

論文の概要の要旨

論文題目 Functional analysis of ALK, a receptor-type protein tyrosine kinase
和訳 受容体型チロシンキナーゼ ALK の機能解析

指導教官 山本 雅 教授

東京大学大学院医学研究科
平成8年4月 入学
医学博士課程
病因・病理学専攻

氏名 茂木 章

序

神経系において特異的に発現の見られる受容体型チロシンキナーゼ (RTK) およびそれらのリガンドは、神経系の発生、分化、生存維持など多彩な生物学的機能を有している。代表的な例として、TrkA/NGF、Ret/GDNF、および Eph/Ephrin などがあげられる。Trk 遺伝子は、ヒト大腸がんにおいて活性化されている癌遺伝子として見い出され、一部の感覚神経と交感神経の分化誘導因子として知られていた NGF (nerve growth factor) の高親和性受容体であることが明らかにされた。Ret 遺伝子もヒトリンパ腫の DNA から NIH 3T3 細胞をトランスフォームする癌遺伝子として同定されたが、現在 GDNF (glial-cell-line-derived neurotrophic factor) に対する受容体であることが知られている。また、近年解析の進んだ Eph/Ephrin ファミリーは、神経回路網の形成時において軸索誘導、標的選択に関与することが明らかにされた。

ALK (anaplastic lymphoma kinase) は神経系に特異的に発現する受容体型チロシンキナーゼである。ALK も上記の Trk や Ret などと同様、癌遺伝子として見い出された。全長 cDNA クローニングおよび in situ ハイブリダイゼーションの結果から、LTK (leukocyte tyrosine kinase) と最も高い相同性 (キナーゼドメインで 78%、細胞外ドメインで約 50%) を示し、マウス胎生後期中枢神経系 (終脳、間脳、中脳、脳幹、および脊髄腹側の特定の神経細胞) や末梢神経系 (三叉神経節、上頸神経節、および後根神経節など) において特異的に発現の見られる新規の受容体型チロシンキナーゼであることが明らかにされた。分子構造および発現パターンの解析から、ALK は特定の神経細胞集団に対して増殖、生存維持などの作用を持つ神経栄養因子、または軸索誘引・反発作用などを持つ

位置情報因子に対する受容体として機能していることが期待されるが、ALK に対するリガンドは現在未同定でありその詳しい機能は不明である。

そこで本研究では、第一章においてALK の下流のシグナルを明らかにするために、ALK の oncogenic form である p80^{NPM-ALK} の癌化能に関わるシグナルの解析を行った。また、第二章では、ALK のリガンドを模倣する活性化抗体、および阻害する中和抗体の候補を得る目的で、ALK の細胞外領域に対するモノクローナル抗体 (mAb) を作成した。これらの実験から、未知の ALK リガンドの想定される生理的機能や、引き起こされる下流シグナルの基礎的情報を得ること、またリガンド候補の検索・同定の際に有用なツールを得ることを意図した。

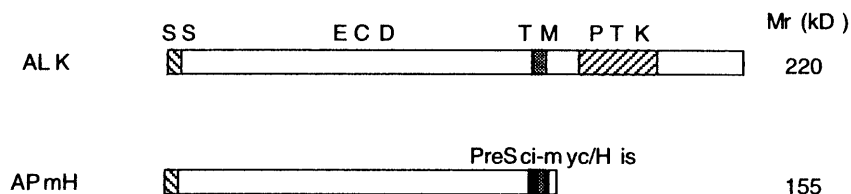
第一章：非ホジキン型リンパ腫の一部に観察される融合蛋白質 p80^{NPM-ALK} の細胞癌化能に関わるシグナルの解析

非ホジキン型リンパ腫の一亜型である anaplastic large cell lymphoma (ALCL) の約 3 割において t(2;5)(p23;q35) の染色体転座が観察される。この転座に伴い、新規のチロシンキナーゼをコードする *alk* 遺伝子と、既知の核蛋白質 nucleophosmin (NPM) をコードする *npm* 遺伝子との融合遺伝子が生じる。ALCL ではこの融合遺伝子産物である p80^{NPM-ALK} の特異的発現、およびチロシン (Y) リン酸化が検出され、p80 から生じる異常なシグナルが本疾患の主要な病因であると考えられている。p80 のトランスフォーム能に関わるシグナルについては、PLCγ1 の結合する Y664 のフェニルアラニン (F) 変異によりトランスフォーム能が失われるという報告がなされたが、Y664 を含む C 末 154 aa を欠失してもトランスフォーム能を持つという報告もあり矛盾していた。これらに対して私は、Y664 がマウス ALK には存在しないことに着目して、p80 の ALK 部分をマウスに置換した変異体を作成し、マウス変異体でもトランスフォーム能を持つことを示した。また、ヒト p80 においても Y664F の変異体では focus の若干の減少が見られるものの依然トランスフォームするという結果を得た。p80 のシグナルに関してはこのほかに Y156 に IRS1、Y567 (と一部 Y156) に SHC がそれぞれ結合するがこれらはトランスフォーム能に大きく影響しないという報告がある。しかし、詳しい比較はなされていなかった。そこで Y156F、Y567F、Y664F の単独および全ての組み合わせの変異体を作成し、それぞれのトランスフォーム能を NIH 3T3 細胞を用い focus formation assay にて比較検討した。その結果、Y567F 単独変異にて wild type に比べ focus 数が約 5 割に減少した。また Y156/567F (2F) でも依然生じる focus は p80 のどの部位を介したシグナルによるのかを検討するため、156/567 以外の Y (NPM 部分の Y および kinase 活性に必須であると考えられる Y342、Y343 を除く。) について 2F にもう 1F を加えた変異体を作成し、それらのトランスフォーム能を検討した。その結果、2F/Y646F でのみさらにトランスフォーム能を減少させることを見出した。以上から、p80 による NIH 3T3 細胞のトランスフォーム能には SHC の主要な結合部位である Y567 を介したシグナルが重要であること、および Y646 への未知のシグナル分子の寄与が示唆された。しかし、Y156/567/646F でもトラ

