

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07163

研究課題名（和文）ゴルジ体に潜みがんシグナルを発信する変異RTK 潜伏機構の解明と新阻害法開発～

研究課題名（英文）Molecular mechanism of Golgi retention of RTK mutant and establishment of a new strategy for inhibition of tyrosine phosphorylation signaling

研究代表者

小幡 裕希 (Obata, Yuuki)

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

研究者番号：20609408

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、受容体チロシンキナーゼKITのゴルジ停留の原因分子の一つとして、PKD2を同定した。消化管間質腫瘍（GIST）の主な原因であるKITが、PKD2およびそのエフェクターによってゴルジ領域に停留し、それらを阻害すると、KITはリリースされて速やかにリソソームに移行して分解され、それに伴い、KITシグナルが抑制されることを見出した。PKD2は、白血病のFLT3キナーゼのゴルジ停留には関与せず、がん種によって、個別に停留機構が備わっていることも明らかになった。今後、PKD2依存的な停留の詳細なメカニズムを明らかにすると共に、GIST以外のがんにおけるRTKの停留機構の解明を試みたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、分子標的薬感受性のKITのみではなく、耐性型KIT変異体も、PKD2依存的にゴルジ領域に停留することを示唆するデータを得ている。PKDインヒビターが、ゴルジ停留の解除を介し、標的薬抵抗型KIT変異体のシグナル発信を抑制することが示唆され、新機序阻害法の開発の一助となるものと考えられる。一方、他のがん種の変異受容体チロシンキナーゼのゴルジ停留は、PKD2活性化では説明できず、それぞれのがんにおける分子メカニズムの解析の重要性も明らかになった。新たなシグナル阻害戦略を見出した点と、他がん種での丁寧な解析の必要性を喚起した点で、本研究の意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Most gastrointestinal stromal tumors (GISTs) develop due to gain-of-function mutations in the tyrosine kinase, KIT. We recently showed that mutant KIT mislocalizes to the Golgi/trans-Golgi network (TGN) and initiates oncogenic signaling. However, the molecular mechanisms underlying its Golgi retention remain unknown. In this study, we found that protein kinase D2 (PKD2) is activated by the mutant, which causes Golgi retention of KIT. In PKD2-inhibited cells, KIT migrates from the Golgi/TGN to lysosomes and subsequently undergoes degradation. Importantly, delocalized KIT cannot trigger downstream activation. In the Golgi/TGN, KIT activates the PKD2-PI4KB pathway to generate a PI4P-rich membrane domain, where the AP1 is aberrantly recruited. Disruption of any factors in this cascade results in the release of KIT from the Golgi/TGN. Our findings unveil the molecular mechanisms underlying KIT mislocalization and provide evidence for a new strategy for inhibition of oncogenic signaling.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：受容体型チロシンキナーゼ ゴルジ/TGN KIT 局在異常 消化管間質腫瘍 (GIST) PKD2 PI4KB

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初までに、本研究グループは、マスト細胞腫・白血病、消化管間質腫瘍 (gastrointestinal stromal tumor: GIST) の発症の大きな原因の一つであるレセプターチロシンキナーゼ (receptor tyrosine kinase: RTK) である KIT の活性化変異体や、急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia: AML) の FLT3 変異体が、それまでに考えられていた細胞膜に局在するのではなく、エンドソーム・リソソーム、ゴルジ/trans-Golgi network (TGN) 等に停留し、そこから無限細胞増殖シグナルを発信することを見出した。予備検討で、他がん (肺がん、骨髄腫、神経芽腫、甲状腺腫等) において調べた限りは、変異 RTK が、オルガネラへの局在異常を呈することは普遍的に言えそうである。変異 RTK のシグナルの場が限局していることから、停留機構を明らかにすることは、その理解を新たな機能阻害方法の構築に繋がる可能性を秘めており、腫瘍生物学的のみならず、分子標的治療学的にも意義深い課題となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、がん細胞の変異 RTK のオルガネラ停留の原因となるマシナリーを明らかにし、それをターゲットとしたチロシンリン酸化シグナルに対する新機序阻害方法の基盤的開発を目的としている。その第一ラウンドとして、本研究グループでデータが蓄積している GIST の KIT のゴルジ停留の原因分子の新スクリーニング方法の構築と機能解析を試みる。さらに、ロックダウンによるフェノコピー探索、タンパク質間相互作用の解析により、メディエータおよびエフェクターを明らかにし、詳細な分子機構の解明に繋げる。それらが他のがんの RTK (マスト細胞腫・白血病の KIT, AML の FLT3, 骨髄腫の FGF レセプター3 等) のオルガネラ停留に関与しているかどうかを検討する。また、オルガネラ停留の解除が、既存の分子標的薬に対し抵抗性を有する RTK 変異体のシグナル発信を抑制するかどうかを明確にする。

