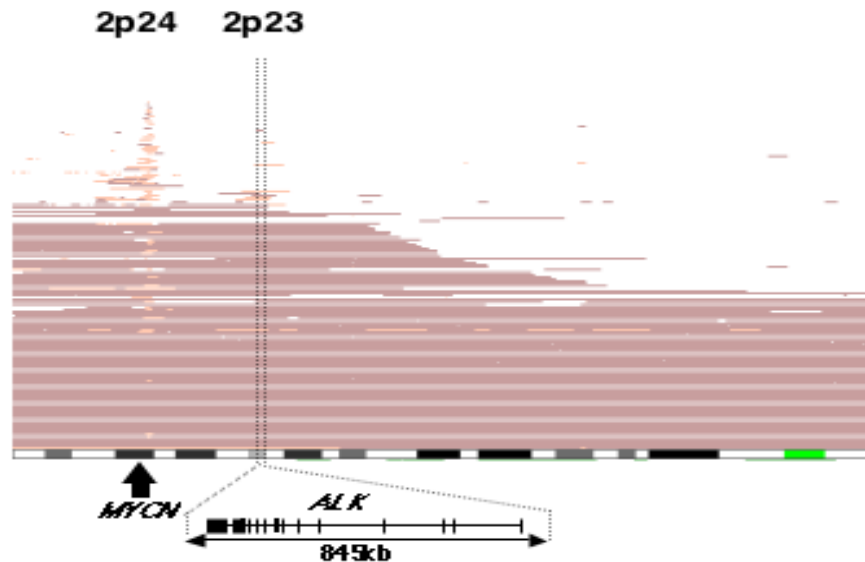
これまでに神経芽腫の染色体異常としては、1p, 2q, 9p, 11q, 14q, 18q のヘテロ接合性消失、17q のコピー数の増加などが知られ[16-23]、遺伝子異常としては、*MYCN* の増幅、*caspase8* 遺伝子のメチル化などが報告されているが、治療の標的タンパクとなる分子などについては明らかにされていなかった [20,24]。

滝田らは神経芽腫の細胞株 24 株、新鮮腫瘍 215 例につき、高密度 SNP アレイである Affymetrix GeneChip 250K *Nsp* I アレイ/CNAG/AsCNAR を用いて、網羅的なゲノムのコピー数の解析を行い、神経芽腫の遺伝子異常の基盤を明ら

かにし発症に関与する遺伝子を同定することを試みた。SNP アレイを用いた解析により、染色体上の *MYCN* の近傍に 2p23 領域の *ALK* に高度遺伝子増幅が確認された。さらに神経芽腫における *ALK* 遺伝子変異の有無に関して、合計 239 検体の神経芽腫につき、直接塩基配列決定法による変異解析を行ない、その結果、新鮮腫瘍 215 例中、13 例(6.1%)、細胞株 24 株中、8 株 (33%) にミスセンス変異が検出された。このミスセンス変異は、キナーゼドメインに存在することが判明し、特にコドン Phe1174 とコドン Arg1275 は変異が集積するホットスポットであることが見いだされた。また、新鮮腫瘍で変異が確認された症例の多くは神経芽腫の進行症例であることが確認された(Figure 4) [11]。

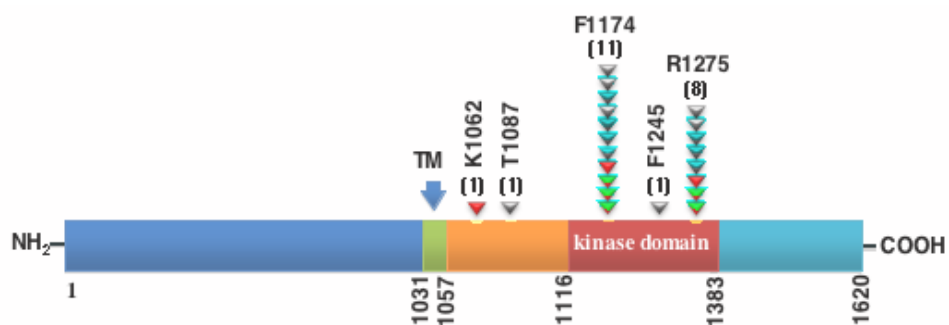
変異 *ALK* の機能解析を行い、この点突然変異がキナーゼの活性化型変異であることを証明し、癌における *ALK* の点突然変異による活性化をはじめて証明した。そして、神経芽腫においても *ALK* キナーゼ阻害剤による分子標的治療の臨床試験が開始されており、難治性の進行神経芽腫の患児に対する新規治療として期待されている[25-26]。

Figure 3 神経芽腫での高度増幅領域における *ALK* 遺伝子の発見



神経芽腫におけるゲノムコピー数の集積図。神経芽腫においては 2p に高度増幅領域（赤）が集積する領域が 2 か所みられる。2p24 の高度増幅域に *MYCN* がみられ、2p23 の高度増幅域には *ALK* が確認される[11]。

Figure 4 神経芽腫に検出された *ALK* 点突然変異



ALK の一次構造と確認された点突然変異。キナーゼドメインの 90%に変異が検出され、とくに、コドン Phe1174 とコドン Arg1275 は変異が集中するホットスポットであることが確認された[11]。

3. 癌におけるチロシンキナーゼ型受容体 ALK の活性化型変化

ヒトの腫瘍におけるチロシンキナーゼ型受容体に活性化型の変化として *EGFR*、*HER2* 遺伝子などにおける過剰発現、*Kit* 遺伝子、*RAS* 遺伝子などの点突然変異、*Ret* 遺伝子における融合遺伝子などが報告される。

現在まで報告されている *ALK* の活性化型の変異について報告する (Figure 5)。 *ALK* においても同様に、頻度の高いもので ALCL、IMT、NSCLC、DLBCL その他、ESCC、RMC、RCC、乳がん、大腸がんでも *ALK* 融合遺伝子の報告されている [27]。 *ALK* の点突然変異は神経芽腫にて多く報告されるが、未分化甲状腺がんでは 10% に *ALK* のキナーゼ領域の点突然変異が報告される [28]。

チロシンキナーゼの活性化機構としてポリペプチド性増殖因子をはじめとするリガンドが、受容体チロシンキナーゼの細胞外領域に結合するとき、レセプターは二量体を形成する。この二量体化によって細胞内のチロシンキナーゼドメインがたがいに接近し、自己リン酸化により活性が上昇する。 *ALK* の活性化の機序として、*EML4-ALK* のように遺伝子融合による二量体の形成の亢進、キナーゼドメインの点突然変異による恒常的なリン酸化の亢進が示されている (Figure 6) [25]。このように報告されている *ALK* の活性化型変化としては、増幅、融合遺伝子、点突然変異である。

Figure 5 さまざまな癌種における ALK の活性化型変化[27]

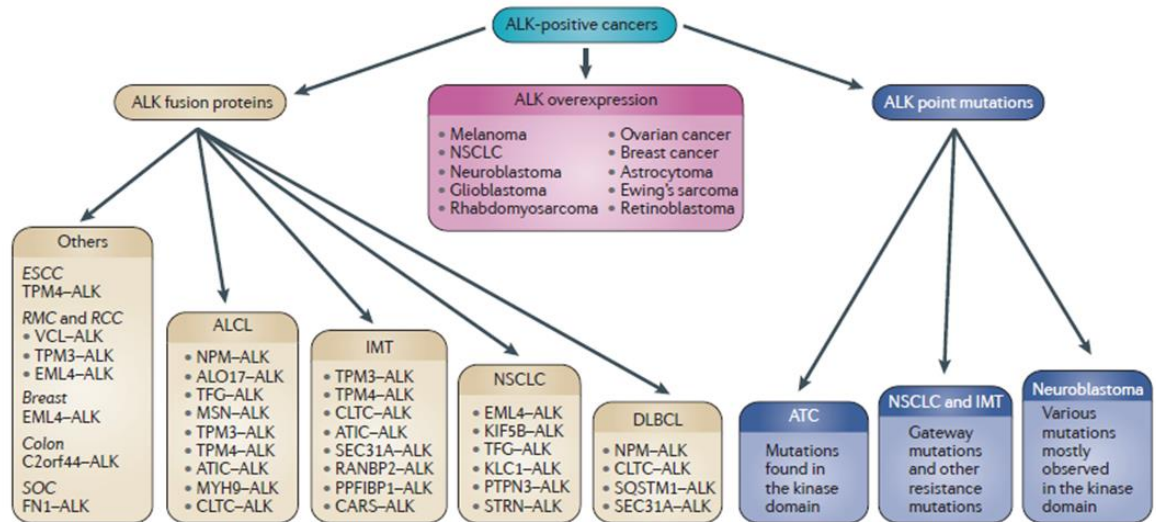
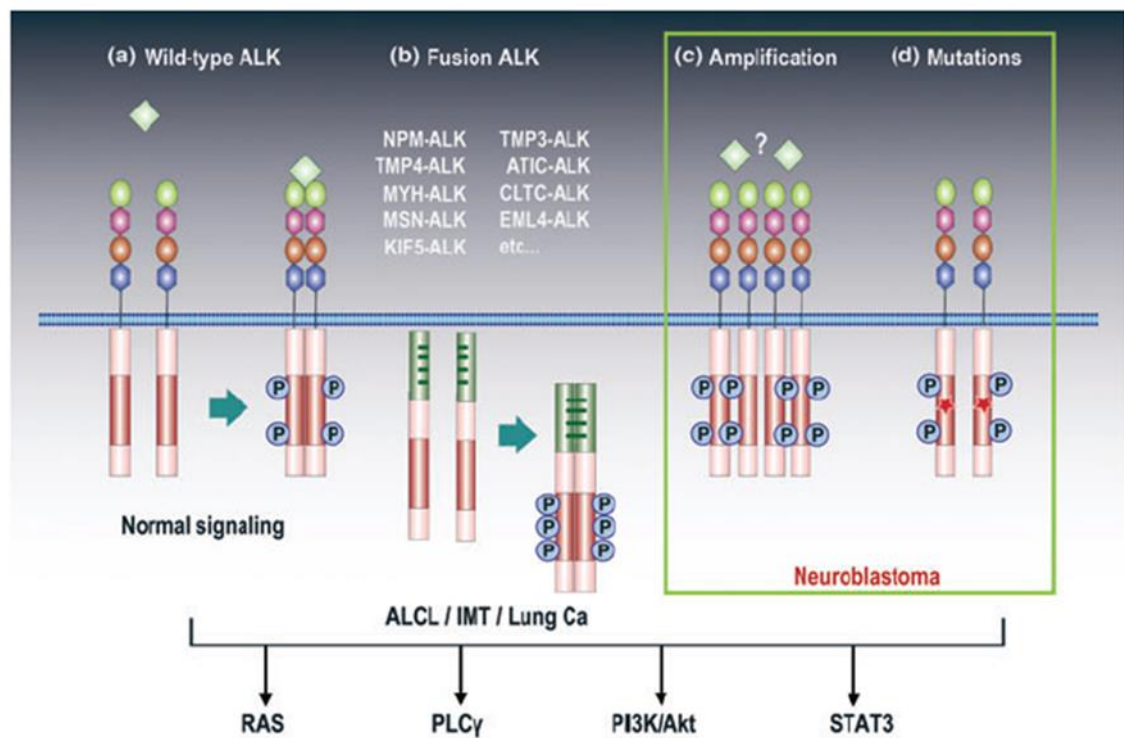


Figure 6 癌における ALK の活性化機構[29]

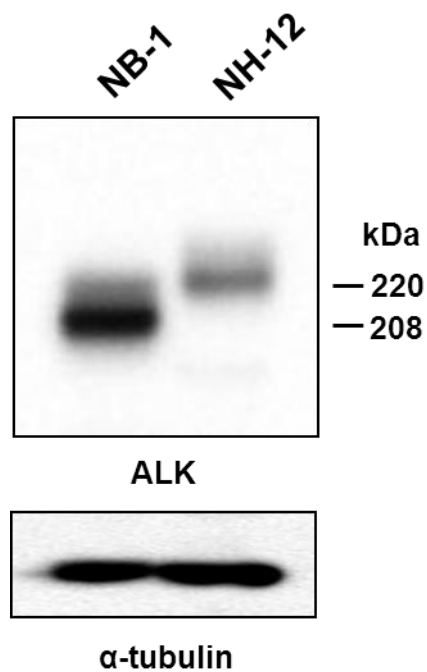


4. NB-1 細胞株における短縮型 ALK の発現

神経芽腫細胞株 24 株(表 1)における ALK の発現をウェスタンブロットにて解析を行った。NB-1 細胞株においては、NH-12 細胞株に比べ、ALK の発現が増幅しているが、NH-12 細胞株にみられる野生型の ALK タンパクの分子量は 220kDa であるのに比べ、NB-1 細胞株では 208kDa と小さい分子量の ALK タンパクが発現していることが確認された(Figure 7)。

NB-1 細胞株において、分子量の小さい短縮型の ALK が発現していることが確認された。ヒト腫瘍における ALK の活性化型変化としては、遺伝子増幅、融合遺伝子、点突然変異であるが、部分欠損型の変化はいままで報告がなかった。私は神経芽腫細胞株 NB-1 において短縮型の ALK を発現している分子機構について解析を行なった。

Figure 7 神経芽腫細胞株 NB-1 における短縮型 ALK の発現



神経芽腫細胞株のウェスタンブロッド解析。野生型の ALK を発現する NH-12 細胞の ALK は 220kDa でみられるのに対し、NB-1 細胞では 208kDa の分子量の ALK タンパクが確認される。内部コントロールとして α -tubulin を示す。

3. 方 法

1) 細胞

本研究に検討した神経芽腫細胞株 24 株を表 1 に示す。SCMC-N 細胞株群は東京大学医学部小児科第 2 研究室にて樹立した。SJNB 細胞株群と UTP-N1 細胞株は AT Look 博士と A Inoue 博士より供与頂いた。その他の細胞株は JCRB 細胞バンクより入手したものをを用いた。NB-1、NH12、NB-19 などヒト神経細胞腫細胞株においては 10-20% fetal bovine serum (FBS) を添加した Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 にて培養した。NIH3T3 細胞においては 10% FBS を添加した Duibecco's modified Eagle medium(DMEM) にて培養した。全ての細胞株は 37℃、5%の CO₂ インキュベーター内で培養を行った。NB-1 細胞株は副腎原発の進行神経芽腫より樹立された細胞株であり、JCRB 細胞バンクより購入した。

