

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07242

研究課題名(和文) 神経芽腫の薬剤感受性や悪性化におけるSrcキナーゼシグナルの役割

研究課題名(英文) Role of Src family kinases in the Drug Resistance and Progression of Neuroblastoma

研究代表者

堺 隆一 (Ryuichi, Sakai)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：40215603

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)：本研究では神経芽腫由来の細胞を用いて、Srcキナーゼやその基質分子が神経芽腫の悪性化のプロセスにおいてどのような役割をしているかの解析を進めてきた。Srcキナーゼ阻害剤を用いた解析では、神経芽腫におけるSrc経路の阻害が、細胞増殖よりも細胞運動について最も顕著な効果を示すことが明らかになった。これらの阻害剤の中でもdasatinibの細胞運動抑制効果が最も強く、10nM程度の低濃度で見られた。この濃度でパキシリンやCasなどのSrcの基質のリン酸化が抑制されていた。一方でsiRNAによるSrc基質群の発現抑制を試みたが、発現抑制による細胞増殖能や細胞運動能に対する影響は限定的であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経芽腫は小児腫瘍の一つとしてがん遺伝子の活性化を引き起こす変異に乏しいにも関わらず高頻度で転移が見られ、また一方で1歳未満で発症する例では自然退縮を起こす症例があることから、転移に関わるチロシンキナーゼであるSrcファミリーの可逆的な活性化が関わっていることを考えている。Src阻害剤は神経芽腫の運動能や浸潤能を選択的に阻害し、増殖能に対する影響は限定的であることから、神経芽腫においても転移などの悪性化に関わる性質にSrcファミリーキナーゼが関わることを示唆された。将来的に進行した神経芽腫に対する適切なSrc阻害剤が有効である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：SFKs are known to be activated in various types of cancers and involved especially in the progression of the disease. The objective of this study is to elucidate the role of SFKs and their substrates in the progression of neuroblastoma. SFK inhibitors such as saracatinib, bosutinib and dasatinib generally caused more significant suppressive effects in cell migration than in cell proliferation in NB39-nu cells. Among SFK inhibitors, dasatinib showed outstanding inhibition of cell migration at the concentration as low as 10 nM. At this concentration, dasatinib caused inhibition of the phosphorylation of several substrates of SFKs such as paxillin and p130Cas. On the other hand, siRNA inhibition of these substrates did not show significant effect on the migration of NB39-nu.

研究分野：腫瘍生化学

キーワード：神経芽腫 Src パキシリン p130Cas dasatinib

1. 研究開始当初の背景

「癌遺伝子の活性化の頻度の少ない神経芽腫で何が悪性化のシグナルを伝えているのか」というのが、当初から一貫した「問い」である。神経芽腫は交感神経に由来する腫瘍で、小児期に最も高頻度に見られる悪性固形腫瘍である。自然消褪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。有効な治療法の開発が進んでいない理由の一つとして、他の固形腫瘍に比べ腫瘍化に関わる活性型遺伝子変異の頻度が少ないことがある。研究代表者は2002年に受容体型チロシンキナーゼ ALK が神経芽腫の一部で遺伝子増幅によって活性化していることを世界で初めて見出した (Miyake I et al, Oncogene 2002; Osajima-Hakomori Y et al, Am J Pathol 2005) が、2008年に他のグループが見つけた ALK の活性型変異を合わせても ALK の変異の頻度は10%強にすぎない。ほとんどの症例で何が神経芽腫の悪性化を引き起こしているかは依然謎のままである。一方で ALK はエンドサイトーシスに関わるタンパク質 Flotillin-1 (FLOT1) と結合しており、この結合が ALK の特異的分解に関わることを示した (Tomiyama A et al, Cancer Res 2014)。FLOT1 の発現低下は神経芽腫細胞で ALK の細胞膜への蓄積と活性化をもたらす、神経芽腫の症例では ALK の遺伝子変異の有無にかかわらず FLOT1 の発現が低いグループで有意に予後不良であることを明らかにした。この ALK 活性化は ShcC や Shp2 などのシグナル媒介分子を介して神経芽腫の悪性化に関わるので、遺伝子変異を伴わない神経芽腫悪性化モデルとして注目しているが、その際これらの ALK シグナル媒介分子は別のチロシンキナーゼである Src ファミリーによるリン酸化で制御されていることを見出した。一方で多くの神経芽腫細胞において Cas など Src キナーゼの基質群のタンパク質の強いリン酸化が認められることも認められたが、神経芽腫の特性と Src キナーゼの活性化の関わりについては未だほとんど明らかになっておらず、遺伝子変異の少ない小児腫瘍でどのように Src キナーゼが活性化し、神経芽腫の悪性化とどのように関わるか興味もたれる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで ALK を中心に進めてきた神経芽腫の活性化シグナルの解析を広げて、神経芽腫における Src ファミリーキナーゼとその基質群の役割を明らかにすることである。基質あるいは活性制御分子として Src シグナル活性化に関わる神経芽腫特異的な分子群を見出し、その神経芽腫の悪性形質との関わりについての解析を進める。さらにこれまでに蓄積した神経芽腫細胞における ALK シグナルの役割に関する知見を用いて、ALK シグナルと Src シグナルとの相互作用を明らかにする。免疫沈降などによる複合体解析とリン酸化解析などにより、ALK と Src の両キナーゼ間には基質分子を介したクロストークがあると推測しているが、詳細はまだ証明できておらず、Src の下流でどのようなシグナルが活性化するかについても全く明らかになっていない。

