

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07208

研究課題名(和文) GIST・血液がん・メラノーマのKitの異常局在とそこから発信されるがんシグナル

研究課題名(英文) Oncogenic Kit signaling on intracellular compartments in leukemia, melanoma, and GIST

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：消化管間質細胞腫(GIST)、急性骨髄性白血病(AML)等の原因の一つとして知られているKITチロシンキナーゼの活性化変異体の異常な細胞内局在と増殖シグナルの関係、異常局在の分子機構の解明に取り組んだ。AMLのKITは、主にエンドソーム系に局在するものの、シグナルは主にゴルジ体から発信することを見出し、ゴルジシグナルという点でGISTのKITと似ていることを成果発表した(Obata et al., 2019)。複数種類の化合物の中から、KITのゴルジ停留を解除するものをスクリーニングし、現在、その化合物の標的が異常局在の原因分子であることを見出している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、がん発症の大きな原因の一つとされてきた受容体型チロシンキナーゼ(RTK)の活性化変異体は、細胞膜で細胞増殖シグナルを発信すると考えられてきたが、調べた限りのケースでは、KIT変異体はオルガネラに停留し、そこからシグナル発信することが明らかになった。他のRTKについても、似たメカニズムを見出しており、異常局在は、がん細胞の変異RTKの普遍的な特徴であることが示唆される。今後、局在異常の原因メカニズムを解明することにより、がん細胞の本態解明に繋がると考えられ、さらに、その理解に基づいた治療薬の開発の一助となると期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, we showed in gastrointestinal stromal tumor (GIST) and mast cell leukemia that a constitutively active mutant of KIT tyrosine kinase mis-localizes to the Golgi apparatus and endosomal compartments, where it can cause oncogenic signals. In this study, we find that in acute myeloid leukemia, a mutant KIT mainly localizes to endosomes, but it transduces growth signals from the Golgi apparatus during the early secretory trafficking (Obata et al., 2019). Currently, we are investigating the molecular mechanism of KIT retention in organelles in cancer cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：急性骨髄性白血病 消化管間質腫瘍 KITチロシンキナーゼ 異常局在 ゴルジ体

## 1. 研究開始当初の背景

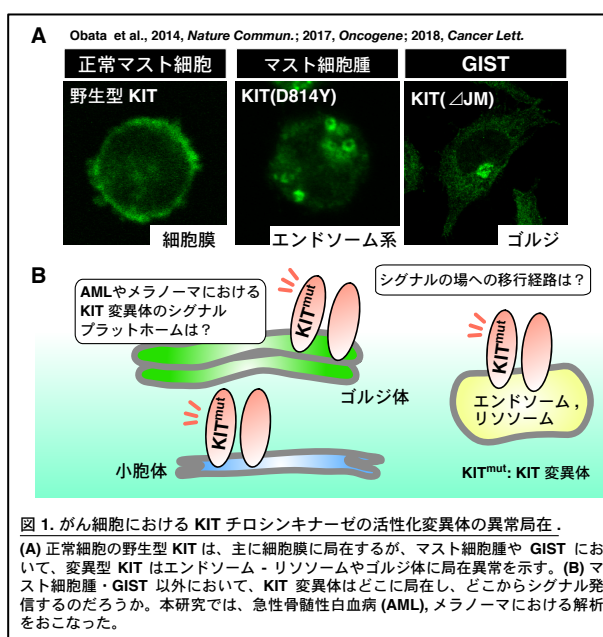
野生型 RTK が、PM でリガンドと結合して活性化し、シグナル伝達することから、がんを発症させる RTK の恒常的活性化変異体も PM からシグナル発信すると考えられてきた。しかしながら、本研究グループは、これまでに、マスト細胞腫や GIST において、KIT チロシンキナーゼの活性化変異体が、PM ではなく、エンドソーム・リソソームやゴルジ体に停留し、オルガネラで下流分子 (AKT, ERK, STATs) を発信することを見出した (Obata et al., 2014, 2017, 2018; Hara et al., 2017; 図 1)。これらの報告は、「他のがん (AML, メラノーマ等) においても KIT はオルガネラからシグナル発信するのだろうか」、「KIT 以外の変異シグナル分子 (EGF レセプター, FTT3, KRAS 等) もオルガネラに停留するのか」、「異常局在の分子メカニズムの解明」、「局在異常の理解に基づいた増殖シグナル阻害の戦術の構築は可能か」等の新たな疑問や重要な課題を生じさせ、本課題では、それらについての研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本課題では、上記を背景とし、はじめに、マスト細胞腫・GIST 以外のがん種における KIT 変異体が「細胞内のいつ・どこから細胞増殖シグナルを発信するのか」を明らかにする。すなわち、AML やメラノーマにおける変異型 KIT の細胞内局在およびシグナルプラットフォームと、そこへのトラフィック経路の解明、シグナルの場への移行のブロッカーが及ぼす無限細胞増殖シグナルへの影響を明確にすることを目的とした実験を計画した。さらに、KIT 変異体のオルガネラ停留の原因となる分子メカニズムの解明を目的とし、① 各がん種における抗 KIT 抗体による免疫沈降、その共沈降物の質量解析、② 停留解除を誘導する化合物のスクリーニング、それら化合物の正確なターゲットの探索を試みた。