新鮮腫瘍検体は東京大学病院、埼玉県立小児医療センターなどの施設にて手術、生検術にて採取され、神経芽腫と診断された検体を解析した。検体の神経芽腫臨床病期、遺伝子背景について表 2 に記す[30]。腫瘍検体の解析について東京大学大学院医学系研究科部局倫理委員会の承認を得て解析を行った。

2) タンパク質抽出

ウエスタンブロット (WB)、免疫沈降 (IP) を目的としたタンパク質抽出を行う際は、培養細胞を PBS で洗浄後、protease inhibitor (Santa Cruz, USA) を加えた RIPA Lysis buffer (Santa Cruz) にて溶解した。Lysate を 4℃、14000rpm、15 分間の条件で遠心分離後、上清を回収した。いずれの場合もタンパク質濃度は BCA Protein Assay kit (Thermo scientific) を用いて測定した。実験操作は付属のプロトコールに従った。

3) ウエスタンブロット(WB)

培養細胞を PBS で洗浄後、WB を目的として抽出したタンパク質に、5× Laemmli sample buffer (100 mM Tris-Cl pH 7.4, 5% SDS, 25% glycerol, 0.075% bromophenol blue)を混合し、100℃、5 分間の条件で還元した。サンプルを 5-10% の gradient ゲル (コスモバイオ) にロードし、SDS-PAGE 法により分離した。SDS-PAGE 後、タンパク質を PVDF 膜 (Immobilon, Millipore) に転写し、5% スキムミルク/TBS-T または 3%BSA/ TBS-T にて室温、1 時間の条件でブロッキングした。ブロッキング溶液で一次抗体を希釈し、4℃、16 時間の条件で一次抗体反応を行った。一次抗体反応後、TBS-T にて 3 回洗浄し、1.5%スキムミルク

ク/TBS-Tにて希釈した二次抗体を用いて、室温、1時間の条件で二次抗体反応を行った。二次抗体反応後、TBS-Tにて3回洗浄し、CCDイメージャーを用いて化学発光検出法でシグナルを検出し、撮影した。

本研究で使用した一次抗体は以下の抗体である。抗 ALK 抗体、抗 PY-20 抗体(以上 Santa Cruz)、抗リン酸化 ALK 抗体、抗 ERK1/2 抗体、抗リン酸化 ERK1/2 抗体、抗 AKT 抗体、抗リン酸化 AKT 抗体、抗 STAT3 抗体、抗リン酸化 STAT3 抗体(以上 Cell Signaling Technology)、抗 FLAG 抗体(Sigma-Aldrich)。本研究で WB に用いた二次抗体の種類は次の通りである。抗 rabbit IgG 抗体 HRP conjugated、抗 mouse IgG 抗体 HRP conjugated(以上 GE Healthcare Life Sciences)。

4) 免疫沈降

細胞を lysis buffer (150mM 塩化ナトリウム、1mM EDTA, 1% TritonX-100, 0.1%SDS, 0.1%NaDOC, 50mM Tris-HCl, PH8.0) に溶解し、抗 FLAG 抗体アガロース(Sigma)に 4℃16 時間ローテートした。沈殿物を洗浄バッファーで 4 回洗浄し、5×Laemmli sample buffer をまぜ 100℃にて 5 分間煮沸した。その後、WB を行い目的のバンドを検出した。

5) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

神経芽細胞腫細胞株の細胞を回収後、RNeasy Mini kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) を用いて、メーカーのマニュアルに従って total RNA を抽出した。4 μ g 相当の total RNA より Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (Pharmacia Biotech, Tokyo, Japan) を用いて、全量 33 μ l の cDNA を合成した。このうち、1 μ l の cDNA を鋳型として使用し、AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems, California, USA) 10 μ l, GC Enhancer 1 μ l, 各 20 pmol のプライマーを加えて、20 μ l の反応系で RT-PCR 法を行った。95 $^{\circ}$ C、9 分のホットスタート後、35 サイクルの PCR 増幅（1 サイクルは 95 $^{\circ}$ C、30 秒、55 $^{\circ}$ C、30 秒、72 $^{\circ}$ C、30 秒）を行った。5 μ l の PCR 産物を、2%アガロースゲルを用いて電気泳動をし、ethidium bromide で染色した後、紫外線ランプのもとで解析した。発現の検討に用いたプライマーは表 3 に示した。

6) サザンブロット解析

高分子の DNA は QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)を用いて NB-1 細胞株、ヒト正常末梢血から抽出を行った。10 μ g のゲノム DNA を制限酵素 *EcoR* I にて処理し、0.8%のアガロースゲルを用いて電気泳動を行った。その後、20 \times SSC を用いた Salt Transfer によりナイロンメンブレンに DNA を転写した。DNA

転写済みのナイロンメンブレンに 0.4N NaOH によるアルカリ固定を施し、更に UV Crosslinker を用いて UV 固定を行った。プローブとして ALK のエクソン 1、2、3、4 に対するプライマーを作製し、それぞれに対する PCR プロダクトを作製した。プライマーを表 3 に示す。この PCR プロダクトをプローブとして、 $[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ と Rediprime II Random Prime Probe を放射性標識した。その後、illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns (GE Healthcare)を用いてプローブの精製を行い、同プローブをハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーションしたメンブレンを 0.1×SSC、0.1% SDS 洗浄液にて洗浄し、X 線フィルムに感光させ、cyclone にて検出を行った。

7) SNP array 解析

NB-1 細胞株より抽出した gDNA を適切な制限酵素で消化し、断端に共通のアダプターを付加した後、PCR により増幅した。PCR 産物の精製後に *DNaseI* 処理によりさらに断片化し、biotin ラベルをした後、GeneChip Mapping 250K/500K Array(Affymetrix)上でハイブリダイゼーションを行った。CNAG/AsCNAR アルゴリズム[31-32]を用いてデータを分析し平均解像度 24kb ~6kb でゲノム全域にわたる網羅的なゲノムコピー数の解析を行った。

8) 定量的ゲノム PCR 解析

定量的ゲノム PCR 解析は SYBER Green qPCR Kit(Bio-Rad)を用い NB-1 細胞株のエクソン、イントロンにプライマーを設定し、解析を行った。ヒト正常ゲノムをコントロールに相対値をしめした。定量的ゲノム PCR 解析に使用したプライマーを表 4 に記す。

8) ALK 変異の強制導入

ヒト ALK cDNA の C 末端に FLAG エピトープを付加した pMX ベクターに組み込んだ。NB-1 細胞株より抽出した部分欠損型変異、キナーゼドメイン F1174L 変異を同様に組み込んだ。レトロウィルスベクターのレトロウィルス粒子への取り込みにはパッケージ細胞である PLAT-E 細胞を用いた。レトロウィルスベクターを FuGENE6 transfection reagent と共に PLAT-E 細胞にトランスフェクションし、培養上清に算出されたウィルスを細胞へ遺伝子導入に用いた。ウィルス含有培養上清は NIH3T3 細胞も培養上清に添加することで遺伝子導入を行った。遺伝子導入後 puromycin を添加することで遺伝子導入細胞の選択を行った。

9) 軟寒天培地によるコロニー増殖能の確認

3.5cm の培養ディッシュの下層に 0.6%のアガロースひき、その上に 10%の FBS と 0.4%のアガロースを混ぜた DMEM 培地に、変異ベクターを導入した NIH3T3 細胞を 1×10^3 個まき、培養を行った。培養後、2 週間で直径 0.1mm 以上のコロニーを計測した。

10) nude マウスへの皮下移植

BALB/c(nu/nu)ヌードマウスは日本クレアより入手した。既報を参考に[7]、コントロールとして部分欠損型変異の ALK ベクターを導入した NIH3T3 細胞と野生型 ALK を導入した NIH3T3 細胞を 1×10^7 個を DMEM 培養液で希釈し、皮下移植した。移植後 21 日目の腫瘍形成について検討した。本研究における動物実験は、東京大学大学院医学系研究科部局動物実験委員会の承認を受け、東京大学動物実験実施規則を遵守して行った。

11) 細胞免疫染色

培養細胞は PBS にて 1 回洗浄後、4% Paraformaldehyde (PFA)/ PBS を用いて、室温 10 分間の条件で固定した。4% PFA/ PBS を除去し、PBS にて 3 回洗浄後、4% donkey 血清/ 0.1% Triton X-100/ PBS を用いて、室温、1 時間の条件でブロッキング処理を行った。ブロッキング液を用いて一次抗体を希釈し、室温、2 時間

の条件で維持抗体反応を行った。本研究で免疫蛍光染色に用いた一次抗体は抗 ALK 抗体(Santa Cruz)、抗 PDI 抗体(abcam)である。一次抗体反応終了後、0.1% Triton X-100/ PBS にて 3 回洗浄し、1%BSA/PBS を用いて二次抗体を希釈し、室温、遮光、1 時間の条件で二次抗体反応を行った。二次抗体反応終了後、0.1% Triton X-100/ PBS にて 3 回洗浄し、退色防止剤含水系封入材 Prolong Gold (Invitrogen) を用いて封入した。封入後、共焦点顕微鏡 (Olympus) による観察を行った。本研究で免疫蛍光染色に用いた二次抗体の種類は次の通りである。抗 mouse IgG 抗体 Alexa Fluor 488、抗 rabbit IgG 抗体 Alexa Fluor 594 (Invitrogen)。ALK と PDI の共局在の定量のため、Pearson's 係数を Fluoview 1000 software を用いて解析を行った。

12) 糖鎖切断酵素による解析

神経芽腫細胞株 NB-1、NH-12 細胞株のタンパクを抽出し、N-glycosidase F, endoglycosidase H にて処理を行った。実験操作は付属のプロトコールに従った。その後、SDS-PAGE 処理を行い、ウエスタンブロットにて、ALK 抗体にて反応を行った。ImageQuant 400 にて検出し、バンドのシグナル強度は ImageQuant TL software version7 にて計測を行った。

13) siRNA による増殖アッセイ

ALK の機能減弱による細胞増殖の影響を検討するため、Cell Counting Kit-8(同人社)を用いて比色法による継時的な細胞増殖アッセイと細胞数の計測による評価を行った。

比色用による解析はNB-1 細胞株、NH-12 細胞株を 96well プレートに 1.0×10^4 の細胞を撒き、24 時間後に Lipofectamine RNAiMAX(Invitoren)を用いて、ALK に対する siRNA をトランスフェクションし、トランスフェクション後翌日より細胞増殖の評価を行った。同時に、対照として、Stealth RNAi Negative Universal Control LO(invitoren)を同様にトランスフェクションし、培養を行った。既報と同様に siRNA 配列は ALK siRNA1:

5'-GAGUCUGGCAGUUGACUUCdTdT-3', ALK siRNA2:

5'-GCUCCGGCGUGCCAAGCAGdTdT-3'(Qiagen)を用いた[11]。

14) ALK キナーゼ阻害剤による増殖抑制効果の検討

神経芽細胞株 NB-1 細胞、SK-N-SH 細胞、TGW 細胞、神経膠芽腫細胞 H4、NIH3T3 細胞を 96well plate にまき培養後、翌日に ALK キナーゼ阻害薬であ

る低分子化合物 TAE684 にて処理を行い、細胞の増殖を CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (promega)にて計測した。

15) 統計解析

各群間の統計学的有意性の解析法として、結果は Mann-Whitney 検定 (U 検定)により統計処理した。P<0.05 を有意差ありとした。

表 1 今回の研究で検討した神経芽腫細胞株

細胞株	<i>MYCN</i> 増幅	<i>ALK</i> status
CHP-134	-	WT
GOTO	+	WT
LAN-1	+	F1174L
LAN-2	+	WT
LAN-5	+	R1275Q
NB-1	-	amplification
NB-16	+	WT
NB-19	+	WT
NB-69	-	WT
NH-12	+	WT
SCMC-N2	+	F1174L
SCMC-N4	+	WT
SCMC-N5	+	K1062M
SJNB-1	-	WT
SJNB-2	+	R1275Q
SJNB-3	-	WT
SJNB-4	+	F1174L
SJNB-5	+	WT
SJNB-6	+	WT
SJNB-7	+	WT
SJNB-8	+	WT
SK-N-SH	-	F1174L
TGW	+	R1275Q
UTP-N-1	+	WT

WT : 野生型

表 2 本研究にて検討した神経芽腫腫瘍検体

臨床所見	症例数
年齢	
1y >	41
1y <	30
Stage	
1	16
2	11
3	12
4	29
4S	2
ND	1
MYCN status	
増幅 (+)	11
(-)	58
ND	2
ALK status	
増幅	1
変異	6
野生型	64
合計	71

ND : 未検査

表 3 RT-PCR に用いたプライマーセット

	Primer Sequence		Annealing
	(5'→3')		Temperature
	Forward	Reverse	(°C)
RT-PCR 解析			
<i>ALK</i> Exon1/ 5	CTTCTCTTCCAGATCTTCGG	ATTCAGGGCAAAGAAGTCCAC	55
Exon 1/ 2	AAGCAGTTGGTGCTGGAGCT	TTTGACTTCCCCTGTGAGCT	55
Exon 2/ 4	CATAGCTCCTTGGAATCACC	ATGAGGAGCAGCAGTGAGCA	55
Exon 4/ 5-6	TTCTCAACACCTCAGCTGAC	ACTGCAGTGAAGGAACATCC	55
Exon 5/ 8-9	GAAACCGCAGCTTGTCTGCA	CGATCAAGAGCTCTCCATGT	55
Exon 8 / 12	AAGTGCTACAGTGACCAGTG	TAGCGGAGAGGACAAGATC	55
Exon 11/14	ATATCTCCATCAGCCTGGAC	AAGAACACCATGATGCGGTC	55
Exon 13/15-16	CCTGAAAGGCATCCAGATCT	AAGATGAAGGATGGAGTGCC	55
Exon 15/ 17	AATCCGTGTGAACAGAAGCG	TGGAGGAGGCGGAGGATATA	55
Exon17/ 19-20	AAATCTTTGCAGGAGGGTG	GCGTCTCCTGCATTGTGTCA	55
Exon 20/ 23	TTTCTCCGGCATCATGATTG	CTCATGGAAGCCCTGATCAT	55
Exon 23/ 26	TGCCTGAAGTGTGCTCTGAA	GATTGGAGACTTCGGGATGG	55
Exon 26/ 30	AGAAACTGCCTCTTGACCTG	GGACCCGGATGTAATCAACA	55
Exon 29/ 30	GGAGAGGATTGAATACTGCA	GTTGCACAAGGTCCACGGAT	55
Exon 30/30	TGCAGAGATCTCTGTTCGAG	GTTGCACAAGGTCCACGGAT	55
Exon 30/ 30	TAACGTTGCAACTGGGAGAC	GTTGCACAAGGTCCACGGAT	55
<i>β-actin</i>	CTTCTACAATGAGCTGCGTG	TCATGAGGTAGTCAGTCAGC	55

