

平成 30 年 4 月 20 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06843

研究課題名(和文) マスト細胞の腫瘍化プロセスの理解：新規細胞株による増殖調節機構の破綻過程の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of mast cell tumorigenesis process

研究代表者

安部 良 (Abe, Ryo)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

研究者番号：20159453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに我々は、免疫研究の過程でマウス脾臓よりマスト細胞株を樹立した。さらに、培養に必要なサイトカイン濃度を低下させることで段階的にマスト細胞の自律増殖を誘導することに成功した。この自律増殖を示す細胞はマスト細胞腫の特徴を備えていたため、本システムにより発症機序をモニターできるものと考えられる。本システムにより、Kitの自己リン酸化(活性化変異)およびErk, Akt活性化は初期に起こり、STAT5活性化は後期に起こることが示唆された。現在、オルガネラ配置や炎症遺伝子の発現の変化を見出しており、今後、それらとKit, Erk, Akt, STAT5活性化のタイミングの関係を解明する。

研究成果の概要(英文)：Previously, we established mast cell lines from mouse spleen and induced their autonomous proliferation by reducing cytokines that are required for normal mast cell growth. Furthermore, the mast cell line have characteristic features of mastocytoma cells. Thus, this experimental system help us to understand the mechanism of development of mast cell cancer.

In this study, we found that Kit autophosphorylation and activation of Erk and of Akt occur in the early stage of cancerization, whereas STAT5 activation is found only in the late phase. At present, analyses of molecular mechanism of the stage-specific activation of Kit, Erk, Akt, and STAT5 are under way.

研究分野：免疫学

キーワード：マスト細胞腫 Kitチロシンキナーゼ PI3K-Akt STAT5

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞はアレルギー反応における重要なエフェクター細胞であるのみならず、様々な慢性炎症性疾患の病態において重要な役割を果たす。また、マスト細胞の制御不能な増殖は蕁麻疹や吐き気を主症状とするマスト細胞症や白血病の一種であるマスト細胞腫につながる事が知られている。したがって、「マスト細胞の増殖の制御破綻がどのように起こるのか」を明らかにすることは、その増殖性疾患の理解において非常に重要であるものと考えられる。しかしながら、マスト細胞の増殖性疾患における詳細な発症メカニズムは不明な部分が多く、ブラックボックスに包まれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、サイトカイン環境の変化に応じて段階的に腫瘍化するユニークなマスト細胞株を用いることで腫瘍化プロセス・無限増殖のメカニズムを明らかにすることである。最近、申請者は新規に樹立したマスト細胞株を様々なサイトカイン環境で培養することで自律増殖性・腫瘍原性を誘導できるコンディションを見出し、腫瘍化プロセスのイベントを段階的にモニターできるシステムを構築した(図1)。さらに、腫瘍化したマスト細胞において、Kitの活性化変異体がエンドリソソーム・小胞体を起点としたがん化シグナリングを起こすことを明らかにした。そこで、マスト細胞の腫瘍化プロセスにおける「遺伝子変異・発現」、「蛋白質の翻訳後修飾」、「シグナル分子の細胞内分布」の変化の解析を試みることで、細胞のがん化メカニズムの正確な理解を目指す。

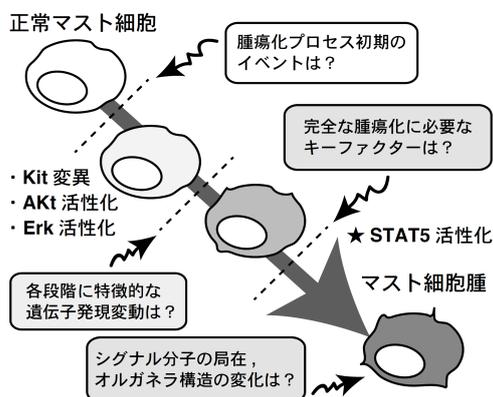


図1. マスト細胞の腫瘍化プロセスのモニターの試み。R細胞は、腫瘍化プロセスの各段階で維持可能であり、シグナル伝達および遺伝子発現の「スナップショット」を得ることが可能である。

3. 研究の方法

本研究では、マスト細胞の腫瘍化プロセスの各段階における正確なメカニズムの解明を目的とし、(1) 腫瘍化プロセスに伴うシグナル伝達の変化と遺伝子変異の解析、(2) 腫瘍化の各段階における遺伝子発現解析、(3) 各段階でのシグナル分子・発現蛋白質の局在変化の解析をおこなう。

最初に、マスト細胞の腫瘍化プロセスにおける蛋白質リン酸化などの翻訳後修飾の変化を見出し、その原因となる遺伝子変異を解明する。次に、腫瘍化プロセスの各段階におけるトランスクリプトーム解析をおこない、遺伝子発現変化とシグナル伝達の変化との関連を明らかにする。さらに、各段階におけるシグナル分子および発現蛋白質の細胞内局在変化を解明する。

4. 研究成果

(1) 腫瘍化プロセスに伴うシグナル伝達の変化と遺伝子変異の解析

図2に示すように、マスト細胞が完全な自律増殖能を獲得する前に、Kitのリン酸化(恒常的活性化変異)、その下流のErk、PI3K-Akt経路の活性化が認められた。一方、STAT5活性化は、自律増殖能を呈する段階まで見られなかった。この後期段階のSTAT5活性化は、Kitキナーゼ阻害剤で抑制されることから、Kit活性に依存したものである。すなわち、STAT5がKitにより活性化されるには、Kit活性だけでは不十分であり、Kit以外のシグナル分子の変異または機能破綻が必要であることが示唆された。本システムにより、Kit変異体により活性化される分子は、各段階に選択的であると予想される。今後、その詳細な分子機構について解析する予定である。

(2) 腫瘍化の各段階での遺伝子発現解析

マスト細胞株が自律増殖能を獲得することに必要なSTAT5活性化に関わる因子の発現亢進または低下を、トランスクリプトーム解析により見出す。正常なマスト細胞株と腫瘍化マスト細胞株のマイクロレイ解析をおこなったところ、炎症関連のシグナル分子の変化が認められた。今後は、それ分子の、各段階での発現解析および過剰発現・ノックダウンの実験をおこない、STAT5活性化における役割を明らかにする。

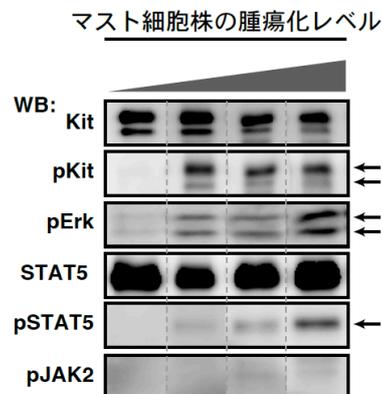


図2. 腫瘍化に伴うシグナル分子の活性化。Kit, Erkのリン酸化は腫瘍化の初期段階で認められる。このKitの活性化は変異によるものである。一方、腫瘍化に必要なSTAT5の完全な活性化は腫瘍化の後期段階で認められる。JAK2の活性化は腫瘍化に必要な。

