

氏 名	こ う 康 た か し 志
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1883 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 病 理 系 専 攻
学位論文題目	Alternative Splicing of the Neurofibromatosis 1 Gene Correlates with Growth Patterns and Neuroendocrine Properties of Human Small-cell Lung-carcinoma Cells (ヒト小細胞肺癌における NF1 遺伝子拮一的スプライシング様式および生物学的特性の検討)
論文調査委員	(主 査) 教 授 藤 田 潤 教 授 成 宮 周 教 授 日 合 弘

## 論 文 内 容 の 要 旨

小細胞肺癌は神経内分泌能に関する生化学的特徴と組織像により非小細胞肺癌（腺癌，扁平上皮癌および大細胞癌）と区別される。さらに，小細胞肺癌は *in vitro* での培養増殖形態と生化学的マーカーの発現様式により classic type と variant type とに分類される。classic type の細胞は variant type の細胞に比べ生物学的性質が種々の点で異なっている。すなわち，variant type の細胞は classic type の細胞より増殖が早く，コロニー形成率が高い。臨床的にも variant type の細胞株が樹立される症例は classic type の細胞株が樹立される症例に比べ予後不良であることが報告されている。神経線維腫症 1 型の責任遺伝子 NF1 は癌遺伝子産物 ras の不活化を促進する GAP 活性を有している。GAP 活性部位内には alternative splicing によって 2 種類の転写産物（TYPE I, TYPE II）が作り出される。TYPE II は TYPE I 活性部位内に 21 個のアミノ酸をコードする 63 塩基が挿入されたもので，splicing による発現変化は神経系細胞の分化と深く関わっている。我々は，小細胞肺癌細胞株を用いてこれら 2 種類の転写産物の発現様式と神経内分泌能との関連性を検討した。

15 株の小細胞肺癌細胞株について NF1 TYPE-I/TYPE II mRNA 発現比を調べた。GAP 活性部位内の 2 つの転写産物を同時に検出できるようにプライマーを設計し，RT-PCR 産物を放射性同位元素でラベルした。ポリアクリルアミド泳動後にオートラジオグラフィーを行いデンストメーターで両者の発現比を求めた。神経細胞接着因子（NCAM）の発現レベルはモノクローナル抗体 UJ13A（DAKO 社）を用いてフローサイトメトリーで検討した。神経内分泌能の代表的なマーカーである芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（DDC）活性については酵素反応で L-dopa より生成した dopamin を Amberlite CG カラムで単離後，溶離された dopamin を HPLC を用い測定した。TYPE-I mRNA の発現が優位であった 10 株中 8 株で，classic type の細胞に特徴的な培養形態を示し，DDC 活性値が高値を示した。これに対し，TYPE-II mRNA の発現が優位であった 5 株全例では variant type の細胞に特徴的な培養形態を示し，NCAM の発

現レベルおよびDCC活性はともに低値であった。

細胞株 NCI-N417 は細胞外マトリックスの一つであるラミニンでコートしたプレート上で培養すると種々の神経分化マーカーの発現上昇とともに神経様突起の放出が観察される。この誘導系で TYPE-I/TYPE-II mRNA 値は誘導前 1.68 であったが、接着後 3 時間で 7.85, 10 時間で 9.41, 48 時間で 3.90 と変化を示した。

以上の実験結果は、NF1 遺伝子の GAP 活性部位内の alternative splicing 様式は小細胞肺癌細胞の神経内分泌能および培養増殖形態に密接に関係することを示すものであり、小細胞肺癌の分類や治療効果の判定に基礎的データを提供することが期待される。classic type 小細胞肺癌やラミニン誘導により認めた NF1 TYPE-I mRNA 発現優位は神経芽細胞種での神経分化による TYPE-II mRNA 発現優位とは逆の関係にある。小細胞肺癌の発生学的起源については神経外胚葉説と気道上皮内分泌細胞説とが現在においても議論的となっている。我々が見いだしたデータは気道上皮内分泌細胞起源説を支持するものである。

### 論文審査の結果の要旨

神経線維腫症 1 型の責任遺伝子 NF 1 の GAP 活性部位内には alternative splicing によって 2 種類の転写産物 (TYPE I, TYPE II) が作り出され、これらの発現変化は神経系細胞の分化と深く関わっている。我々は、小細胞肺癌細胞株を用いてこれら 2 種類の転写産物の発現様式と神経内分泌能との関連性を検討した。

15 株の小細胞肺癌細胞株について RT-PCR 法で NF-1 TYPE-I/TYPE-II mRNA 発現比と神経内分泌能の代表的なマーカーである芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (DDC) 活性と神経細胞接着分子 (NCMA) の発現レベルを検討した。TYPE-I mRNA の発現が優位であった 10 株中 8 株で、classic type の細胞に特徴的な培養形態を示し、DDC 活性値が高値を示した。これに対し、TYPE-II mRNA の発現が優位であった 5 株全例では variant type の細胞に特徴的な培養形態を示し、NCAM の発現レベルおよび DCC 活性はともに低値であった。細胞株 NCI-N417 の分化誘導系で TYPE-I/TYPE-II mRNA 発現比は増加した。

以上の実験結果は、NF 1 遺伝子の GAP 活性部位内の alternative splicing 様式は小細胞肺癌細胞の神経内分泌能および培養増殖形態に密接に関係することを示すものであり、小細胞肺癌の分類や治療効果の判定に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 9 年 2 月 7 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。