

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21639

研究課題名(和文) ドライバー遺伝子変異キナーゼのオルガネラ局在安定化機構の解明と新たな治療開発戦略

研究課題名(英文) The elucidation of the mechanism of cellular localization of driver gene products and its medical application

研究代表者

西田 俊朗(Nishida, Toshiro)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト・客員研究員

研究者番号：40263264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：GISTの変異KITや肺癌の変異EGFRは、それぞれゴルジ体やエンドソームに停留し活性化している。本研究ではその停留分子機構を解明し、分解誘導による新規治療開発の可能性を探る。GISTの変異KITは、阻害剤A処理でゴルジ体からリソソームに移動し分解される。この際ユビキチン化も亢進する。一方、HSP90阻害剤を処理すると、プロテアソームでKIT分解がおこる。エンドソームに集積し活性化する変異EGFRでもHSP90阻害剤処理で分解が促進された。現在、これら阻害剤を処理した時の細胞内移動経路と処理機構を明らかにするためマルチカラー超解像三次元ライブイメージングで解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドライバー遺伝子変異を持つがん細胞では、その遺伝子産物は、正常タンパク質とは異なる場所に集積し、分解を逃れ長期に増殖シグナルを出し、がん化を促進している。本研究で、GISTの変異KITのオルガネラ停留には、特定の分子が関与していること、この分子を阻害すると変異KITは選択的に本来KITが分解を受けるリソソームに輸送され分解されることが解った。一方、タンパク質の3次元構造を変えるHSP90阻害剤処理では、異常タンパク質の細胞内処理機構が働き、プロテアソームでキナーゼの分解が進むことが解った。前者は腫瘍特異的で変異キナーゼに選択的で、今後、新しい標的治療薬開発の候補となり得る。

研究成果の概要(英文)：Mutated KIT of GIST and mutated EGFR of lung cancer are retained and activated in the Golgi apparatus and endosomes, respectively. In this study, we elucidated their retention mechanisms and explore the possibility of new development of anti-cancer agents. Mutated KIT of GIST accumulated in the Golgi apparatus is transported to lysosomes and degraded by addition of inhibitor A. Meanwhile, ubiquitination of KIT is also increased. On the contrary, treatment with HSP90 inhibitors may cause KIT degradation in proteasomes. Mutant EGFR, accumulated and activated in endosomes, was also degraded by addition of HSP90 inhibitors. Currently, we are analyzing with multicolor super-resolution three-dimensional live imaging to clarify detailed intracellular migration of molecules and kinase processing mechanism when these inhibitors are treated.

研究分野：消化器外科

キーワード：ドライバー遺伝子 ゴルジ体 タンパク分解 ユビキチン化 プロテアソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

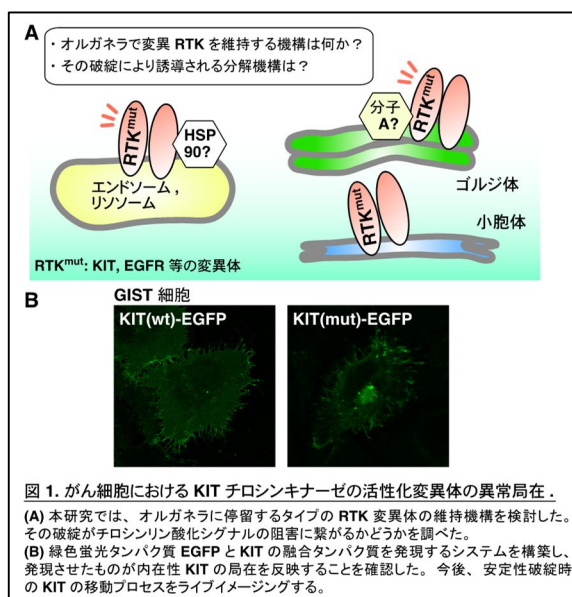
申請者らは、マスト細胞白血病、消化管間質細胞腫 (GIST)、急性骨髄性白血病等において、これまで細胞膜でシグナルを起こすと考えられてきたレセプターチロシンキナーゼ (RTK) KIT の恒常的活性化変異体が、低ユビキチン化状態でエンドソーム/リソソームやゴルジ体に停留し、そこで下流分子 (AKT、STAT5、ERK) を活性化していることを見出した (Obata et al., 2014, 2017, 2019)。予備検討では、他のがんの変異シグナル分子 (EGFR、PDGFRA、FLT3、FGFR3、RAS、SRC など) も特定のオルガネラに集積していることを発見している。KIT 変異体については、正常 (wild-type KIT) に比し分解が遅く長命であることを示唆するデータが得られている。異常集積しているオルガネラで停留し代謝・分解されにくい分子メカニズムや分解代謝を促進した場合、その後の移動場所や分解機構に関しては全く不明である。