このようなシグナルを理解することで、小児期の発症や自然消褪など神経芽腫の特徴となる性質の理解につながっていくことが期待できる。また神経芽腫では頻度の高い活性化変異が見つかっていないため有効な分子標的療法が限られているが、この Src シグナルの解析により新たな治療法の創出につながることを期待される。

3. 研究の方法

A) 神経芽腫細胞株における Src シグナルの影響の解析

Src(Y416)のリン酸化特異的抗体を用いて NB-39、SK-N-SH、TNB-1 など一連の神経芽腫細胞株における Src ファミリーの活性化状態を検討する。さらに神経芽腫細胞株を Src キナーゼ阻害剤の Saracatinib、Dasatinib、Bosutinib など処理し、Src キナーゼ阻害剤が Crizotinib などの ALK 阻害剤に対する感受性や cisplatin などの化学療法剤に対する感受性に与える影響を調べる。Src ファミリー分子 (Src, Fyn, Yes) の shRNA によるノックダウンが、神経芽腫細胞の非接着環境でのスフェロイド形成能に与える影響を調べる。これらの解析により神経芽腫における Src シグナルの重要性と、ALK シグナルとの相互作用についての情報を得る。

B) 神経芽腫細胞における ALK 結合リン酸化質の Src キナーゼとの関わり解析

これまでの解析で同定された ALK と結合するチロシンリン酸化タンパク質群 (Tomiyama A et al, 2014) のリン酸化が Src 阻害剤処理や Src ファミリーのノックダウンにより変化するかどうかを調べ、ShcC のように ALK シグナル経路と Src シグナル経路のクロストークに関わる分子を探し、分子の同定を進める。

C) Src シグナル媒介分子の神経芽腫の悪性化との関わり解析

神経芽腫の Src シグナルを媒介するタンパク質群について、公開データベースでそれらの発現と神経芽腫の予後との相関の有無を調べる。また個々の分子に対してノックダウンを行い、が神経芽腫の増殖能、運動能に与える影響などを調べ、これらの情報から神経芽腫の悪性形質獲得に重要な分子を絞り込む。絞り込まれた分子については必要に応じて特異的抗体やチロシンリン酸化部位特異的抗体を作成し、細胞内局在や病理組織における発現を検討する。これらの解析で神経芽腫における Src シグナル媒介分子を明らかにする。

