

論文の内容の要旨

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

はじめに

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。*NPM1* 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。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。また、間野らによる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* 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。

がん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化を報告した。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。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。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。

神経芽腫細胞株 24 株における *ALK* の発現をウエスタンブロットにて解析を行い、野生型の *ALK* タンパクの分子量は 220kDa であるのに比べ、NB-1 細胞株において 208kDa と小さい分子量の *ALK* の発現が確認された。そこで、私は短縮型の *ALK* タンパクの発現の分子機構について解析をすすめた。

研究方法および結果

1. 神経芽腫細胞株 NB-1 における転写産物の解析

短縮型の *ALK* タンパクの発現から部分欠損を考慮し、*ALK* 全長のプライマーを設定し RT-PCR にて転写産物の解析を行った。その結果、*ALK* のエクソン 2,3 の欠損したインフレームシフトが確認された。神経芽腫新鮮腫瘍 71 検体の解析では、部分欠損は確認されなかった。

2. 神経芽腫細胞株 NB-1 における *ALK* ゲノム構造の解析

NB-1 細胞株の *ALK* のゲノムの解析を行い、ゲノムの部分欠損型変異であることを確認した。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し、intron3 領域のコピー数が低下を確認した。さらに、*ALK* の各エクソンの PCR 産物をアンプリコンとしたサザンブロット解析を行い、*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を確認した。タンパクの一次構造として細胞外領域の MAM 領域の部分欠損している、細胞外領域の部分欠損型の変異を同定した。

3. 部分欠損型 *ALK* 変異の造腫瘍性

ALK においてはじめて同定した部分欠損型の変異に対して、造腫瘍性を確認した。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 細胞を用いて、軟寒天培地によるコロニー形成能の確認、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。軟寒天培地培養にて、*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観察された。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。

4. 部分欠損型 *ALK* 変異の発現誘導によるリン酸化の解析

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。NB-1 細胞株において ALK のリン酸化が亢進していることを確認し、部分欠損型 ALK 変異ベクターを導入した NIH3T3 細胞を用いて、ウェスタンブロット法にて野生型 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。また、免疫沈降法にて、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、同様に野生型に比べ部分欠損型変異の細胞の酵素活性の上昇が確認された。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。

5. 部分欠損型変異 ALK の小胞体局在

チロシンキナーゼが選択的に STAT シグナル経路を活性化している機序として急性白血病における FLT-3 の ITD(internal tandem duplication)において、局在が小胞体に局限することにより、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。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損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。

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、NB-1 細胞株では ALK が小胞体に局在していることを示した。また、糖鎖切断酵素を用いて糖鎖修飾の解析を行い、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 ALK タンパクであることを確認した。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を示唆している。

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 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。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 と低い子と同様に、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した。

結語

ヒトの癌における ALK の変化は、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。神経芽腫細胞株において短縮型の ALK タンパク発現が確認されたことから、今回私は転写産物、ゲノム構造の解析を行い、エクソン 2,3 が欠失しインフレームシフトがみられる ALK における細胞外領域の部分欠損型変異を初めて同定した。次に、この部分欠失型の 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。さらにこの部分欠損型の変異ベクターを導入した NIH3T3 細胞にて解析を行い、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。また下流シグナルとして STAT3 が亢進していることを確認し、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を示した。最後に ALK キナーゼ阻害剤、siRNA による発現抑制実験を行い、分子標的療法への治療戦略を示した。