## 3. 研究の方法

血液系の細胞株として、Kasumi-1 (AML,  $KIT^{N822K}$ ), SKNO-1 (AML,  $KIT^{N822K}$ ), M-07e (急性巨核芽球性白血病,  $KIT^{WT}$ ) を、メラノーマ細胞株として WM8 ( $KIT^{N818K}$ ), WM39 ( $KIT^{WT}$ ) を用いた。細胞内局在の解析のために、固定細胞を抗 KIT 抗体およびオルガネラマーカー (小胞体, ゴルジ体, エンドソーム, リソソーム等をラベル) で共免疫染色し、共焦点レーザースキャン蛍光顕微鏡を用いた測定によりデータ取得した。細胞内シグナル伝達の解析には、チロシンキナーゼ阻害剤 (イマチニブ, PKC412) や種々の細胞内輸送ブロッカー (プレフェルジン A, モネンシン, パフィロマイシン A1 等) を処理した細胞由来のライセートに対し、リン酸化抗体等によるウェスタンブロッティングをおこなった。さらに、局在異常メカニズムの検討のために、① 抗 KIT 抗体による免疫沈降物に対する共沈降物の質量解析、② 停留解除を誘導する化合物のスクリーニング (数十種類からの候補選定)、それら化合物のターゲット探索を試みた。



#### 4. 研究成果

##### (1) AML, メラノーマにおける変異型 KIT の局在異常, チロシンリン酸化イメージング

はじめに、AML 細胞, メラノーマ細胞における KIT 変異体の細胞内局在を解析した。M-07e や WM39 (いずれも *KIT<sup>WT</sup>*) の KIT が主に PM に局在するのに対し、AML 細胞 (Kasumi-1, SKNO-1) の変異型 KIT は、小胞状オルガネラに分布していた。それらの小胞の位置は、小胞体 (endoplasmic reticulum: ER) やゴルジ体のマーカーと比較し、エンドソームマーカーと有意に一致した。すなわち、AML の変異型 KIT は、野生型と異なり、エンドソームに集積することが明らかになった (図 2A)。イマチニブおよび PKC412 のようなチロシンキナーゼ阻害剤を処理すると、PM の KIT が有意に増加した (図 2B)。この結果は、変異型 KIT は、ER で新規合成後、PM へ分泌輸送を受けた後、自身のキナーゼ活性に依存したエンドサイトーシスを受け、エンドソームへ移行することを示唆する。さらに、シグナルの場を明らかにするために、抗チロシンリン酸化 KIT 抗体でイメージングしたところ、興味深いことに、KIT 活性化は、主に核近傍ゴルジ領域で起きていることが明らかになった。メラノーマについては、KIT の局在オルガネラはゴルジ体であり、そこで活性化していることを確認した。

##### (2) 変異 KIT のシグナルの場 (ゴルジ体) への移行ブロック

小胞体→ゴルジ体の輸送をブロックするプレフェルジン A 等が、AML 細胞の KIT 変異体の増殖シグナルを抑制するかどうかを調べた。免疫染色により、当該インヒビター処理が、Kasumi-1 細胞の変異型 KIT の小胞体停留を引き起こすことを確認した後、KIT およびその下流の AKT, ERK, STAT5 のリン酸化を調べたところ、変異型 KIT の自己リン酸化の減少に伴い、下流分子群の活性化が顕著に抑制された。この KIT シグナルは、ゴルジ排出阻害剤 (モネンシン) やエンドソーム成熟阻害剤 (パフィロマイシン A1) では阻害されなかった。すなわち、AML の KIT 変異体が増殖シグナルを発信しているオルガネラは、ゴルジ体であることが強く示唆された。さらに、ゴルジ体での増殖シグナル維持における、脂質ラフトの重要性を示唆するデータを得た。AML 細胞の KIT 変異体が、局在異常を呈するのは間違い無いが、シグナルの場は、主に分布するエンドソームではなく、初期分泌の過程で経由するゴルジ領域であるという興味深い研究成果となった。メラノーマにおける変異型 KIT もゴルジ体から増殖シグナルを発信する可能性が高く、現在、それを確認する実験を計画している。

