

令和元年6月4日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05419

研究課題名(和文)腫瘍細胞内のチロシンキナーゼ活性化部位の同定とそれに基づく創薬基盤の開発

研究課題名(英文) Identification of intracellular activation sites of mutated tyrosine kinases in tumor cells and drug development based on the cellular localization

研究代表者

西田 俊朗 (Nishida, Toshiro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・病院長

研究者番号：40263264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：GISTの主な原因であるKITチロシンキナーゼの活性化変異体がゴルジ体に局在し、増殖シグナル発信していることを明らかにした。ゴルジ体に集積したKITは、小胞体で新規合成され初期分泌を受けたもので、ゴルジ体停留は自身のキナーゼ活性に依存することを明らかにした。一方、KIT阻害剤イマチニブの細胞内分布は、イマチニブに蛍光分子を付加したライブイメージングでは、大部分のイマチニブは二次リソソームに集積していた。詳細な解析から、イマチニブはリソソーム膜へ集積していた。イマチニブ抗体による免疫染色でも同様の結果を得た。

以上より、標的～阻害剤の細胞内分布の点からは、分子標的薬の改善点の余地が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GISTの原因であるKIT遺伝子変異に伴うKITキナーゼ変異体がゴルジ体に集積し、ゴルジ体のみ自己活性化し、増殖シグナルを出しており、新規に合成された(変異)KITのER→ゴルジ体の輸送を阻害することで、イマチニブ感受性株も耐性株も増殖抑制され、細胞死に至る発見は、分子標的薬に耐性になったドライバー遺伝子変異をもつがん腫治療に新しい方法論の道筋を示した。同時に、自己活性化した変異KITと阻害剤イマチニブが、細胞内で不均等分布を示すことは、ドライバー遺伝子変異に対し開発された、或いは、開発段階にある標的治療薬の細胞内分布の重要性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Mutated KIT tyrosine kinase, a major cause of gastrointestinal stromal tumor (GIST), mainly locates in the Golgi apparatus and activates downstream kinases. The KIT protein accumulated and activated in the Golgi apparatus is newly synthesized in ER and is transferred to the Golgi, and its Golgi accumulation appears to depend on the activation of KIT kinase. On the contrary, imatinib, a specific inhibitor of KIT tyrosine kinase, is indicated to be piled up in the secondary lysosomes using imatinib modified with fluorescents (NBD, BODIPY) or antibody to imatinib. Detailed analysis suggests that imatinib-fluorescents locate on the outer lysosomal membrane. These results indicate that the subcellular distribution of the target (KIT) and its inhibitor (imatinib) do not always harmonized with, suggesting room for improvement of the molecularly-targeted agents.

研究分野：消化器外科

キーワード：GIST Kit 分子標的薬 イマチニブ 細胞内分布

1. 研究開始当初の背景

臨床的な消化管間質細胞腫 (gastrointestinal stromal tumor: GIST) は、消化管に発生する比較的稀な悪性腫瘍である。申請者等の研究で受容体型チロシンキナーゼの *KIT* 或いは *PDGFRA* 遺伝子の gain-of-function mutations が腫瘍化と腫瘍細胞増殖の原因であることが明らかにされた (Hirota et al., *Science*, 1998; Nishida et al., *Nat. Genet.*, 1998; Hirota et al., *Gastroenterology*, 2003)。その後、GIST を対象に固形腫瘍で初めて *KIT* チロシンキナーゼを標的とした分子標的治療開発が行われ、国内外で申請者等は臨床試験に関与しイマチニブ・スニチニブ・レゴラフェニブの開発を行い、進行・再発 GIST 患者の予後を大きく改善した (Nishida et al., *Int. J. Clin. Oncol.*, 2008; Sawaki et al., *Cancer*, 2011; Demetri et al., *Lancet*, 2013)。以後、肺がん・大腸がん・乳がん等々で特定のドライバー遺伝子変異を標的とした分子標的治療薬が開発され、各がん種のドライバー遺伝子変異を持つ希少フラクションで画期的な予後改善が見られた。しかし、GIST を含め何れの標的治療でも、変異標的へのオンターゲット効果に加え、正常標的や他のキナーゼ阻害などオフターゲット作用で生じる有害事象 (AE) で、腫瘍細胞を消滅させるほど抗がん効果を発揮できず、全ての症例で治療後も腫瘍細胞が生き残り、最終的にその中から薬剤耐性腫瘍細胞 (多くの場合標的遺伝子の二次遺伝子変異) が生じ、治療効果が無くなることが明らかになった。従って、耐性変異を伴った腫瘍細胞にも効果があり、安全で、より有効な治療薬や治療法が求められている。例えば、標的腫瘍細胞のドライバー遺伝子変異キナーゼに作用し、オンターゲット効果のみを發揮させて治療効率を高めることで更なる予後改善と AE を低減し QOL の改善が期待できる。