表 4 定量的ゲノム PCR 解析に用いたプライマーセット

	Primer Sequence (5'→3')		Annealing Temperature (°C)
	Forward	Reverse	
quantitative genomic PCR analyses			
<i>ALK</i> Exon 1	CTCAGCGAGCTGTTTCAGTTG	CAGTCCCGAAGATCTGGAAG	55
Intron 1	CTGCTTGGTTCCTCACATCC	GTCTGAGTCATTGGCTAATCTCA	55
Exon 2	ACCCAAGCACATGGATCAG	GATGAGACAGGAAAGGGAAGG	55
Intron 2	GGTATACACGTGCCATGGTG	CCAAATACGGCATGTTCTCA	55
Exon 3	GGAGTGCAGCTTTGACTTCC	CTGGGCATCTCCTTAGAACG	55
Intron 3	TGGCATGATTGATTACCCAAG	CTGGAGATCACCCCTTTGAGG	55
Exon 4	CAACACCTCAGCTGACTCCA	CTCTCTTGCAGCCTCGTTG	55

表 5 サザンブロット解析に用いたプライマーセット

Primer Sequence (5'→3')			Annealing Temperature (°C)
Forward	Reverse		
Southern blot analyses			
<i>ALK</i> Exon 1	AGAGTCTGGCAGTTGACTTC	TGCTCACAAACAGTCCCGAAG	60
Exon 2	TCAACTCAGTCTACTGGTGG	GGATATGGCAGACACAAAGC	60
Exon 3	AGCCCTGTGGTATTGACAAC	AGATGGGACTTGTCTTCCTC	60
Exon 4	AGAATGGAGGAAGAAGGCTG	GTAATTGCTCAACCTGGACC	60
<i>TUBA4A</i>	CTCTCACACTCTGGTATCTC	CTGACCATTAGCACAGTCTC	60

4. 結 果

1) 神経芽腫細胞株 NB-1 における転写産物の解析

神経芽腫細胞株 NB-1 で短縮型の ALK タンパクの発現が確認されたことから、その分子機構としてトランスクリプトバリエーションやゲノムの変異による部分欠損を考慮し、転写産物の解析を行った。

NB-1 細胞株と野生型の ALK を発現している細胞株を対照として、それぞれから抽出した mRNA から逆転写した cDNA に *ALK* のエクソン 1 からエクソン 30 まで全長を網羅するようにプライマーを設計し RT-PCR にて解析を行った。

その結果、エクソン 1 とエクソン 5 にプライマーにて PCR を施行した結果、野生型の ALK を発現している NB-19 細胞株では 626bp のプロダクトが確認されるが、NB-1 細胞株では 341bp の短いプロダクトが確認された。この PCR プロダクトをダイレクトシーケンシングにて解析を行い、NB-1 細胞株のプロダクトでは ALK のエクソン 2、3 の 285bp が欠失したインフレームシフトがおきていることが確認された(Figure 8a)。

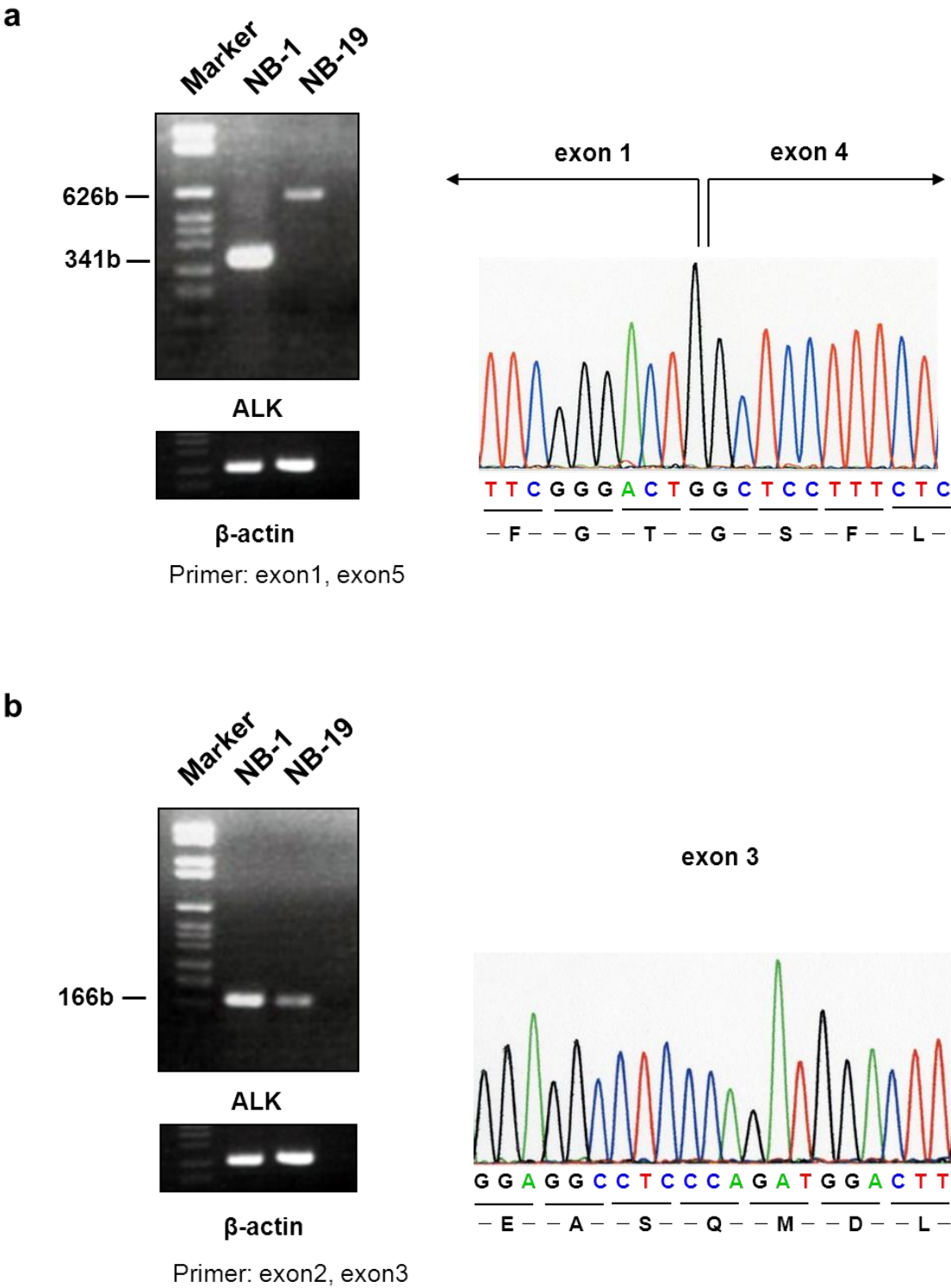
また、エクソン 2,3 にプライマーを設定し、PCR を施行すると、NB-1 細胞株においても対照と同じ大きさの 166bp の PCR プロダクトは確認され、ダイレクトシーケンスによってもエクソン 2,3 の配列が確認され野生型の ALK の発現も発現していることが確認された(Figure 8b)。

エクソン 1,5 をプライマーとした PCR プロダクトとエクソン 2,3 をプライマーとした PCR プロダクトはともに、対照のバンドに比べ増幅が確認されるが、部分欠失が確認される ALK のエクソン 1,5 のプライマーによる短いプロダクトの方がよりコントロールに比べより強く増幅され、部分欠損型の ALK の発現が高いことが確認される。

NB-1 細胞株においては ALK の増幅がみられ、部分欠失型の ALK と野生型の ALK が heterogeneity に存在するが、部分欠損型の ALK の発現が優位であることが示唆された。

また、表 2 にしめす神経芽腫新鮮腫瘍 71 検体の cDNA を用いて、RT-PCR にて ALK の部分欠失型変異の有無を確認したが、NB-1 細胞株で確認されたエクソン 2,3 のインフレームシフトはみられなかった。

Figure 8 神経芽腫細胞株 NB-1 における転写産物の解析



(a) 神経芽腫細胞株の RT-PCR 解析とダイレクトシーケンス。

神経芽腫細胞株から mRNA を抽出し逆転写酵素にて cDNA を作製し、ALK のエクソン 1,5 にプライマーを設定し PCR にて解析を行った。野生型の ALK を発現している NB-19 細胞株では 627bp の PCR 産物が確認されるが、NB-1 細胞株においては 314bp の PCR 産物が確認される。内部コントロールとして β -actin を示す。PCR 産物をシーケンス解析にてエクソン 2-3 の欠失したインフレームシフトが確認された。

(b) 神経芽腫細胞株の RT-PCR 解析とダイレクトシーケンス。

エクソン 2,3 にプライマーを設定し行った PCR にて解析にて、NB-1 細胞株においても野生型と同様の PCR プロダクトが確認される。PCR プロダクトの増幅から NB-1 細胞株では野生型の ALK の発現に比べ、インフレームシフトの ALK の発現が高いことが示される。

2) NB-1 細胞株における部分欠損型変異のゲノム構造の解析

今回確認された NB-1 細胞株における *ALK* の部分欠損型がトランスクリプトバリエーションかゲノムの変異であるのかを確認するために、ゲノム構造の解析を行った。

高密度 SNP アレイを用いて NB-1 細胞株の *ALK* 遺伝子の位置する 2p24 をゲノムのコピー数を解析すると、NB-1 細胞株において、2p23 の *ALK* の位置する領域には高度の増幅がみられるが、intron3 領域をしめす chr2:299911541-29912210 の SNP においては、他の *ALK* 領域に比べ、ゲノムのコピー数が低下していることが確認された(Figure 9a)。

また、定量的ゲノム PCR 解析にて、NB-1 細胞株の *ALK* ゲノムの相対的な比較を行い、エクソン 2-3 がエクソン 1,4 に比べ低下していることを確認した(Figure 8b)。

さらに、*ALK* のゲノムのコピー数についてサザンブロット解析を用いて解析を行った。*ALK* のエクソン 1、2、3、4 それぞれのプライマーを作製し PCR 産物をアンプリコンとしてハイブリダイズさせることによりゲノムのコピー数

の確認を行った。正常ヒト末梢血から採取したゲノムを正常対象としてサザンブロット解析をした。内部コントロールとして *TUBA4A* のゲノム配列をプライマーとして設定して行ったサザンブロットではアンプリコンに差が見られない条件で、NB-1 細胞株では正常コントロールと比べると、*ALK* 遺伝子のエクソン 1-4 全てにおいて増幅していることが確認されが、NB-1 細胞株において、*ALK* のエクソン 1 とエクソン 2 を比較すると、エクソン 1 が優位に増幅しており、エクソン 3 とエクソン 4 を比較してもエクソン 4 が優位に増幅していることが確認された(Figure 10)。

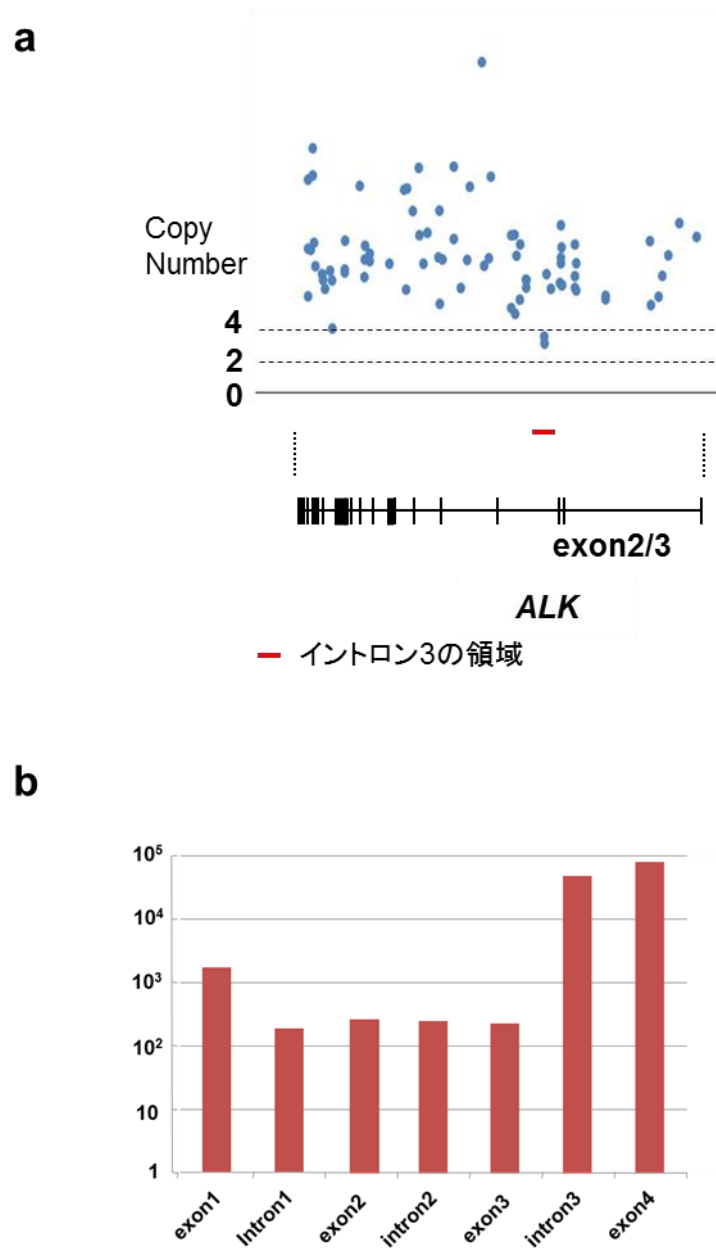
このことから今回確認された *ALK* のエクソン 2-3 の部分欠損はトランスクリプトバリエーションではなく、ゲノムにおける部分欠損型変異であることが確認された。

