

論文の内容の要旨

論文題目

Analyses of the *MET* and *PTPN11* Genes in Pediatric Malignancies

小児悪性腫瘍における *MET* 遺伝子および *PTPN11* 遺伝子の解析

氏名 陳 玉 彦

はじめに

個体の発生や組織・臓器形成の調節、細胞の増殖・分化や細胞分裂の制御のためには、細胞内外において複雑なシグナル伝達が必要である。これまでにシグナル伝達にチロシンリン酸化反応が重要であることが明らかにされてきた。蛋白質のチロシンリン酸化は、チロシンリン酸化酵素（キナーゼ）とチロシン脱リン酸化酵素（フォスファターゼ）で調節される。チロシンキナーゼは受容体型と非受容体型に分類され、受容体型チロシンキナーゼ（RTK: receptor protein tyrosine kinase）の多くは、細胞外からの増殖シグナルや分化シグナルに関するリガンドを介して活性化され、標的蛋白質のチロシン残基を特異的にリン酸化し、様々の細胞内シグナル伝達分子へと情報を伝える。チロシンキナーゼの活性化は白血病、肺がんなど多くの癌腫の発癌過程で重要な役割を果たしている。チロシンフォスファターゼ（PTP: protein tyrosine phosphatase）ファミリーはこれまでに約 90 のメンバーが報告されており、クラシック PTPs も受容体型と非受容体型に分類され、このうちシグナルを正や負に制御する遺伝子も報告されている。以上より、チロシンリン酸化酵素とチロシン脱リン酸化酵素は共に様々な腫瘍の発生や進展に重要な役割を演じている事が推測されている。

横紋筋肉腫（rhabdomyosarcoma: RMS）は小児軟部腫瘍の中で最も頻度が高く、組織学的には

胎児型 (embryonal type; ERMS) と胞巣型 (alveolar type; ARMS) に大別される。近年の集学的治療により ERMS の治療成績は改善されてきたが、ARMS は他の小児固形腫瘍と比べても依然として極めて予後不良である。ARMS に特徴的な遺伝子異常として *PAX3-FKHR* と *PAX7-FKHR* 融合遺伝子が知られているが、これ以外に *CDKN2A* (*p16*, *p14*) 遺伝子の変異や *MET* 遺伝子の高発現も報告されている。*MET* は RTK に属し、hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) の受容体である。HGF-MET シグナルは再生、増殖、転移など様々な生理機能に関与している。HGF-MET シグナルと *p16*, *p14* は、それぞれ筋肉の発育、細胞周期および TP53 依存性アポトーシスに関与することが判明している。*p16* は悪性黒色腫、膵臓癌、肺がんなど様々な癌で変異を起こしていることが報告されており、*MET* も腎臓癌や肝癌など多くの癌で変異や高発現が検出されている。また、*p16*, *p14* の欠失と *MET* の高発現を同時に起こしているトランスジェニックマウスでは RMS を高頻度に発症することが判明している。

PTPN11 遺伝子は non-receptor protein tyrosine phosphatase をコードし、2つの Src homology-2 domain (SH2) と protein tyrosine phosphatase domain を有する。*PTPN11* 遺伝子は様々な組織の細胞質に発現し、サイトカイン、成長因子などによって Ras などを通じ、細胞内シグナル伝達に関与する。*PTPN11* は当初 Noonan 症候群の原因遺伝子として報告され、さらに骨髄異形成症候群 (MDS)、特に若年性骨髄単球性白血病 (JMML) にも *PTPN11* の変異が認められたことから、白血病発症の原因遺伝子としても注目されている。また、Noonan 症候群に発症する RMS、神経芽腫 (NB) も報告されている。

私はチロシンキナーゼである *MET* 遺伝子およびチロシンフォスファターゼである *PTPN11* 遺伝子の横紋筋肉腫の発症、進展における意義を検討した。また、コントロールとして、神経芽腫および小児造血器腫瘍における *PTPN11* 遺伝子の変異の頻度も検索した。

材料

1. *MET* 遺伝子の解析：RMS の細胞株 7 株および新鮮腫瘍 32 例
2. *PTPN11* 遺伝子の解析：RMS の細胞株 7 株、新鮮腫瘍 30 例、NB の細胞株 25 株、新鮮腫瘍 40 例、および白血病の細胞株 95 株 (AML19 株、CML5 株、T-ALL14 株、B-ALL12 株、B-precursor ALL45 株)、新鮮検体 261 例 (AML85 例、MDS17 例、JMML22 例、T-ALL5 例、B-precursor ALL90 例、乳児白血病 42 例)