4. 研究成果

A) rcシグナルの影響の解析：神経芽腫の悪性化に関わる ALK キナーゼのタンパク質複合体の解析で、これまでに ALK が Flotillin-1 によりタンパク質レベルで活性化 - 不活性化の制御を受けることを見出し、その活性化を媒介するシグナル分子 ShcC や Shp2 が、Src ファミリーキナーゼの基質としてリン酸化による制御を受けていることが示唆された Saracatinib、Dasatinib、Bosutinib の 3 種類の Src 阻害剤を用いた Wst-1 アッセイによりの増殖能(24 時間、72 時間) と TransWell アッセイによる運動能(24 時間) に対する影響を調べたところ、どの阻害剤も 10 μ M 以上の高濃度でも増殖能に対する影響が見られなかったのに対し、はるかに低濃度の阻害剤で細胞運動能に対する影響が見られた。特にダサチニブは 10nM 程度の低い濃度にて強く細胞運動能を抑制し、この濃度でパキシリンや p130Cas などの Src の基質のリン酸化が抑制されていた。これに対して対照群に用いたクリゾチニブ、アレクチニブなどの ALK 阻害薬は神経芽腫の細胞運動能と細胞増殖能に対して同程度の感受性しか示さず、Src シグナル経路は ALK シグナル経路とは異なった形で神経芽腫の悪性化に関わっていることが示唆された。Dasatinib を用いた時に特に著明な運動能阻害が見られたことについては、Src 阻害剤の間でそれぞれの Src ファミリー分子や基質分子の特異性の違いは考えにくいので、他の非受容体型チロシンキナーゼとの協調作用も考えている。

B) Src ファミリー結合タンパク質の同定：NB-39-nu 細胞に、Src ファミリーの Src、Yes、Fyn の野生型あるいは恒常的な活性化能を持つ 527F 変異体を全長で、また N 末側の SH3-SH2 ドメイン領域を Flag タグをつけた形で発現させ、これらの Src ファミリータンパク質と結合するチロシンリン酸化タンパク質を検出し同定することを試みた。トランジェントな発現細胞と薬剤選択を経た安定的な発現細胞の両者を用いたが、パキシリンや p130Cas など既知の結合タンパク質以外に新規の Src 結合タンパク質を検出し同定するには至らなかった。神経芽腫細胞の遺伝子導入効率が低いことと、導入された神経芽腫細胞の Src 発現が高いと細胞が浮遊してしまうなどの問題があり、このような試みには実験に用いた CMV プロモーターよりも弱いプロモーターを用いて生理的に近い発現量で行う必要があることが示唆された。

C) Src シグナル媒介分子の解析： Src キナーゼ特有の細胞運動能制御に関する下流分子を明らかにするため、Src によってチロシンリン酸化を受ける基質タンパク質群のリン酸化状態の解析を行った。Src の下流で細胞運動能に深く関与することが知られる。p130Cas、コルタクチン、パキシリン、カテニンなど Src に基質群に対する siRNA を設計した。通常の遺伝子導入試薬では発現抑制がウカム行かなかったため、Neon を用いたエレクトロポレーション法を用いた方法で導入条件を検討し、神経芽腫細胞においてタンパク質レベルでの発現を効率よくおさえる条件を見出すことができた。コルタクチンやパキシリンについては、発現抑制によって細胞形態が紡錘形から球形に変化することが観察されたが、細胞増殖能や細胞運動能に対する影響は限定的であった。コルタクチンや p130Cas については発現抑制による形態変化、細胞増殖能、細胞運動能に対する影響はほとんど観察されなかった。発現の減少に伴いこれらの基質のリン酸化の亢進が認められ、恐らく何らかのフィードバックメカニズムが存在するものと考えられる。このようなフィードバックメカニズムがロックダウンの影響をマスクしている可能性が考えられ、今後 CRISPR-Cas9 を用いてロックアウト細胞を樹立し解析していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamashita Ken, Kiyonari Shinichi, Tsubota Shoma, Kishida Satoshi, Sakai Ryuichi, Kadomatsu Kenji	4. 巻 111
2. 論文標題 Thymidylate synthase inhibitor raltitrexed can induce high levels of DNA damage in MYCN amplified neuroblastoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2431 ~ 2439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14485	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 Kakizawa Sho, Kishimoto Yasushi, Yamamoto Shinichiro, Onga Kazuko, Yasuda Kunihiko, Miyamoto Yoshiaki, Watanabe Masahiko, Sakai Ryuichi, Mori Nozomu	4. 巻 10
2. 論文標題 Functional maintenance of calcium store by ShcB adaptor protein in cerebellar Purkinje cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71414-y	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 Nagamura Yuko, Miyazaki Makoto, Nagano Yoshiko, Yuki Masako, Fukami Kiyoko, Yanagihara Kazuyoshi, Sasaki Kazuki, Sakai Ryuichi, Yamaguchi Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 PLEKHA5 regulates the survival and peritoneal dissemination of diffuse-type gastric carcinoma cells with Met gene amplification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41389-021-00314-1	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 Sawayama Tadashi, Nakashima Katsuhiko, Ichimura Tohru, Sakai Ryuichi, Uekita Takamasa	4. 巻 42
2. 論文標題 Homophilic complex formation of CDCP1 via the extracellular CUB2 domain facilitates SFK activation and promotes cancer cell migration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 1507-1516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2019.7271	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 該当する