今回同定された部分欠損型 *ALK* タンパクの一次構造の構成図を示す(Figure 11)。ALK は膜貫通型のチロシンキナーゼであり、細胞外領域、傍膜貫通部、チロシンキナーゼを含む細胞内領域にて構成される。ALK の細胞外領域は MAM (meprin, A5 protein and receptor protein tyrosine phosphatase mu) domain (aa264-427 と aa480-626) と LDLa (low-density lipoprotein class A) domain (aa453-471)によって構成される。今回欠損が確認された *ALK* のエクソン 2,3

は aa224-318 をコードし、インフレームシフトにより MAM 領域の部分欠損していることが確認される。

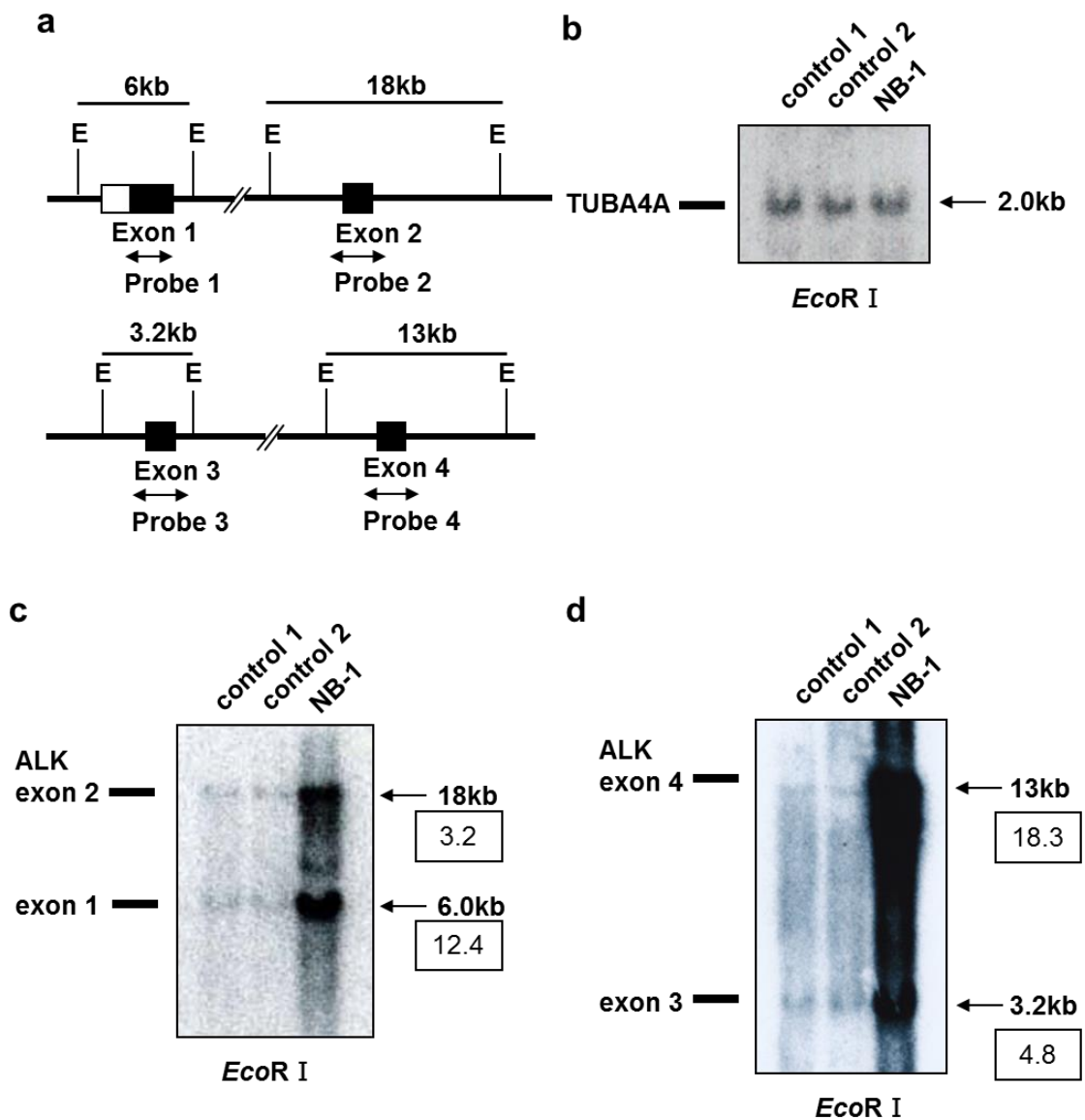
癌において確認される *ALK* の変異では転座、逆位などにより融合遺伝子、キナーゼドメインの点突然変異が報告されているが、細胞外領域の部分欠損型の変異は報告がなく、機能的な解析をすすめた。

Figure 9 NB-1 細胞株の *ALK* ゲノムコピー数の解析



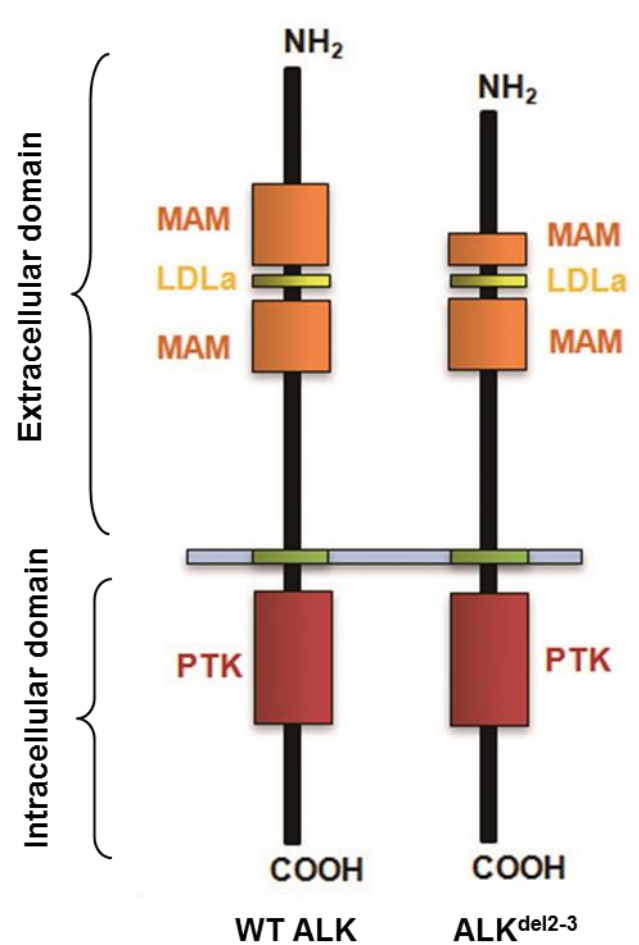
(a) NB-1 細胞株の高密度 SNP アレイによる *ALK* のゲノムコピー数の解析。NB-1 細胞株においては *ALK* のゲノムコピー数は増幅みられているが、intron3 の領域の 3 プローブ(29911541-29912210)は他のプローブに比べコピー数の低下がみられる。(b) 定量的ゲノム PCR 解析。*ALK* のエクソン 1-4、イントロン 1-3 にプライマーを設定し定量的 PCR 解析を行った。

Figure 10 NB-1 細胞株の ALK ゲノムのサザンブロット解析



- (a) サザンブロット解析における PCR 産物のプローブ。E:EcoR1
- (b) 内部コントロールとして TUBA4A の PCR 産物にてハイブリダイズを行った。
- (c) ALK のエクソン 1,2 の PCR プロダクトをラベルしハイブリダイズを行った。エクソン 2 に比べ、エクソン 1 の高度なゲノムの増幅が確認される。
- (d) ALK のエクソン 3,4 の PCR プロダクトをラベルしハイブリダイズを行った。エクソン 3 に比べ、エクソン 4 の高度なゲノムの増幅が確認される。

Figure 11 部分欠損型 ALK タンパクの構成図



ALK タンパクは膜貫通型のチロシンキナーゼ受容体であり、細胞外領域、傍膜貫通部、細胞内領域にて構成される。細胞内領域にはチロシンキナーゼが位置する。細胞外領域には MAM 領域(aa264-427 と aa480-626)と LDLa 領域(aa453-471)から構成される。今回欠損の確認されるエクソン 2,3 は aa224-318 をコードし、インフレームシフトにより MAM 領域の部分欠損していることが確認される。

3) 部分欠損型 ALK 変異の造腫瘍性

神経芽腫 NB-1 において選択的に増幅がみられた ALK の部分欠損型変異 (ALK^{del2-3}) が機能獲得型の変異ではないかと仮説を立て、機能解析を行った。造腫瘍性の確認のため、*in vitro* の検討として軟寒天培地によるコロニー形成能の確認、*in vivo* の検討としてヌードマウスに皮下移植を行い腫瘍形成の有無について検討を行った。

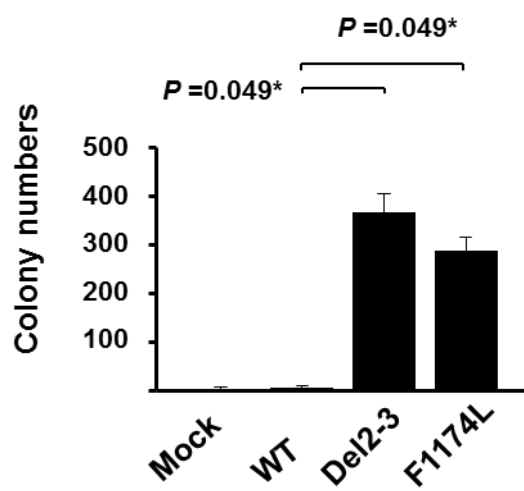
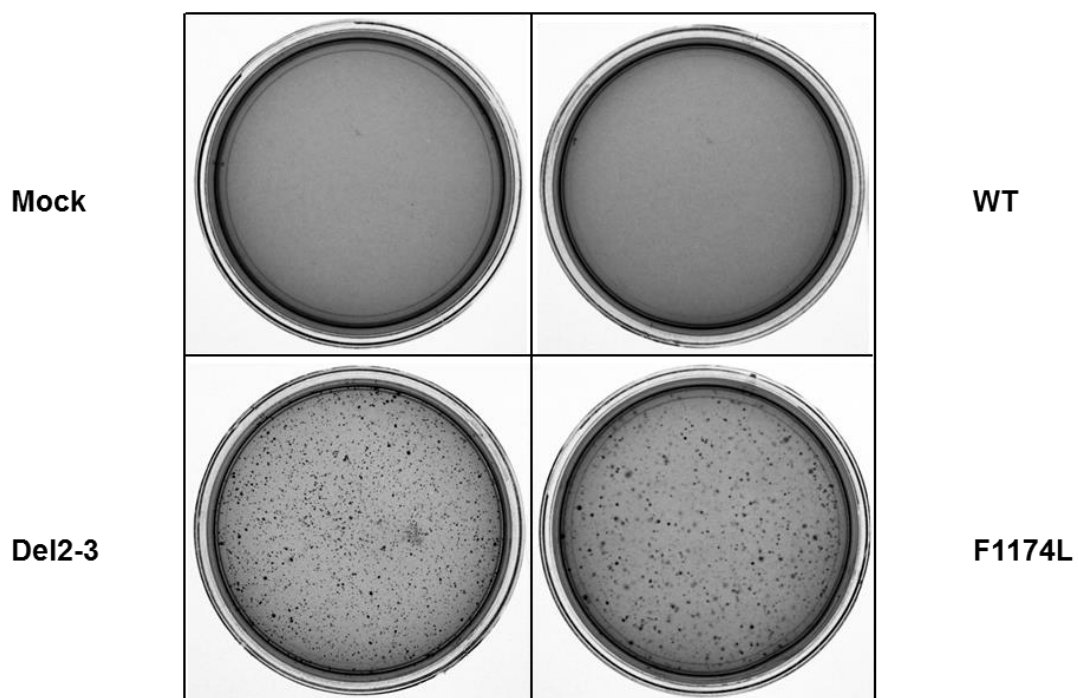
部分欠損型変異を強制発現させたマウスの正常繊維芽細胞株である NIH3T3 細胞を軟寒天培地で培養し、コロニーの生成能の検討を行ったところ、野生型の ALK を導入した細胞に比べて部分欠損型の ALK 変異ベクターを挿入した細胞はポジティブコントロールとして F1174L 変異を導入した細胞と同様に、有意にコロニー増生が観察された。このことから部分欠損型の ALK 変異は *in vitro* での足場非依存性増殖能を有することが確認された (Figure 12)。

さらに部分欠損型の変異 ALK とコントロールとして野生型の ALK ベクターを発現させた NIH3T3 細胞をそれぞれヌードマウスの皮下に接種したところ、正常 ALK を発現する細胞を接種してもマウスに腫瘍は形成されなかったが、

部分欠失型の ALK 変異を導入した細胞において、腫瘍の形成が認められた。したがって、部分欠損型 ALK 変異は *in vivo* で腫瘍を増殖させる能力をもつことが示された(Figure 13)。

このことから、ALK の部分欠損型変異は *in vitro*, *in vivo* において造腫瘍性をもつことを確認した。

Figure 12 軟寒天培地によるコロニーの造成能



軟寒天培地において、部分欠損型変異を発現させた NIH3T3 細胞では、野生型 ALK を発現させた細胞と比べて、明らかなコロニーの増生が認められた。

Figure 13 ノードマウスへ皮下接種



Del2-3 (5/5)



WT (0/5)

野生型 ALK を発現した細胞を接種してもマウスに腫瘍は形成されないが、部分欠損型の ALK を発現した細胞を接種した場合に腫瘍の形成が認められた。

4) 部分欠損型 ALK 変異の発現誘導によるリン酸化の解析

ALK に限らず、チロシンキナーゼはまず自己リン酸化をうけて活性化され、下流タンパク質にシグナルを伝達することが知られている。したがって、自己リン酸化の検出はそのタンパク質の活性化の指標となる。そこで、部分欠損型変異の ALK に過剰なチロシンキナーゼ活性が生じているかを検討した。

