

平成 30 年 4 月 20 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18427

研究課題名(和文) GISTにおけるKit活性の時空間解析：オルガネラのみで起こるがんシグナリング

研究課題名(英文) Spatio-temporal analysis of Kit signalling in GIST: oncogenic signals on intracellular compartments

研究代表者

小幡 裕希 (Yuuki, Obata)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・講師

研究者番号：20609408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：消化管間質細胞腫(GIST)は、胃・小腸・大腸の筋層に発症する肉腫であり、約85%の症例でKitチロシンキナーゼの活性化変異が認められる。そのため、Kit阻害剤イマチニブが治療薬として用いられるが、抵抗型Kitの存在が報告され、その制圧が喫緊の課題となっている。本課題では、GIST患者由来の腫瘍切片や細胞株を用い、イマチニブ抵抗性の有無にかかわらず、Kit変異体がこれまで考えられてきた細胞膜ではなくゴルジに分布し、そこでシグナルを発信していることを明らかにした。本研究は、Kitシグナルの時空間情報を明らかにし、治療薬の効果の正確な理解および新たな治療法の開発の一助となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：GISTs are caused by activating mutations in the Kit tyrosine kinase. Most primary GIST patients respond to the Kit inhibitor imatinib, but this drug often becomes ineffective because of secondary mutations in the Kit kinase domain. The characteristic intracellular accumulation of imatinib-sensitive and -resistant Kit is well documented, but its relationship to oncogenic signaling remains unknown. Here, we show that in cancer tissue from primary GIST patients as well as in cell lines, mutant Kit(Kit(mut)) accumulates on the Golgi. In imatinib-resistant GIST with a secondary Kit mutation, Kit localizes on the Golgi. Furthermore, Kit(mut) on the Golgi signals and activates Akt and STAT5. Blocking the biosynthetic transport of Kit(mut) to the Golgi from the ER inhibits oncogenic signaling. These results suggest that the Golgi serves as a platform for oncogenic Kit signaling. Our study may offer a new strategy for treating imatinib-resistant GISTs.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：消化管間質細胞腫 Kitチロシンキナーゼ ゴルジ体 PI3K-Akt経路 STAT5 Mek-Erk経路

1. 研究開始当初の背景

消化管間質細胞腫 (gastrointestinal stromal tumor: GIST) は、胃・小腸・大腸の筋層に生じる肉腫であり、日本では 10 万人に 1~2 人 (年間 1000~2000 人) が発症する。GIST の治療の第一選択は、外科的摘出だが、その約 30% のケースで再発し、化学療法・放射線療法の効果がほとんど無いため、手術不能となると手の施しようがないがんだった。しかしながら、1998 年に大阪大学 (当時) の北村幸彦博士らの研究グループにより、「GIST は消化管蠕動運動を司るカハル介在細胞 (またはその前駆細胞) に発現する Kit チロシンキナーゼの変異体による恒常的な細胞増殖シグナルが原因で起こる」ことが明らかにされ (Hirota et al., 1998, *Science*; Nishida et al., 1998, *Nature Genet.*; Kitamura et al., 2003, *Cancer Sci.*)、治療薬開発におけるブレイクスルーがもたらされた。すなわち、Kit チロシンキナーゼ阻害剤メシル酸イマチニブ (グリベック、ノバルティス・ファーマ) が GIST の増殖を顕著に抑制することが示され (Joensuu et al., 2000, *NEJM*)、患者の寿命は飛躍的に延びた (5 年生存率 92%)。

イマチニブによる GIST の治療は、固形がんで初めての「分子標的治療」の成功例となったが、依然として残っている課題と新たな問題が生じている。そもそも、GIST の Kit 変異体が「細胞内でいつ・どこで・どのようにシグナルを発信するのか」がブラックボックスに包まれており、我々はターゲットである分子の実体を十分に理解していないものと考えられる。また、イマチニブを長期投与 (2 年半から 3 年) すると、突然効果が無くなり、GIST 細胞の再増殖が認められることが新たな問題となっている。現在、その 80% 以上の原因が Kit のイマチニブ抵抗変異の獲得であることが明らかになっているが (Nishida et al., 2008, *Cancer Sci.*; Lasota and Miettinen, 2008, *Histopathology*)、この二次変異体を効果的かつ副作用が少なく阻害する戦略の構築が喫緊の課題となっている。