2. 研究の目的

本研究は、がん細胞の変異シグナル分子のオルガネラ停留と安定化および代謝の分子メカニズムを解明し、ドライバー遺伝子変異を持つがんに対する新たな治療開発の基盤を構築することを目的としている。申請者らは、これまで細胞膜でシグナルを起こすと考えられてきた KIT チロシンキナーゼの自己活性化変異体が、低ユビキチン化状態でエンドソームやゴルジ体に停留し、下流分子を恒常的に活性化していることを報告した。一方、EGFR 等の変異体はエンドソームに停留している。これら変異体が本来集積する場所～則ち、正常 (wild-type) チロシンキナーゼが集積する細胞膜以外に集積する分子機構やそこで分解されず活性化状態で存在する要因は不明である。また、その分解代謝を促進し細胞内での活性化シグナルを抑制した場合、どのような経路や分解機構で代謝されるかも不明である (図 1A)。本研究では、GIST の変異 KIT をモデルとし、細胞内局在機構解析と生化学的解析を組み合わせこれら課題の解析実験を計画した。

3. 研究の方法

KIT の変異位置が異なる四種の GIST 細胞株と EGFR 変異を有する肺腺癌細胞株を用い、タンパク質安定性に重要な HSP90 阻害剤等を処理した。それらを処理した細胞を溶解してライセートを調製し、イムノプロットをおこなった。さらに、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定して抗 KIT 抗体およびオルガネラマーカーで染色した。HSP90 阻害剤で誘導された分解



が、リソソームによるものかどうかを確認するために、塩化アンモニウムまたはクロロキンをを用いた。また、ライブイメージング用に KIT-EGFP 発現コンストラクトを作成した。

4. 研究成果

(1) A インヒビターによる KIT のリソソームへの移行

幾つかの化合物を GIST 細胞に検討したところ、ほとんどのものは KIT レベルに影響を与えなかった一方で、イムノプロット上の KIT 変異体のバンドを有意に減少させるもの (阻害剤 A) を見出した。その際の KIT の細胞内局在を調べたところ、小胞状オルガネラに移行し、western blotting で KIT のタンパク質レベルの低下が確認された。これら結果から、KIT が集積する小胞状オルガネラは、リソソームと予想し、マーカーである LAMP1 と共染色した。阻害剤 A を処理すると、KIT は LAMP1 で囲まれる領域に移動することが認められた。さらに、阻害剤 A にリソソームでの分解阻害剤 (塩化アンモニウム、クロロキンはまたはバフィロマイシン A1) を同時に処理すると、KIT のタンパク質レベルは維持された。言い換えると、阻害剤 A の標的分子は、KIT のリソソーム移行を止め、KIT を長命化していることが示唆される。阻害剤 A による KIT のリソソームへの移行・分解は、ゴルジタンパク質 (GM130、Syntaxin 6、golgin97、AKT、ERK、STAT5) では認められず、KIT に選択的な機構であると予想される。本化合物は、マスト細胞白血病の KIT 変異体には影響はなく、GIST に選択的に作用することが示唆された。

今後、ノックダウン等により、阻害剤 A の標的分子を明確にし、その分子の局在を明確にし、さらに、共免疫沈降法および *in vitro pull down*、PLA 法等により、KIT との物理的相互作用を確認する。また、阻害剤 A 処理時の KIT のユビキチン化レベルが亢進することを確認しており、ユビキチン化様式および E3 リガーゼの探索をおこなう予定である。