3. 研究の方法

KIT のゴルジ停留の原因マシナリーのスクリーニング: GIST-T1 細胞 (コスモバイオ) に、研究グループが所有するシグナル伝達研究に関する化合物 (30 種類程度) を 8 時間処理し、4%パラホルムアルデヒドで固定後に KIT を免疫染色した。蛍光顕微鏡下で、KIT の局在に影響を与えるもののターゲットタンパク質が、停留の原因マシナリーの候補分子として、機能解析ステージに進めた。

イムノブロットイング: 細胞を SDS-PAGE サンプルバッファーで溶解し、タンパク質抽出液を作製した。SDS-PAGE 展開後、タンパク質を PVDF メンブレンに転写し、5%スキムミルクまたは BSA でブロッキング後、一次抗体、HRP-二次抗体とそれぞれ 1 時間インキュベーションし、洗浄後にバンドを測定した。

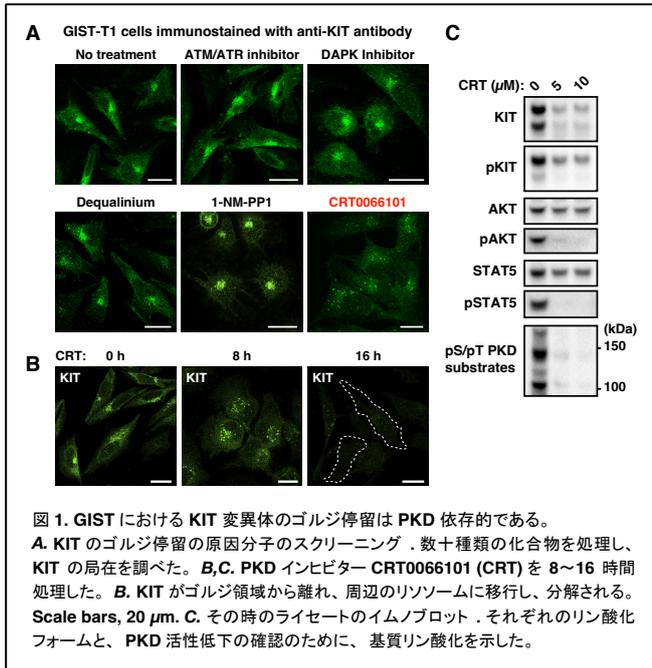
免疫蛍光染色および共焦点レーザー顕微鏡による局在解析: 細胞を poly-L-lysine コートしたカバーガラス上に播種し、2 日後に固定した。サポニンで透過、3% BSA でブロッキング後、一次抗体、二次抗体 (蛍光ラベル) とそれぞれ 1 時間インキュベーションし、洗浄後にスライドガラスにマウントした。サンプルの蛍光は共焦点レーザー顕微鏡で検出し、三次元超解像イメージングは、理化学研究所の中野明彦博士が開発した SCLIM で実施した。

タンパク質間相互作用・結合の解析: 興味の対象としているタンパク質を抗体で免疫沈降し、共沈降するタンパク質をイムノプロットで解析した。相互作用が生じる細胞内部位については、近接ライゲーション法で確認した。免疫染色と同様に、カバーガラス上の細胞に 2 種のタンパク質に対する抗体を処理し、近接している場合に二次抗体にタグしてある核酸をライゲーション・伸長し蛍光を発するので、それを共焦点顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

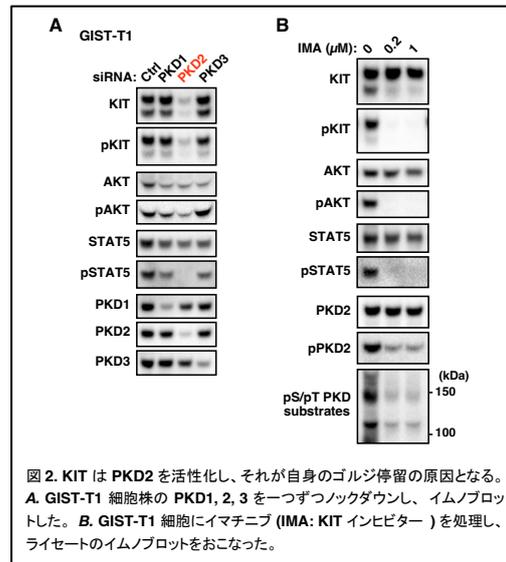
(1) 変異 RTK のオルガネラ停留の原因メカニズムのスクリーニング

はじめに、GIST のゴルジ停留の原因メカニズムを明らかにするために、化合物スクリーニングを試みた。分子標的薬 (イマチニブ) 感受性の KIT 変異体を有する GIST-T1 細胞に、小規模ではあるが、本研究グループが所有する化合物を処理し、KIT の局在を変化させるものを探した。ほとんどのものはヒットしなかったが、唯一、KIT のゴルジ局在を減少させる化合物 Protein Kinase D (PKD) インヒビター (CRT0066101: CRT) を見出した (図 1A,B)。即ち、この化合物のターゲットタンパク質である PKD の活性化が KIT のゴルジ停留の原因であることが予想される。本研究で構築した局在変化をリードアウトとしたスクリーニングは、化合物のサンプルサイズを拡げて、第 2 ラウンドとして、他がん種他 RTK (AML の FLT3, 肺がんの MET 等) に対し、実施中である。



(2) GIST の KIT のゴルジ停留の原因としての PKD 活性化

PKD は、TGN での輸送キャリア形成のキー分子であるが、我々は、その活性化が調節不能になることで、特定分子の輸送に負の影響を与えると予想した。GIST に CRT を処理した際の KIT シグナルと局在への影響を詳細に調べた。興味深いことに、CRT で KIT のゴルジ/TGN 局在を減少させた際、KIT シグナル (AKT, STAT5 活性化) は顕著に減少した (図 1C)。この時、KIT の一分子当たりの活性は低下しなかった一方で、KIT のタンパク質レベルは減少した。免疫蛍光染色では、ゴルジ領域の KIT は有意に減少し、周辺オルガネラへの移行が観察された。ゴルジ体周辺のオルガネラと KIT のタンパク質レベルの減少というデータから、リソソームへの移行を予想し、共染色による確認を試みた。その結果、CRT 処理細胞では、KIT のゴルジ/TGN 局在の減少、それに伴うリソソームマーカとの一致が確認された。即ち、KIT は PKD 活性化に依存してゴルジ/TGN に停留しており、インヒビターによって PKD が不活性化されると、ゴルジ/TGN からリリースされ、速やかにリソソームに移行し、分解されることが明らかになった。



(3) GIST の KIT のゴルジ停留における PKD2 の必要性

ヒトの PKD は、3 メンバーから構成されることから、次に、特定メンバーが重要なのかどうかを検討した。そのために、siRNA で PKD1, PKD2, PKD3 を一つずつノックダウンし、CRT 処理のフェノコピーを探索した。重要なことに、PKD2 をノックダウンした際に、(1) KIT のゴルジ停留の解除、(2) それに伴うシグナル低下、(3) KIT のリソソームへの移行・分解が認められた (図

2A)。この KIT の局在・シグナルへの影響は、PKD1, PKD3 のノックダウン細胞では認められなかった。実臨床で問題となる「イマチニブ抵抗型 KIT」を有する GIST-R9, GIST430 についても、KIT のゴルジ停留における PKD2 の必要性を示唆するデータを得た。重要なことに、ゴルジ領域からのリリースが、イマチニブ抵抗型 KIT のシグナルを低下させたことから、シグナルの場から移行させることが、標的薬耐性型シグナルの阻害に繋がることを示唆される。

(4) KIT は、PLCG2 を介して PKD2 を活性化する

次に、PKD2 が KIT 下流で活性化されているかどうかを検討した。GIST-T1 細胞に、KIT インヒビターイマチニブを処理した際、PKD2 の活性化の指標である S876 (autophosphorylation site) のリン酸化が有意に低下した (図 2B)。さらに、共沈降法により、KIT は自身の活性依存的に PKD2 と相互作用することが明らかになった。即ち、GIST の KIT 変異体は PKD2 を活性化して、自身をゴルジ領域に停留させることが示唆される。

