

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460682

研究課題名(和文) 甲状腺癌モデルマウスを用いたRETキナーゼシグナルの網羅的リン酸化解析

研究課題名(英文) Phosphoproteomic analysis of RET kinase signal in MTC model mice

研究代表者

川井 久美 (Kawai, Kumi)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・准教授

研究者番号：50362231

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)：現在我が国で他臓器固形癌に対しすでに認可のあるマルチキナーゼ阻害剤である Sunitinib が変異RETによる細胞増殖、遊走能およびRET下流のシグナルを抑制することを甲状腺髄様癌モデルマウス MoMuLV/RET-MEN2A 由来髄様癌細胞株を用いて示した。Sunitinib の経口投与により MoMuLV/RET-MEN2A 甲状腺髄様癌は有意に縮小し、MEN2A 型変異RETを有する患者に Sunitinib が有効である可能性が示された。甲状腺髄様癌組織を用いた LC/MS 分析では、変異RETとともにチロシンリン酸化を受けた様々なシグナル関連、増殖関連タンパク質が同定され、今後さらなる解析が待たれる。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of multi-kinase inhibitor Sunitinib on MEN2A-RET thyroid medullary carcinoma cells, and Sunitinib presented remarkable inhibition of cell growth, migration and phosphorylation of down stream signaling molecules. Oral administration of Sunitinib to MoMuLV/RET-MEN2A mice exhibited significant tumor regression suggesting the promising effect of Sunitinib on MEN2A patients. LC/MS analysis on thyroid carcinoma tissue of MoMuLV/RET-MEN2A mice presented various interesting phosphotyrosine-binding proteins, and further analysis is required to elucidate the significance of these proteins in thyroid carcinogenesis.

研究分野：実験病理学

キーワード：RET 甲状腺髄様癌 モデルマウス プロテオミクス解析 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

RET は受容体型チロシンキナーゼをコードする癌原遺伝子であり、その活性型点突然変異により腫瘍性疾患である多発性内分泌腫瘍症(MEN)2型を生じ、また不活性型変異によりヒルシュスプルング病を発症するなど、変異によって多種のヒト疾患の原因遺伝子となる。また *RET* が別の遺伝子と再構成して甲状腺乳頭癌の原因となることが知られており、さらに肺癌で *RET* と *KIF5B* の遺伝子再構成が報告され *RET* による癌化機構の解明と分子標的薬の解析の重要性が増していた。我々のグループを始め多くの研究者が遺伝子発現解析から個々の分子へと着目し *RET* による癌化の分子機構の解明を行ってきたが *RET* による癌化に伴う網羅的タンパク質リン酸化プロファイルの解析はまだ十分行われておらず、我々が作製した MEN2A 型変異を導入した *RET* 遺伝子発現させたトランスジェニックマウス MoMuLV/*RET-MEN2A* を用いて、*RET* による癌化に伴う網羅的タンパク質リン酸化解析を目指した。

2. 研究の目的

MoMuLV/*RET-MEN2A* は全例甲状腺に髄様癌を発生するモデルマウスである。我々はこれまでも未認可の阻害剤を用いた *RET* シグナル抑制と腫瘍縮小効果について解析を行ってきたが、今回は消化管間質腫瘍・腎細胞癌および膵神経内分泌腫瘍に対しすでに本邦で認可されているキナーゼ阻害剤 Sunitinib を用いてまず細胞レベルで *RET* 下流のシグナル分子のリン酸化抑制効果の解析を行い、さらには Sunitinib(Suni)を MoMuLV/*RET-MEN2A* へ投与し、in vivo での効果を解析する。そして、MoMuLV/*RET-MEN2A* 甲状腺癌におけるタンパク質リン酸化プロファイルを明らかにし、Suni 投与によって抑制される *RET* 下流のリン酸化分子について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 細胞増殖抑制の解析

細胞は MoMuLV/*RET-MEN2A* 由来 甲状腺髄様癌細胞株 MTC を用いた。阻害剤として Suni および、対象として本邦で根治不能な甲状腺髄様癌に対し認可された Vandetanib (Van)をそれぞれ 0~1uM の濃度で添加、また陰性コントロールには溶媒として用いた DMSO を MTC 培養上清に加え 48 時間培養後に MTS assay を行った。

2) 遊走能抑制の解析

MTC 細胞を 6cm dish に培養し、上清に阻害剤 Suni, Van をそれぞれ 0~1uM または DMSO を加えて Scratch assay を行った。スクラッチ後 18h,24h の細胞の移動距離を画像解析ソフト Win Roof にて解析した。