まず、内在性の ALK タンパクの検討のため、NB-1 細胞株と野生型の ALK の発現している NH-12 細胞株における ALK のリン酸化の確認を行った。野生型の NH-12 細胞株に比べ NB-1 細胞株においてはリン酸化 ALK の上昇がみられた(Figure 14)。

しかし、NB-1 細胞株は ALK の発現が高度増幅しており、ALK はチロシンキナーゼとして増幅によっても、自己リン酸化の亢進がみられる。部分欠損型変異の ALK に過剰な酵素活性がみられているかを検討するために、ALK 変異ベクターを強制発現させた NIH3T3 細胞にてリン酸化の解析を行った。

変異をもつ発現ベクターと、ポジティブコントロールとして ALK の恒常的なリン酸化の確認されている ALKF1174L 変異ベクター、野生型の ALK ベクターを発現させた NIH3T3 細胞で、自己リン酸化の検討を行った。野生型 ALK

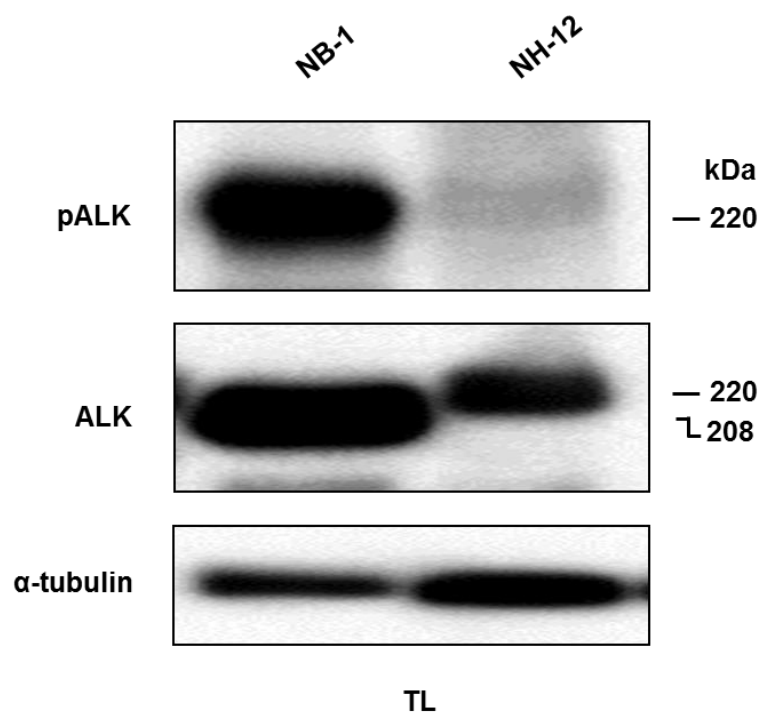
を発現させた細胞と比べて、部分欠損型変異を発現させた細胞は、ALK のリン酸化が亢進していることを確認した(Figure 15a)。

自己リン酸化の亢進の確認のため、ALK 抗体を用いた免疫沈降実験を行ったが、一次抗体として ALK 抗体を使用した免疫沈降実験では十分なタンパク量を確保することができず実験上の問題があり、FLAG 抗体を用いてベクターを強制導入した細胞を特異的に免疫沈降し解析を行った。総チロシンキナーゼ抗体である PY20 で酵素活性の比較を行い、野生型を導入した細胞に比べ部分欠損型変異を導入した細胞の酵素活性の上昇が確認された(Figure 15b)。

そして ALK チロシンキナーゼの下流分子への影響を検討したところ、すでに強いキナーゼ活性を持つことが確認されている F1174L 変異を導入した細胞では ERK、AKT、STAT3 のそれぞれのリン酸化が亢進しているのに対し、部分欠損型変異を導入した細胞では STAT3 のリン酸化が選択的に亢進していることが確認された(Figure 16)。

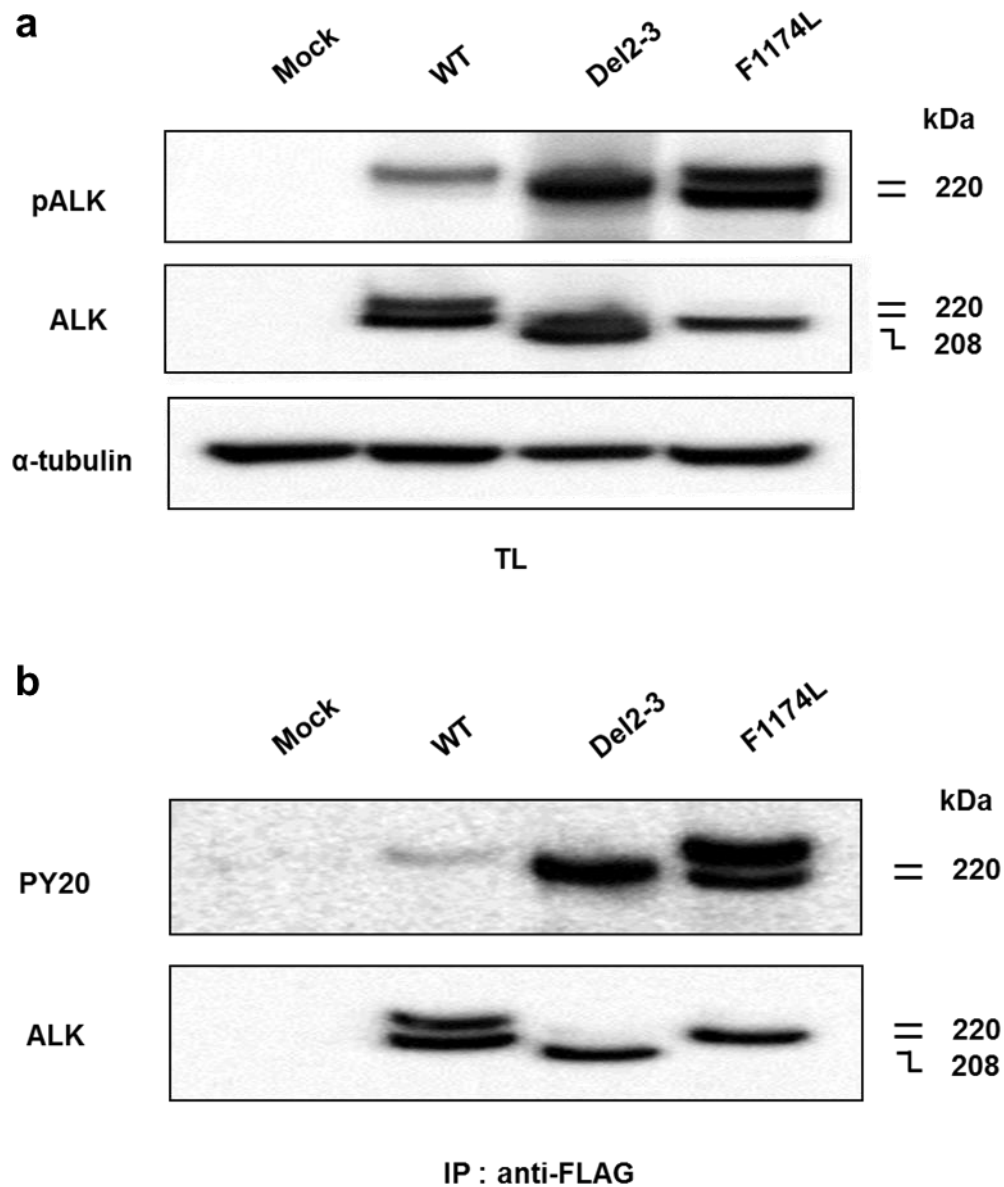
以上から、部分欠損型 ALK 変異はチロシンキナーゼとしてリン酸化が亢進し過剰な酵素活性が生じていること。そして、チロシンキナーゼの下流分子として STAT3 の選択的なリン酸化の亢進がみられていることを確認した。

Figure 14 神経芽腫細胞腫細胞株における ALK のリン酸化の解析



部分欠損型変異の発現する NB-1 細胞株と野生型 ALK を発現する NH-12 細胞株をウエスタンブロットにて ALK のリン酸化の解析を行った。NB-1 細胞株では NH-12 細胞株に比べ、ALK の過剰発現が確認され、ALK のリン酸化の亢進が確認された。

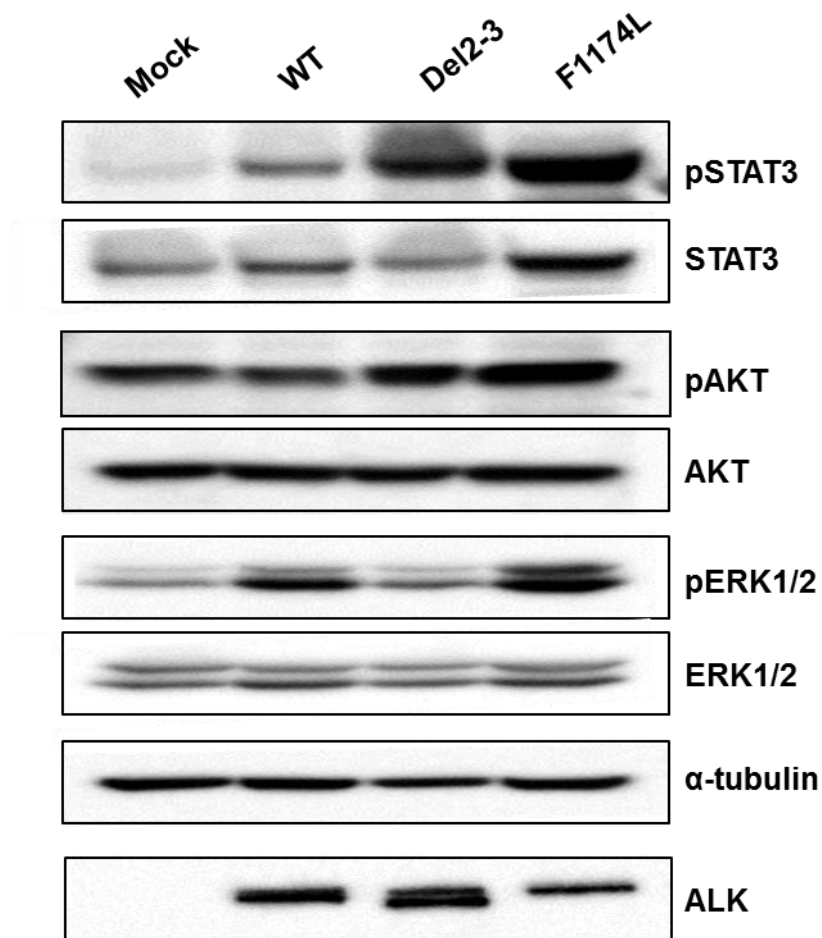
Figure 15 変異ベクターを導入した NIH3T3 細胞における ALK のリン酸化の解析



(a) ALK ベクターを導入した NIH3T3 細胞のリン酸化の解析。野生型 ALK を導入した細胞に比べ、強いリン酸化が確認されている F1174 変異を導入した細胞と同様に、部分欠損型変異を導入した細胞はリン酸化の亢進が確認された。

(b) 免疫沈降による ALK の自己リン酸化の解析。野生型、部分欠損型、活性化型変異の ALK に FLAG-tag にて標識をしたベクターを導入した NIH3T3 細胞を FLAG 抗体に免疫沈降して、抗リン酸化チロシン抗体 PY20 にてリン酸化の確認を行った。野生型の ALK を導入した細胞に比べ、部分欠損型の ALK 変異を導入した細胞はリン酸化の亢進が確認された。

Figure 16 ALK の下流分子のリン酸化の解析



ALK 活性化型変異として知られる F1174L 変異を導入した細胞では ERK1/2, AKT, STAT3 のリン酸化が確認されるが、部分欠損型 ALK 変異を導入した細胞では STAT3 の選択的なリン酸化が確認される。

5) 部分欠損型変異 ALK の小胞体局在

今回同定した部分欠損型の ALK 変異が悪性の形質転換能をもつことを *in vitro*, *in vivo* において証明し、チロシンキナーゼとしてキナーゼの活性化をもつ変異であることを確認した。次に、どのような機序で細胞外領域の部分欠損型変異により ALK 受容体が活性化されるのかという点について解析を加えた。

変異ベクターを NIH3T3 細胞に強制発現させた細胞における ALK の下流分子のリン酸化の解析において、ALK^{del2-3} においては STAT3 のリン酸化が選択的にみられていることが確認された。

チロシンキナーゼが選択的に STAT シグナル経路を活性させている機序として急性白血病における FLT-3 の ITD(internal tandem duplication)変異において、局在が小胞体に限局することにより、STAT シグナル経路の選択的な活性化がみられることを報告している[33]。この報告を参考に、今回 ALK においてはじめて確認されたチロシンキナーゼ ALK の細胞外ドメインの部分欠失型変異が小胞体保持シグナルを利用し、小胞体に局在し、JAK/STAT pathway を利用して過剰なリン酸化活性をもつのではないかと仮説をたてた。

第一に、ALK の細胞内局在について免疫染色にて検討を行った。部分欠損型変異の発現する NB-1 細胞株と野生型の ALK の発現する NH-12 細胞株を ALK 抗体と小胞体マーカーである PDI 抗体を用いて二重染色を行い、共焦点顕微鏡を用いて、局在の確認を行った。

