

## 81. 細胞内小器官の分子を標的とする標的治療法開発

西田 俊朗

\*国立がん研究センター 東病院 胃外科

Key words : 分子標的治療, 消化管間質腫瘍, KIT, Drug-Delivery-System, ゴルジ

### 緒言

肺癌等のチロシンキナーゼ等にドライバー遺伝子変異を持つがんに対する標的治療薬は、進行再発がん患者に予後改善を含む画期的な治療効果と QOL の向上をもたらした。現在、次世代シークエンサー (NGS) でドライバー遺伝子変異を検索し、遺伝子変異に応じて precision medicine を行うことが現実のものとなってきた。これらチロシンキナーゼを標的とする標的治療薬は変異タンパク質を比較的特異的に阻害はするものの、正常標的の阻害 (オンターゲット効果) や他のキナーゼ阻害に伴うオフターゲット効果による有害事象を 100% 伴い、患者 QOL や薬剤容量の制限にも関係し、標的特異性に関しては改善の必要性がある。一方で分子標的治療薬も含め抗がん剤等の薬剤が、標的の細胞内での様な動態を示し、どこに分布し、どの様にそれぞれの標的に作用しているかを検討した報告は殆どなく、細胞内薬剤動態の詳細は全く不明である。

正常の KIT (wild type KIT) は、小胞体 (ER) で合成された後、ゴルジで糖鎖修飾を受け、細胞膜に移動し、細胞膜でリガンドの SCF と結合し二量体化を起こし活性化して、最終的にはエンドサイトーシスを受けてエンドソームで処理される<sup>1)</sup>。一方、最近、我々は遺伝子変異を持つ KIT チロシンキナーゼの細胞内での活性化場所を マスト細胞腫や消化管間質腫瘍 (GIST: Gastrointestinal Stromal Tumor) で解析した。マスト細胞腫では エンドソームで変異 KIT が活性化し、GIST ではゴルジ体 (主にトランスゴルジ) で活性化していることを見出した<sup>2,3)</sup>。則ち、がんでは変異チロシンキナーゼの細胞内 sorting が wild-type と異なっていることが示唆された。この現象は、他のドライバー遺伝子変異でがん細胞増殖が促される場合にも見られ (例えば、EGFR 変異肺癌)、ドライバー遺伝子変異を持つがんに一般的な現象と考えられる。

本研究では超解像度ライブイメージングシステム (SCLIM) を用い、トランスゴルジでの正常 KIT と変異 KIT の Sorting とゴルジでの局在化の機構を明らかにすることと、治療薬であるイマチニブが細胞内に取り込まれた後、細胞内の動態を明らかにしどこに集積しているかを明らかにすることが目的である。

### 方法

初発 GIST の KIT 遺伝子変異症例 (exon 9, exon 11, exon17) と PDGFRA 遺伝子変異症例 (exon 18)、wild type GIST 並びに二次遺伝子変異を持つイマチニブ耐性 GIST (KIT 遺伝子 exon 11 変異陽性) のパラフィンブロックを用いて、KIT と PDGFRA チロシンキナーゼと各オルガネラマーカーとの共在を共焦点顕微鏡にて観察した。

GIST 細胞株 (GIST T1 並びに GIST882) を用い、輸送阻害剤、KIT 阻害剤、下流の細胞内シグナル伝達系 (AKT-mTOR, STAT5, MEK-Erk 系) 阻害剤等の投与により、KIT の活性化と局在部位、KIT 下流のシグナル伝達系の活性化状態を調べ、GIST 細胞の増殖能や細胞死との関連を調べた。

更に、蛍光残基を付けたイマチニブを合成 (Imatinib-NBD, Imatinib-BODIPY) するとともに、Turn-on システム用のシクロオクテン付きイマチニブと Turn On 用 BODIPY を合成し、腫瘍細胞株を用いた *in vitro* での Turn On 手法を確立した (Fig. 1) <sup>4)</sup>。尚、Turn-on システムとは、BODIPY 等蛍光物質と標識したい物質を別々に作製、事前に蛍光標識したい物質にアルケン或いはアルキン結合を付けておき、二つの物質が同時に存在すると瞬時に結合し、結合した時に初めて強い蛍光を発する手法である。