ンスフォーム活性は残ることから、これら以外の標的分子が関与すると考えられる。この点については、p80/3F 変異体には Grb2, PI3-K の p85 サブユニット, PLC γ 1 との結合が依然見られるのでこれらの結合部位の関与をさらに検討する必要がある。また、Grb2 が TrkA の活性化に必須な Y (上述 p80 の Y387, Y390 に相当する部位) と直接結合するという報告や標的分子にリン酸化チロシンに依存しない結合をするアダプター分子の存在が知られてきており、これらの分子のトランスフォームへの関与を検討する必要があると思われる。

第二章：ALK の細胞外領域に対するモノクローナル抗体の作成

生理的機能を有する抗体を得るために、抗原は哺乳動物細胞の糖鎖修飾をもち非変性の条件下で精製されたものであることが望まれる。このような抗原を得るためにマウス ALK の細胞外領域に protease site を挟み myc/His tag を付加した蛋白質を発現するプラスミドを作成した (pAPmH; 下図参照)。pAPmH を HEK 293 T 細胞に発現させ、APmH を培養液から chelating Sepharose にて回収し PreScission (GST-protease) 消化により tag を分離した。さらに glutathione Sepharose にて protease を除去し PBS に対して透析を行った。得られた標品を抗原にして 3 週齢ラットに免疫しリンパ節を採取、ミエローマ細胞 (PAI 細胞) とのハイブリドーマを作成した。ハイブリドーマの培養上清を用いて ELISA スクリーニングを行ったところ 210 クローン中 12 の陽性クローンを同定した。(動物免疫と ELISA スクリーニングは、東京都立臨床医学総合研究所の小谷博士との共同研究) これら陽性クローンのうち Western blotting および免疫沈降実験により 11 クローンが ALK の細胞外領域を認識することを確認した。さらにこれらの抗体が ALK リガンドを模倣する活性を持つかを調べるために NIH 3T3 細胞にマウス ALK を安定発現させた細胞株 (2-C4) を作成し、各抗体を作用させたところ 4 クローンで ALK の自己リン酸化の上昇が認められた。ALK は全長と考えられる約 220 kD と minor な 160 kD のバンドの 2 本が観察されるが、この自己リン酸化の上昇は 160 kD のバンドにより強く認められた。この生理的意義は未解明であるが ALK の活性化に伴うプロセシングが存在する可能性を示唆するのも知れない。抗体による ALK の活性化をさらに解析するために、特に顕著に活性化能の認められたクローン 16-39 を産生・精製した。mAb 16-39 による ALK のリン酸化の time course を観察したところリン酸化は刺激後 5 min で最大に達し、以後減衰し、24 時間後も低レベルのリン酸化が持続することが明らかになった。また抗体の容量依存性を検討したところ、抗体濃度の増加とともに ALK のリン酸化は上昇し 3-10 μ g/ml に



て最大のリン酸化を引き起こすことを示した。この ALK の活性化が下流のシグナルを動かすことができるかを調べるために刺激を加えた 2-C4 細胞の全溶解物を MAP kinase (ERK1/2) の活性化を反映すると考えられているリン酸化 form を認識する抗体で Western blot したところ、MAP kinase のリン酸化が観察された。一方、Stat 3 のチロシンリン酸化は認められなかった。またこれらの変化は抗体を作用させていない細胞および ALK を発現していない細胞には観察されなかった。さらに mAb 16-39 が内在性の ALK を活性化できるかを調べるために、ヒト神経芽細胞腫の細胞株である SK-N-SH 細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、これらの細胞種でも ALK のチロシンリン酸化および MAP kinase のリン酸化が観察された。さらに抗体刺激により SHC, Cbl が ALK と会合し、チロシンされることを明らかにした。また PI 3-kinase の p85 subunit は抗体刺激に伴い ALK と会合し、自身のリン酸化は受けないものの約 200 および 130 kDa の共沈タンパクのリン酸化を受けることを示した。これらより本研究にて作成した抗 ALK モノクローナル抗体 mAb 16-39 は ALK の活性化を介して特定の下流シグナルを動かすことができると考えられた。さらに ALK の活性化により細胞レベルの挙動にどのような変化が引き起こされるかを調べるために、血清飢餓にした SK-N-SH 細胞に mAb 16-39 を 20 nM の濃度で加え培養したところ、著明な神経突起様構造物の伸長および生存維持が観察された。また、0.1% 血清存在下で [³H]thymidine の DNA への取り込みを観察したところ、抗体刺激により DNA 合成を促進した。これらのことから、mAb 16-39 は *in vitro* において神経細胞栄養因子様活性を有し、ALK は生体内で特定の神経細胞の増殖・分化に関わっている可能性が示された。mAb 16-39 による上記生物学的現象の分子機構の解明、および mAb 16-39 が *in vivo* においてどのような作用を有するかについての解析はこれからの課題であるが、未知の ALK リガンドの生理機能に関する非常に興味深い示唆が得られることが期待される。また、免疫沈降実験にて ALK と結合するが自己リン酸化を引き起こさない 7 クローンに関しては、将来 ALK の中和抗体として有用である可能性があり、さらなる解析が必要である。