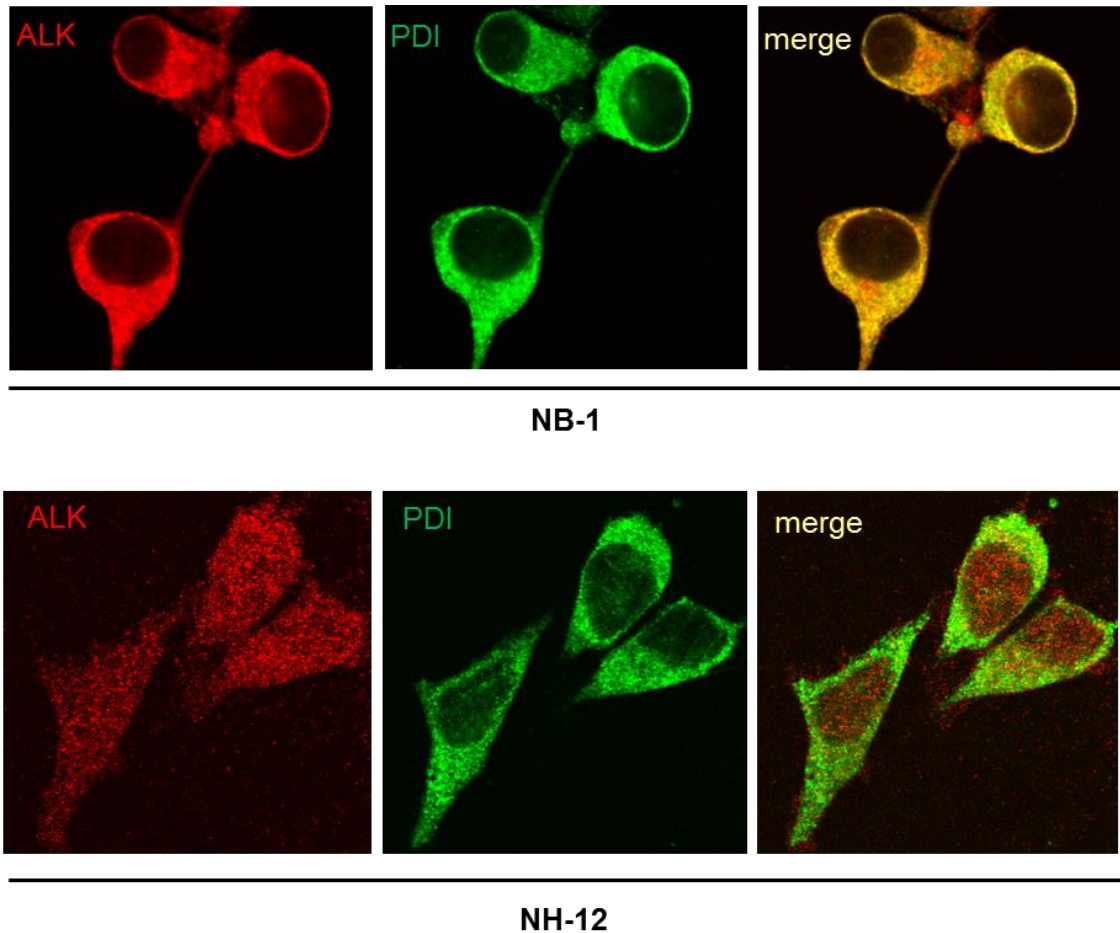
Figure 17 に示すように NH-12 細胞株にみられる野生型 ALK は膜蛋白として PDI とは異なる局在をしめすのに対し、NB-1 細胞における ALK の発現は PDI と共局在がみられ、NB-1 細胞株に発現する部分欠損型 ALK が小胞体に局在していることが示された。また ALK と PDI の共局在を Pearson 係数にて定量化にて解析を行い、NB-1 細胞においては ALK が有意に小胞体に局在することを確認した(Figure 18)。

次に、NB-1 細胞株と NH-12 細胞株における ALK の局在の変化と糖鎖修飾の確認を行った。膜タンパクはリボゾームにて合成された後、小胞体ーゴルジ体にて糖鎖の修飾と選別を受け、細胞膜へと輸送される。成熟した糖鎖修飾をうけたタンパクは膜蛋白へ移行していると考えられ、未熟な糖鎖修飾をうけたタンパクは小胞体に留まっていると考えられる。糖鎖切断酵素である Endo-H は未熟な糖鎖修飾を選択的に切断し、N-glycosidase F は成熟した糖鎖修飾、未熟な糖鎖修飾の両方を切断する働きを持つ。つまり、Endo-H によって切断され

るタンパクは未熟な糖鎖修飾を受けているタンパクであることが示される。神経芽腫細胞株 NB-1 細胞株と NH-12 細胞株よりタンパクを抽出し、糖鎖切断酵素を用いた後にウェスタンブロットにて電気泳動し、ALK タンパクの糖鎖修飾の確認を行った。正常 ALK を発現している NH-12 細胞株に比べ、NB-1 細胞株では多くの ALK タンパクが Endo-H による糖鎖切断を受けていることが確認され、小胞体に局在する未熟な糖鎖修飾を受けているタンパクであることが確認された(Figure 19)。

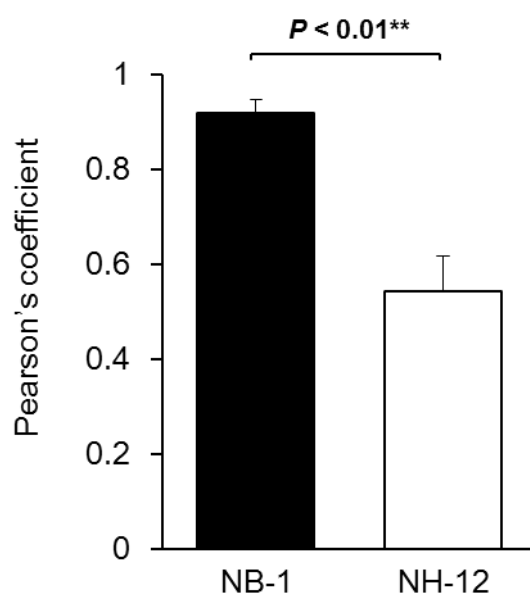
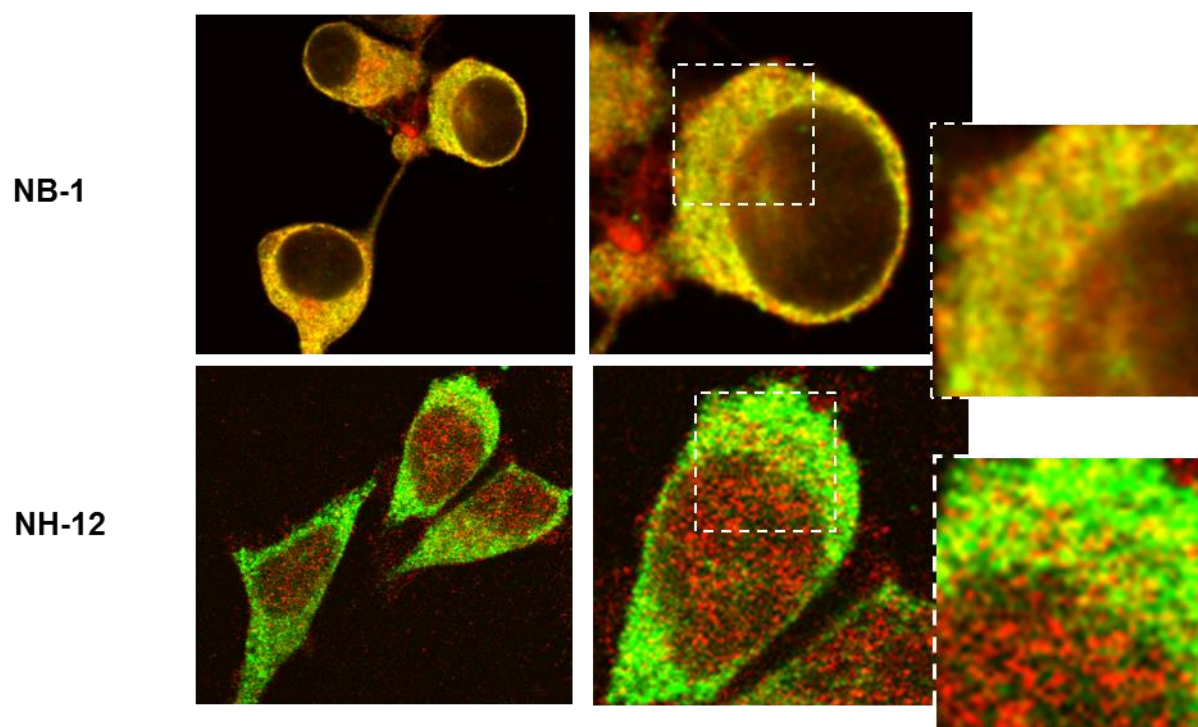
これらの結果から、NB-1 細胞株において部分欠損型 ALK は小胞体に局在していることが示され、JAK/STAT 経路を選択的に活性化したリン酸化の機構が示された。

Figure 17 神経芽腫細胞株 NB-1 における ALK の細胞内局在



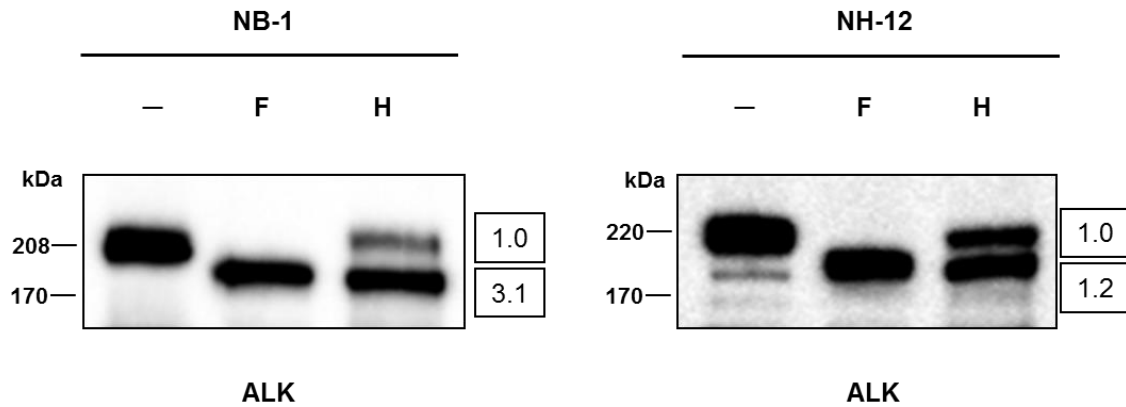
神経芽腫細胞株における ALK と PDI（小胞体マーカー）との共免疫染色。 コ
ンロールとして野生型の ALK を発現している NH-12 細胞株では ALK は細胞
膜にみられ、PDI と共局在を示さない。NB-1 細胞株において、ALK は小胞体
と共局在がみられ、小胞体に局在していることが示される。

Figure 18 共免疫染色の Pearson 係数による定量化



共焦点顕微鏡にて得られた ALK と PDI の共局在の定量を Pearson 係数にて解析をおこなった。NB-1 細胞株では ALK と PDI は有意に共局在が示される。

Figure 19 NB-1 細胞株における ALK の糖鎖修飾の解析



NB-1 細胞株、NH-12 細胞株より抽出したタンパクを糖鎖切断酵素にて処理をおこなった。左より 無処理の細胞(lane1, -), N-glycosidase F (lane 2,F), endoglycosidase H (lane 3, H)。糖鎖処理を行った後、ALK 抗体にて検出を行った。野生型の ALK の発現のみられる NH-12 細胞株に比べ、NB-1 細胞株では Endo-H による感受性が高く、未熟な糖鎖の修飾をうけている ALK タンパクが発現していることが示された。

6) ALK の発現抑制による細胞増殖の変化

最後にこの部分欠損型の ALK 変異の分子標的療法への可能性を検討するため、低分子 ALK 阻害剤 TAE684 と 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。

ALK の機能減弱による細胞増殖の影響を検討するため、Cell Counting Kit-8(同人社)を用いて比色法による継時的な細胞増殖アッセイを行った。部分欠損型の変異を有する NB-1 細胞株と野生型 ALK を発現する NH-12 細胞株に ALK 特異的二重鎖 siRNA を導入し、細胞の増殖を観察した。

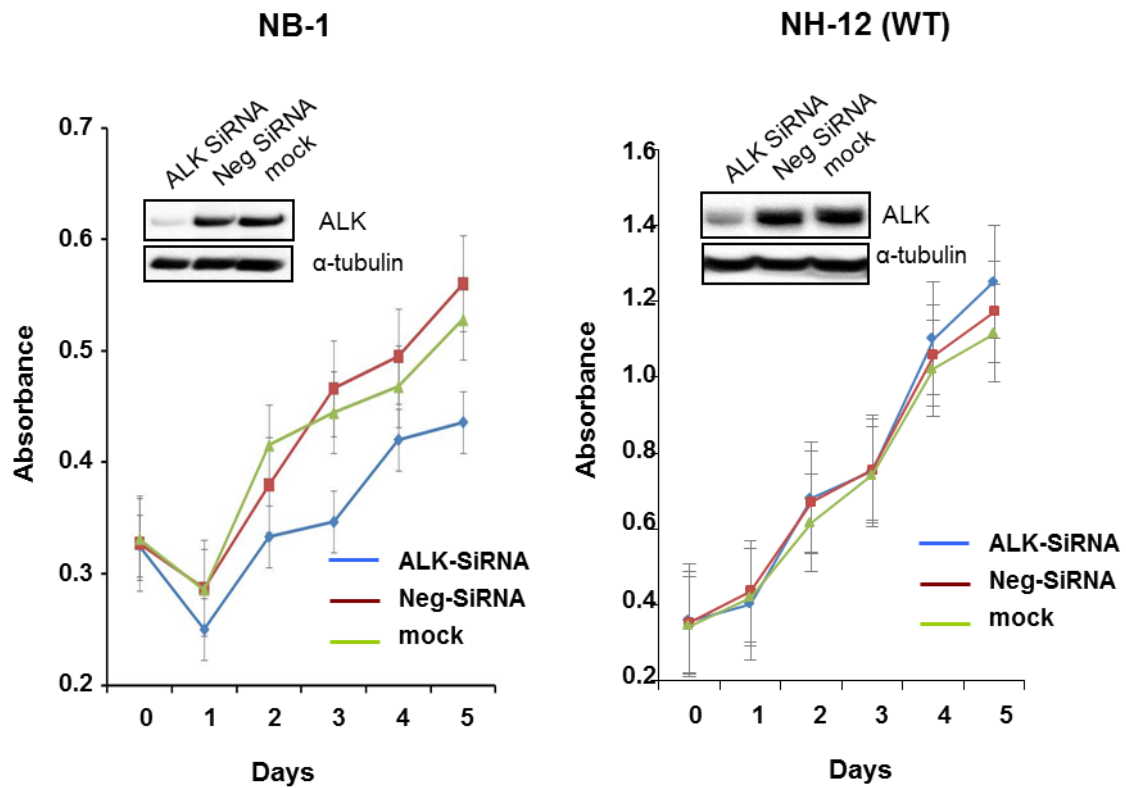
ALK 特異的 siRNA により ALK の発現が抑制された NB-1 細胞株では明らかな細胞増殖の抑制が認められたが、野生型 ALK を発現する NH-12 細胞株では増殖抑制はみられなかった。また未処理の細胞や非特異的な siRNA を導入した細胞では ALK の発現には変化はみられず、増殖抑制も認められなかった。このことから、変異 ALK キナーゼの発現は神経芽腫の細胞増殖を促進していることが判明した(Figure 20)。

