

平成30年 5月31日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26290043

研究課題名(和文) 神経芽腫におけるALK結合蛋白質群の役割

研究課題名(英文) Biological roles of ALK-binding molecules in neuroblastoma

研究代表者

堺 隆一 (Sakai, Ryuichi)

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経芽腫細胞においてALKとチロシンホスファターゼSHP2がALKのチロシンキナーゼ活性依存性に結合し、クリゾチニブのようなALK阻害剤はSHP2の540番と580番のチロシン残基でのリン酸化を抑制することを示した。ドッキング分子ShcCのノックダウンによりALKとShcCの結合が抑制されたことから、両者の結合がShcCを介していることが示唆された。Shp2ホスファターゼの阻害剤PHPS1の処理により、NB39-nu細胞のERK1/2の活性や、増殖能・運動能が低下した。以上の事よりSHP2とALKの相互作用が神経芽腫の進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：By the screening of phosphotyrosine-containing proteins associated with ALK in neuroblastoma cells, we identified SHP2 as one of the binding partners of ALK. Immunoprecipitation study revealed binding of SHP2 with ALK by ALK activity-dependent manner, and knockdown of ALK or inhibition of kinase activity of ALK by ALK inhibitors suppressed phosphorylation of SHP2 at Tyr540 and Tyr580 in NB-39-nu neuroblastoma cells which have ALK addiction. In addition, knockdown of ALK-binding docking protein ShcC resulted in decrease of ALK-SHP2 interaction. On the other hands, treatment of SHP2 inhibitor PHPS1 or knockdown of SHP2 resulted in down-regulation of ERK1/2 activation, proliferation and migration of NB-39-nu cell. However, phosphorylation of ALK was up-regulated by inhibition or knockdown of SHP2. From these results, very complicated interplay between ALK and SHP2 during the regulation of oncogenesis of the neuroblastoma cells is suggested.

研究分野：細胞内シグナル伝達

キーワード：神経芽腫 SHP2 ALK

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は小児期に最も高頻度に見られる悪性固形腫瘍の一つであるが、自然消滅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。急務である有効な治療法の開発が進んでいない理由の一つとして、治療標的として他の固形腫瘍に見られるような腫瘍化に関わる活性型の遺伝子変異が見つからないことにある。

代表研究者は一群の神経芽腫の細胞株でチロシンリン酸化が異常に亢進した蛋白質に気づき、精製により同定したところ ALK という受容体型チロシンキナーゼであった。ALK は遺伝子増幅による過剰発現で活性化していることがわかり 2002 年に報告した (Miyake I et al, *Oncogene* 2002)。このような神経芽腫では活性化した ALK が細胞の生存に必須で、ALK を RNAi で抑えることにより神経芽腫細胞がアポトーシスを起こすこと、ヒト神経芽腫組織でも ALK の遺伝子増幅が低頻度ながらみられることを 2005 年に報告した (Osajima-Hakomori Y et al, *Am. J. Pathol.* 2005)。さらに活性化した ALK は神経特異的に発現するドッキング蛋白質 ShcC と結合してこの蛋白質を強くチロシンリン酸化しており、ALK-ShcC 経路が神経芽腫の増殖異常や分化抑制に関わることが示唆された (Miyake I et al, *Oncogene* 2005, 2009)。一方 2008 年 10 月に東大の小川博士のグループを含め国内外の 4 つのグループが、神経芽腫の組織に高頻度に ALK の活性型変異があることをゲノムのリシーケンスなどにより見出した。ここにきて一気に神経芽腫の腫瘍化における ALK 活性化の重要性が広く認識された。また非小細胞肺癌でも間野博士らのグループが新しい EML4-ALK の融合蛋白質を見出したことで、ALK がリンパ腫・肺癌・神経芽腫の 3 つの異なる腫瘍で治療標的として一躍脚光を浴びることになった。

肺癌やリンパ腫と違って、神経芽腫では ALK は融合蛋白質を作ることなく活性型変異や過剰発現で活性化している。上図で示すように融合蛋白質の場合には、ALK は膜貫通ドメイン(TM)を失うので、細胞質に移行した上で活性化すると考えられている。それに対し全長の ALK を持つ神経芽腫においては、全く違った機序で ALK が腫瘍の特性に関わる可能性があるが、ALK についてはリガンドや生理的な役割を含めほぼ全く分かっていないのが現状である。また神経芽腫で見つかった多種の点変異は、それぞれ病態や ALK 阻害剤感受性に違いがある可能性が示唆されているが、その機序については詳細は明らかになっていない。我々は 2011 年から基盤研究 (B) の支援を受けて神経芽腫において ALK と結合してチロシンリン酸化を受ける基質分子を質量分析により同定して、その中で神経芽腫の発生や性質に関わる分子を機