申請者等は GIST を中心に、この二次耐性の現れる要因と腫瘍細胞内での変異チロシンキナーゼの活性化に伴う増殖機構を研究してきた。その過程で、(1) 二次遺伝子変異は治療前から存在するとは言えず、治療後生き残った Src-family kinases の活性化等を伴った特徴的な表現型を持つ細胞集団 (persistent tumor cells) から生じている事 (Takahashi et al., 2013, *Int. J. Cancer*), (2) マスト細胞白血病では、正常とは異なり変異 *KIT* がエンドリソソームに局在し、細胞増殖が起こっていることを見出した (Obata et al. *Nat. Commun.*, 2014)。変異チロシンキナーゼが正常カウンターパートとは異なる細胞内小器官で活性化している事は他の肺がん (EGFR) 等でも指摘されている (Chung et al., 2009, *BMC Cell Biol.*)。これまでに、申請者は GIST で臨床検体と GIST cell lines を用い、細胞膜に輸送されリガンド SCF と結合し活性化する wild-type *KIT* とは異なり、変異 *KIT* は核近傍に留まり活性化していることを示唆するデータを得た。一方で、標的治療薬 (例えば、イマチニブ) の細胞内分布と動態に関しては、その詳細は全く不明である。

2. 研究の目的

近年、ドライバー変異を持つがんで、変異キナーゼが正常キナーゼとは異なる細胞内小器官で活性化していることが肺がん・マスト細胞腫・GIST 等で指摘されている。申請者の研究では GIST の変異 *KIT* 活性化は核近傍で生じることが示唆され、一方、イマチニブ細胞内分布の詳細は不明である。本研究は GIST の臨床検体と細胞株を用い、I. 細胞内の変異 *KIT* 局在化の詳細部位を同定、その分子機構を解明し、II. 臨床使用濃度でのイマチニブの細胞内動態・分布の解明、III. 変異 *KIT* が細胞内で局在するオルガネラに集積する *KIT* 阻害剤を開発し、細胞内ドラッグデリバリー手法の基礎的開発を行うことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

GIST における *KIT* シグナルの場の理解, 分子機構の解明: GIST 患者から樹立された細胞株 (イマチニブ感受性または耐性) および臨床標本 (腫瘍切片・パラフィンブロック) において、*KIT* およびオルガネラマーカを免疫蛍光染色し、共焦点レーザースキャン顕微鏡で局在解析をおこなった。さらに、抗リン酸化 *KIT* 抗体を用いて、*KIT* 活性のイメージン

グを試みた。その後、KIT の細胞内輸送をプレフェルジン A (brefeldin A: BFA), monensin, パフィロマイシン A1 (bafilomycin A1: bafA1) などによって抑制した時の KIT シグナルへの影響を免疫沈降法とウェスタンブロッティングを組み合わせて調べた。KIT のオルガネラ集積の分子機構については、複数の化合物の中から、異常局在を解除するものをスクリーニングした。

イマチニブの細胞内分布の解析, 化学修飾による分布制御: イマチニブに蛍光分子を直接付加したものや、TCO を付加して tetrazine-BODIPY を加えると蛍光を発するようにしたイマチニブを、時間・空間分解能が極めて高いシステム (SCLIM) でライブイメージングした。また、抗イマチニブ抗体で固定細胞を免疫染色し、オルガネラマーカーと比較した。さらに、イマチニブにスフィンゴシンを結合させた化合物を合成した。

4. 研究成果

GIST における KIT のシグナルの場の理解とその原因となる分子機構の解明

GIST 細胞株 (GIST-T1) において、KIT 変異体は、異常に核近傍領域に集積しており、その領域はゴルジマーカー (GM130 および golgin97) の分布と一致した (図 1A)。KIT のゴルジ体への集積は、細胞株のみではなく、臨床検体 (腫瘍切片) でも検出された (図 1B)。ゴルジ体に集積した KIT は、小胞体で新規合成された後に初期分泌を受けたものであり、さらに、自身のチロシンキナーゼ活性に依存して停留していることを明らかにした。KIT の活性化の指標である自己リン酸化 (pY568/570/721/730/823/936) は、ゴルジ領域に局限して起きていた (図 1C)。興味深いことに、イマチニブ感受性 (GIST-T1), 抵抗性 (GIST-R8/R9, GIST48/430) のどの細胞株でも、KIT 変異体は、変異のタイプに関係なくゴルジ体に集積し、そこからがん増殖シグナルを発信していた。また、阻害剤 (イマチニブ, BLU-285, PKC412) を投与し KIT 変異体の自己活性化を阻害すると、KIT 変異体はゴルジ体集積せず細胞膜に移動した。本研究成果は、GIST における KIT 変異体の異常局在およびシグナルプラットフォームを解明し、増殖シグナルが発信されるメカニズムの理解を深めるものであると考えられる。さらに、KIT の小胞体→ゴルジ体の輸送を抑制すると、KIT シグナル (KIT 下流のシグナルカスケード活性化: Akt, Erk, STAT5 活性化) が抑制され、ゴルジ→細胞膜, エンドソーム輸送を阻害しても KIT シグナルには影響無いことを見出した。則ち、KIT のシグナルプラットフォームへの移行を抑制することは、実臨床で問題となっているイマチニブ抵抗型変異 KIT を伴う耐性腫瘍の新たな治療戦略となるものと期待される。

イマチニブの細胞内分布の解析, 化学修飾による分布制御

イマチニブ (IMA) に BODIPY, NBD を付加した BODIPY-IMA, NBD-IMA を合成し、GIST-T1 細胞に処理し、ライブイメージングおよび固定細胞での観察をおこなった。他グループの先行研究では、数十 μM の IMA を処理した細胞でのライブイメージング (ラマン散乱顕微鏡/蛍光イメージング) がおこなわれているが、本実験では、 $1\mu\text{M}$ 以下で検出可能だった。BODIPY-IMA, NBD-IMA 共に、核周辺に小胞上に広く分布していた (図 2)。IMA が分布する小胞は LysoTracker の分布と一致し、超解像観察

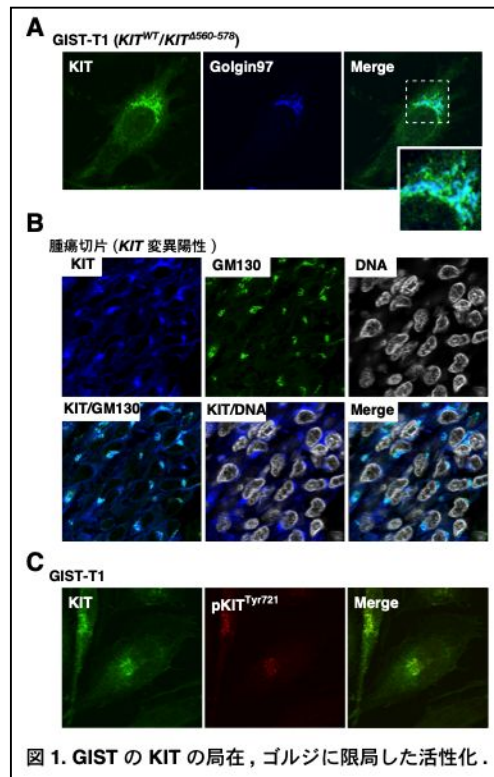


図 1. GIST の KIT の局在, ゴルジに局限した活性化.

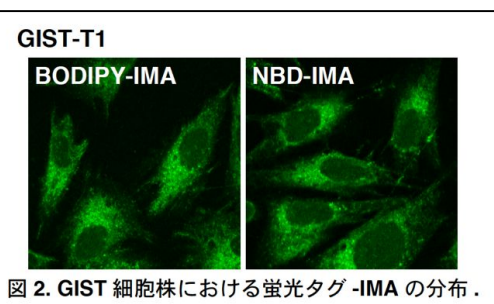


図 2. GIST 細胞株における蛍光タグ-IMA の分布.

では、リソソーム膜に挿入されていることが示唆された。TCO-IMA 処理細胞に tetrazine-IMA を加えて蛍光を発するようにしたシステムでも同様の結果が得られた。さらに、抗 IMA 抗体と複数のオルガネラマーカによる免疫染色を試みたところ、IMA は、大部分がリソソームに集積していた。これらの結果は、IMA は、GIST の KIT を抑制してはいるが、細胞内分布の点で、治療薬-標的分布が一致せず、改良の余地があることを示唆する。現在、IMA の細胞内分布の変化を期待して、スフィンゴシン等の化学修飾を施したものを作出し、イメージングと生化学解析をおこなっている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件)

Yasunaga M, Saijou S, Hanaoka S, Anzai T, Tsumura R & Matsumura Y.: Significant antitumor effect of an antibody against TMEM180, a new colorectal cancer-specific molecule. *Cancer Sci.* 110, 761-770 (2019)

Kurokawa K, Osakada H, Kojidani T, Waga M, Suda Y, Asakawa H, Haraguchi T & Nakano A.: Visualization of secretory cargo transport within the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 218, 1602-1618 (2019)

Nishida T.: Asian consensus guidelines for gastrointestinal stromal tumor: what is the same and what is different from global guidelines. *Transl. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 11 (2018)

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 Lett.* 415, 1-10 (2018)