これまでにいくつかの ALK 阻害剤が開発され、肺癌、悪性リンパ腫におけるこれらの化合物の細胞増殖抑制効果が確認されている。今回、ALK キナーゼ阻害剤 TAE684 を用いて解析を行った。

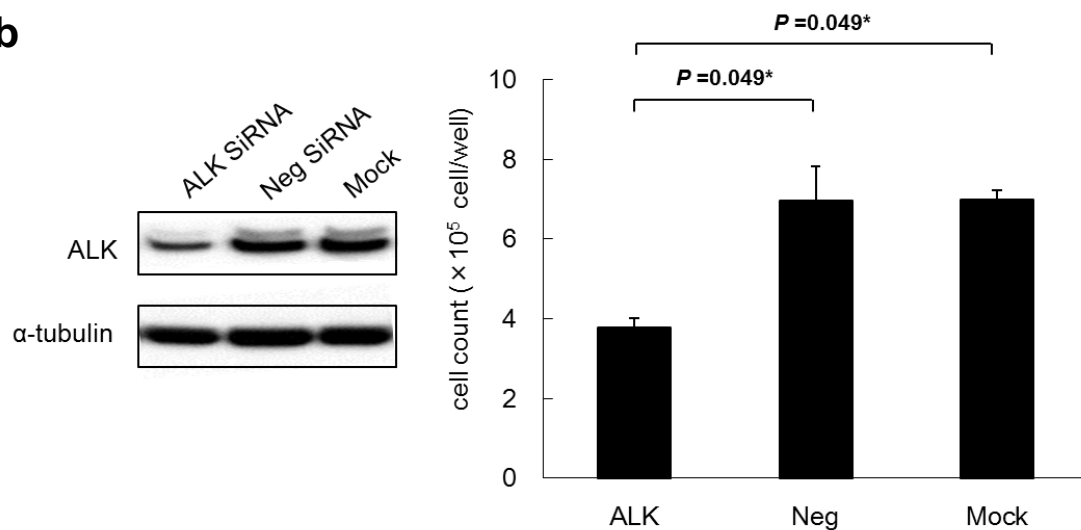
神経芽腫細胞株、神経膠芽腫細胞株、NIH3T3 細胞について、TAE684 の増殖抑制効果を検討したところ、TAE684 に感受性株である SK-N-SH が 49nm と低いことと同様に、NB-1 細胞株の IC₅₀ は 13nm と低く顕著な細胞増殖抑制効果が確認された(Figure 21)。

Figure 20 神経芽細胞における ALK 発現のノックダウンと細胞増殖

a

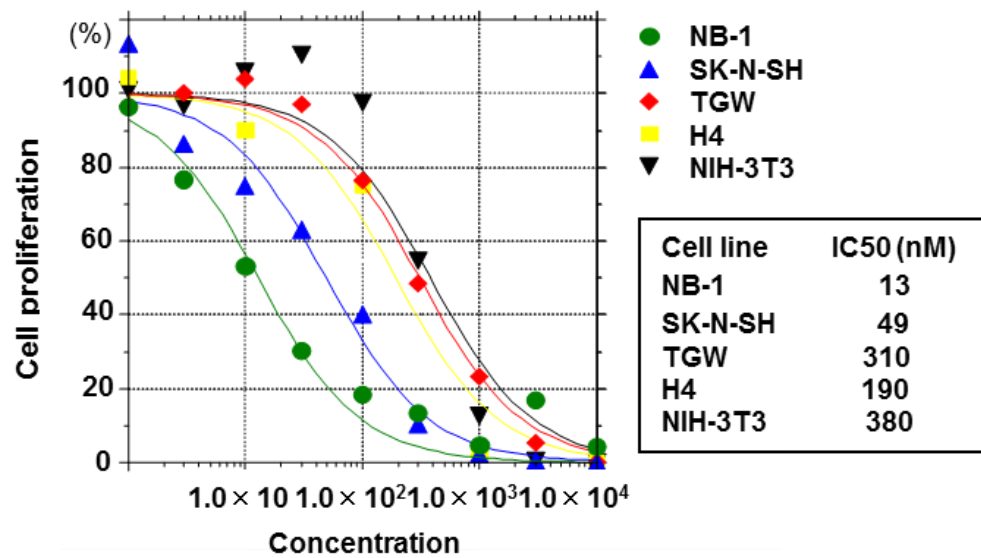


b



ALK ノックダウンによる細胞増殖アッセイ (a) 神経芽腫 NB-1 細胞株と NH-12 細胞株を用いた比色法による検討。(b) NB-1 細胞株を用いた細胞数カウントによる検討。

Figure 21 ALK キナーゼ阻害剤による細胞増殖抑制効果



ALK キナーゼ阻害剤 TAE684 の投与により ALK を発現していない NIH3T3 細胞や神経膠芽腫細胞株に比べ、ALK のキナーゼ活性型変異をもち TAE684 感受性株として知られる SK-N-SH 細胞株と同様に高い増殖抑制効果が確認された。

5. 考 察

神経芽腫細胞株において短縮型の *ALK* を発現していることが確認され、私はその分子機構の解析を行った。RT-PCR による転写産物の解析によりエクソン 2,3 が欠損したインフレームシフトを確認し、SNP アレイ、定量的ゲノム PCR 解析、サザンブロット解析により、ゲノムの部分欠損型の変異であることを確認した。NB-1 細胞株では *ALK* は高度増幅しており、野生型の *ALK* も増幅がみられるが、細胞外領域の部分欠損型の *ALK* 変異が優位に高度増幅していることを確認した。癌における *ALK* の活性化型の変化として、転座や逆位による融合遺伝子、点突然変異によるアミノ酸置換、遺伝子増幅がみられる。しかし、ヒト腫瘍において *ALK* における細胞外領域の部分欠損型変異は報告がなく、癌における生物学的機構について解析をすすめた。

細胞外領域の部分欠損型の変異が融合遺伝子やキナーゼドメインの点突然変異と同様に他の活性化型の変化と類似した機能獲得型の変化であると仮説をたて、造腫瘍性とキナーゼの活性化の検討を行った。この部分欠損型の *ALK* 変異が、軟寒天培地によるコロニーアッセイにおいて増殖がみられ、ヌードマウスによる接種で腫瘍の増殖がみられ、*in vivo*, *in vitro* において造

腫瘍性をもつことを証明した。そして、神経芽腫細胞株を用いて NB-1 細胞における内在性 ALK のリン酸化の亢進していることを確認した。NB-1 細胞株では ALK は高度増幅がみられており、チロシンキナーゼ型受容体として増幅によりキナーゼの恒常的な活性化がみられる。そこで、部分欠損型の ALK 変異ベクターを導入した NIH3T3 細胞における解析を行い、チロシンキナーゼとして自己リン酸化の亢進がみられることを確認した。また、ALK 活性化の下流シグナルとして STAT3 が選択的に活性化されていることが示された。そして、神経芽腫細胞株における ALK のノックダウン実験を行うことにより、ALK が細胞増殖に強く関与していることを証明した。以上から、ALK における細胞外領域の部分欠損型変異は機能獲得型の変異であることが示された。

神経芽腫の新鮮腫瘍 71 検体と神経芽腫細胞株 23 株にて検討を行ったが、細胞外領域の部分欠損型変異は、同定されなかった。そのため、今回の変異が神経芽腫における ALK の変化として頻度の高い変化ではない。しかし、その後の報告で神経芽腫において ALK のエクソン 4-11 が欠損し細胞外領域の部分欠損型の変異が報告された[34]。この変異は進行神経芽腫の腫瘍検体からも確認されていることは重要な知見である。

また、チロシンキナーゼ型受容体の細胞外領域の欠損型の変異は、いくつかの癌がん遺伝子において確認されている[35-37]。最も頻度の高いのはグリオブラストーマの約 40-50%に EGFR の増幅がみられ、そのうち 50-70%に EGFR 遺伝子のエクソン 2 から 7 の細胞外領域の欠失し、801 塩基のインフレームシフトがみられる EGFR variant III (Δ EGFR) が知られている[38-39]。この変異型 EGFR は上皮成長因子(epidermal growth factor: EGF)の存在なしでも、そのチロシン残基が恒常的にリン酸化され活性化されていて、細胞増殖に関わることが知られている[40-41]。また、MET proto-oncogene family に属し、おもに上皮系の癌の形質維持や浸潤に関与することがしられるがん遺伝子である Receptor d'origine nantaais (RON) においては、いくつかの variant が報告されている。RON Δ 160 は RON のエクソン 5-6 の 109 のアミノ酸が欠失し、8 鎖の細胞外領域の部分欠損がみられる。RON Δ 160 は 正常組織にはみられないが、大腸がんの 50%以上に、脳腫瘍の 90%以上に発現がみられ、キナーゼの恒常的なリン酸化を示すことが知られる[42-44]。 Δ EGFR、RON Δ 160 においてもリガンド非依存性の恒常的なリン酸化が確認されているが、なぜ細胞外領域の部分欠損により恒常的なリン酸化がみられるかについて、詳細は明らかになっていない。

ALK のチロシンキナーゼのミスセンス変異はチロシンキナーゼの恒常的

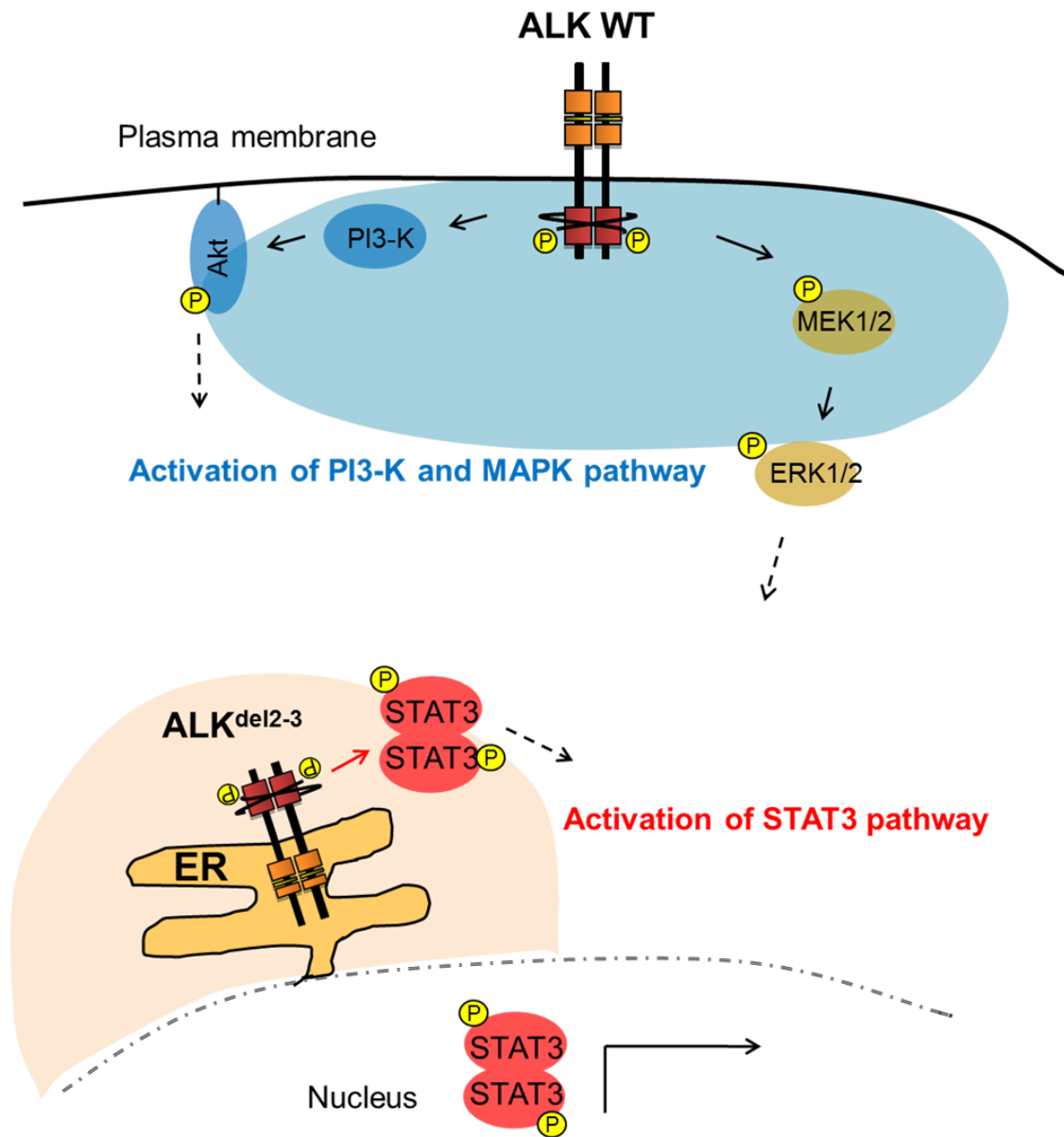
なりリン酸化を示し、そのなかでも強い酵素活性を示す F1174L 変異などは、下流分子として RAS-ERK, JAK-STAT3, そして PI3K-AKT の経路全ての活性が亢進していることが確認されている。今回の検討では部分欠損型変異では STAT3 の選択的なリン酸化が亢進していることが確認された。そこで、白血病にみられるチロシンキナーゼ型受容体である FLT-ITD が小胞体への局在の変化により、ERK、AKT 経路を活性化しない、STAT 経路を選択的に活性化する機序が報告[33]を参考に、小胞体への局在の変化の検証を行った。そして、免疫染色と糖鎖修飾の確認実験により、NB-1 細胞の内在性 ALK は小胞体に局在し、STAT 経路の酵素活性を選択的に活性化させている可能性が示唆された(Figure 22)。

