

学位論文題名

Isolation of a distinct class of gain-of-function SHP-2 mutants with oncogenic Ras-like transforming activity from solid tumors

(固形腫瘍に由来し発がん性 RAS 様形質転換能を示す機能獲得型 SHP-2変異体の単離)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

非受容体型チロシン脱リン酸化酵素SHP-2は、増殖刺激等で活性化された受容体型チロシンキナーゼからの細胞内シグナル伝達を担う分子である。SHP-2活性に依存した細胞内シグナルはRAS-ERK-MAPK経路を活性化し、細胞の増殖、分化及び運動能を制御する。しかしながら、このシグナル伝達に関わるSHP-2の基質分子に関しては未だ不明な点が多く残されている。一方、SHP-2をコードするPTPN11遺伝子の生殖系細胞変異は小児骨髄単球性白血病を好発する先天奇形症候群であるNoonan症候群の原因であることが知られていたが、その後散発性の血液悪性疾患においてもPTPN11の機能獲得型変異が報告されるようになり、SHP-2の異常活性化がヒトの発癌に直接関与することが強く示唆されている。しかしながら、PTPN11変異は固形癌ではこれまでほとんど報告されておらず、SHP-2の異常と固形腫瘍との関係は不明のままである。そこで本研究では、固形癌発症におけるSHP-2の役割を明らかにすることを目的とし、外科切除固形腫瘍検体におけるPTPN11の変異探索を進め、新たに見出した変異型SHP-2の生化学的及び細胞生物学的機能解析を行った。

【対象と方法】

対象：2001年6月から2003年2月までに北海道大学腫瘍外科およびその関連施設において切除後凍結保存された腫瘍組織および正常組織を用いた。SHP-2発現ベクターの構築：Mycタグ配列を付加した野生型および変異型ヒトSHP-2 cDNAを、哺乳類発現ベクターpSP65SR α へ挿入した。大腸菌発現ベクターについては、SHP-2 cDNAをpGEX-6P-2ベクターへ挿入した。遺伝子変異の探索：組織検体におけるPTPN11変異の探索をPCR-single-strand conformation polymorphism法及び塩基配列決定法により行った。In vitro ホスファターゼアッセイ：大腸菌体内に発現させた種々のglutathione-S-transferase融合SHP-2をグルタチオンビーズを用いて精製し、p-nitrophenyl phosphateを基質としてその活性を測定した。細胞培養および遺伝子導入：ヒト胃上皮細胞株AGSは10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640にて培養し、遺伝子導入にはLipofectamine2000試薬を用いた。マウス繊維芽細胞株NIH3T3は10%仔ウシ血清を含むDMEMで培養し、遺伝子導入はリン酸カルシウム法を用いた。免疫沈降反応および免疫プロット：遺伝子導入36時間後のAGS細胞より細胞抽出液を調製し、抗Myc抗体による免疫沈降反応を行った。細胞抽出液および免疫沈

降物を用いて SDS-PAGE および免疫ブロットを行った。NIH3T3 フォーカスフォーメーションアッセイ：NIH3T3 細胞に遺伝子導入 12 時間後 5%仔ウシ血清を含む DMEM に交換し、以降 3 日ごとに培地交換を行い 3 週間培養した。細胞をホルマリン固定後、クリスタルバイオレット染色でフォーカスを可視化した。Soft agar アッセイ：DMEM に 10%仔ウシ血清と 0.5%Agar を加えた軟寒天培地で細胞を 2 週間培養後、形成されたコロニーを撮影した。In vivo 異種移植アッセイ：生後 6 週の雌 BALB/c-nu/nu マウスに一部位につき 1×10^6 個の細胞を皮下注射し、腫瘍性増殖の有無を最長 3 ヶ月間観察した。