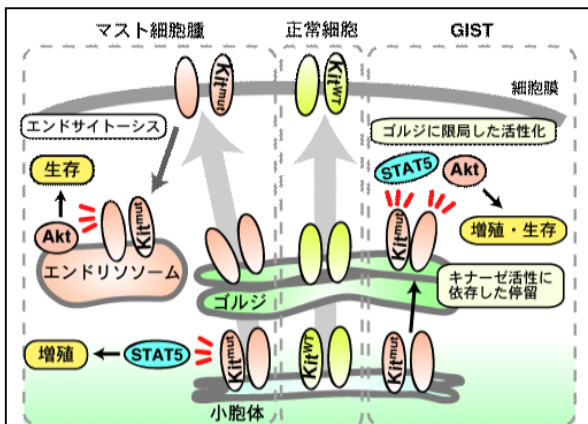


図 1. マスト細胞腫・GIST における Kit のオルガネラシグナリング。マスト細胞腫の Kit はエンドリソソーム・小胞体で Akt, STAT5 をそれぞれ活性化する。それとは異なり、GIST の Kit はゴルジ体でのみ Akt, STAT5 を活性化する。
mut, mutant; WT, wild-type.

2. 研究の目的

近年、我々は、免疫を司るマスト細胞が無限増殖するような白血病の一種のがん (マスト細胞白血病) では、Kit 変異体が、これまで考えられてきた細胞膜ではなくエンドリソソームや小胞体といったオルガネラからがんシグナル (PI3K-Akt 経路, STAT5 転写因子の活性化) を発信することを見出した (Obata et al., 2014; Hara et al., 2017; Toyoshima et al., 2017; 図 1 左)。また、マスト細胞白血病において、Kit のシグナルプラットフォームへの移行をブロックすることが、増殖シグナル抑制に繋がることを報告した (Obata et al., 2014; Hara et al., 2017)。

本研究の目的は、その研究成果をマスト細胞白血病以外の研究に発展させるものであり、GIST の Kit 変異体が (1) どのオルガネラに集積し、どこからシグナルを発信するのか、(2) それはイマチニブへの抵抗型変異の獲得によって変化するのかを明らかにし、(3) その理解を新たな治療戦略の構築に繋げることである。したがって、本研究は、腫瘍生物学的にも医薬学的にも意義深いものになると考えられる。

3. 研究の方法

GIST 患者から樹立された細胞株 (イマチニブ感受性, GIST-T1, GIST882; イマチニブ耐性, GIST-R8, GIST-R9) および臨床標本 (パラフィンブロック由来の腫瘍切片) において、抗 Kit 抗体およびオルガネラマーカーで免疫蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡で局在解析をおこなった。多点イメージングで得られた蛍光値を定量し、共局在の指標としてピアソン相関係数を算出して有意差検定をおこなった。また、細胞表面の Kit を、細胞外ドメインを認識する抗体で染色し、フローサイトメーターで測定・定量した。さらに、抗リン酸化 Kit 抗体および抗チロシンリン酸化抗体を用いて、Kit 活性のイメージングを試みた。また、Kit シグナルを調べる目的で、下流の Akt, STAT5, Erk のリン酸化をウェスタンブロッティングで解析した。

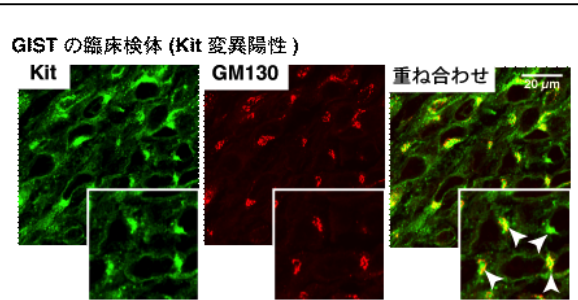


図 2. GIST の臨床標本における Kit の局在解析。GIST における Kit は、これまで考えられてきた細胞膜ではなく、ゴルジ体に局在している。緑, Kit; 赤, ゴルジマーカー

蛋白質間相互作用の解析には、抗 Kit 抗体による共免疫沈降法を用いた。さらに、Kit の細胞内輸送をブレフェルジン A (brefeldin A: BFA), モネンシン, バフィロマイシン A1 (bafilomycin A1: bafA1), ツニカマイシン, サイトカラシン D, Pitstop2, Filipin などによって抑制した時の Kit シグナルへの影響を調べた。細胞増殖は、トリチウムチミジンの DNA への取り込みで、また、足場非依存性の増殖は、アガロース上での培養と MTT アッセイによって測定した。

