



Title	Aberrant Expression of Glycosylation in Juvenile Gastrointestinal Stromal Tumors
Author(s)	高橋, 剛
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49877
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	たか 高	はし 橋	つよし 剛
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	第 2 2 3 6 4 号		
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 5 月 15 日		
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻		
学 位 論 文 名	Aberrant Expression of Glycosylation in Juvenile Gastrointestinal Stromal Tumors (若年型消化管間質腫瘍における糖鎖修飾変異の検討)		
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 澤 芳樹 (副査) 教 授 林 紀夫 教 授 福澤 正洋		

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

消化管間質腫瘍 (Gastrointestinal Stromal Tumor:GIST) は、KIT 遺伝子の機能獲得型変異により、膜型チロシンキナーゼ：KIT タンパク質の自己活性化が生じ、細胞内増殖シグナルが持続的に入ることが原因の一つであることが1998年に報告された。KIT 遺伝子異常はGISTの約80%~90%に認め、その後、約5%のGISTに、KITと同じく膜型チロシンキナーゼであるPDGFRA遺伝子の機能獲得型遺伝子変異が確認された。一方、KITやPDGFRA遺伝子に異常を認めないGISTが約5%~10%存在し、これらGISTは、KITやPDGFRAチロシンキナーゼの分子標的治療薬であるメチル酸イマチニブに対して不応である。KITやPDGFRA遺伝子に異常を認めないGISTの多くは、若年型GISTか或いは神経線維腫症に伴うGISTで、後者の原因はNF-1遺伝子異常が考えられているが、前者の発生原因は不明である。

30歳未満に発症する若年型GISTは、胃に多く、多発傾向を示すが、組織学的に低悪性度など特異な表現型を有する。特に重要なことは、若年型GISTでは既知の遺伝子変異を認めない症例が多く、60歳前後に好発する成人型GISTと異なる発生機構が考えられている。

本研究の目的は、KITやPDGFRA遺伝子変異を認めない若年型GISTの発生機構を、増殖シグナル伝達系タンパク質の活性化に着目し、プロテオーム解析を用い明らかにすることである。

〔 方 法 〕

- ① 1998年以降外科手術を受けた30歳未満の若年発症GIST 7症例 (中央値18歳、10-28歳、男性：女性=3:4) を対象とした。RT-PCR法でKITとPDGFRA遺伝子のmRNAを増幅、全シークエンスを検索した。

- ② 若年型と成人型GIST(KITあるいはPDGFRA遺伝子変異例) 検体よりタンパク質を抽出、抗チロシンリン酸化抗体で免疫沈降の後、SDS-PAGEで電気泳動、若年型GISTに特異的に発現するリン酸化タンパク質を検索した。特異的なタンパク質を、トリブシンでゲル内消化を行い、質量分析計 (Liquid chromatography-Mass Spectrometry: LC-MS)を用いタンパク質の同定を行った。
- ③ Western Blottingにて、若年型と成人型GISTのKIT下流の細胞内シグナル伝達系 (STAT1, STAT3, MAPK, AKT) の活性化状態を比較検討した。
- ④ 若年型GISTに認められる小分子量のKITタンパク質の成因を、翻訳後糖鎖修飾を中心に解析した。
A:N型糖鎖の切断酵素Glycopeptidase FでN型糖鎖を切断、その前後のKITタンパク質のWestern Blottingを行った。
B:シアル酸切断酵素neuraminidaseを用いシアル酸を除去、KITのWestern Blottingを行った。
- ⑤ DNAマイクロアレイを用い若年型と成人型GISTでのmRNA発現差異を、シアル酸転移酵素を中心に解析した。候補遺伝子に関し定量的PCRを用い、mRNA発現差を確認した。
- ⑥ SSA-レグチンアガロースを用いレクチン沈降し、Western BlottingにてKITを定量した。

〔 成 績 〕

- ① 若年型GIST7例中、3例にKIT遺伝子exon11の異常を認め、PDGFRA遺伝子の異常を認めた。若年型GIST 4症例はKIT並びにPDGFRA遺伝子いずれにも変異を認めなかった。
- ② SDS-PAGEにて、130KDaに若年型GISTに特異的なリン酸化タンパク質を認めた。LC-MS解析で、若年型GISTに特異的にリン酸化が起こっているタンパク質はKITタンパク質であり、若年型GISTでは、KITタンパク質は通常のKITタンパク質 (140KDa) に比し、分子量が約10KDa小さくなっていることが確認された。
- ③ 若年型GISTにおいて、成人型GISTと同様の細胞内シグナル系 (STAT1, STAT3, MAPK, AKT) の活性化が認められた。
- ④ A:成人型GIST並びに若年型GISTから抽出された異なる分子量のKITタンパク質は、Glycopeptidase F酵素添加後、分子量は軽量化、同じ分子量 (120KDa) になった。
B:同様に、neuraminidase処理にても、両KITタンパク質は同じ分子量になった。則ち、若年型GISTのKITタンパク質の分子量低下の原因は、N型糖鎖のシアル酸付加の差であることが示唆された。
- ⑤ DNAマイクロアレイでは、N型糖鎖のGal末端に2-6シアル酸を付加する転移酵素であるST6Gal1のみが若年型GISTで有意に低下していた。定量的PCRでは、ST6Gal1の発現は若年型GISTで約1/5倍に低下していた。
- ⑥ レクチンブロットで、2-6シアル酸付加タンパク質を濃縮し解析すると、若年型GISTでは、成人型GISTに比し、2-6シアル酸修飾されたKITタンパク質の減少を認めた。

〔 総 括 〕

若年型GISTでは、成人型GISTと同様にKITチロシンキナーゼのリン酸化とその下流の細胞内増殖シグナル系の活性化が生じている。また、若年型GISTに見られるKITタンパク質は通常のKITタンパク質より分子量の小さいタンパク質である。

分子量低下の原因は、遺伝子変異に伴うアミノ酸配列の変化やリン酸基修飾の違いではなく、N型糖鎖のシアル酸修飾の差である。若年型GISTの糖鎖修飾の変化は、シアル酸転移酵素（ST6Gal1）の発現低下が原因であると考えられた。

KITやPDGFRA遺伝子に異常を認めない若年型GISTでは、N型糖鎖修飾の異常を伴うKITタンパク質の活性化が起っていた。

論文審査の結果の要旨

発生原因が不明であり、分子標的治療に抵抗性のある若年型消化管間質腫瘍（Gastrointesitnal Stromal Tumor：GIST）を対象に、その細胞内増殖シグナル伝達系の活性化のメカニズムと糖鎖修飾の関与を検討することを、研究テーマとした。

リン酸化タンパクの発現解析を行うことで、若年型GISTにおいても成人GISTと同様に、KITチロシンキナーゼの活性化が生じていることを証明した。そのうえ、KIT下流の細胞内増殖シグナル系の活性化が生じていることを発見し、腫瘍発生に繋がる要因を明らかにした。

さらに、若年型GISTでは、N型糖鎖修飾の生合成の過程においてシアル酸を付加する酵素（ST6GAL1）に発現異常があること、そのため若年型GISTで発現するKITタンパクが通常のKITと糖鎖修飾の違いが生じていることを証明した。

これらの研究は、若年型GISTの病因解明さらに治療の開発に寄与すると期待され、学位の授与に値すると考えられる。