(2) HSP90 阻害剤による KIT 変異体の分解誘導

多くの RTK の分子構造安定化に重要な HSP90 に対する阻害剤 (17AAG 等) を複数の GIST 細胞株に処理した。HSP90 阻害剤を処理したところ、western で KIT タンパク質レベルが有意に減少した。この際、AKT、STAT5、ERK 等のレベルには変化無く、この HSP90 阻害剤による KIT 減少は KIT 選択的であることが示唆されている。HSP90 阻害剤と塩化アンモニウムまたはクロロキンを同時処理した際、KIT タンパク質レベルの回復は全く認められない。すなわち、リソソームでの分解以外の分解機構が関与していることが示唆された。則ち、プロテアソームでの分解が予想され、現在、プロテアソーム阻害剤 MG132 またはボルテゾミブとの併用により、確認をおこなっている。また、HSP90 阻害剤は、肺腺癌のエンドソームに集積している EGFR のタンパク質分解も誘導し、その際のメカニズムについても検討中である。

以上の結果から、KIT は、HSP90 と阻害剤 A の標的分子により、分解抑制を受けていることが示唆された。HSP90 阻害剤、或いは、阻害剤 A いずれを作用させても、ユビキチン化が重要な役割を果たしていることが知られているため、これら阻害剤の処理時の変異 KIT のユビキチン化レベルを確認する予定である。

現在、(1)、(2) の実験について、ライブイメージングをおこなうための蛍光タンパク質タグした KIT の発現系を構築している。GIST 細胞株の KIT-EGFP、KIT-mCherry のトランスフェクションについては、至適条件を見出し、発現させた KIT-FP は、野生型も変異型も、内在性レベルのものを反映した局在を示すことを確認した (図 1B)。今後、この発現系を用いて、マルチカラーの超解像三次元ライブイメージングを試みる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Saito Y, Takahashi T, Obata Y, Nishida T, Ohkubo S, Nakagawa F, Serada S, Fujimoto M, Ohkawara T, Nishigaki T, Sugase T, Koh M, Ishida T, Tanaka K, Miyazaki Y, Makino T, Kurokawa Y, Nakajima K, Yamasaki M, Hirota S, Naka T, Mori M, Doki Y. | 4. 巻 122 |
| 2. 論文標題 TAS-116 inhibits oncogenic KIT signalling on the Golgi in both imatinib-naive and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumours. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Br J Cancer | 6. 最初と最後の頁 658-667 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-019-0688-y | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Okuma HS, Yonemori K, Narita SN, Sukigara T, Hirakawa A, Shimizu T, Shibata T, Kawai A, Yamamoto N, Nakamura K, Nishida T, Fujiwara Y. MASTER KEY Project: Powering Clinical Development for Rare Cancers through a Platform Trial. | 4. 巻 108 |
| 2. 論文標題 MASTER KEY Project: Powering Clinical Development for Rare Cancers through a Platform Trial. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Clin Pharmacol Ther. | 6. 最初と最後の頁 596-605 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cpt.1817 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Nishida T, Doi T. | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 A New Approach to Refractory GIST with Diverse Acquired Mutations. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Lancet Oncol. | 6. 最初と最後の頁 864-865 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/S1470-2045(20)30209-6 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Yamawaki K, Shiina I, Murata T, Tateyama S, Maekawa Y, Niwa M, Shimonaka M, Okamoto K, Suzuki T, Nishida T, Abe R & Obata Y. | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 FLT3-ITD transduces autonomous growth signals during its biosynthetic trafficking in acute myelogenous leukemia cells. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 22678 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-02221-2 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|------------------|
| 1. 著者名 Blay, JY., Kang, YK., Nishida, T. von Mehren M. | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 astrointestinal stromal tumours. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nat Rev Dis Primers | 6. 最初と最後の頁 22 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41572-021-00254-5 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Nishida T, Yoshinaga S, Takahashi T, Naito Y. | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Recent Progress and Challenges in the Diagnosis and Treatment of Gastrointestinal Stromal Tumors | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancers | 6. 最初と最後の頁 3158 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13133158 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 西田俊朗 |
| 2. 発表標題 希少がん診療の現状 |
| 3. 学会等名 令和2年度 第1回大阪府がん診療連携協議会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|--------------|
| 研究分担者 | 小幡 裕希 (Obata Yuuki) (20609408) | 国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長 (82606) | 細胞培養実験、生化学実験 |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|---|---|-------------------------|
| 研究 分 担 者 | 黒川 量雄 (Kurokawa Kazuo) (40333504) | 国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究センター・ 専任研究員 (82401) | SCLIMによる蛍光測定, 遺伝 子導入 |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |