

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300353

研究課題名(和文) 神経芽腫で活性化したALKの下流シグナルの解析

研究課題名(英文) Analysis of mediators of ALK signaling activated in neuroblastoma

研究代表者

堺 隆一 (SAKAI, RYUICHI)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：40215603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,900,000円、(間接経費) 5,070,000円

研究成果の概要(和文)：神経芽腫において同定された新規のALK結合リン酸化蛋白質Flotillin-1(FLOT1)は、ALKと選択的に結合しエンドサイトーシスを介してALK蛋白質の分解に関わることを示した。また、神経芽腫で見られる変異型ALKとFLOT1との結合能が野生型に比べ著明に減少しているのが確認された。一方で神経芽腫でFLOT1の発現を抑制すると、細胞運動能、足場非依存性増殖、造腫瘍能などが増加するという結果も得られた。以上のことからFLOT1の発現低下やFLOT1との結合能が低いALK変異によりALK蛋白質の安定性が増すことが神経芽腫のがん化シグナルの増強に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of anaplastic lymphoma kinase (ALK) in oncogenesis of neuroblastoma, phosphotyrosine-containing proteins associated with ALK were investigated. Flotillin-1 (FLOT1), a plasma membrane protein involved in endocytosis, was identified as a binding partner of ALK. Knockdown of FLOT1 in neuroblastoma cells caused dissociation of ALK from endosomes along with membrane accumulation of ALK, which resulted in activation of ALK and downstream signals. Suppression of FLOT1 expression also enhanced oncogenic properties of neuroblastoma cells both in vitro and in vivo. On the other hand, oncogenic ALK mutants showed less binding affinity to FLOT1. Lower expression levels of FLOT1 were observed in highly malignant subgroups of human neuroblastoma tissues. Taken together, it was suggested that decreased levels of FLOT1 or defects in binding affinity between ALK mutants and FLOT1 may cause malignant phenotypes of neuroblastoma through the activation of ALK signaling.

研究分野：腫瘍学分野

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

キーワード：ALK 神経芽腫 チロシンリン酸化 シグナル伝達 質量分析

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は小児期に最も高頻度に見られる悪性固形腫瘍の一つであるが、自然消滅傾向を有する一部の早期症例を除き、全体の約3分の2は3,4期の進行例であり、長期生存率は未だ約30%に過ぎない。急務である有効な治療法の開発が進んでいない理由の一つとして、治療標的として他の固形腫瘍に見られるような腫瘍化に関わる活性型の遺伝子変異が見つからないことにある。代表研究者は一群の神経芽腫の細胞株でチロシンリン酸化が異常に亢進した蛋白質に気づき、精製により同定したところ Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) という受容体型チロシンキナーゼであった。その後 ALK は、神経芽腫の一部で点突然変異による活性化が見つかり、染色体転座による ALK の活性化が見つまっている悪性リンパ腫や肺がんの一部と合わせて、これらの腫瘍の発生に直接関わる分子であることが近年示唆されている。しかし ALK が特定の腫瘍を引き起こすメカニズムは解明されていない。これまで主にリンパ腫の NPM-ALK 融合蛋白質の機能解析から、ERK1/2、AKT、STAT3 などの分子が下流のシグナル分子として提唱されており、また ALK の活性化した神経芽腫でもこれらの経路の活性化は確認されている。ただ ERK1/2、AKT に関しては EGF 受容体など多くの増殖因子受容体の共通の下流分子であることが知られているので、ALK 特有の腫瘍制御メカニズムを説明できるものではない。肺がんやリンパ腫と違って、神経芽腫では ALK は融合蛋白質を作ることなく活性型変異や過剰発現で活性化しており、全長の ALK を持つ神経芽腫においては、全く違った機序で ALK が腫瘍の特性に関わる可能性があるが、ALK についてはリガンドや生理的な役割を含めほぼ全く分かっていない状況であった。

2. 研究の目的

本研究の目的はチロシンキナーゼとして神経芽腫の発生に深く関わっている ALK の特異的な役割を明らかにすることである。そのために、活性型 ALK がキナーゼとしてリン酸化する基質群の解析に焦点をあわせる。ALK 特有の腫瘍制御メカニズムの解明には、ALK がチロシンリン酸化する基質分子の包括的な理解が欠かせないと考え。現在までの国内外の研究では一般的な下流分子 ERK や AKT が ALK のシグナルも伝えると仮定して論じているが、これでは ALK 活性化の臓器特異性やそれに伴う特有の病態を説明出来ていない。本研究では、神経芽腫で活性化した ALK チロシンキナーゼがリン酸化する基質群を実際に同定し、その腫瘍特性との関わりを解析することにより、ALK チロシンキナーゼが伝える特別ながん化シグナルの本態を明らかにすることをその目的とする。膜上で活性化した神経芽腫の ALK は、既に報告した ShcC のような他のシステムとは全く異なった蛋白質群をリン酸化して独自のシグナルを伝え、

神経芽腫の病態を引き起こしていると考えられることができる。このようなシグナルの理解は、小児期の発症や自然退縮など神経芽腫の特徴となる性質を理解することにもつながる。

3. 研究の方法

野生型および活性型の ALK を導入した神経芽腫細胞 TNB-1 を用いてチロシンリン酸化蛋白質群を解析し、ALK によってリン酸化の変化した蛋白質と ALK と結合する蛋白質群を網羅的に解析する。また抗リン酸化チロシン抗体 4G10 抗体カラムを用いて生成を行い、質量分析で順次同定を行う。同定された分子については ALK のノックダウンや阻害剤でリン酸化が下がるか、ALK と結合能を有するか、の2点を確認して、ALK の結合分子あるいは基質として絞り込む。同定された ALK 関連チロシンリン酸化蛋白質について RNAi 法によってノックダウンした時の神経芽腫の増殖能、コロニー形成能、転移能などを解析し ALK の oncogenic なシグナルを媒介する分子を選別する。ALK との結合を阻害するペプチドなどシグナルを阻害する分子を用いて治療モデルを作り、リン酸化抗体を作成し神経芽腫組織におけるリン酸化の意味を解析する。

4. 研究成果

神経芽腫細胞 TNB-1 にタグ付きの ALK 全長を発現し、タグの抗体および抗リン酸化チロシン抗体 4G10 の2段階のカラム精製により ALK と結合するチロシンリン酸化蛋白質を質量分析により次々に同定していった。ALK に結合するリン酸化蛋白質として同定した約30の蛋白質のうち IRS1、SOS1、Grb2、ZO-1 など幾つかについては、ALK との結合がリンパ腫など他の系でも報告されており、この手法で ALK 結合蛋白質が確かに同定されていることが示唆された。新規の ALK 結合リン酸化蛋白質のうち Flotillin1 (FLOT1)、PTPN11 (SHP2)、SH2B1 については、特異的抗体や siRNA を用いた解析を進めた。特に Flotillin-1 (FLOT1) はパブリックデータベースの解析で、その発現量の低いことが神経芽腫の予後不良と関わることから、特に注目して ALK との関わりで機能解析を進めた。FLOT1 は細胞膜上のラフトに局在し、エンドサイトーシスに関わることが知られていたため、ALK 蛋白質の分解に関わる可能性を考えた。蛍光染色で FLOT1 はラフトおよびエンドソームと考えられる細胞質内の顆粒において ALK との共局在が認められた。神経芽腫細胞において FLOT1 の発現を RNAi で抑制すると膜上の ALK 蛋白質の量が著明に増加することから、FLOT1 は ALK と選択的に結合しエンドサイトーシスを介して ALK 蛋白質の分解に関わることが示された。また、神経芽腫で見られる F1174L など幾つかの変異に関して、変異型 ALK と FLOT1 との結合能が野生型に比べ著明に減少しているのが確認された。一方で神経芽腫で FLOT1 の発現をノックダウンにより抑制すると、細胞運動能、足場非依存

性増殖、ヌードマウスにおける造腫瘍能などが増加するという結果も得られた。以上のことから FLOT1 の発現低下や FLOT1 との結合能が低い ALK 変異により ALK 蛋白質の安定性が増すことが神経芽腫のがん化シグナルの増強に関わる可能性が示唆された。この結果は、ALK 蛋白質の発現量が遺伝子変異の有無にかかわらず神経芽腫の予後不良に関わるという解析結果とも整合性があり、今後 FLOT1 低値の神経芽腫において ALK 阻害剤が治療に有効であるかを検証する必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

