

Title	Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell line causing ligand-independent activation of c-kit product
Author(s)	振津, 琢磨
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39269">https://hdl.handle.net/11094/39269</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;大阪大学の博士論文について</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	ふり 振 津 琢 磨
博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )
学 位 記 番 号	第 1 1 6 3 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 1 月 1 1 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell line causing ligand-independent activation of c-kit product (ヒトマスト細胞性白血病細胞株における c-kit プロトオンコジーンのリガンド非依存的活性化をきたす突然変異の同定)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松 沢 佑 次 (副査) 教 授 木 谷 照 夫 教 授 北 村 幸 彦

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [目 的]

レセプター型チロシンキナーゼをコードする c-kit プロトオンコジーンは、正常の生体内では血液幹細胞、マスト細胞、生殖細胞、メラノサイトなどに発現されており、そのリガンドの stem cell factor (SCF) はこれらの系統の細胞の増殖・分化を制御する重要な微小環境因子である。この c-kit は一部の骨髄性白血病、肺小細胞癌、精巣腫瘍などの腫瘍細胞にも発現していることが報告されているが、腫瘍化における c-kit の役割は明らかになっていない。我々は c-kit 遺伝子産物 (Kit) がリガンド非依存的に活性化しているヒト白血病細胞株を見出したので、その活性化機構を明らかにするために c-kit の遺伝子解析を行った。

#### [方法ならびに成績]

##### (1) HMC-1 細胞における Kit のリガンド非依存的活性化

レセプター型チロシンキナーゼは、リガンドが結合すると活性化し自己のチロシン残基をリン酸化し、そして、その自己リン酸化チロシンを介してレセプターに会合する基質標的蛋白質を更にリン酸化・活性化して細胞内へ情報を伝達する。そこで種々のヒト白血病細胞株における Kit の活性化状態をスクリーニングするために、SCF 刺激前後の Kit の自己チロシンリン酸化を比較検討したところ、マスト細胞性白血病患者の末消血から樹立されたヒト白血病細胞株 HMC-1 においては Kit が SCF 刺激前から恒常的にチロシンリン酸化されていた。一方、他の白血病細胞株では Kit のチロシンリン酸化は SCF 刺激後のみに認められた。Kit の生理的な活性化の指標として基質標的蛋白質の一つである P13 キナーゼと Kit との会合状態について共免疫沈降法により検討したところ、HMC-1 細胞では SCF 刺激前より Kit が恒常的に P13 キナーゼと会合していた。更に、抗 Kit モノクローナル抗体を用いた immune complex kinase assay による検討でも、HMC-1 細胞では SCF 刺激前から Kit の強いキナーゼ活性化が認められた。以上の結果より、HMC-1 細胞の Kit は外来性の SCF 刺激なしに恒常的に活性化されていると考えられた。一方、HMC-1 細胞自身による SCF 産生について検討したところ、HMC-1 細胞における SCF mRNA の発現は RT-PCR 法によっても検出されず、また HMC-1 細胞培養上清中に SCF 活性は認めら

れなかった。従って、この HMC-1 細胞における Kit の恒常的活性化はオートクリン機構によるものではなく、リガンド非依存的な活性化であると結論された。

## (2) HMC-1 細胞における c-kit 遺伝子の点突然変異

この Kit のリガンド非依存的活性化が Kit の分子異常によるものである可能性を検討するために、HMC-1 細胞の c-kit cDNA の全コード領域の塩基配列を解析した。HMC-1 の2つの c-kit 対立遺伝子のうち一方は正常であったが、片方の c-kit 遺伝子内には2カ所の点突然変異 ( $T^{1700} \rightarrow G$ ,  $A^{2468} \rightarrow T$ ) が認められた。この2つの点突然変異は膜貫通部とキナーゼドメイン間のコドン560とキナーゼドメイン間のコドン816に位置し、それぞれ  $Val^{560} \rightarrow Gly$  と  $Asp^{816} \rightarrow Val$  のアミノ配置換をきたすものであった。

## (3) 変異 c-kit 遺伝子による Kit のリガンド非依存的活性化

これらのアミノ酸置換の Kit キナーゼ活性に及ぼす影響を検討するために、上記2つの変異を単独あるいは重複して c-kit 遺伝子に導入し、ヒト胎性腎細胞株 (293T) に発現させて変異 Kit の活性化を比較検討した。なお、2つの変異が共にヒトとマウスの Kit において完全に保存されたアミノ酸配列内に位置していることから、この実験ではマウスの c-kit 遺伝子に変異を導入した。(マウス Kit では上記変異は  $Val^{559} \rightarrow Gly$  と  $Asp^{814} \rightarrow Val$  に対応する) これら変異 Kit のキナーゼ活性を SCF 非存在下で比較検討したところ、膜貫通部直下の単独変異 ( $Val^{559} \rightarrow Gly$ ) では軽度の、またキナーゼドメイン内の単独変異 ( $Asp^{814} \rightarrow Val$ ) では強度の恒常的活性化を認め、両者の重複変異では  $Asp^{814} \rightarrow Val$  単独変異と同程度の強い恒常的活性化を認めた。以上の結果より、HMC-1 細胞の c-kit 遺伝子に見出された2つの点突然変異はいずれも Kit のリガンド非依存的活性化に関与しており、特にキナーゼドメイン内の点突然変異が強いキナーゼ活性化の主な原因となっているものと結論された。

### [総括]

マスト細胞性白血病由来のヒト白血病細胞株 HMC-1 において、Kit のリガンド非依存的活性化きたす c-kit 遺伝子の突然変異を見出した。このような c-kit 遺伝子の活性化突然変異が腫瘍化に関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究では、ヒトマスト細胞性白血病由来の細胞株 HMC-1 において、レセプター型チロシンキナーゼの1つである c-kit 遺伝子産物 (Kit) が、リガンド非依存的に活性化していることを見出した。そして、c-kit 遺伝子の解析と変異 c-kit 遺伝子の発現実験から、この Kit のリガンド非依存的活性化が、c-kit 遺伝子の2ヶ所の点突然変異によるものであることを明らかにした。このような c-kit 遺伝子のリガンド非依存的活性化をきたす突然変異の報告は、本研究が初めてであり、白血病の発症機構を解明する上で重要な知見と考えられ、学位に値するものと認める。