



Title	A Novel Gain-of Function Mutation of c-kit Gene in Gastrointestinal Stromal Tumors
Author(s)	中原, 征則
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45994
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

氏 名	なか はら まさ のり 中 原 征 則
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 9 0 5 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 10 月 21 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	A Novel Gain-of Function Mutation of <i>c-kit</i> Gene in Gastrointestinal Stromal Tumors (消化管間葉系細胞腫瘍における新たな <i>c-kit</i> 遺伝子の機能獲得性突然変異)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 下村伊一郎 (副査) 教 授 金倉 讓 教 授 林 紀夫

論 文 内 容 の 要 旨

[目的] *c-kit* 遺伝子はネコ線維肉腫を引き起こすウィルスのゲノム内に見つかった癌遺伝子 *v-kit* の正常ホモログとしてクローニングされ、分子量約 145 Kd の受容体型チロシンキナーゼ (KIT) をコードしている。KIT は 5 個の免疫グロブリン様繰り返し構造を持つ細胞外領域、細胞膜貫通領域、細胞膜直下の傍細胞膜領域及び ATP 結合部位を持つドメインと自己リン酸化部位を持つドメインに分かれて存在するキナーゼ領域から構成されている。

c-kit 遺伝子は血液細胞 (マスト細胞、赤血球系細胞)、メラノサイト、生殖細胞などの分化・増殖に重要な役割をしていることが知られていたが、マウス・ラット・ヒトの腫瘍性マスト細胞株やヒトのマスト細胞腫の患者で KIT がリガンドである stem cell factor (SCF) の刺激なしに恒常的に活性化される *c-kit* 遺伝子の機能獲得性変異が報告され、*c-kit* 遺伝子はマスト細胞の生理学的な分化・増殖だけでなく、マスト細胞の腫瘍性増殖にも重要な役割をしていることが明らかとなった。

最近、我々は免疫組織化学的検討で消化管間葉系細胞腫瘍 (GISTs) の 94% (49 例中 46 例) に KIT が陽性であることを発見した。また、GISTs 6 例について *c-kit* 遺伝子解析を行った結果、6 例中 5 例において KIT の傍細胞膜領域のコドン 550 番 (Lys) から 560 番 (Val) の 11 アミノ酸内に集中して様々な変異がみられ、それらの変異がマスト細胞腫の場合と同様に機能獲得性変異である事を明らかにし、*c-kit* 遺伝子の機能獲得性変異が GISTs の腫瘍発生機構に重要な役割をしていると考えられた。

GISTs の腫瘍発生機構にどのような *c-kit* 遺伝子の変異が関与しているのか、さらに GISTs の症例を増やして遺伝子解析を行ったところ、これまでにみつかった KIT の傍細胞膜領域コドン 550 番 (Lys) から 560 番 (Val) の 11 アミノ酸の下流に変異を発見した。そこで、本研究では新たにみつかった変異も機能獲得性変異であるのかどうかを検討した。

[方法ならびに成績] GISTs に発現する *c-kit* 遺伝子を DNA sequencing 法を用いて調べた結果、傍細胞膜領域のコドン 579 番 (Asp) の欠失型変異 (KIT^{del579}) をみつけた。この変異が機能獲得性変異であるのか検討するために、site-directed mutagenesis によりマウス型の変異 *c-kit* 遺伝子を作成し IL-3 依存性に増殖するマウスリンパ球細胞株 (Ba/F3) に導入した。また、コントロールとしてマウス正常 *c-kit* 遺伝子を Ba/F3 に導入した。

各トランスフェクタントから KIT を免疫沈降し、イムノブロット法により KIT のチロシンリン酸化を調べた。正

常 KIT ではリガンドである SCF 刺激後においてのみ強いチロシンのリン酸化がみられたが、KIT (KIT^{del579}) では SCF の刺激なしにチロシンのリン酸化がみられた。

また、イムノ複合体キナーゼアッセイにより KIT のキナーゼ活性の程度を調べると、正常 KIT では SCF の刺激がないとキナーゼの活性化はみられなかったが、KIT^{del579} では SCF による刺激がなくてもキナーゼ活性の亢進を認めた。

次に、KIT^{del579} が実際に細胞増殖に及ぼす影響を調べるために、MTT アッセイ法により各トランスフェクタントの増殖能を検討したところ、正常 KIT を導入した Ba/F3 細胞は SCF や IL-3 濃度依存性に増殖したのに対して、KIT^{del579} を導入した Ba/F3 細胞は SCF や IL-3 がなくても自立的に増殖した。

さらに、各トランスフェクタントの *in vivo* における増殖能を調べるためにヌードマウスの皮下に移植し腫瘍形成能を比較したところ、正常 KIT を導入した Ba/F3 細胞は腫瘍を形成しなかったのに対して、KIT^{del579} を導入した Ba/F3 細胞は自律的に増殖し腫瘍を形成した。

〔総括〕 新たに見つかった KIT の傍細胞膜領域のコドン 579 番 (Asp) 欠失型変異は、傍細胞膜領域のコドン 550 番 (Lys) から 560 番 (Val) の 11 アミノ酸内における変異と同様に機能獲得性変異であり、GISTs の発生機構に重要な役割をしていると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は消化管間葉系細胞腫瘍における新たな *c-kit* 遺伝子変異を発見し、その遺伝子異常が腫瘍発生に関わる機構について詳細に検討したものである。胃に発生した消化管間葉系細胞腫瘍の一症例において、*c-kit* 遺伝子傍細胞膜領域のコドン 579 番 (Asp) 欠失型突然変異が見つかった。マウス型の変異 *c-kit* 遺伝子をマウス IL-3 依存性リンパ球細胞株に導入し、その遺伝子産物である変異 KIT (KIT^{del579}) のチロシンリン酸化・活性化について調べると、KIT^{del579} はリガンドである SCF の刺激なしに強いチロシンリン酸化・活性化を示した。また、KIT^{del579} を持つトランスフェクタントは MTT アッセイで SCF や IL-3 非依存性に増殖し、ヌードマウスに移植すると腫瘍を形成した。これらの結果より、新たに見つかった *c-kit* 遺伝子傍細胞膜領域のコドン 579 番 (Asp) 欠失型突然変異は機能獲得性変異であることが示された。消化管間葉系細胞腫瘍における *c-kit* 遺伝子の突然変異は傍細胞膜領域のコドン 550 番 (Lys) から 560 番 (Val) の 11 アミノ酸内に集中すると考えられていたが、本論文は新たな遺伝子異常を初めて見出し、詳細な検討によりその遺伝子異常が腫瘍の発生機構に重要な役割をしていることを明らかにしたものであり、学位に値するものと認める。