3) *RET* 下流シグナルおよび apoptosis 誘導の解析: Western blotting

MTC 細胞培養上清に 0-10uM の Suni, Van をそれぞれ 0~1uM または DMSO を加えて 6 時間まで培養の後 RIPA buffer で lysis して Western blotting(WB)を行った。使用した抗体を以下に記す。

anti-*RET*, anti-phosphotyrosine, anti-MEK 1/2, anti-phospho MEK, anti-p44/42 MAPK (Erk1/2), anti-phospho p44/42 MAPK (Erk1/2), anti-AKT, anti-phospho AKT, anti-Caspase 3, anti-Cleaved Caspase 3, anti-beta actin

4) 免疫不全マウスでの移植腫瘍の検討

3ヶ月齢の免疫不全マウス SHO mouse (hairless SCID mouse)背部皮下に 4.8×10^6 個の MTC 細胞を接種後 2ヶ月経過して腫瘍が一定の大きさに生着した後に経口ゾンデで Suni を 12.5% Cremophor, 12.5% Ethanol in water に溶解し、体重あたり 40mg/kg を 3週間投与した。陰性コントロールは溶媒を投与した。薬剤投与期間終了後にマウスを解剖し、腫瘍サイズの計測と腫瘍サンプルの採取を行った。

5) MoMuLV/*RET-MEN2A* への Sunitinib 投与の検討

3ヶ月齢の MoMuLV/*RET-MEN2A* に経口ゾンデで Suni もしくは陰性コントロールとして溶媒の Cremophor/Ethanol in water を 4)の実験同様に 3週間投与した。薬剤投与後にマウスを解剖し、甲状腺腫瘍サイズの計測と腫瘍サンプルの採取を行った。

6) MoMuLV/*RET-MEN2A* 甲状腺腫瘍のチロシンリン酸化タンパクの LC/MS 分析

3ヶ月齢の MoMuLV/*RET-MEN2A* 甲状腺腫瘍を RIPA buffer で lysis の後、anti-phosphotyrosine(Millipore) および anti-*RET*(IBL)を用いて、Dyna beads Protein G Immunoprecipitation Kit により免疫沈降を行い、チロシンリン酸化タンパクおよび *RET* 結合性タンパクの濃縮の後、Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用い LC/MS 分析を行った。得られた分析データは SwissProt (Uni-Prot)のデータベースを使用して解析を行った。

7) MoMuLV/*RET-MEN2A* 甲状腺腫瘍における網羅的タンパク解析

8ヶ月齢の MoMuLV/*RET-MEN2A* 甲状腺腫瘍および野生型コントロールマウス甲状腺組織を 7M Urea, 0.1% NP-40/500mM Triethyl ammonium bicarbonate buffer にて lysis し、iTRAQ 試薬マルチプレックスキット (Sciex)に従いサンプル調整を行った。TripleTOF™ 5600 (Sciex)にて分析を行い、データ解析は ProteinPilot™ Software を用いて行った。

4. 研究成果

1) Sunitinib は Vandetanib と同等の MTC 細胞増殖抑制を示した

図 1 に示すようにマルチキナーゼ阻害剤である Suni および Van 投与により MTC 細胞は阻害剤の濃度依存性に増殖抑制効果を示した。濃度が高くなるに Suni が高い阻害効果を示す傾向がみられたが、両薬剤の効果に有意差は認めなかった。50%増殖抑制濃度は Suni 0.38 μ M, Van 0.44 μ M であり、Suni は現在根治不能な甲状腺髄様癌に対し認可された薬剤である Van に匹敵する髄様癌細胞増殖抑制効果が *in vivo* で示された。

