

Title	Complementary DNA sequence encoding the major neural cell adhesion molecule isoform in a human small cell lung cancer cell line
Author(s)	齋藤, 伸一
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/39319">http://hdl.handle.net/11094/39319</a>
DOI	
rights	
Note	

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

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

氏 名	さい とう じん いち 齋 藤 伸 一
博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )
学 位 記 番 号	第 1 1 4 4 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 6 年 5 月 1 9 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	Complementary DNA sequence encoding the major neural cell adhesion molecule isoform in a human small cell lung cancer cell line (ヒト肺小細胞癌培養株に発現する神経細胞接着分子の cDNA 塩基配列)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岸 本 忠 三 (副査) 教 授 濱 岡 利 之      教 授 祖 父 江 憲 治

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [目 的]

肺小細胞癌 (small cell lung cancer, SCLC) は、早期から転移する悪性度の高い癌であるが、抗癌剤や放射線に高感受性のため内科的治療が主体となり、手術が中心治療となる非肺小細胞癌との鑑別は重要な問題である。そこで肺小細胞癌に特異性を示し、非肺小細胞癌とは反応しないマウスモノクローナル抗体 (monoclonal antibody, mAb) ITK-2 を作製した。この抗体は、SCLC に反応する抗体群の中では cluster 1 に分類されるが、その認識抗原は神経細胞接着分子 (neural cell adhesion molecule, N-CAM) であることが1989年に判明している。N-CAM は免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーに属する糖蛋白でホモフィリックな細胞間接着を担っているが、単一ゲノムから転写されてくる mRNA 前駆体の3' 端を中心とする alternative splicing とポリシアル酸の付加により多様な isoform を生ずることが知られている。最近の研究では、N-CAM は一部の非肺小細胞癌でも認められており、肺癌の浸潤、転移のみならず、その発生及び神経内分泌系への分化にも何らかの機能的役割を果たしていると想定される。その解明のため、まず肺小細胞癌に発現している N-CAM の isoform 及びその一次構造を明らかにすることを試みた。

#### [方法ならびに成績]

培養株として樹立された SCLC 細胞で BALB/c マウスを免疫し、得られた脾細胞とマウス骨髄腫細胞とのハイブリドーマをスクリーニングすることによりマウス IgG1 型 mAb ITK-2 を得た。各種のヒト癌細胞培養株との反応性を ELISA 法で、ヒト正常組織及び肺癌組織との反応性を免疫組織染色でそれぞれ検討した結果、ITK-2 は肺小細胞癌と神経内分泌系由来の正常組織及び腫瘍に特異性を示した。次いで ITK-2 認識抗原の分子量を免疫沈降法にて検討した結果、SCLC 培養株では 145kDa の位置に明瞭な band を形成し、神経芽細胞腫培養株では 140 - 200kDa の位置にスメア状の band を形成した。以上の結果より ITK-2 は肺小細胞癌に対する抗体分類では最も major group である cluster1 に属する抗体であり、またその認識抗原は主に 145kDa N-CAM isoform と考えられた。

ヒト骨格筋より単離された N-CAM の塩基配列をもとにプライマーを作製し、ヒト SCLC 培養株 OS2-R より抽出した mRNA から合成した DNA を鋳型として polymerase chain reaction (PCR) を行った。増幅した DNA

標品をサブクローニングして N-CAM 5' 端 294bp の cDNA probe を得た。この probe を用いて Northern blotting を行った結果、9種の SCLC 培養株では全例に 6.2kb の single band が検出され、また 2種の神経芽細胞腫培養株では 6.2kb に加え 7.4kb の band も認められた。以上より SCLC では 6.2kb の mRNA にコードされる 145kDa N-CAM が主に発現するものと考えられたが、その一次構造を決定するためまず、ヒト SCLC 培養株 OS-2R より  $\lambda$  gt10 cDNA library を作成した。前述の probe でスクリーニングを行い、得られた 2個の陽性クローンを解析することにより 2960bp の配列を決定した。その結果、829 個のアミノ酸をコードしており、176bp の 5' 非翻訳領域と 190 bp の 3' 非翻訳領域を含んでいた。既知の N-CAM cDNA との類似性より、19 アミノ酸よりなる疎水性の signal peptide の後、exon1-14 から成る extracellular domain と transmembrane domain である exon16、および exon18 を含まない short cytoplasmic domain が連続していた。通常の exon に加え、exon 12 と 13 の間には AAG からなる 3bp の mini-exon の存在を認めた。この SCLC よりクローニングされた N-CAM cDNA は、VASE と呼ばれる exon を含まないこと、アミノ酸置換を伴わない G から T への 1塩基置換が 1620 番目の位置に認められること、の 2点を除けば、基本的には、ヒト神経芽細胞腫より分離同定された 140kDa N-CAM isoform の cDNA と同一であった。

[総括]

本研究において、1. SCLC では N-CAM は、6.2kb の mRNA 及び 145kDa の糖蛋白として発現すること、2. その一次構造には通常の exon1-14, 16, 17, 19 に加えて exon12 と 13 の間に 3bp の mini-exon AAG を含むこと、3. 基本的に神経芽細胞腫に発現する 145kDa N-CAM isoform と同一であること、が明らかとなった。

### 論文審査の結果の要旨

神経細胞接着分子 (neural cell adhesion molecule, N-CAM) は、肺小細胞癌に加えて、一部非肺小細胞癌にも発現しており、肺癌の浸潤・転移のみならず、その発生や神経内分泌系への分化に重要な役割を果たしているものと考えられる。N-CAM には多様な isoform が存在するが、本研究ではまず、肺小細胞癌では、おもに 6.2kb の mRNA および 145kDa の糖蛋白として発現することを明らかにした。さらに、肺小細胞癌培養株よりその cDNA 塩基配列を決定したところ、通常の exon1~14, 16, 17, 19 以外に、exon12 と exon13 の間に 3bp の mini-exon AAG が含まれることを見いだした。肺小細胞癌に発現する 145kDa N-CAM isoform は、神経芽細胞腫に発現する 140kDa isoform と基本的に同一であったが、その詳細を明らかとしたことは、今後、肺癌の生物学的特性や臨床的特徴を解明する上で、新たな知見を加えたものであり、学位の授与に値すると思われる。