

審査の結果の要旨

氏名 茂木 章

本研究は受容体型チロシンキナーゼの生物学的機能を明らかにするため、神経系において高い発現を示す受容体型チロシンキナーゼ ALK およびその oncogenic form である p80^{NPM-ALK} に注目し、その機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

(1)

染色体転座 t(2;5)(p23;q35)を伴う非ホジキン型リンパ腫において観察される融合遺伝子産物 p80 は Y156, Y567, Y664 を介してそれぞれ IRS1, SHC, PLC γ が直接結合することが示されている。これらシグナル伝達分子の結合配列であるチロシン残基の細胞癌化への寄与を明らかにするために 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、Y156 が p80 によるトランスフォームに重要であることが示された。また、156/567/664 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することにより、Y646 も p80 による NIH 3T3 細胞のトランスフォームに関与することが示された。

(2)

1. 受容体型チロシンキナーゼ ALK はリガンドが未知のためその生理的機能は全く不明であった。そこで、ALK リガンドを模倣する活性化抗体を得る目的で細胞外領域に対するモノクローナル抗体を作成した。これらの抗体を NIH 3T3 細胞にマウス ALK を安定発現させた細胞株 2-C4 に作用させ、anti-ALK polyclonal 抗体による免疫沈降物のチロシンリン酸化を Western blotting 法により検討することによりクローン 16-39 が ALK の著明なチロシンリン酸化を引き起こすこと

を示した。

2. mAb 16-39 による ALK のチロシンリン酸化の時間経過および容量依存性を観察したところ、ALK のリン酸化は刺激後 5 min で最大に達し以後減衰、24 時間後も低レベルのリン酸化が持続すること、また抗体濃度の増加とともに ALK のリン酸化は上昇し 3-10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度にて最大のリン酸化を引き起こすことを示した。

3. ヒト神経芽細胞腫の細胞株である SK-N-SH 細胞において、抗体刺激による ALK の活性化に伴い SHC, Cbl といったシグナル分子が ALK と会合しチロシンリン酸化されることを免疫共沈法および Western blot 法により明らかにし、また ERK1/2 の活性化を反映するリン酸化が引き起こされることを示した。さらに PI 3-kinase の p85 subunit は抗体刺激に伴い ALK と会合し、約 200 および 130 kDa のリン酸化タンパクと免疫共沈することを示した。

4. SK-N-SH および 2-C4 細胞を用いて細胞レベルでの抗体の作用を検討した。血清飢餓下の SK-N-SH 細胞に抗体を加えることにより、mAb 16-39 は神経突起様構造物の著明な伸長および生存維持作用を示すことを明らかにした。また、0.1% 血清存在下での [^3H]thymidine の取り込みを指標として抗体による増殖促進能の検討を行った。ALK を発現した 2-C4 および SK-N-SH 細胞は抗体の容量依存的な取り込みの促進を示したのに対し、NIH 3T3 細胞は促進がみられず、16-39 抗体は ALK 依存的にこれらの細胞の増殖促進作用を示すことを明らかにした。

以上、本論文は非ホジキン型リンパ腫の一部において観察される融合遺伝子産物 p80^{NPM-ALK} の増殖シグナルに関わるチロシン残基の同定を行うことにより本リンパ腫の発癌機構の理解を深めた。また p80 の normal counterpart である受容体型チロシンキナーゼ ALK の活性化抗体を作成することにより ALK の活性化により引き起こされるシグナル伝達経路の解析および細胞レベルでの ALK の機能解析を行った。これらは受容体型チロシンキナーゼの関わる発癌のメカニズム、神経系の発達・維持等の研究において重要な貢献をなしうるものであり、学位の授与に値するものと考えられる。