(3) 各段階でのシグナル分子・発現蛋白質の局在変化

以前に我々は、マスト細胞腫ではKitがエ

ンドソーム/リソソームといったオルガネラに集積しチロシンリン酸化シグナルを起こすことを報告している。正常マスト細胞とマスト細胞腫のエンド/リソソームを観察したところ、マスト細胞腫におけるそれらオルガネラの肥大化を見出した。すなわち、腫瘍化とオルガネラ動態の変化の関係が示唆される。予備的な検討では、小胞体・ゴルジ体のような初期分泌のオルガネラには変化がなかった。今後、腫瘍化の各段階でのエンド/リソソームの形態変化の解析を試みる。さらに、マイクロアレイ解析で候補となっているオルガネラ形態変化を担う分子群の機能獲得・喪失の実験をおこなう予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Wakamatsu, E., Omori, H., Kawano, A. & Abe, R.: Strong TCR stimulation promotes the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells induced in vitro through increasing the demethylation of Foxp3 CNS2. *Mol. Immunol.* In press (2018) 査読有り
- ② Obata, Y., Horikawa, K., Shiina, I., Takahashi, T., Murata, T., Tasaki, Y., Suzuki, K., Yonekura, K., Esumi, H., Nishida, T. & Abe, R.: Oncogenic Kit signalling on the Golgi is suppressed by blocking secretory trafficking with M-COPA in GISTs. *Cancer Letters*, 415, 1-10. doi: 10.1016/j.canlet.2017.11.032 (2018) 査読有り
- ③ Wakamatsu, E., Omori, H., Tabata, Y., Akieda, Y., Watanabe, S., Ogawa, S. & Abe, R.: CD28 co-stimulation is dispensable for the steady state homeostasis of intestinal regulatory T cells. *Int Immunol.* 30, 171-180. doi: 10.1093/intimm/dxy013 (2018) 査読有り
- ④ Ohtsuka, J., Oshima, H., Ezawa, I., Abe, R., Oshima, M. & Ohki, R.: Functional loss of p53 cooperates with the in vivo microenvironment to promote malignant progression of gastric cancers. *Sci. Rep.* 8, 2291. doi: 10.1038/s41598-018-20572-1 (2018) 査読有り
- ⑤ Obata, Y., Horikawa, K., Takahashi, T., Akieda, Y., Tsujimoto, M., Fletcher, J.A., Esumi, H., Nishida, T. & Abe, R.: Oncogenic signaling by Kit tyrosine kinase occurs selectively on the Golgi apparatus in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene*, 36, 3661-3672. doi: 10.1038/onc.2016.519 (2017) 査読有り
- ⑥ Hara, Y., Obata, Y., Horikawa, K., Tasaki, Y., Suzuki, K., Murata, T., Shiina, I. & Abe, R.: M-COPA suppresses endolysosomal Kit-Akt oncogenic signalling through inhibiting the secretory pathway in neoplastic mast cells. *PLOS ONE*, 12, e0175514. doi: 10.1371/journal.pone.0175514 (2017) 査読有り
- ⑦ Toyoshima, S., Wakamatsu, E., Ishida, Y., Obata, Y., Kurashima, Y., Kiyono, T. & Abe, R.: The spleen is the site where mast cells are induced in the development of food allergy. *Int. Immunol.* 29, 31-45. doi: 10.1093/intimm/dxx005 (2017) 査読有り
- ⑧ Nozaki, Y., Tamori, S., Inada, M., Katayama, R., Nakane, H., Minamishima, O., Onodera, Y., Abe, M., Shiina, S., Tamura, K., Kodama, D., Sato, K., Hara, Y., Abe, R., Takasawa, R., Yoshimori, A., Shinomiya, N., Tanuma, S.I. & Akimoto, K. Correlation between c-Met and ALDH1 contributes to the survival and tumor-sphere formation of ALDH1 positive breast cancer stem cells and predicts poor clinical outcome in breast cancer. *Genes & Cancer.* 7-8, 628-639. doi: 10.18632/genesandcancer.148 (2017) 査読有り
- ⑨ Tanamachi, K., Nishino, K., Mori, N., Suzuki, T., Tanuma, S.I., Abe, R. & Tsukimoto, M. Radiosensitizing effect of P2X7 receptor antagonist on melanoma in vitro and in vivo. *Biol. Pharm. Bull.* 40, 878-887. doi: 10.1248/bpb.b17-00083 (2017) 査読有り
- ⑩ Ohtsuka, S., Ogawa, S., Wakamatsu, E., Abe, R.: Cell cycle arrest caused by MEK/ERK signaling is a mechanism for suppressing growth of antigen-hyperstimulated effector T cells. *Int. Immunol.* 11, 547-557 (2016) 査読有り
- ⑪ Suzuki, T., Kishimoto, H. & Abe, R.: Requirement of interleukin 7 signaling for anti-tumor immune response under lymphopenic conditions in a murine lung carcinoma model. *Cancer Immunol. Immunother.* 65, 341-354. doi: 10.1007/s00262-016-1808-7 (2016) 査読有り
- ⑫ Inaba, S., Numoto, N., Ogawa, S., Morii, H., Ikura, T., Abe, R., Ito, N. & Oda M.: Structures and thermodynamic analysis reveal distinct mechanisms of CD28 phosphopeptide binding to the SH2 domains of three adaptor proteins. *J. Biol. Chem.* 292, 1052-1060. doi: 10.1074/jbc.M116.755173 (2016) 査読有り
- ⑬ Makinoshima, H., Takita, M., Saruwatari, K., Umemura, S., Obata, Y., Ishii, G., Matsumoto, S., Sugiyama, E., Ochiai, A., Abe, R., Goto, K., Esumi, H. & Tsuchihara, K.: Signaling through the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/mammalian target of rapamycin (mTOR) axis is responsible for aerobic glycolysis mediated by glucose transporter in epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated lung adenocarcinoma. *J. Biol. Chem.* 290, 17495-17504. doi: 10.1074/jbc.M115.660498 (2015) 査読有り