新たなタンパクはリボゾームで合成され、小胞体にて成熟タンパクとなるプロセスを経てゴルジへ輸送され、成熟した膜蛋白はその後細胞膜へと移行する。小胞体は新規合成タンパクの品質管理機構をもち、なんらかの折り畳み不良タンパクが増加すると、小胞体に蓄積することが知られる。癌細胞においては、この生体機構を利用し、STAT 経路を中心としたシグナル経路を活性化させ、生存をはかっている可能性がある。今回の実験の結果は、チロシンキナーゼ型受容体の部分欠損型変異の悪性形質維持に関わる新たな機構の解明に手掛かりとなる可能性がある。

脳腫瘍の中でも悪性度の高い腫瘍である神経膠芽腫において細胞外領域の部分欠損のみられる EGFR variant 3 (Δ EGFR)は腫瘍検体において高頻度に見られる。なぜ細胞外領域の部分欠損により、リガンド非依存的な恒常的な活性化が見られるかについては、明らかになっていない。今回の ALK の解析結果から、そのひとつの可能性として、細胞外領域の欠損によりタンパクの立体構造の変化が見られ、ミスフォールディング蛋白として小胞体に蓄積することが、恒常的な活性化機構の原因として推察される。今回の解析で示された部分欠損型の ALK の局在の変化と選択的なシグナルの経路の活性化は、EGFR など多くの発癌に関わる膜蛋白チロシンキナーゼの新たな活性化機構の解明に広がる可能性があると考えられる。

以上をまとめると、本研究において癌におけるがん遺伝子 *ALK* の変化としてはじめて細胞外領域の部分欠損型の変異を同定した。さらには、この変異が悪性の形質転換能をもつこと、チロシンキナーゼ型受容体として過剰なリン酸化が見られることを明らかにした。そして、細胞外領域の部分欠損型の変異は小胞体への局在による新たなチロシンキナーゼの活性化の機序を明らかにする可能性が示された[45]。

Figure 22 部分欠損型 ALK の局在変化による活性化の機序



膜蛋白チロシンキナーゼであるALKは細胞膜に局在し、PI3-K経路やMAPK経路の活性化がみられるが、部分欠損型ALK変異 ALK^{del2-3} は小胞体に局在することによりSTAT経路の選択的な活性化がみられる。

6. 結 論

本研究では、ヒトの癌において *ALK* の細胞外領域の部分欠損型の変異を同定し、軟寒天培地によるコロニーアッセイ、ヌードマウスに接種による腫瘍形成の確認により、この部分欠損型変異が造腫瘍性をもつこと、また、ウェスタンブロット解析でチロシンキナーゼとしてリン酸化の亢進がみられることを確認し、*ALK* の部分欠損型変異はがんにおいて活性化型変異であることを証明した。また、選択的な *STAT3* のリン酸化の活性から、小胞体への局在の変化による、キナーゼ活性の新たな機序が示唆された。

部分欠損型変異の解析により、治療標的とチロシンキナーゼの活性化に対する新たな機構を明らかにする可能性が示される。

略語集

UTR	untranslated region
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
NPM1	nucleophosmin1
RAS	rat sarcoma
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
JAK	Janus kinase
STAT	Signal Transducers and Activator of Transcription
<i>TPM</i>	Tropomyosin
CARS	cystein-tRNA synthetase
CLTC	clathrin heavy chain
cDNA	complementary DNA
EML4	echinoderm microtubule associated protein-like 4
MYCN	N-myc proto-oncogene protein
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
HER2	human EGFR-related 2
ALCL	Anaplastic large cell lymphoma
IMT	Inflammatory myofibroblastic tumour
NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma
ESCC	Esophageal Squamous Cell Carcinoma
RMC	renal medullary carcinoma
RCC	Renal cell carcinoma
WB	Western blotting
IP	immunoprecipitation
SDS	sodium dodecyl sulfate
PAGE	Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride
BSA	Bovine serum albumin
TBS-T	Tris Buffered Saline with Tween® 20
HRP	horseradish peroxidase
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
PFA	Palaformaldehyde

PBS	Phosphate buffered saline
MAM	Meprin/A5-protein/PTPmu
LDLa	low density lipoprotein receptor class A
FLT3	fms-related tyrosine kinase 3
ITD	internal tandem duplication
siRNA	small interfering RNA
RON	Recepteur d'origine nantais

7. 引用文献

1. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer K, Shapiro DN, Look AT, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in NON-HODGKINS-LYMPHOMA (VOL 263, PG 1281, 1994). Science. 1995;267(5196):316-7.
2. Shiota M, Nakamura S, Ichinohasama R, Abe M, Akagi T, Takeshita M, et al. Anaplastic large-cell lymphomas expressing the novel chimeric Protein P80(NPM/ALK) - a distinct clinicopathological entity. Blood. 1995;86(5):1954-60.
3. Lamant L, Dastugue N, Pulford K, Delsol G, Mariamé B. A new fusion gene TPM3-ALK in anaplastic large cell lymphoma created by a (1;2)(q25;p23) translocation. Blood. 1999;93(9):3088-95.
4. Siebert R, Gesk S, Harder L, Steinemann D, Grote W, Schlegelberger B, et al. Complex variant translocation t(1;2) with TPM3-ALK fusion due to cryptic ALK gene rearrangement in anaplastic large-cell lymphoma. Blood. 1999;94(10):3614-7.
5. Meech SJ, McGavran L, Odom LF, Liang X, Meltesen L, Gump J, et al. Unusual childhood extramedullary hematologic malignancy with natural

- killer cell properties that contains tropomyosin 4--anaplastic lymphoma kinase gene fusion. *Blood*. 2001;98(4):1209-16.
6. Touriol C, Greenland C, Lamant L, Pulford K, Bernard F, Rousset T, et al. Further demonstration of the diversity of chromosomal changes involving 2p23 in ALK-positive lymphoma: 2 cases expressing ALK kinase fused to CLTCL (clathrin chain polypeptide-like). *Blood*. 2000;95(10):3204-7.
 7. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448(7153):561-U3.
 8. Mano H. Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer. *Cancer Sci*. 2008;99(12):2349-55.
 9. Soda M, Takada S, Takeuchi K, Choi YL, Enomoto M, Ueno T, et al. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(50):19893-7.
 10. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(18):1693-703.

11. Chen YY, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, et al.
Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*.
2008;455(7215):971-U56.
12. Maris JM. Medical Progress: Recent Advances in Neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(23):2202-11.
13. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *New England Journal of Medicine*.
1999;341(16):1165-73.
14. De Bernardi B, Nicolas B, Boni L, Indolfi P, Carli M, di Montezemolo LC, et al. Disseminated neuroblastoma in children older than one year at diagnosis: Comparable results with three consecutive high-dose protocols adopted by the Italian Co-Operative Group for Neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21(8):1592-601.
15. Pearson ADJ, Pinkerton CR, Lewis IJ, Imeson J, Ellershaw C, Machin D, et al. High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: a randomised trial. *Lancet*

Oncology. 2008;9(3):247-56.

16. Takita J, Hayashi Y, Kohno T, Shiseki M, Yamaguchi N, Hanada R, et al.

Allelotype of neuroblastoma. *Oncogene*. 1995;11(9):1829-34.

17. Takita J, Hayashi Y, Kohno T, Yamaguchi N, Hanada R, Yamamoto K, et

al. Deletion map of chromosome 9 and p16 (CDKN2A) gene alterations in neuroblastoma. *Cancer Res*. 1997;57(5):907-12.

18. Takita J, Hayashi Y, Nakajima T, Adachi J, Tanaka T, Yamaguchi N, et

al. The p16 (CDKN2A) gene is involved in the growth of neuroblastoma cells and its expression is associated with prognosis of neuroblastoma patients. *Oncogene*. 1998;17(24):3137-43.

19. Takita J, Hayashi Y, Takei K, Yamaguchi N, Hanada R, Yamamoto K, et

al. Allelic imbalance on chromosome 18 in neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 2000;36(4):508-13.

20. Takita J, Yang HW, Chen YY, Hanada R, Yamamoto K, Teitz T, et al.

Allelic imbalance on chromosome 2q and alterations of the caspase 8 gene in neuroblastoma. *Oncogene*. 2001;20(32):4424-32.

21. Yang HW, Chen YZ, Takita J, Soeda E, Piao HY, Hayashi Y. Genomic

structure and mutational analysis of the human KIF1B gene which is

homozygously deleted in neuroblastoma at chromosome 1p36.2.

Oncogene. 2001;20(36):5075-83.

22. Saito-Ohara F, Imoto I, Inoue J, Hosoi H, Nakagawara A, Sugimoto T, et

al. PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma. Cancer

Res. 2003;63(8):1876-83.

23. Attiyeh EF, London WB, Mossé YP, Wang Q, Winter C, Khazi D, et al.

Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. N

Engl J Med. 2005;353(21):2243-53.

24. Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, Grzeschik KH, Naylor SL,

Sakaguchi AY, et al. Chromosome localization in normal human cells

and neuroblastomas of a gene related to c-myc. Nature.

1984;308(5956):288-91.

25. Mossé YP, Wood A, Maris JM. Inhibition of ALK signaling for cancer

therapy. Clin Cancer Res. 2009;15(18):5609-14.

26. Mossé YP, Lim MS, Voss SD, Wilner K, Ruffner K, Laliberte J, et al.

Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory

solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology

Group phase 1 consortium study. Lancet Oncol. 2013;14(6):472-80.

27. Hallberg B, Palmer RH. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(10):685-700.
28. Murugan AK, Xing M. Anaplastic thyroid cancers harbor novel oncogenic mutations of the ALK gene. *Cancer Res*. 2011;71(13):4403-11.
29. Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y. Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma. *Cancer Sci*. 2011;102(2):302-8.
30. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NLT, Castel V, Castleberry RP, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *Journal of Clinical Oncology*. 1993;11(8):1466-77.
31. Nannya Y, Sanada M, Nakazaki K, Hosoya N, Wang L, Hangaishi A, et al. A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res*. 2005;65(14):6071-9.
32. Yamamoto G, Nannya Y, Kato M, Sanada M, Levine RL, Kawamata N, et al. Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. *Am J Hum*

- Genet. 2007;81(1):114-26.
33. Choudhary C, Olsen JV, Brandts C, Cox J, Reddy PNG, Boehmer FD, et al. Mislocalized Activation of Oncogenic RTKs Switches Downstream Signaling Outcomes. *Molecular Cell*. 2009;36(2):326-39.
34. Cazes A, Louis-Brennetot C, Mazot P, Dingli F, Lombard B, Boeva V, et al. Characterization of rearrangements involving the ALK gene reveals a novel truncated form associated with tumor aggressiveness in neuroblastoma. *Cancer Res*. 2013;73(1):195-204.
35. Pedersen MW, Meltorn M, Damstrup L, Poulsen HS. The type III epidermal growth factor receptor mutation - Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Annals of Oncology*. 2001;12(6):745-60.
36. Lu Y, Yao HP, Wang MH. Multiple variants of the RON receptor tyrosine kinase: Biochemical properties, tumorigenic activities, and potential drug targets. *Cancer Letters*. 2007;257:157-64.
37. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*. 2010;141(7):1117-34.
38. Ekstrand AJ, James CD, Cavennee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins

- VP. Genes for epidermal growth-factor receptor, transforming growth factor-alpha, and epidermal growth-factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Research*. 1991;51(8):2164-72.
39. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, et al. Structural alterations of the epidermal growth-factor receptor gene in human gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(7):2965-9.
40. Pedersen MW, Meltorn M, Damstrup L, Poulsen HS. The type III epidermal growth factor receptor mutation - Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Annals of Oncology*. 2001;12(6):745-60.
41. Gan HK, Kaye AH, Luwor RB. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2009;16(6):748-54.
42. Chen YQ, Zhou YQ, Angeloni D, Kurtz AL, Qiang XZ, Wang MH. Overexpression and activation of the RON receptor tyrosine kinase in a panel of human colorectal carcinoma cell lines. *Experimental Cell Research*. 2000;261(1):229-38.
43. Wang MH, Kurtz AL, Chen YQ. Identification of a novel splicing product

of the RON receptor tyrosine kinase in human colorectal carcinoma cells.

Carcinogenesis. 2000;21(8):1507-12.

44. Zhou YQ, He C, Chen YQ, Wang D, Wang MH. Altered expression of the

RON receptor tyrosine kinase in primary human colorectal

adenocarcinomas: generation of different splicing RON variants and

their oncogenic potential. Oncogene. 2003;22(2):186-97.

45. Okubo J, Takita J, Chen Y, Oki K, Nishimura R, Kato M, et al. Aberrant

activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in

neuroblastoma. Oncogene. 2012;31(44):4667-4676.

8. 謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、ご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学小児科准教授 滝田順子先生、東京大学小児科前教授 五十嵐隆先生に謹んで感謝の意を表します。

本研究の全般について直接ご指導いただいた、京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座教授 小川誠司先生、京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座 真田昌先生、東京大学小児科助教 樋渡光輝先生、無菌治療部講師 加藤元博先生、群馬県立小児医療センター院長 林泰秀先生、および東京大学小児科 岡明教授に心より深謝申し上げます。

また、本研究の遂行にあたりご指導をいただいた群馬県立小児医療センター 血液腫瘍科 大木健太郎先生、東京大学小児科助教 西村力先生に深く感謝いたします。本研究室実験助手、村松雅世氏、星野なおこ氏、殷毅氏、事務 齋藤文江氏にはご指導、ご支援いただき、深く感謝いたします。免疫染色をご指導頂きました東京大学発達医科学分野准教授 田中輝幸先生、助教 斉藤真木子先生に深く感謝いたします。

また、ご指導をいただいた慶応大学医学部遺伝子制御研究室教授 佐谷秀行先生、助教 サンペトラ・オルテア先生に、厚く御礼申し上げます。

最後に、研究を支えて頂きました、帯広市に住む祖母、父母、旭川市に住む父母、兄夫妻に心から感謝いたします。そして、心の支えになってくれた鉄生、祐生、清生と研究を承諾しどのような状況においても応援してくれた妻佳子に心から感謝します。