- 1 Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K, Yamaguchi H, Sakai R. Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. *Cancer Res*. 2014 in press
- 2 Yamaguchi H, Takanashi M, Yoshida N, Ito Y, Kamata R, Fukami K, Yanagihara K, Sakai R. Saracatinib impairs the peritoneal dissemination of diffuse-type gastric carcinoma cells resistant to Met and fibroblast growth factor receptor inhibitors. *Cancer Sci*. 105:528-536, 2014
- 3 Yamaguchi H, Yoshida N, Takanashi M, Ito Y, Fukami K, Yanagihara K, Yashiro M, Sakai R. Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. *PLoS One* 9: e85485, 2014
- 4 Miyazawa Y, Uekita T, Ito Y, Seiki M, Yamaguchi H, Sakai R. CDCP1 regulates the function of MT1-MMP and invadopodia-mediated invasion of cancer cells. *Mol Cancer Res*. 11 :628-637, 2013
- 5 Shirakihara T, Kawasaki T, Fukagawa A, Semba K, Sakai R, Miyazono K, Miyazawa K, Saitoh M. Identification of integrin $\alpha 3$ as a molecular marker of cells undergoing epithelial-mesenchymal transition and of cancer cells with aggressive phenotypes. *Cancer Sci*. 104: 1189-1197, 2013
- 6 Kasuga M, Ueki K, Tajima N, Noda M, Ohashi K, Noto H, Goto A, Ogawa W, Sakai R, Tsugane S, Hamajima N, Nakagama H, Tajima K, Miyazono K, Imai K. Report of the Japan Diabetes Society/Japanese Cancer Association Joint Committee on Diabetes and Cancer. *Cancer Sci*. 104: 965-976, 2013
- 7 Uekita T, Fujii S, Miyazawa Y, Hashiguchi A, Abe H, Sakamoto M, Sakai R. Suppression of autophagy by CUB domain-containing protein 1 signaling is essential for anchorage-independent survival of lung cancer cells. *Cancer Sci*. 104: 865-870, 2013
- 8 Uekita T & Sakai R. Roles of CUB domain-containing protein 1 signaling in cancer invasion and metastasis. *Cancer Sci*. 12: 1943-1948, 2011
- 9 Yamaguchi H, Yoshida S, Muroi E, Yoshida N, Kawamura M, Kouchi Z, Nakamura Y, Sakai R, and Fukami K. Phosphoinositide 3-kinase signaling pathway mediated by p110 α regulates invadopodia formation. *J. Cell Biol*. 193: 1275-1288, 2011
- 10 Ozeki C, Sawai Y, Shibata T, Kohno T, Okamoto K, Yokota J, Tashiro F, Tanuma S, Sakai R, Kawase T, Kitabayashi I, Taya Y & Ohki R. Cancer susceptibility polymorphism of p53 at codon 72 affects phosphorylation and degradation of p53 protein. *J Biol Chem*. 286: 18251-18260, 2011.
- 11 Yagi R, Tanaka M, Sasaki K, Kamata R, Nakanishi Y, Kanai Y & Sakai R. ARAP3 inhibits peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma cells by regulating cell adhesion and invasion. *Oncogene* 30 :1413-1421, 2011

〔学会発表〕(計 30 件)

上北尚正、山口英樹、堺隆一：CDCP1 は MT1-MMP の機能と浸潤突起を介した癌細胞の浸潤を制御する (2013.10.3-5) 第 72 回日本癌学会総会 (横浜)

山口英樹、柳原五吉、八代正和、堺隆一：間質線維芽細胞との相互作用を指標としたスキルス胃癌腹膜播種に対する分子標的薬の探索 (2013.10.3-5) 第 72 回日本癌学会総会 (横浜)

白木原琢哉、堺隆一、齋藤正夫：FGF-2 による TGF- β 誘導性 EMT の亢進とがん浸潤への関与 (2013.10.3-5) 第 72 回日本癌学会総会 (横浜)

富山新太、上北尚正、山口英樹、佐々木一樹、滝田順子、中川原章、森健太郎、堺隆一：新規 ALK 結合蛋白質である Flotillin-1 は、endocytosis を介して ALK シグナルを制御す

る(2013.10.3-5)第72回日本癌学会総会(横浜)

Sakai R, Tomiyama A, Uekita T, Yamaguchi H, Sasaki K, Takita J, Nakagawara A, Mori K: Flotillin-1 is a novel ALK binding protein which regulates ALK signaling through receptor endocytosis. (2013.8.7-10) 7th Mechanisms & Models of Cancer, La Jolla, USA

Shirakihara T, Sakai R, Saitoh M: FGF-2 accelerates TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition and promotes invasion of cancer. (2013.8.7-10) 7th Mechanisms & Models of Cancer, La Jolla, USA

Uekita T, Yamaguchi H, Sakai R: CDCP1 regulates the function of MT1-MMP and invadopodia-mediated invasion of cancer cells. (2013.8.7-10) 7th Mechanisms & Models of Cancer, La Jolla, USA

上北尚正、堺隆一: がん細胞の足場非依存性増殖における CDCP1 シグナルを介したオートファジー抑制の重要性 (2013.7.11-12) 第22回日本がん転移学会学術集会・総会(松本)

白木原琢哉、齋藤正夫、堺隆一: FGF-2 による TGF- 誘導性 EMT の亢進とがん浸潤への関与 (2013.7.11-12) 第22回日本がん転移学会学術集会・総会(松本)