⑭ Akieda, Y., Wakamatsu, E., Nakamura, T., Ishida, Y., Ogawa, S. & Abe, R.: Defects in regulatory T cells due to CD28 deficiency induce a qualitative change of allogeneic immune response in chronic graft-versus-host disease. *J. Immunol.* 194, 4162-4174. doi: 10.4049/jimmunol.1402591 (2015) 査読有り

[学会発表] (計 15 件)

① 小川修平, 渡辺志帆, 安部 良: The regulation of CD28 tyrosine phosphorylation and the function of CD28-mediated costimulation. The 46th Annual Meeting of the Japanese society of Immunology (仙台, 2017. 12)

② 田畑由紀, 小川修平, 若松 英, 渡辺志帆, 安部 良: IL-2 production is negatively regulated by free fatty acid receptor 2 (Ffar2) mediated signaling. The 46th Annual Meeting of the Japanese society of Immunology (仙台, 2017. 12)

③ 大塚句子, 江澤一生, 安部 良, 大島正伸, 木理恵子: がん抑制遺伝子 p53 機能喪失を伴った胃がんモデルを用いたの悪性化機能の解明. 第 76 回日本癌学会学術総会 (横浜 2017.9)

④ 原 泰志, 小幡裕希, 堀川啓太, 村田貴嗣, 鈴木恭平, 田崎靖崇, 椎名 勇, 安部 良: イマチニブ耐性 Kit の阻害に関する新規戦略: M-COPA による分泌経路の阻害はマスト細胞腫のエンドリソソームにおける Kit のがんシグナルを抑制する. 2017 年度 生命科学系学会 合同年次大会 (神戸, 2017. 12)

⑤ 小幡裕希, 堀川啓太, 高橋 剛, 原 泰志, 椎名 勇, 江角浩安, 西田俊朗, 安部 良: マスト細胞腫・GIST における Kit チロシンキナーゼの異常局在とオルガネラシグナリング~がんシグナルの発信源は細胞内小器官にあった~ 第 160 回 日本獣医学会学術集会 シンポジウム 招待講演 (鹿児島, 2017. 9)

⑥ 小幡裕希, 堀川啓太, 原 泰志, 椎名 勇, 江角浩安, 西田俊朗, 安部 良: マスト細胞白血病・GIST を無限増殖に導く Kit チロシンキナーゼのがんシグナルは細胞膜ではなくオルガネラから発信される. 第 69 回 日本細胞生物学会大会 (仙台, 2017. 6)

⑦ 堀川啓太, 小幡裕希, 高橋剛, 江角浩安, 西田俊朗, 安部 良: 消化管間質細胞腫における Kit チロシンキナーゼのがんシグナリングは細胞膜ではなくゴルジ体で起こる. 第 39 回 日本分子生物学会大会 (横浜, 2016.11)

⑧ 小幡裕希, 堀川啓太, 高橋 剛, 穂枝佑紀, 辻本正彦, 原 泰志, 江角浩安, 西田俊朗, 安部 良: 消化管間質細胞腫, マスト細胞腫の無限増殖にはオルガネラでの PI3K-Akt シグナルが必要である ~変異型 Kit チロシンキナーゼのゴルジ体, エンドリソソームへの異

常局在とがんシグナリング~ 第 39 回 日本分子生物学会大会 シンポジウム 招待講演 *The PI3K-Akt Signal Transduction: Update and Future Direction* (横浜, 2016. 12)