能解析から明らかにすることを目的に研究を開始した。神経芽腫細胞 TNB-1 にタグ付きの ALK 全長を発現し、タグの抗体および抗リン酸化チロシン抗体 4G10 の 2 段階のカラム精製により ALK と結合するチロシンリン酸化蛋白質を質量分析により次々に同定していった。その結果約 30 の蛋白質が再現性よく同定された。このうち IRS1、SOS1、Grb2、ZO-1 など幾つかについては、ALK との結合がリンパ腫など他の系でも報告されており、この手法で ALK 結合蛋白質が確かに同定されていることが示唆された。そのうち Flottilin1 (FLOT1)、PTPN11 (SHP2)、SH2B1 については、特異的抗体や siRNA を用いた解析が開始時点までにある程度進んでいた。

2. 研究の目的

本研究の目的はここまで進めてきた ALK 結合蛋白質の機能解析を進めて、神経芽腫の発生に深く関わっている ALK の特異的な役割を明らかにすることである。これまでに同定された ALK 結合蛋白質のうち FLOT1 は細胞膜上のラフトに局在し、エンドサイトーシスに関わることが知られていたため、ALK 蛋白質の分解に関わる可能性を考えた。蛍光染色で FLOT1 はラフトおよびエンドソームと考えられる細胞質内の顆粒において ALK との共局在が認められた。神経芽腫細胞において FLOT1 の発現を RNAi で抑制すると膜上の ALK 蛋白質の量が著明に増加し、同時に細胞の運動能・浸潤能が上昇した。神経芽腫で見られる ALK の変異のうち F1174L など幾つかにおいて、変異型 ALK と FLOT1 との結合能が野生型に比べ著明に減少しているのが確認され、このような変異により ALK 蛋白質の安定性が増すことでがん化シグナルの活性化につながっている可能性が示唆された。FLOT1 については更に ALK の分解を介して神経芽腫の造腫瘍能、転移能に与える影響を解析していく。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退縮など神経芽腫の特徴となる性質につながっていく可能性がある。また同定された分子群の中には ALK の特異的下流シグナルを伝える分子の候補もありその機能解析を進めることは極めて重要である。本研究では、これまでに神経芽腫細胞で同定された ALK と結合するチロシンリン酸化蛋白質群の機能解析から神経芽腫発症のメカニズムを明らかにすることをその目的とする。

3. 研究の方法

解析が先行している FLOT1、PTPN11 (SHP2)、SH2B1 については ALK のシグナルにおける役割および神経芽腫の悪性度との関わりについて詳細に検討する。同定された分子のうち未報告で解析が進んでいない約 10 の分子については、必要に応じ特異的抗体を作成して ALK の結合分子/基質としての評価を行い絞り込む。更に RNAi によって発現を抑えた時の神経芽腫の増殖能、コロニー形成能、転移

能などを解析し、ALK の oncogenic なシグナルを媒介する分子を選別する。

さらに ALK との結合を阻害するペプチドなどシグナルを阻害する分子を用いて治療モデルを作り、リン酸化抗体を作成し神経芽腫組織におけるリン酸化の意味を解析する

4 . 研究成果

神経芽腫細胞において ALK と結合するチロシンリン酸化蛋白質を質量分析により次々に同定して得られた蛋白質のうち、Flotillin-1 (FLOT1) は神経芽腫においては ALK と選択的に結合し、エンドサイトーシスを介して ALK 蛋白質の分解に関わること、FLOT1 の発現低下により ALK 蛋白質の安定性が増すことが神経芽腫のがん化シグナルの増強に関わることを示した。実際、FLOT1 の発現量の低いことが神経芽腫の予後不良と関わることも認められた。