PKD の機能には、ゴルジ/TGN におけるジアシルグリセロールレベルが重要であることが報告されており、我々は、その産生酵素であるホスホリパーゼ C ガンマ (PLCG) に着目した。PLCG1 または PLCG2 をノックダウンしたところ、興味深いことに、PLCG2 をノックダウンした時のみ、PKD2 活性化が抑制され、さらに、PKD2 阻害時のフェノコピーとなった (図 3A)。さらに、イマチニブ処理時、PLCG2 の活性化が抑制された。即ち、PKD2 は、KIT-PLCG2 の下流で活性化されることが示唆される。詳細なデータは示さないが、GIST における PKD2 のエフェクターは、PI4KB であり、それにより、GGA1, AP1 といった膜交通のキー分子を異常にリクルートして、KIT がゴルジ/TGN に停留してしまうことを示唆するデータを得ている (図 3B, 図 4)。

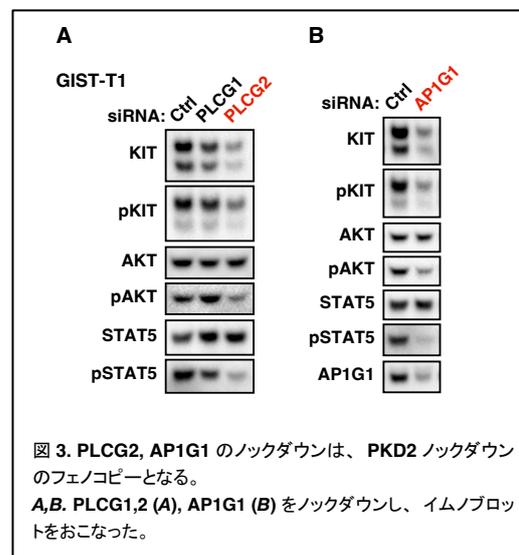


図 3. PLCG2, AP1G1 のノックダウンは、PKD2 ノックダウンのフェノコピーとなる。
A,B. PLCG1,2 (A), AP1G1 (B) をノックダウンし、イムノブロットをおこなった。

(5) PKD2 およびそのエフェクターは、他がん種の RTK の局在やシグナルにおいて役割を果たさない

最後に、血液がんの正常 KIT や変異 KIT, AML の FLT3 変異体の局在やシグナル発信に、PKD2 が関与しているかどうか、検討した。はじめに、HMC-1.1, HMC-1.2 (マスト細胞白血病, 変異 KIT), Kasumi-1 (AML, 変異 KIT), M-07e (急性巨核芽球性白血病, 野生型 KIT) の PKD2 をノックダウンしたところ、KIT レベルおよびシグナルに影響が無かった。さらに、AML のゴルジ領域に停留する FLT3 変異体についても、PKD2 をノックダウンしても、局在にもシグナルにも影響無かった (骨髄種の FGF レセプター3 についても同様だった)。即ち、PKD2 による KIT のゴルジ停留は、GIST に特別なものであり、他がん種における RTK のオルガネラ停留の原因メカニズムは、PKD2 で説明できず、それぞれにおける個別のスクリーニングおよび候補タンパク質の機能解析が必要であることが明らかになった。

KIT-PLCG2-PKD2-PI4KB 経路が制御不能になることによって、KIT だけではなく、他のタンパク質の細胞内トラフィックに影響を受け、それが

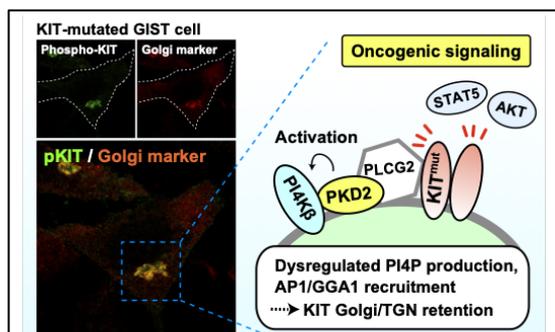


図 4. GIST の KIT のゴルジ停留機構のモデル図
本研究では、化合物スクリーニングを契機に、GIST の KIT が、PKD2 依存的にゴルジ体に停留することを明らかにし、さらに、この停留機構を標的とした KIT シグナル阻害戦略を見出した。