Uekita T, Sakai R: Oncogenic Ras-ERK signaling requires activation of CDCP1 pathway for promotion of tumor metastasis (2013.2.21-25) 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, Hawaii, USA

Yamaguchi H, Yoshida N, Takanashi M, Yanagihara K, Sakai R: Differential sensitivities to molecular target drugs in scirrhous gastric carcinoma cell lines (2013.2.21-25) 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, Hawaii, USA

堺隆一: スキルス胃癌のシグナル異常の解析 (2013.2.27-3.1) 第85回日本胃癌学会総会(大阪)

上北尚正、清野透、堺隆一: Ras-ERK シグナルによる癌の転移能の亢進は CDCP1 発現誘導を介する (2012.9.19-21) 第71回日本癌学会総会(札幌)

山口英樹、柳原五吉、堺隆一: スキルス胃癌細胞株における c-Met 受容体型チロシンキナーゼ依存性の検討 (2012.9.19-21) 第71回日本癌学会総会(札幌)

二見仁康、堺隆一: 神経芽腫における ALK による RET タンパク質発現制御の解析 (2012.9.19-21) 第71回日本癌学会総会(札幌)

富山新太、上北尚正、山口英樹、鎌田礼子、佐々木一樹、中川原章、堺隆一: 新規 ALK 結合蛋白質である Flotillin-1 は、endocytosis を介して ALK シグナルを制御する (2012.9.19-21) 第71回日本癌学会総会(札幌)

上北尚正、堺隆一: CDCP1 は Ras により発現誘導され、がん細胞の足場非依存性及び浸潤、転移に關与する (2012.7.12-13) 第21回日本がん転移学会学術集会・総会(広島)

山口英樹、堺隆一: スキルス胃癌細胞における Met シグナル伝達系の機能解析 (2012.7.12-13) 第21回日本がん転移学会学術集会・総会(広島)

Tomiyama A, Uekita T, Sakai R: Flotillin-1 is a novel ALK binding protein which regulates ALK signaling through receptor endocytosis. (2012.6.18-21) Advances in Neuroblastoma Research 2012, Toronto, Canada

Sakai R, Uekita T: CDCP1 links Ras and Src signaling pathways as a common effector for the promotion of tumor metastasis (2012.3.30-4.3) AACR Annual Meeting 2012, Chicago, USA

Yamaguchi H, Yanagihara K, Yashiro M, Sakai R: Cancer-associated fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and three-dimensional invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. (2012.3.30-4.3) AACR Annual Meeting 2012, Chicago, USA

Yoshida N, Yamaguchi H, Muroi E, Takanashi M, Fukami K, Sakai R: Differential requirements for the receptor tyrosine kinase c-Met in scirrhous gastric carcinoma cell lines. (2012.3.30-4.3) AACR Annual Meeting 2012, Chicago, USA

Sakai R: Critical role of CDCP1 in RAS-mediated tumor progression and cell death (2011.11.1-2) France-Japanese Symposium on Cancer Research, Tokyo, Japan.

上北尚正、堺隆一: CDCP1 によるオートファジーの抑制はがん細胞の足場非依存性増殖に重要である (2011.10.3-5) 第70回日本癌学会総会(名古屋)

山口英樹、柳原五吉、八代正和、堺隆一：腫瘍由来線維芽細胞との共培養によるスキルス胃癌浸潤機構の解析（2011.10.3-5）第70回日本癌学会総会（名古屋）

二見仁康、堺隆一：神経芽腫のALK標的治療におけるRETシグナルの関わり（2011.10.3-5）第70回日本癌学会総会（名古屋）

富山新太、山口英樹、鎌田礼子、中川原章、北中千史、堺隆一：神経芽腫におけるALKのチロシンリン酸化結合体白質群の同定とALK特異的ながん化シグナルにおける役割（2011.10.3-5）第70回日本癌学会総会（名古屋）

Uekita T, Miyazawa Y, Sakai R: CDCP1 links Ras and Src signaling pathways as a common effector for the promotion of tumor metastasis (2011.9.17-20) Japanese-German Cancer Workshop, Hiroshima, Japan.

Uekita T, Sakai R: CDCP1 links RAS and Src signaling pathways as a common effector for the promotion of tumor metastasis (2011.8.10-14) Mechanisms & Models of Cancer 2011, La Jolla, USA

山口英樹、堺隆一：スキルス胃癌細胞の胃癌由来線維芽細胞を介した細胞外基質リモデリングと浸潤（2011.6.30-7.1）第20回日本がん転移学会学術集会・総会（浜松）

〔図書〕(計 0件)

〔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
<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions>

/07grow/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者
堺隆一 (SAKAI, Ryuichi)
独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長
研究者番号：40215603

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：