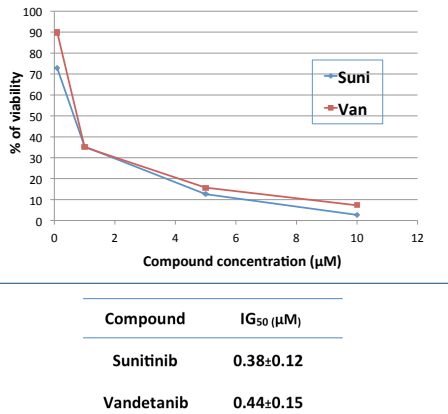


図 1 Sunitinib による MTC 細胞増殖抑制

2) Sunitinib による MTC 細胞遊走能抑制

次に、Suni および Van 投与により MTC 細胞の遊走能が抑制されるか検討を行った。図 2 に示すようにスクラッチ後 18 時間で、コントロールの DMSO 添加に比し、Suni および Van いずれでも MTC 細胞の遊走を抑制した。遊走能抑制効果は 18 時間では Van で Suni に比し有意に高い結果であったが、24 時間後の計測では Van で遊走能抑制効果が高い傾向はみられたが、両薬剤の間に有意差は認めなかった (data not shown)。今回の結果より髄様癌細胞の遊走能抑制には Van がより有効な傾向はあるが、24 時間以上の投与では Suni との間に有意差はなく、Suni の遊走能抑制効果が示された。

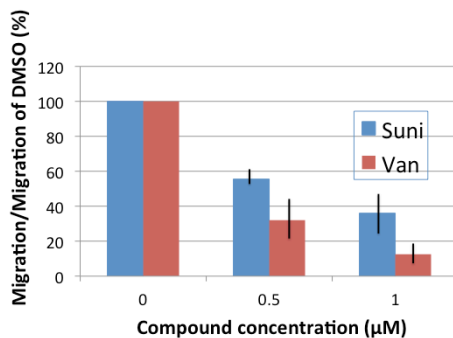


図 2 Sunitinib による遊走能抑制

3) Sunitinib の RET 下流シグナルの抑制

Suni による細胞増殖抑制および遊走能抑制が RET シグナルの抑制を伴うことを示すために、MTC 細胞を Suni, Van 添加で培養の後、lysis を行って Western blot により RET 下流のシグナルのリン酸化を解析した。

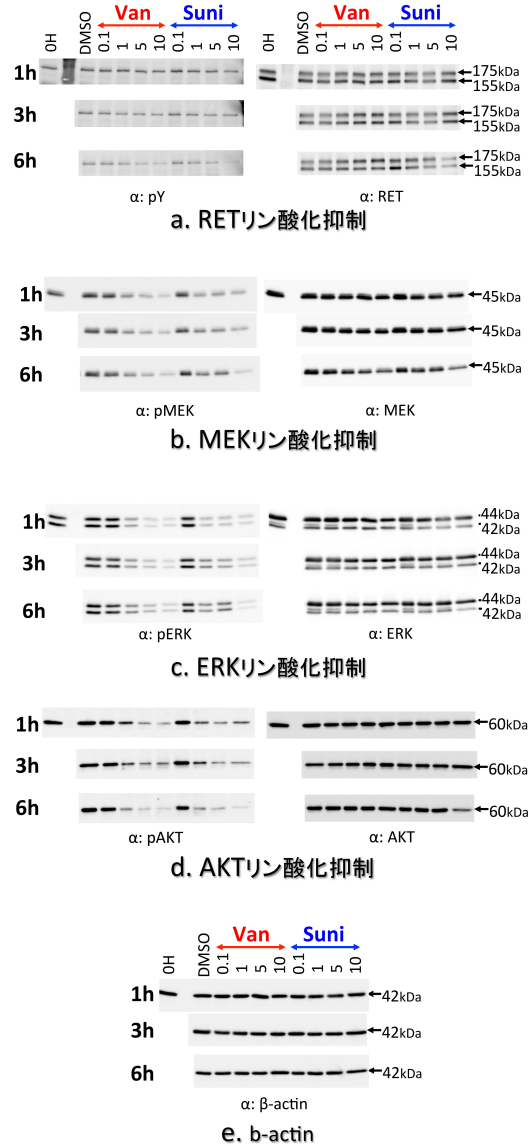


図 3 Sunitinib による RET シグナル抑制

図 3 に示すように、Suni を 6 時間培養上清に添加することで濃度依存的に RET リン酸化抑制を示した。RET リン酸化阻害効果は Suni より Van でやや高い傾向が見られた。RET 下流の RAS/ERK 経路の MEK, p44/42 MAPK は Suni 添加で Van と同等に濃度依存的に、経時的にリン酸化が抑制された。

次に Suni が RET 下流で重要な PI3K/AKT 経路を抑制するかを検討した。Suni 1 μ M 投与 1 時間後より AKT リン酸化が低下し、経時的・濃度依存的にリン酸化抑制が認められた。ERK および AKT のリン酸化抑制効果は Suni では Van より高いことが示された。泳動タンパク量は beta actin の発現で検出