Sugase T, Takahashi T, Serada S, Fujimoto M, Ohkawara T, Hiramatsu K, Nishida T, Hirota S, Saito Y, Tanaka K, Miyazaki Y, Makino T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Nakajima K, Hanasaki K, Kishimoto T, Mori M, Doki Y & Naka T.: SOCS1 gene therapy has antitumor effects in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor cells through FAK/PI3 K signaling. *Gastric Cancer*, 21, 968-976 (2018)

Yasunaga M, Manabe S, Furuta M, Ogata K, Koga Y, Takashima H, Nishida T & Matsumura Y.: Mass spectrometry imaging for early discovery and development of cancer drugs. *AIMS Med. Sci.*, 5, 162-180 (2018)

Fuchigami H, Manabe S, Yasunaga M & Matsumura Y.: Chemotherapy payload of anti-insoluble fibrin antibody-drug conjugate is released specifically upon binding to fibrin. *Sci. Rep.* 8, 14211 (2018)

Kurokawa K & Nakano A.: The ER exit sites are specialized ER zones for the transport of cargo proteins from the ER to the Golgi apparatus. *J. Biochem.* 165, 109-114 (2018)

Obata Y, Horikawa K, Takahashi T, Akieda Y, Tsujimoto M, Fletcher JA, 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 (2017)

Nishida T.: Therapeutic strategies for wild-type gastrointestinal stromal tumor: is it different from KIT or PDGFRA-mutated GISTs? *Transl. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 92 (2017)

Kanda T, Masuzawa T, Hirai T, Ikawa O, Takagane A, Hata Y, Ojima H, Sodeyama H, Mochizuki I, Ishikawa T, Kagimura T & Nishida T.: Surgery and imatinib therapy for liver oligometastasis of GIST: a study of Japanese Study Group on GIST. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 47, 369-372 (2017)

Takahashi T, Elzawahry A, Mimaki S, Furukawa E, Nakatsuka R, Nakamura H, Nishigaki T, Serada S, Naka T, Hirota S, Shibata T, Tsuchihara K, Nishida T & Kato M. Genomic and transcriptomic analysis of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 56, 303-313 (2017)

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 (2017)

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 (2017)

Yasunaga M, Manabe S, & Matsumura Y.: Immunoregulation by IL-7R-targeting antibody-drug conjugates: overcoming steroid-resistance in cancer and autoimmune disease. *Sci. Rep.* 2017 7, 10735 (2017)

Nishida T, Goto O, Raut CP & Yahagi N.: Diagnostic and treatment strategy for small gastrointestinal stromal tumors. *Cancer*, 122, 3110-3118 (2016)

Nishida T & Doi T.: Pazopanib for both GIST and soft-tissue sarcoma. *Lancet Oncol.* 17, 549-550 (2016)

Nishida T, Tsujimoto M, Takahashi T, Hirota S, Blay JY & Wataya-Kaneda M. Gastrointestinal stromal tumors in Japanese patients with neurofibromatosis type I. *J. Gastroenterol.* 51, 571-578 (2016)

Kurokawa K, Suda Y & Nakano A.: Sar1 localizes at the rims of COPII-coated membranes *in vivo*. *J. Cell Sci.* 129, 3231-3237 (2016)

〔学会発表〕(計9件)

Kurokawa K, Ikeda A, Funato K, Muñiz M & Nakano A.: Visualization of GPI-anchored proteins sorting in the ER. 第70回日本細胞生物学会・日本発生生物学会合同大会(東京, 2018, 6)

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: 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)

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)

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)

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)

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)

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)

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)

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)

〔図書〕(計2件)

黒川量雄 小胞体からゴルジ体へのタンパク質選別輸送. 生体の科学 69巻, p532-535, 2018年

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, p44-49, 2017 年

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

該当無し

取得状況 (計 0 件)

該当無し

〔その他〕

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 安永正浩

ローマ字氏名: Yasunaga Masahiro

所属研究機関名: 国立がん研究センター東病院

部局名: 新薬開発分野

職名: ユニット長

研究者番号 (8 桁): 80450576

研究分担者氏名: 眞鍋史乃

ローマ字氏名: Manabe Shino

所属研究機関名: 理化学研究所

部局名: 開拓研究本部

職名: 専任研究員

研究者番号 (8 桁): 60300901

研究分担者氏名: 黒川量雄

ローマ字氏名: Kurokawa Kazuo

所属研究機関名: 理化学研究所

部局名: 光量子工学研究センター

職名: 専任研究員

研究者番号 (8 桁): 40333504

研究分担者氏名: 小幡裕希

ローマ字氏名: Obata Yuuki

所属研究機関名: 東京理科大学

部局名: 生命医科学研究所

職名: 講師

研究者番号 (8 桁): 20609408

(2) 研究協力者

該当無し

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。