GIST 細胞の増殖や移動能に寄与している可能性があり、今後、そのような課題に取り組む予定である。また、GIST の KIT 以外の RTK の局在異常の原因メカニズムについても、本研究で構築したスクリーニングを活用し、明らかにしたい。また、シグナルの場からのリリースが、無限細胞増殖シグナルのブロックに繋がることから、前臨床試験を計画し、新機序治療薬開発の一助としたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Natsume M, Niwa M, Ichikawa S, Okamoto T, Tsutsui H, Usukura D, Murata T, Abe R, Shimonaka M, Nishida T, Shiina I & Obata Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Brefeldin A and M-COPA block the export of RTKs from the endoplasmic reticulum via simultaneous inactivation of ARF1, ARF4, and ARF5	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2024.107327	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 Obata Y, Kurokawa K, Tojima T, Natsume M, Shiina I, Takahashi T, Abe R, Nakano A & Nishida T	4. 巻 42
2. 論文標題 Golgi retention and oncogenic KIT signaling via PLC 2-PKD2-PI4KIII activation in gastrointestinal stromal tumor cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 113035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.113035	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 Teranishi R, Takahashi T, Obata Y, Nishida T, Okubo S, Kazuno H, Saito Y, Serada S, Fujimoto M, Kurokawa Y, Saito T, Yamamoto K, Yamashita K, Tanaka K, Makino T, Nakajima K, Hirota S, Naka T, Eguchi H & Doki Y	4. 巻 152
2. 論文標題 Combination of pimitespib (TAS-116) with sunitinib is an effective therapy for imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int. J. Cancer	6. 最初と最後の頁 2580-2593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.34461	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 該当する

1. 著者名 Miyazaki T, Chung S, Sakai H, Ohata H, Obata Y, Shiokawa D, Mizoguchi Y, Kubo T, Ichikawa H, Taniguchi H, Aoki K, Soga T, Nakagama H, Okamoto K.	4. 巻 113
2. 論文標題 Stemness and immune evasion conferred by the TD02-AHR pathway are associated with liver metastasis of colon cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 170-181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15182.	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 該当する

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小幡裕希
2. 発表標題 白血病・消化管肉腫におけるチロシンキナーゼの局在異常・その分子メカニズム
3. 学会等名 第1回 生物系 明治薬科大学 若手研究者講話(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小幡裕希, 黒川量雄, 戸島拓郎, 夏目美祐希, 椎名 勇, 高橋 剛, 安部 良, 中野明彦, 西田俊朗
2. 発表標題 消化管間質細胞腫のKITチロシンキナーゼのゴルジ滞留およびシグナル発信の原因はPLC 2-PKD2-P14K111 経路の活性化である
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 夏目美祐希, 丹羽真琳子, 市川翔, 村田貴嗣, 下仲基之, 安部 良, 西田俊朗, 椎名 勇, 小幡裕希
2. 発表標題 変異チロシンキナーゼの細胞増殖シグナルに対する細胞内輸送ブロッカーM-COPAの作用機序研究
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小幡裕希, 黒川量雄, 戸島拓郎, 夏目美祐希, 椎名 勇, 高橋 剛, 安部 良, 中野明彦, 西田俊朗
2. 発表標題 消化管間質細胞腫における変異KITチロシンキナーゼのシグナルの場 [ゴルジ領域] への異常局在, その原因メカニズムの同定
3. 学会等名 第45回 分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 夏目美祐希, 丹羽真琳子, 下仲基之, 村田貴嗣, 安部 良, 西田俊朗, 椎名 勇, 小幡裕希
2. 発表標題 消化管間質細胞腫および肺腺がんにおける変異チロシンキナーゼの細胞増殖シグナルに対するBFA-like細胞内輸送プロテオソーム阻害効果および作用機序研究
3. 学会等名 第45回 分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 剛, 寺西立冴, 小幡裕希, 大久保秀一, 数野裕美, 西田俊朗, 斎藤百合奈, 山下公太郎, 西塔拓郎, 田中晃司, 山本和義, 牧野知紀, 黒川幸典, 中島清一, 江口英利, 土岐祐一郎
2. 発表標題 GISTに対する新規HSP90阻害薬TAS-116とマルチチロシンキナーゼの併用効果に関する検討
3. 学会等名 第31回 日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺西立冴, 高橋 剛, 小幡裕希, 数野裕美, 大久保秀一, 西田俊朗, 黒川幸典, 山本和義, 西塔拓郎, 山下公太郎, 田中晃司, 牧野知紀, 中島清一, 江口英利, 土岐祐一郎
2. 発表標題 イマチニブ耐性GISTに対するSunitinibとTAS-116によるコンビネーション治療の検討
3. 学会等名 第30回 日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------