【結果】

1. 固形腫瘍における *PTPN11* 遺伝子変異の探索

肝癌 72 例、胃癌 108 例、甲状腺腫瘍 54 例について *PTPN11* 遺伝子変異を探索し、肝癌の 1 例より 1520C>A の点変異を検出した。これは SHP-2 タンパクの 507 番目のスレオニンをリシンに置換する (T507K) ミセンス変異であった。同一症例の正常組織においてはこの変異は検出されず、腫瘍特異的な体細胞変異と考えられた。

2. T507K SHP-2 の酵素活性

In vitro ホスファターゼアッセイにより野生型 SHP-2、T507K SHP-2 および白血病由来 E76K SHP-2 (76 番目のグルタミン酸がリシンに置換) の活性を比較した。野生型に比して E76K SHP-2 は 100 倍以上の活性を示し、一方 T507K SHP-2 は約 2 倍の活性を示した。

3. T507K 変異が基質特異性に与える影響

基質捕捉型 SHP-2 変異体 (DM SHP-2 : D425A および C459S を有する) および DM SHP-2 に T507K または E76K 変異を導入した変異型 SHP-2 (DM/T507K SHP-2 及び DM/E76K SHP-2) を AGS 細胞に発現させ、免疫沈降法を用いて各 SHP-2 により捕捉されたチロシンリン酸化タンパクの比較を行った。その結果、DM/E76K SHP-2 と DM SHP-2 では見られない分子量 65000~70000 ダルトンのタンパク群が DM/T507K SHP-2 と特異的に共沈殿した。このことから、T507K 変異は SHP-2 の基質特異性を変化させ、野生型 SHP-2 では脱リン酸化を受けないチロシンリン酸化タンパク質を基質として認識している可能性が示唆された。

4. T507K SHP-2 の形質転換能

固形腫瘍由来 T507K SHP-2 並びに白血病または Noonan 症候群由来変異型 SHP-2 を用いてフォーカスフォーメーションアッセイを行った。その結果、T507K SHP-2 を発現する細胞においてのみフォーカスが形成され、T507K SHP-2 は NIH3T3 細胞を形質転換させることが示された。そこで、T507K SHP-2 を構成的に発現する NIH3T3 細胞株 (NIH/T507K) を樹立し、T507K SHP-2 の発癌への関与を検討した。NIH/T507K 細胞株の細胞形態は、発がん性 RAS 変異体 (HRAS^{V12}) で形質転換された NIH3T3 細胞株 (NIH/RAS) と酷似していた。さらに、Soft agar アッセイにおいては、NIH/T507K 細胞は NIH/RAS 細胞と同様に足場非依存的な増殖能を示し、in vivo 異種移植アッセイにおいて NIH/T507K 細胞および NIH/RAS 細胞は共に腫瘍性増殖を示した。これらのことから、T507K 変異を有する SHP-2 は、NIH3T3 細胞において発がん性 RAS 変異体ときわめて類似した形質転換能を示すことが示唆された。次に、T507K SHP-2 による NIH3T3 細胞形質転換に関わる下流シグナル系を検討するため、NIH/T507K 細胞および NIH/RAS 細胞において RAS の直接標的分子である RAF-1 の活性化状態を調べた。その結果、NIH/RAS 細胞と同様に NIH/T507K 細胞においても RAF-1 の活性化が観察され、T507K SHP-2 および HRAS^{V12} による RAF-ERK 経路の活性化が NIH3T3 の形質転換に寄与していることが予想された。しかしながら、NIH3T3 細胞を形質転換できない白血病および Noonan 症候群由来の SHP-2 変異体も RAF-1 の活性化を誘導した。

【考察】

本研究は、SHP-2 の変異が固形腫瘍の発症に関与し得ることを生化学的および細胞生物学的に示した最

初の報告である。本研究において固形腫瘍から単離された機能獲得型 T507K SHP-2 変異体は、野生型 SHP-2 と比較して酵素活性が質的および量的に変化していた。加えて、T507K SHP-2 は発がん性 RAS と同様の形質転換能を示し、NIH3T3 細胞を *in vitro* および *in vivo* の両方で形質転換させた。白血病および Noonan 症候群に由来する SHP-2 変異体にはこのような性質を認めないことから、T507K SHP-2 変異体は他の SHP-2 変異体には認められない基質特異性の質的・量的変化を獲得しているものと推察される。これに関連して、RAF-ERK 経路の構成的活性化は T507K SHP-2 および HRAS^{V12} ばかりでなく NIH3T3 細胞を形質転換できない白血病および Noonan 症候群由来の SHP-2 変異体においても引き起こされた。このことから、RAF-ERK 経路の構成的活性化は T507K SHP-2 による NIH3T3 細胞形質転換の十分条件ではなく、固形癌の発症には RAF-ERK 経路に加え、さらに他の細胞内分子の必要であると推察される。T507K SHP-2 により特異的に脱リン酸化される基質タンパクは固形癌の発症に深く関与している可能性が高く、その同定が SHP-2 の異常と固形癌との関係をより明確に説明可能にするものと期待される。また今回得られた結果より、個々の変異型 SHP-2 分子種間におけるホスファターゼ活性の質的・量的な差異が、SHP-2 依存的に悪性化する細胞種ならびに組織・臓器の特異性を決定している可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 畠 山 昌 則
副 査 教 授 近 藤 哲

学位論文題名

Isolation of a distinct class of gain-of-function SHP-2 mutants with oncogenic Ras-like transforming activity from solid tumors

(固形腫瘍に由来し発がん性 RAS 様形質転換能を示す
機能獲得型 SHP-2変異体の単離)

非受容体型チロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 は、RAS-MAPK 経路を活性化し、細胞の増殖、分化及び運動能を制御する。しかし、このシグナル伝達に関わる SHP-2 の基質分子に関しては未だ不明な点が多く残されている。一方、SHP-2 をコードする *PTPN11* 遺伝子の生殖系細胞変異は小児骨髄単球性白血病を好発する先天奇形症候群の原因であり、散発性の血液悪性疾患においても *PTPN11* の機能獲得型変異が報告され、SHP-2 の異常活性化とヒト発癌の関連が示唆されている。しかし、SHP-2 の異常と固形腫瘍との関係は不明である。本研究では、固形癌発症における SHP-2 の役割を明らかにすることを目的とした。2001 年 6 月から 2003 年 2 月までに北海道大学腫瘍外科およびその関連施設において切除後凍結保存された肝癌 72 例、胃癌 108 例、甲状腺腫瘍 54 例について PCR-single-strand conformation polymorphism 法及び塩基配列決定法により *PTPN11* 遺伝子変異を探索し、肝細胞癌の 1 例より 1520C>A の点変異を検出した。これは SHP-2 タンパクの 507 番目のスレオニンをリシンに置換する (T507K) ミスセンス変異で、腫瘍特異的な体細胞変異と考えられた。この変異は活性中心に面した位置にあり、SHP-2 の自己抑制および基質の活性中心への進入に影響しうると考えられた。In vitro ホスファターゼアッセイにより野生型 SHP-2、T507K SHP-2 および白血病由来 E76K SHP-2 (76 番目のグルタミン酸がリシンに置換) の活性を比較した。野生型に比して E76K SHP-2 は 100 倍以上の活性を示し T507K SHP-2 は約 2 倍の活性を示した。基質捕捉型 SHP-2 変異体 (DM SHP-2 : D425A および C459S を有する) および DM SHP-2 に T507K または E76K 変異を導入した変異型 SHP-2 (DM/T507K SHP-2 及び DM/E76K SHP-2) を AGS 細胞に発現させ、免疫沈降法を用いて各 SHP-2 により捕捉されたチロシンリン酸化タンパクの比較を行った。その結果、DM/E76K SHP-2 と DM SHP-2 では見られない分子量 65000-70000 ダルトンのタンパク群が DM/T507K SHP-2 と特異的に共沈殿した。すなわち、T507K 変異は SHP-2

の基質特異性を変化させ、野生型 SHP-2 では脱リン酸化を受けないチロシンリン酸化タンパク質を基質として認識している可能性が示唆された。次に、各 SHP-2 変異体の形質転換能を検討するため、T507K SHP-2 並びに白血病または先天奇形症候群由来変異型 SHP-2 を用いて NIH3T3 フォーカスフォーメーションアッセイを行った。T507K SHP-2 を発現する細胞においてのみフォーカスが形成され、T507K SHP-2 は NIH3T3 細胞を形質転換させることが示された。そこで、T507K SHP-2 を構成的に発現する NIH3T3 細胞株 (NIH/T507K) を樹立し、T507K SHP-2 の発癌への関与を検討した。NIH/T507K 細胞株の細胞形態は、発がん性 RAS 変異体 (HRAS^{V12}) で形質転換された NIH3T3 細胞株 (NIH/RAS) と酷似していた。さらに、Soft agar アッセイにおいては、NIH/T507K 細胞は NIH/RAS 細胞と同様に足場非依存的な増殖能を示し、*in vivo* 異種移植アッセイにおいて NIH/T507K 細胞および NIH/RAS 細胞は共に造腫瘍性を示した。従って、T507K 変異を有する SHP-2 は、NIH3T3 細胞において発がん性 RAS 変異体と類似した形質転換能を示すことが示唆された。次に、T507K SHP-2 による NIH3T3 細胞形質転換に関わる下流シグナル系を検討するため、NIH/T507K 細胞および NIH/RAS 細胞において RAS の直接標的分子である RAF-1 の活性化状態を調べた。その結果、NIH/RAS 細胞と同様に NIH/T507K 細胞においても RAF-1 の活性化が観察され、T507K SHP-2 および HRAS^{V12} による RAF-ERK 経路の活性化が NIH3T3 の形質転換に寄与していることが予想された。しかし、NIH3T3 細胞を形質転換できない白血病および先天性奇形症候群由来の SHP-2 変異体も RAF-1 の活性化を誘導した。本研究において固形腫瘍から単離された機能獲得型 T507K SHP-2 変異体は、野生型 SHP-2 と比較して酵素活性が質的・量的に変化していた。また、T507K SHP-2 は発がん性 RAS と同様の形質転換能を示し、NIH3T3 細胞を *in vitro* および *in vivo* の両方で形質転換させた。白血病および先天性奇形症候群に由来する SHP-2 変異体にはこのような性質を認めず、T507K SHP-2 変異体は他とは異なる基質特異性の質的・量的変化を獲得しているものと推察される。RAF-ERK 経路の構成的活性化は T507K SHP-2 および HRAS^{V12} ばかりでなく NIH3T3 細胞を形質転換できない白血病および先天性奇形症候群由来の SHP-2 変異体においても引き起こされた。従って、RAF-ERK 経路の構成的活性化は T507K SHP-2 による NIH3T3 細胞形質転換の十分条件ではなく、固形癌の発症には RAF-ERK 経路の他に、細胞内分子の脱制御が必要であると推察される。T507K SHP-2 により特異的に脱リン酸化される基質タンパクは固形癌の発症に深く関与している可能性が高く、その同定が SHP-2 の異常と固形癌との関係をより明確に説明可能にするものと期待される。

口頭発表に続き、副査秋田弘俊教授より T507K SHP-2 の獲得した新しい基質について、副査近藤哲教授より固形癌における SHP-2 変異の低頻度について、副査畠山昌則教授より SHP-2 の異常が先天奇形症候群の原因となることに基づく RAS-MAPK 経路の細胞増殖以外の機能について、最後に主査今村雅寛教授より SHP-2 変異の分類の背景についての質問があった。

いずれの質問に対しても申請者はその主旨をよく理解し、自らの研究内容と文献的考察を混じえて適切に回答した。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。