1. 著者名 Miyazaki Makoto, Otomo Ryo, Matsushima-Hibiya Yuko, Suzuki Hidenobu, Nakajima Ayana, Abe Naomi, Tomiyama Arata, Ichimura Koichi, Matsuda Koichi, Watanabe Toshiki, Ochiya Takahiro, Nakagama Hitoshi, Sakai Ryuichi, Enari Masato	4. 巻 4
2. 論文標題 The p53 activator overcomes resistance to ALK inhibitors by regulating p53-target selectivity in ALK-driven neuroblastomas	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-018-0059-0	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 Nagamura Yuko, Miyazaki Makoto, Nagano Yoshiko, Tomiyama Arata, Ohki Rieko, Yanagihara Kazuyoshi, Sakai Ryuichi, Yamaguchi Hideki	4. 巻 13
2. 論文標題 SHP2 as a Potential Therapeutic Target in Diffuse-Type Gastric Carcinoma Addicted to Receptor Tyrosine Kinase Signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4309 ~ 4309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13174309	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 Miyamoto Shingo, Nagano Yoshiko, Miyazaki Makoto, Nagamura Yuko, Sasaki Kazuki, Kawamura Takeshi, Yanagihara Kazuyoshi, Imai Toshio, Ohki Rieko, Yashiro Masakazu, Tanaka Masato, Sakai Ryuichi, Yamaguchi Hideki	4. 巻 526
2. 論文標題 Integrin 5 mediates cancer cell-fibroblast adhesion and peritoneal dissemination of diffuse-type gastric carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 335 ~ 345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2021.11.008	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Shirakihara T, Sakai R
2. 発表標題 Identification and functional analysis of FGFR2 binding proteins in diffuse-type gastric carcinoma
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白木原琢哉、堺隆一
2. 発表標題 スキルス胃がんの進展に関わるFGF受容体結合タンパク質Tfr1の機能解析
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白木原琢哉、堺隆一
2. 発表標題 びまん性胃がんの進展に関わるFGFR2結合タンパク質の探索と機能解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本真吾、宮崎允、柳原五吉、矢代正和、堺隆一、山口英樹
2. 発表標題 スキルス胃癌と間質線維芽細胞の直接的相互作用に関わる分子の探索
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白木原琢哉、堺隆一
2. 発表標題 スキルス胃がんの進展に寄与するFGF受容体結合タンパク質の探索と機能解析
3. 学会等名 第27回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本真吾、堺隆一、山口英樹
2. 発表標題 スキルス胃がんと間質線維芽細胞の直接的な相互作用に関わる分子機構の解明
3. 学会等名 第27回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白木原琢哉、堺隆一
2. 発表標題 スキルス胃がんの進展に関わるFGFR2結合タンパク質の探索と機能解析
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本真吾、中坊彩花、深見希代子、柳原五吉、堺隆一、山口英樹
2. 発表標題 びまん性胃がんにおけるRhoAのスプライシング異常とそれに伴う発現及び活性の低下
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shirakihara T, Sakai R
2. 発表標題 Identification and functional analysis of FGFR2 binding proteins in schirrous gastric cancer
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference : Breakthrough in Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shirakihara T, Sakai R
2. 発表標題 Identification and functional analysis of FGFR2 binding proteins in diffuse-type gastric carcinoma
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019 (国際学会)
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