また同じく質量分析で ALK と結合することが示されたチロシンホスファターゼ SHP2 は、最近のゲノム解析で神経芽腫の数パーセントで ALK と相補的に活性型変異が認められることが報告されており、これらの2つの蛋白質が協調して悪性化に関わるシグナルを伝える可能性について検討した。両者の結合は ALK のチロシンキナーゼ活性に依存しており、ALK が活性化した NB39-nu 細胞をクリゾチニブのような ALK 阻害剤で処理すると、SHP2 の 540 番と 580 番のチロシン残基でのリン酸化を抑制することを観察した。更にドッキング分子 ShcC のノックダウンにより ALK と ShcC の結合が抑制されたことから、両者の結合が ShcC を介していることが示唆された。Shp2 ホスファターゼの阻害剤 PHPS1 の処理により、NB39-nu 細胞の ERK1/2 の活性や、増殖能・運動能が低下した。以上の事より SHP2 と ALK の相互作用が神経芽腫の進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。

またまず HEK293 細胞に FLAG タグを付加した点変異型活性化 ALK2 種 (F1174L, R1285Q)、融合型活性化 ALK2 種 (EML4-ALK, NPM-ALK) を発現させ、FLAG タグによる免疫沈降にてこれらに結合してくるリン酸化タンパク質の解析を行った。活性化 ALK はどれも強い自己リン酸化が認められ、4 種の変異型に共通して結合する 45kD、55kD などリン酸化タンパク質に加え、点変異型と NPM-ALK 融合型に特異的に結合するチロシンリン酸化タンパク質がそれぞれ複数認められた。EML4-ALK については、明らかに特異的に結合するリン酸化タンパク質は認められなかった。NPM-ALK の特異結合タンパク質についてさらに解析を進めるため、抗 FLAG タグ抗体と抗リン酸化チロシン抗体による 2 段階の精製により、HEK293 細胞内で NPM-ALK タンパク質と結合するタンパク質の同定を試みた (図 1)。45kD と 55kD の結合タンパク質はすでに報告のある ShcA タンパク質であった。70kD、130kD、170kD、250kD などのユニークなリン酸化タンパク質については、現在いくつかの候補タ

ンパク質などから免疫沈降や阻害剤によるリン酸化の変化などから絞り込みを行っている。

内在性に NPM-ALK を発現するヒト未分化大細胞リンパ腫細胞株である SUP-M2 細胞と SUDHL1 細胞を用いた解析も進め、これらの細胞の中で NPM-ALK が強く自己リン酸化していること、ShcA タンパク質に加え 70kD、130kD、170kD、250kD などのユニークなリン酸化タンパク質がこの細胞の中でも、内在性の NPM-ALK と結合していることを確認した。またこれらの細胞に ALK 阻害剤であるクリゾチニブ、アレクチニブや Src 阻害剤であるダサチニブ、サラカチニブを投与し、タンパク質のリン酸化の変化の観察と、細胞の増殖能に対する影響を観察した。これまで観察した ALK 結合リン酸化タンパク質群のリン酸化は ALK 阻害剤によりどれも抑制され、これらのタンパク質が ALK と結合することで ALK によりリン酸化を受けていることが示唆された。Src の阻害剤も ALK 阻害剤と同程度の濃度でこれらの細胞の増殖能に影響を与えたが、チロシンリン酸化に明瞭な変化がみられるタンパク質は少なく、これらのリンパ腫の細胞のチロシンリン酸化を介したシグナルが NPM-ALK の強い制御下にあることが確認された。現在、新規の NPM-ALK 結合リン酸化タンパク質候補分子群について確認と機能解析を進めているが、現在まだ公表できる段階ではない。

今回の研究により、細胞膜に存在する点変異型活性化 ALK と細胞質や核に存在すると考えられる融合型活性化 ALK の結合リン酸化タンパク質の間には、ShcA などいくつかの共通して利用されるシグナル伝達分子がある一方で、それぞれの系で特異的な媒介分子によるシグナルが伝えられていることが示唆され、それは癌種や細胞種の違いを超えて、結合特異性により使い分けられていると考えられた。

これらの結合分子により安定化して活性化した ALK は *in vitro* で神経芽腫に ALK 阻害剤に対する感受性を誘導することから、臨床症例でも FLOT1 の発現が低く、ShcC、Shp2 の発現やリン酸化の高い症例では、ALK 阻害剤への感受性が亢進して治療に有効である可能性が示唆された。

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 7 件)

Miyazaki M, Otomo R, Matsushima-Hibiya Y, Suzuki H, Nakajima A, Abe N, Tomiyama A, Ichimura K, Matsuda K, Watanabe T, Ochiya T, Nakagama H, Sakai R, Enari M. The p53 activator overcomes resistance to ALK inhibitors by regulating p53-target selectivity in ALK-driven neuroblastomas. Cell Death Discov.