方法

1. Real-time quantitative PCR (RQ-PCR) 解析により、RMS の検体における *MET*, *p16* および

2. Western blot analysis および免疫沈降を行って、RMS の細胞株において MET の蛋白発現およびリン酸化状態を解析した。
3. PCR-single-strand conformation polymorphism analysis (PCR-SSCP) 法と直接塩基決定法を用いて、MET 遺伝子の傍膜領域と tyrosine kinase domain (exon 14-21) および CDKN2A、TP53 遺伝子の全 coding 領域の変異の検索を行った。また、PTPN11 遺伝子の全 coding 領域の変異を検索し、RMS の検体について、直接塩基決定法で NRAS、KRAS、HRAS 遺伝子の変異の検索も行った。
4. RT-PCR を用いて、RMS の検体における PAX3-FKHR と PAX7-FKHR 融合遺伝子の発現を検討した。
5. RMS の検体において、MET、p16 および p14 の発現と臨床的因子の相関について統計的解析を行った(Mann-Whitney U test、Fisher's exact test、log-rank test)。

結果

RMS における MET、p16/p14、TP53 遺伝子の解析

1. RMS における MET、p16、p14 の発現および相対 DNA copy number : MET の発現は RMS の細胞株 7 株および新鮮腫瘍 17 例ですべて検出され、MET の高発現 (> mean value) は 24 検体中 7 検体で認められたが、ゲノムの増幅はみられなかった。p16 の低発現または発現消失は 24 検体中 11 検体で検出され、p14 の低発現または発現消失は 24 検体中 10 検体で検出された。細胞株 3 株および新鮮腫瘍 2 例で CDKN2A の DNA copy number が半分以上に低下していた。MET の高発現を有する新鮮腫瘍 2 例で p16 と p14 の低発現または発現消失も同時に検出された。
2. RMS における MET の蛋白発現およびリン酸化 : RMS の細胞株 7 株では MET の蛋白発現は mRNA の発現と一致した。蛋白の高発現が認められた 4 株の ARMS のうち 3 株で自己リン酸化が検出された。
3. RMS における MET、CDKN2A、TP53 の変異 : RMS の細胞株 7 株と新鮮腫瘍 32 例では MET の変異が検出されなかった。ARMS の細胞株 SJRH-18 では p16 のコドン 80 に nonsense 変異が検出された。この変異は p14 では Pro135Leu の missense 変異に相当する。細胞株 7 株中 5 株および新鮮腫瘍 17 例中 3 例では TP53 の変異が検出された。
4. RMS における融合遺伝子の発現 : ARMS の細胞株 4 株および新鮮腫瘍 3 例で PAX3-FKHR、ARMS の 1 例で PAX7-FKHR が検出された。PAX3-FKHR を有する細胞株 4 株のうち 3 株、新鮮腫瘍 3 例のうち 2 例で MET の高発現が検出された。

5. *MET*、*p16/p14* の発現量と臨床的因子の相関の解析：*MET* の発現量は病期、融合遺伝子および予後と相関していた ($P = 0.04$; $P = 0.04$; $P = 0.02$; Mann-Whitney *U* test)。胞巣型および年長児 (> 3y) の *MET* 発現量が高い傾向がみられたが、有意差は認められなかった。*p16* と *p14* の発現量は 3 歳以下の症例に有意に低かったが、病期、病理像、予後などとの相関はみられなかった。

RMS、NBおよび造血器腫瘍における*PTPN11*、*RAS*遺伝子の解析

1. RMSにおける*PTPN11*の変異：RMSにおいて37検体中1例の胎児型RMSで*PTPN11*の変異 (A72T)が検出された。
2. RMSにおける*RAS*の変異：*PTPN11*の変異を有していない胎児型の細胞株1株および胎児型の新鮮腫瘍1例で*NRAS*のmissense変異がみられ、*NRAS*を活性化させる変異であった。
3. NBおよび造血器腫瘍における*PTPN11*の変異：NBの計65検体では*PTPN11*の変異が検出されなかった。JMML22例中11例で*PTPN11*の変異がみられた。MDSでは17例中1例、AMLでは細胞株19株中2株、新鮮検体85例中1例、乳児白血病では42例中1例で*PTPN11*の変異が検出された。検出された変異はすべてmissenseで、N-SH2 domainのエクソン3のコドン60、61、72、76に集中した。また、B-precursor ALLにおいては90例中1例のt(1;19)転座を有するpre-B ALLで新たな変異(R152H)がみられた。この変異は180例の正常コントロールでは検出されなかった。

考察

RMS において *MET* 遺伝子の mRNA と蛋白の高発現が認められ、さらに高発現の検体で *MET* 蛋白がリン酸化された事から *MET* のチロシンキナーゼ活性が恒常に高い事が示された。一方、*p16* と *p14* の発現低下または発現欠失が認められ、*p16* と *p14* の変異および *TP53* の変異も検出され、さらに頻度は少ないものの、RMS の胎児型において *PTPN11* および下流の *NRAS* の変異も検出されたことから、これらの遺伝子が協同作用で一部の RMS の発生に関与する可能性が示唆された。また、*MET* の発現量は予後と相関し、RMS の進展にも関与すると考えられる。*MET* の特異的抑制剤の開発によって、難治性 RMS の新たな治療法になる可能性も考えられる。