⑨ Obata, Y., Horikawa, K., Takahashi, T., Akieda, Y., Tsujimoto, M., Esumi, H., Nishida, T. & Abe, R.: Oncogenic signals by Kit tyrosine kinase occur on the Golgi apparatus in gastrointestinal stromal tumor cells ~ Spatiotemporal analyses of imatinib-resistant and -sensitive Kit signaling ~ The 41st Naito Conference (Sapporo, 2016. 7)

⑩ 小幡裕希, 堀川啓太, 穂枝佑紀, 椎名 勇, 江角浩安, 西田俊朗, 安部 良: 消化管間質細胞腫における Kit チロシンキナーゼの異常局在: ゴルジ体に限局したがんシグナリング. 第 68 回 日本細胞生物学会大会 (京都, 2016. 6)

⑪ 小幡裕希, 堀川啓太, 穂枝佑紀, 椎名 勇, 江角浩安, 西田俊朗, 安部 良: 消化管間質細胞腫における Kit チロシンキナーゼの異常局在とがんシグナリングの関係. 第 2 回 日本細胞生物学会 若手の会 (京都, 2016. 6)

⑫ Obata, Y., Toyoshima, S., Horikawa, K., Nishida, T., Esumi, H. & Abe, R.: Mislocalized activation of oncogenic receptors ~Oncogenic Kit signalling from intracellular compartments in neoplastic mast cells~ The International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Science (2016 年 2 月 28 日, 千葉)

⑬ Toyoshima, S., Wakamatsu, E., Obata, Y., Ogawa, S. & Abe, R.: Activated T cells control the pathogenic mast cells under allergic conditions. 第 44 回 日本免疫学会大会 (札幌, 2015. 11)

⑭ 小幡裕希, 豊島翔太, 堀川啓太, 若松 英, 小川修平, 西田俊朗, 江角浩安, 安部 良. Oncogenic Kit signals on intracellular compartments are required for neoplastic mast cell proliferation. 第 3 回 ブリストル血液アカデミー (2015 年 9 月 5 日, 札幌)

⑮ 小幡裕希, 豊島翔太, 若松 英, 小川修平, 西田俊朗, 江角浩安, 安部 良: マスト細胞白血病, 消化管間質細胞腫におけるオルガネラシグナリング: Kit チロシンキナーゼの活性化変異体はオルガネラをがん化シグナリングのプラットフォームとする. 第 67 回 日本細胞生物学会大会 ワークショップ (東京, 2015. 6)

[図書] (計 5 件)

① 鈴木利宙, 安部 良: IL-7 の抗腫瘍応答における功罪—抗腫瘍免疫応答の増強による抗腫瘍効果と炎症誘導を介した腫瘍形成の促進. 医学のあゆみ Vol.126 No.11 p1095-1101, 2017 年

② 小幡裕希: マスト細胞のがん化シグナリングは細胞内小器官で起こる. 科学フォーラム 第357号, p30-p35, 2017年

③ 豊島翔太, 安部 良: T細胞反応性のマスト細胞の分化. 臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社) 第65巻 第4号 p390-393, 2016年

④ 小幡裕希: 消化管間質細胞腫のKitの増殖シグナルは細胞膜ではなくゴルジ体から発信される. 科学フォーラム 第378号, p44-p49, 2017年

⑤ 小幡裕希, 豊島翔太, 若松 英, 小川修平, 江角浩安, 安部 良: マスト細胞をがん化に導く Kit のシグナル伝達は細胞膜ではなく「エンドリソソーム」, 「小胞体」で起こる. 臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社) 第64巻 第4号 380-385, 2015年

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

東京理科大学

<http://www.tus.ac.jp>

東京理科大学生命医科学研究所

<http://www.ribs.tus.ac.jp>

東京理科大学 生命医科学研究所

免疫生物学研究部門 安部研究室

tus-ribsjm.clsv.jp/immunology/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安部 良 (Abe Ryo)

東京理科大学・生命医科学研究所・教授

研究者番号: 20159453

(2) 研究分担者

小幡 裕希 (Obata Yuuki)

東京理科大学・生命医科学研究所・講師

研究者番号: 20609408

若松 英 (Wakamatsu Ei)

東京理科大学・生命医科学研究所・助教

研究者番号: 40632617

(3) 連携研究者

研究者番号:

(4) 研究協力者