をを行い図 3e に示すように同程度であった。

4) Suni による MTC 細胞の apoptosis 誘導
Suni による細胞増殖抑制へのアポトーシス誘導の関与を検討するため、WB にて caspase 3 の開裂を検討した。

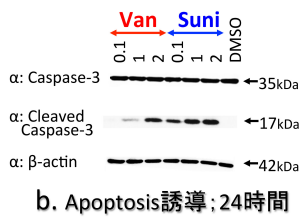
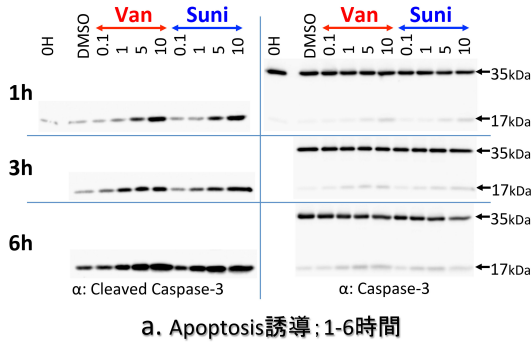


図 4 Sunitinib による apoptosis 誘導

図 4a に示すように 1 時間から 6 時間にかけて Suni 投与により経時的・濃度依存的に Cleaved caspase-3 が増加してアポトーシスの誘導が確認された。6 時間まででは若干 Van のアポトーシス誘導効果が高い傾向がみられた。しかし図 4b に示すように 24 時間投与では、薬剤濃度が 0.1uM と低いにも関わらず、Suni 投与で Cleaved caspase 3 が確認された。以上より、アポトーシス誘導効果は Suni では Van より高いことが示された。

5) 免疫不全マウスでの MTC 細胞移植腫瘍への Sunitinib 投与による腫瘍縮小

3ヶ月齢の免疫不全マウス SHO mouse 背部皮下に MTC 細胞を 4.8×10^6 個接種し、2ヶ月後より 3 週間 Suni または溶媒の Cremophor/EtOH 蒸留水を投与し、3 週間の投与終了後に解剖し腫瘍サイズの計測を行った。腫瘍の薬剤投与前後でのサイズ比 post/pre では、コントロール投与群 21.9 ± 18 に対し、Suni 投与群では 17.7 ± 8.9 と Suni 投与群で腫瘍の縮小傾向がみられたが、有意差は認めなかった。

6) MoMuLV/RET-MEN2A への Sunitinib 投与の検討

3ヶ月齢の MoMuLV/RET-MEN2A に 3 週間 Suni または溶媒の Cremophor/EtOH 蒸留水を投与し、3 週間の投与終了後に解剖し甲状腺腫瘍サイズの計測を行った。甲状腺腫瘍はコントロール投与群 $7.17 \pm 2.8 \text{ mm}^3$ に対し、Suni 投与群では 4.57 ± 2.0 と Suni 投与により甲状腺腫瘍の有意な縮小が認められた

($p < 0.05$)。

7) MoMuLV/RET-MEN2A 甲状腺腫瘍のチロシンリン酸化タンパクの LC/MS 分析

次に、MoMuLV/RET-MEN2A 甲状腺腫瘍で RET 活性化に伴うリン酸化タンパク質の網羅的解析を行うため、リン酸化タンパク質の濃縮を抗 phospho tyrosine 抗体(pY)での免疫沈降(IP)により行った。

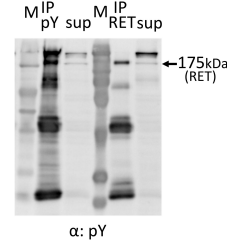


図 5 MoMuLV/RET-MEN2A 甲状腺腫瘍組織免疫沈降産物の WB

図 5 に示すように pY および RET での免疫沈降で明瞭な RET のバンドが確認された。この IP 産物を trypsin で in solution digestion を行い、Orbitrap Fusion を用い LC/MS 分析を行った。pY の IP 産物で 208 タンパク質、pRET の IP 産物で 292 タンパク質が同定され、うち 150 のタンパク質が pY と RET 両抗体で共沈していた。興味深いことに RET での IP では導入したヒト変異 RET 遺伝子由来のヒト RET タンパクとともに mouse の内在性 ret タンパクが確認されたが、pY ではヒト RET タンパクのみが確認され、内在性 mouse ret タンパクはリン酸化をうけていないことが示唆された。

accession	description	MW(kDa)	score	
			Pe1	PeRET
Q9R0G1	Kat11 family-transferring protein 5 [RFP5]	69.5	461.22	549.42
P34152	Focal adhesion kinase 1 OS=Mus musculus GN=FAK2 [FAK1]	123.5	337.06	
Q68FF6	ARF GTPase-activating protein GAT1 [GAT1]	85.2	227.82	
Q9E628	Rho guanine nucleotide exchange factor 7 [RHOGEF7]	97.0	206.98	
Q9E522	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1 [SHBP1]	133.5	206.45	
Q3UN00	Src kinase-activated phosphatase 2 [SAP2]	40.7	101.17	65.94
Q9M02	ARF GTPase-activating protein GAT2 [GAT2]	78.7	75.58	
Q9CQD8	IQM domain-containing protein 1 [IQM1]	71.4	67.25	
Q730E5	AFGAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 [SAP2]	106.7	32.20	77.54
R0P252	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit, alpha-2 [GNAB2]	40.5	30.53	
Q35601	FYH-binding protein OS=Mus musculus GN=Fyb PE=1 SV=2 [-FYB_MOUSE]	90.0	28.20	54.75
A2A859	Rho GTPase-activating protein 27 [RHG27]	97.0	27.90	
Q96631	Growth factor receptor-bound protein 2 [GRB2]	25.2	20.15	
P8WU2	FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 1 [FARP1]	118.8		16.11

図 6 甲状腺腫瘍組織 IP 産物 LC/MS 分析結果の抜粋

図 6 に pY および RET で IP した産物の LC/MS 分析結果の抜粋を示すが、MoMuLV/RET-MEN2A 甲状腺腫瘍では種々の MAPK 経路のタンパク質や cell adhesion, 細胞骨格関連タンパク質がリン酸化を受け、また RET と共沈していた。この中で Focal adhesion kinase 1(FAK1)が高いリン酸化を示したが、これまでの報告にもあるように RET が高いリン酸化を示す今回の腫瘍組織において、FAK1 は RET で共沈がみられなかった。今回新たに FAK1 と同様

FERM domain を持つ FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 1 がリン酸化された RET と共沈してきており、今後さらなる解析を行っていく予定である。

7) MoMuLV/RET-MEN2A 甲状腺腫瘍における網羅的タンパク解析

Accession #	Name	114wt:116TG
sp P32848 PRVA	Parvalbumin alpha	38.31417625
sp P07310 CRM	Creatine kinase M-type	35.33568905
sp O09165 CASG1	Calsequestrin-1	29.41176471
sp O6VCT4 CES3	Carboxylesterase 3	14.32664756
sp A2AS58 TTTN	Titin	13.29787234
sp O08710 TYG	Thyroglobulin	11.69590943
sp P70160 CALC	Calcitonin OS=Mus musculus GN=Calca PE=2 SV=1	7.04211635
sp P08249 MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial	6.426135219
sp O920F7 SYUG	Gamma-synuclein OS=Mus musculus GN=Snca PE=1 SV=1	3.698224852
sp P26339 CMGA	Chromogranin-A	2.729257642
sp O903D8 ATPD	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	2.4431957
sp P08228 SODC	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	2.249212776
sp P97855 G3BP1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	1.995211492
sp O908X2 CC124	Coiled-coil domain-containing protein 124	1.629195178
sp O922Y9 PROSC	Proline synthase co-transcribed bacterial homolog protein	1.584786054
sp O62WNU AQB	N-alpha-acetyltransferase 3B, Na/C auxiliary subunit	1.235441169
sp P02089 HBZ2	Hemoglobin subunit beta-2	1.056859015
sp O62418 DBNL	Drebrin-like protein	1.018641133
sp P51125 ICAL	Calpastatin	1
sp O9WVA4 TAGL2	Transgelin-2	0.903668996
sp O08795 GLUB2	Glucosidase 2 subunit beta	0.772678102
sp O8B9P2 RCN2	Reticulocalbin-2	0.660676533
sp P26350 PTMA	Prothymosin alpha	0.648634624
sp P21107-2 PTM3	Isoform Cytoskeletal of Tropomyosin alpha-3 chain	0.56705057
sp P02088 HBZ1	Hemoglobin subunit beta-1	0.510516643
sp O902Z2 DERM	Dermatopontin	0.492029128
sp P140695 IOA6	Protein S100-A6	0.487319501
sp O90D0J PTMS	Parathyromosin	0.432507244
sp P13020 GELS	Gelsolin	0.42462845
sp P18221 THRB	Prothrombin	0.38810502
sp O01149 CO1A2	Collagen alpha-2(I) chain	0.38083874
sp P04186 CFAB	Complement factor B	0.373245745
sp O61128 CFI1	Complement factor I	0.277970813
sp P47879 IBP4	Insulin-like growth factor-binding protein 4	0.239882937
sp O07456 AMBP	Protein AMBP	0.16030038
sp P07759 SPA3K	Serine protease inhibitor A3K	0.131825252
sp O91X72 HEMO	Hemopexin	0.092044586
sp P29899 FETUA	Alpha-2-HS-glycoprotein	0.07728131
sp O6FZED MUC19	Mucin-19	0.066680447
sp O08677-2 KNG1	Isoform LMW of Kininogen-1	0.063095882
sp P50404 SFTPD	Pulmonary surfactant-associated protein D	0.057016444
sp P07724 ALBU	Serum albumin	0.039084027
sp O92111 TRFE	Serotransferrin	0.036643728
sp P21614 VTDB	Vitamin D-binding protein	0.021877625

最後に野生型マウス甲状腺組織と MoMuLV/RET-MEN2A 甲状腺腫瘍とを用い、trypsin で in solution digestion の後、iTRAQ ラベルを行い、TripleTOF™ 5600 で分析し野生型と MoMuLV/RET-MEN2A でのタンパク質発現量の比の検討を行った。

図 7 野生型マウス甲状腺と MoMuLV/RET-MEN2A 甲状腺腫瘍組織 I での iTRAQ 分析結果の抜粋

iTRAQ 分析の結果の抜粋を図 7 に示すが、確かに甲状腺腫瘍組織において Calcitonin, Chromogranin-A, Thyroglobulin と呼んだ甲状腺特異的タンパクの発現量上昇が MoMuLV/RET-MEN2A 甲状腺腫瘍組織において確認された。転移との相関を示す thymosin や parathyromosin, Insulin growth factor シグナルと関連する分子など興味深い分子の発現変化が同定されているが、リン酸化レベルの解析はまだまだ途中であり、今後野生型甲状腺と腫瘍の間だけでなく、甲状腺腫瘍組織での Suni 投与によるタンパク質発現やリン酸化状態の変化の解析を進めていく予定である。

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 4 件)

① 川井久美, 高橋雅英, RET 遺伝子研究の歩

みと甲状腺癌、Thyroid Cancer Explore、査読無、vol.2、No.2、pp.25-31、2016

② 川井久美, 榎本篤、多発性内分泌腫瘍症、病理と臨床、査読無、vol.34、pp.375-377、2016

③ Nahoko Nishimura, Kumi Kawai 他、Fat embolism syndrome: an autopsy-proven case involving a patient on dialysis and systemic scleroderma、Clinical medicine insights case reports、査読有、vol.7、pp.7-12、2014

④ Kaho Fujii, Kumi Kawai 他、Ovarian mucinous tumors arising from mature cystic teratomas- a molecular genetic approach for understanding the cellular origin、Human pathology、査読有、vol.45、pp.717-724、2014

[学会発表] (計 4 件)

① 高須大輔, 川井久美 他、第 11 回日本臨床検査学教育学会学術大会、切片厚が乳癌 HER2 免疫染色に及ぼす影響、2016 年 9 月 1 日、神戸

② 船戸連嗣, 川井久美 他、第 104 回日本病理学会総会、MEN2A 型変異 RET を有する甲状腺腫瘍がん細胞におけるチロシンキナーゼ阻害薬の効果の検討、2015 年 4 月 30 日、名古屋

③ 川井久美、徒然病理医絵巻 女性病理医の日常 第 104 回日本病理学会総会、2015 年 4 月 30 日、名古屋

④ 川井久美、山田徳香、村上秀樹、高橋雅英 他、キナーゼ阻害剤バンデタニブとスニチニブによる甲状腺腫瘍細胞阻害効果の解析、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25 日、横浜

[図書] (計 2 件)

① 川井久美 他、医学書院、標準理学療法学・作業療法学 病理学第 4 版、295 (2017)

② 川井久美 他、文光堂、スタンダード病理学第 4 版、543 (2015)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川井久美 (KAWAI, Kumi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50362231

(2) 研究分担者

高橋 雅英 (TAKAHASHI, Masahide)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40183446

村上 秀樹 (MURAKAMI, Hideki)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90303619

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

山田徳香 (YAMADA, Norika)