Miyamoto S, Nagamura Y, Nakabo A, Okabe A, Yanagihara K, Fukami K, Sakai R, Yamaguchi H. Aberrant alternative splicing of RHOA is associated with loss of its expression and activity in diffuse-type gastric carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 495:1942-1947, 2018

Yamaguchi H, Ito Y, Miura N, Nagamura Y, Nakabo A, Fukami K, Honda K, Sakai R : Actinin-1 and actinin-4 play essential but distinct roles in invadopodia formation by carcinoma cells. *Eur J of Biochem*, 96 : 685-694 , 2017

Nakashima K, Uekita T, Yano S, Kikuchi JI, Nakanishi R, Sakamoto N, Fukumoto K, Nomoto A, Kawamoto K, Shibahara T, Yamaguchi H, Sakai R : Novel small molecule inhibiting CDCP1-PKC δ pathway reduces tumor metastasis and proliferation. *Cancer Sci.* 108 : 1049-1057 , 2017

Ichimura K, Sakai R et al (50 人中 46 番目) :Intracranial Germ Cell Tumor Genome Analysis Consortium. Recurrent neomorphic mutations of MTOR in central nervous system and testicular germ cell tumors may be targeted for therapy. *Acta Neuropathol.* 131 : 889-901 , 2016.

Ueno H, Tomiyama A, Yamaguchi H, Uekita T, Shirakihara T, Nakashima K, Otani N, Wada K, Sakai R, Arai H, Mori K : Augmentation of invadopodia formation in temozolomide-resistant or adopted glioma is regulated by c-Jun terminal kinase-paxillin axis. *Biochem Biophys Res Commun.* 468 : 240-247 , 2015.

Yamaguchi H, Sakai R : Direct interaction between carcinoma cells and cancer associated fibroblasts for the regulation of cancer invasion. *Cancers (Basel)* 14 : 2054-2062 , 2015.

〔学会発表〕(計 9 件)

神経芽腫細胞における SHP2 と ALK の結合は、神経芽腫細胞の腫瘍原性を制御する、口頭、富山新太、上野英明、白木原琢哉、中島克彦、山口英樹、森健太郎、堺隆一、第 74 回日本癌学会学術総会、2015

Identification of ALK-binding phosphotyrosine-containing proteins as the critical regulators of oncogenic properties of neuroblastoma cells,富山新太、堺隆一、2015 Asia-pacific Symposium of Neuroblastoma ,2015

神経芽腫の ALK 阻害剤感受性を制御する ALK 結合リン酸化蛋白質群、堺隆一、富山新太、第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本

神経芽腫における ALK 受容体シグナルの Flotillin-1 と ShcC- Shp2 経路による制御、堺隆一、富山新太、日本ホスファターゼ会議 2016、2016

The signaling complex of tyrosine phosphatase SHP2 and docking protein ShcC regulates oncogenicity of neuroblastoma cells in a tyrosine-phosphorylation dependent manner. , 富山新太、堺隆一、Advances in Neuroblastoma Research 2016、2016

神経芽腫における ShcC を介した SHP2 と ALK の結合は、神経芽腫細胞の腫瘍原性を制御する、富山新太、白木原琢哉、中島克彦、山口英樹、森健太郎、堺隆一、第 75 回日本癌学会学術総会、2016

Interaction of SHP2 with ALK regulates oncogenicity of neuroblastoma cells , 堺隆一 , 12th International Conference on Protein Phosphatase , 2016

スキルス胃癌細胞における SHP2 の機能解析、山口英樹、富山新太、堺隆一；第 76 回日本癌学会学術総会 2017

The signaling complex of tyrosine phosphatase SHP2 and docking protein ShcC regulates oncogenicity of neuroblastoma cells in a tyrosine-phosphorylation dependent manner , 富山新太、堺隆一 , The 3rd Asia-Pacific International Symposium of Neuroblastoma 2017

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

堺 隆一 (SAKAI Ryuichi)
北里大学・医学部生化学・教授
研究者番号：40215603

(2) 研究分担者

白木原 琢哉 (SHIRAKIHARA Takuya)
北里大学・医学部生化学・助教
研究者番号：30548756

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

山口 英樹 (YAMAGUCHI Hideki)
公立財団法人佐々木研究所・腫瘍細胞研究
部・部長
富山 新太 (Tomiya Arata)
防衛医科大学校・脳神経外科・講師