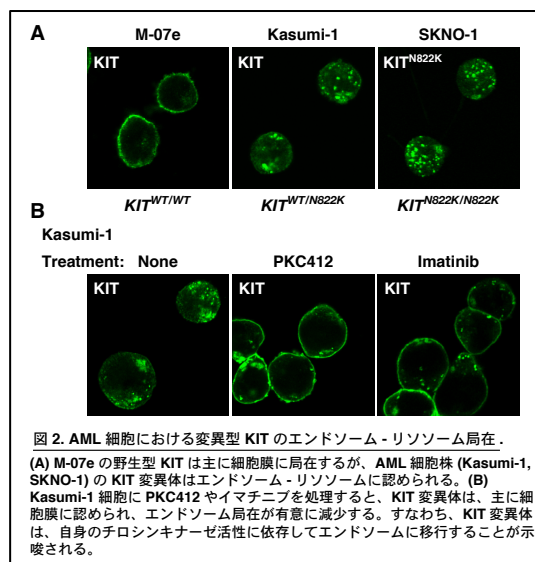


図 2. AML 細胞における変異型 KIT のエンドソーム-リソソーム局在。(A) M-07e の野生型 KIT は主に細胞膜に局在するが、AML 細胞株 (Kasumi-1, SKNO-1) の KIT 変異体はエンドソーム-リソソームに認められる。(B) Kasumi-1 細胞に PKC412 やイマチニブを処理すると、KIT 変異体は、主に細胞膜に認められ、エンドソーム局在が有意に減少する。すなわち、KIT 変異体は、自身のチロシンキナーゼ活性に依存してエンドソームに移行することが示唆される。

##### (3) がん細胞における KIT 変異体の局在異常の原因となる分子メカニズムの解析

KIT 変異体のオルガネラ停留の原因となる分子メカニズムを明らかにするために、種々のがん細胞について、抗 KIT 抗体による免疫沈降をおこない、共沈降物中からの候補分子の探索をおこなった。また、別のアプローチとして、数十種類の化合物 (インヒビターまたはアクチベーター) から、KIT の局在異常を解除するものをスクリーニングした。GIST における探索については、予備データが蓄積され、両アプローチから、幾つかの候補分子群を見出し、変異型 KIT のゴルジ停留の原因メカニズムに迫ることが期待される。今後、それら候補の細胞内局在解析、機能喪失実験および相互作用解析をおこなう予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Saito Y, Takahashi T, Obata Y, Nishida T, Ohkubo S, Nakagawa F, Serada S, Fujimoto M, Ohkawara T, Nishigaki T, Sugase T, Koh M, Ishida T, Tanaka K, Miyazaki Y, Makino T, Kurokawa Y, Nakajima K, Yamasaki M, Hirota S, Naka T, Mori M, Doki Y.	4. 巻 122
2. 論文標題 TAS-116 inhibits oncogenic KIT signalling on the Golgi in both imatinib-naive and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumours.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br. J. Cancer.	6. 最初と最後の頁 658-667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-019-0688-y.	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 Obata Y, Hara Y, Shiina I, Murata T, Tasaki Y, Suzuki K, Ito K, Tsugawa S, Yamawaki K, Takahashi T, Okamoto K, Nishida T, Abe R.	4. 巻 4
2. 論文標題 N822K- or V560G-mutated KIT activation preferentially occurs in lipid rafts of the Golgi apparatus in leukemia cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Commun. Signal.	6. 最初と最後の頁 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12964-019-0426-3.	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 Ohata H, Shiokawa D, Obata Y, Sato A, Sakai H, Fukami M, Hara W, Taniguchi H, Ono M, Nakagama H, Okamoto K.	4. 巻 28
2. 論文標題 NOX1-dependent mTORC1 activation via S100A9 oxidation in cancer stem-like cells leads to colon cancer progression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 1282-1295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.06.085.	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 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 -
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 BioRxiv	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) 10.1101/2021.01.01.424454.	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小幡裕希, 原 泰志, 椎名 勇, 村田貴嗣, 津川 翔, 山脇康平, 高橋 剛, 岡本康司, 西田俊朗, 安部 良
2. 発表標題 変異型Kitチロシンキナーゼのゴルジ体への異常局在とそこから発信される増殖シグナル -GIST・急性骨髄性白血病におけるオルガネラシグナル-
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019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
---------	---------