4. 研究成果

免疫染色法と共焦点レーザー顕微鏡によって局在解析をおこなったところ、GIST 細胞株 (GIST-T1, GIST882, イマチニブ感受性) において、Kit 変異体は、明らかに異常に核近傍領域に集積しており、細胞膜にはほとんど見られなかった。オルガネラマーカとの共染色により、その領域は小胞体でもエンドソーム・リソソームでもなく、ゴルジ体 (特にトランス側) であることが明らかになった。Kit のゴルジ体への集積は、細胞株のみではなく、GIST 患者の臨床標本でも検出された (図 2)。すなわち、GIST における Kit 変異体は、これまで考えられてきた細胞膜ではなく、ゴルジ体に局在することが明らかになった (図 1 右)。マスト細胞のがんにおける Kit のエンドリソソーム局在と明らかに異なることは興味深い。

エンドサイトーシス阻害剤 (サイトカラシン D, Pitstop2, Filipin) は、Kit の局在に影響を与えず、ゴルジ体への集積は維持されていた。すなわち、ゴルジ体に集積した Kit は、エンドサイトーシスによって内在化したものではなく、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ることが示唆された。さらに、Kit キナーゼ阻害剤イマチニブを処理することで Kit のゴルジ局在が有意に減少し、細胞膜局在が増加した。これらの結果は、GIST における Kit 変異体は、キナーゼ活性に依存してゴルジ体に停留していることを示すものである (図 1 右)。

Kit の活性化の指標である自己リン酸化をイメージングしたところ、Kit 活性は、核近傍ゴルジ領域に限局して認められた。また、この細胞のチロシンリン酸化シグナルの大部分はゴルジ体で起きており、Kit 下流の PI3K-Akt 経路, Mek-Erk 経路, STAT5 がゴルジ体で活性化されることを示唆するデータが得られた。興味深いことに、イマチニブ抵抗型 Kit 変異体の発現が認められる GIST 細胞株 (GIST-R8, GIST-R9) でも、臨床標本でも、Kit はゴルジ体からがんシグナルを発信していることが明らかとなった (Obata et al., 2017, 2018)。シグナルプラットフォームであるゴルジ体以外に分布する Kit が下流分子を活性化できない理由については、脱リン酸化酵素の役割が示唆されている。少なくとも、小胞体の

Kit のリン酸化はホスファターゼ阻害剤でレスキューされることから、ゴルジ体ではそのような負の調節機構が破綻していることが示唆された。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顕著に深めるものであると考えられる。

さらに我々は、Kit 変異体の小胞体→ゴルジ体の輸送を抑制した時に、Kit シグナルが抑制され、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 (Obata et al., 2017, 2018)。すなわち、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 Kit の新たな阻害戦略となるものと期待される。

今後は、① Kit 変異体が原因の一つであると報告されている急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML, CBF タイプ), 粘膜メラノーマにおける Kit シグナルが、どのオルガネラで起きているのか、② マスト細胞のがん・GIST・AML・粘膜メラノーマにおける Kit の異常局在の原因となる分子機構の解析、③ 他のがんにおける他の変異型チロシンキナーゼのシグナルの場の解明、④ シグナルプラットフォームの理解を応用した副作用が少なく効果的な治療法の開発をおこないたい。

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 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 Letters, 415, 1-10. doi: 10.1016/j.canlet.2017.11.032 (2018) 査読有り

② Obata, Y., Horikawa, K., Takahashi, T., Akieda, Y., Tsujimoto, M., Fletcher, J.A., 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. doi: 10.1038/onc.2016.519 (2017) 査読有り

③ 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. doi: 10.1371/journal.pone.0175514 (2017) 査読有り

④ 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. doi: 10.1093/intimm/dxx005 (2017) 査読有り

〔学会発表〕 (計 8 件)

① 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
イマチニブ耐性 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)

② 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)

③ 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)

④ 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)

⑤ 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)

⑥ 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)

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: ゴルジ体に局限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)

⑧ 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 1 件)

① 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-p49, 2017 年

〔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

東京理科大学
<http://www.tus.ac.jp>

東京理科大学生命医科学研究所
<http://www.ribs.tus.ac.jp>

東京理科大学 生命医科学研究所
免疫生物学研究部門 安部研究室
tus-ribsjm.clsv.jp/immunology/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小幡 裕希 (Yuuki Obata)

東京理科大学・生命医科学研究所・講師

研究者番号： 20609408

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

研究者番号：

(4) 研究協力者