The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Neoplastic Transformation of Hematopoietic Cells by Constitutively Activating Mutations of c-kit Receptor Tyrosine Kinase
Author(s)	北山, 等
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40875
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 49 】

氏　　名	北山　等（きたやま　ひとし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　13439　号
学位授与年月日	平成 9 年 11 月 4 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	Neoplastic Transformation of Hematopoietic Cells by Constitutively Activating Mutations of c-*kit* Receptor Tyrosine Kinase （c-kit 活性化突然変異による造血細胞の腫瘍化に関する研究）
論文審査委員	（主査） 教授　金倉　譲 （副査） 教授　松澤　佑次　　教授　北村　幸彦

論文内容の要旨

［目的］ c-kit 受容体型チロシンキナーゼ（KIT）は，造血幹細胞やマスト細胞の増殖・分化に必須であり，c-kit やそのリガンドである幹細胞因子（stem cell factor［SCF］）に機能喪失（loss-of function）変異が存在すると高度の貧血やマスト細胞の欠損が生じることが知られている。一方，c-kit 遺伝子は，レトロウイルス由来の癌遺伝子より同定されたものであるが，血球の腫瘍性増殖における役割については不明であった。KIT はリガンド依存性に活性化され下流にシグナルを伝達するが，ヒトマスト細胞性白血病細胞株 HMC-1では，KIT はリガンド非依存性に活性化されており，c-kit 遺伝子に 2 種類の恒常的活性化（gain-of function）変異（Val^{559}→ Gly［膜直下領域］と Asp^{814}→ Val［キナーゼ領域］）が認められた。本研究の目的は Val^{559}→ Gly (G559) ならびに Asp^{814}→ Val (V814) 変異による KIT の恒常的活性化機構を解析すると共に，変異 c-kit 遺伝子を造血因子依存性細胞株や正常造血細胞に導入し変異 KIT の腫瘍原性を明らかにすることである。

［方法ならびに成績］

1．レトロウイルスによる遺伝子導入法を用いて，マウス野生型（wild type：WT）KIT（KIT^{WT}）ならびに変異 KIT（KIT^{G559}，KIT^{V814}）をマウス interleukin-3（IL-3）依存性細胞株（FDC-P1 と Ba/F3）に発現させた。SCF 刺激前後の KIT のチロシンリン酸化をウエスタンブロット法で検討すると，KIT^{G559}，KIT^{V814} 共に SCF 刺激前からチロシンリン酸化を受けており，変異 KIT は恒常的に活性化していた。受容体型チロシンキナーゼはリガンドが結合することにより二量体を形成し，活性化すると考えられている。KIT^{G559} と KIT^{V814} の SCF 刺激前後における二量体形成の状態を検討すると，KIT^{G559} においては SCF 刺激前から二量体が認められたのに対し，KIT^{V814} では SCF 刺激前には二量体形成は認められなかった。以上のことから，KIT^{G559} と KIT^{V814} では活性化機序が異なるとともに，KIT^{G559} の恒常的活性化にはリガンド非依存性の二量体化が関与している可能性が示唆された。

2．野生型ならびに変異 KIT を発現した IL-3 依存性細胞株の増殖反応を MTT アッセイ法により検討した。ベクターのみ或いは KIT^{WT} を導入した細胞株は親株と同様に IL-3 依存性に増殖した。また KIT^{WT} を発現した細胞は SCF 依存性に増殖するようになった。変異 KIT を発現した細胞株は造血因子非存在下でも活発に増殖するようにな

り，変異KITにより造血因子非依存性増殖能を獲得すると考えられた。またこれらの細胞株をヌードマウスに移植すると，腫瘍を形成した。

3．5-FU処理したマウス骨髄細胞に変異KITを発現させ，正常造血幹細胞に及ぼす影響について検討した。メチルセルロース法によりコロニーアッセイを行うと，KIT^{G559}を導入した骨髄細胞から造血因子非存在下でも少数のGMコロニーが，またKIT^{V814}導入細胞からはGMコロニーに加えて混合コロニーが出現した。ベクターのみあるいはKIT^{WT}を導入した骨髄細胞は造血因子非存在下ではコロニーを形成せず，変異KIT，特にKIT^{V814}が正常造血幹細胞に対しても自律性増殖をもたらすことが明らかとなった。

4．正常及び変異KITを遺伝子導入したマウス骨髄細胞をW/W^Vマウスに骨髄移植し，in vivoにおける変異KITの腫瘍原性について検討した。KIT^{WT}導入細胞を移植したマウスでは全く白血病の発症は認められなかった。KIT^{V814}導入細胞を移植したマウスでは移植後6週から19週の間に10匹中6匹と高率に急性白血病が発症し，またKIT^{G559}移植マウス10匹中1匹にも急性白血病が認められた。これらの白血病細胞は主としてB細胞性の形質を有していた。

5．白血病を高率に発症したKIT^{V814}を用いてトランスジェニックマウスを作製した。マウスMHC class IであるH2-L^d promoterを有するplasmid pLG-1にV814変異c-kit遺伝子を組み込んだベクターを作成し，DBF1（DBAxC57BL/6）由来の受精卵にmicroinjectionした。変異KITの組み込みが確認されたマウス15匹中2匹にB細胞性の急性白血病，2匹にリンパ腫（1匹は胸腺原発のT細胞性リンパ腫，1匹は小腸のリンパ腫）が発症した。

［総括］

キナーゼ領域内（V814）ならびに膜直下領域（G559）変異によりKITは共に恒常的に活性化していたが，両者の二量体形成様式には違いがあり，活性化機序が異なる可能性が示唆された。両変異KITはマウス造血因子依存性細胞株や正常造血幹細胞に造血因子非依存性増殖をもたらした。更にマウス骨髄移植系及びトランスジェニックマウスを用いたin vivoの解析では，変異KIT発現により造血器腫瘍が発症した。以上の結果より，c-kit活性化変異は造血器腫瘍の発症に関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

c-kit受容体は造血幹細胞やマスト細胞の増殖や分化に重要な受容体型チロシンキナーゼである。本研究はヒトマスト細胞性白血病細胞株HMC-1で見出されたc-kit遺伝子の2種類の活性化突然変異（膜直下領域のG559変異とキナーゼ領域のV814変異）の活性化機序とその生物学的作用について検討したものである。まず変異c-kit受容体の二量体形成様式について検討し，G559変異ではリガンド非依存性の二量体形成により活性化するのに対し，V814変異ではリガンド非存在下では二量体形成しておらず，2種類の変異c-kitの活性化機序が異なることを示した。次にレトロウイルスによる遺伝子導入法を用い正常造血細胞に変異c-kit遺伝子を発現させると，in vitroで造血因子非依存性のコロニーが出現すること，またこれらの細胞を移植されたマウスに白血病が発症することを明らかにした。更にV814変異トランスジェニックマウスを作製し，造血器腫瘍が発症することを示した。以上の結果より，c-kit受容体の恒常的活性化（特にV814変異）により造血細胞の腫瘍化が起こることが明らかになった。最近ヒト造血器腫瘍の一部や色素性蕁麻疹患者においてV814変異と同じc-kit遺伝子の突然変異が検出されたとの報告がなされ，これらの疾患とc-kit活性化変異との関連が強く示唆されている。本研究はc-kit活性化突然変異の腫瘍原性について初めて証明したものであり，造血器腫瘍の治療戦略を考える上で重要な腫瘍化機構の一部を解明したものと考えられる。よって本研究は学位授与に値すると思われる。