\*現所属：国立がん研究センター 中央病院

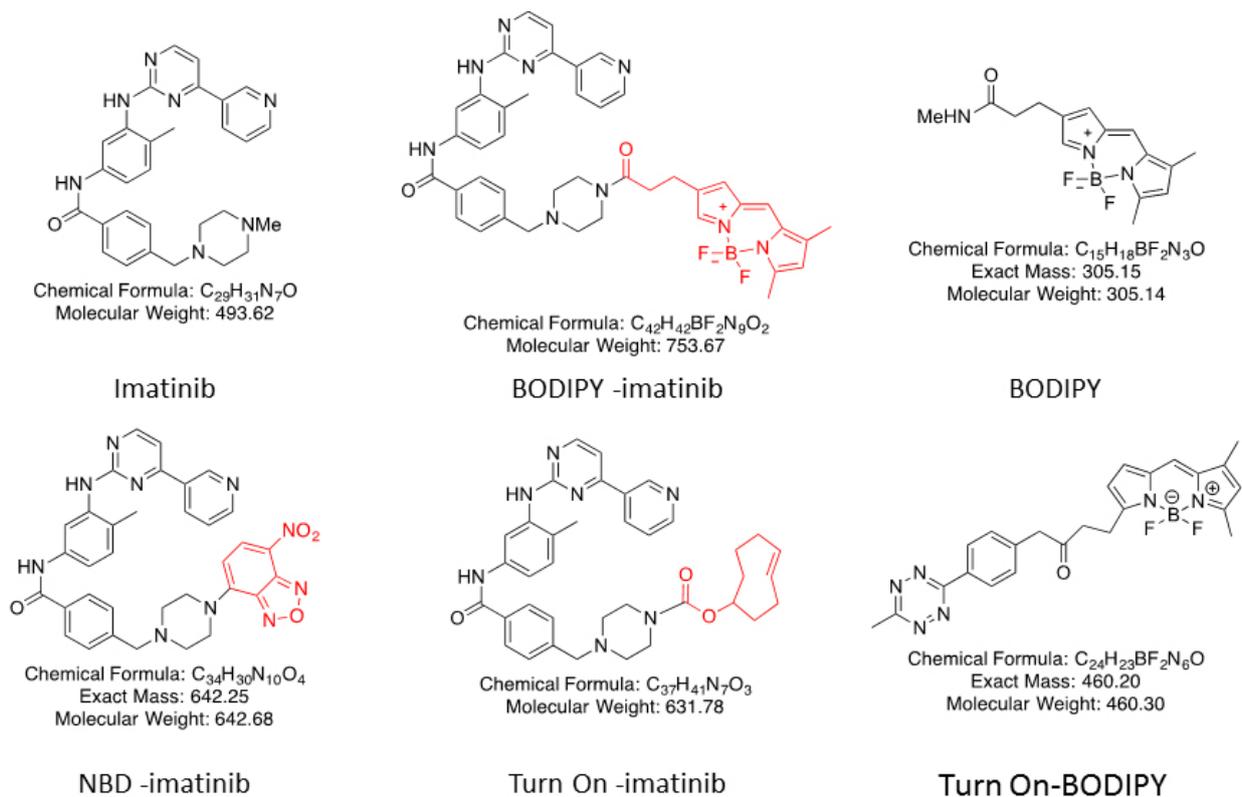


Fig. 1. Structure of imatinib and related drugs including turn-on drugs  
Figures show imatinib, synthesized fluorescent imatinib and turn-on drugs.

## 結果

### 1. 臨床検体での細胞内での KIT 局在

臨床検体を用い変異 KIT ないし変異 PDGFRA の細胞内の局在部位をオルガネラマーカークとの共染で確認した。変異 KIT ないし変異 PDGFRA はゴルジマーカの GM130 並びに Golgin97 と共存し、LysoTracker、Lamp1 (リソゾームマーカーク) や Calnexin (ER マーカーク) とは共存しなかった (Fig. 2)。一方、wild type KIT (PDGFRA 変異 GIST に発現する KIT や wild type GIST の KIT) は細胞膜に集積していた。詳細な変異 KIT の局在を確認すると、主局在はトランスゴルジであった。耐性型二次遺伝子変異を持つイマチニブ耐性 GIST も KIT はゴルジに集積していた。

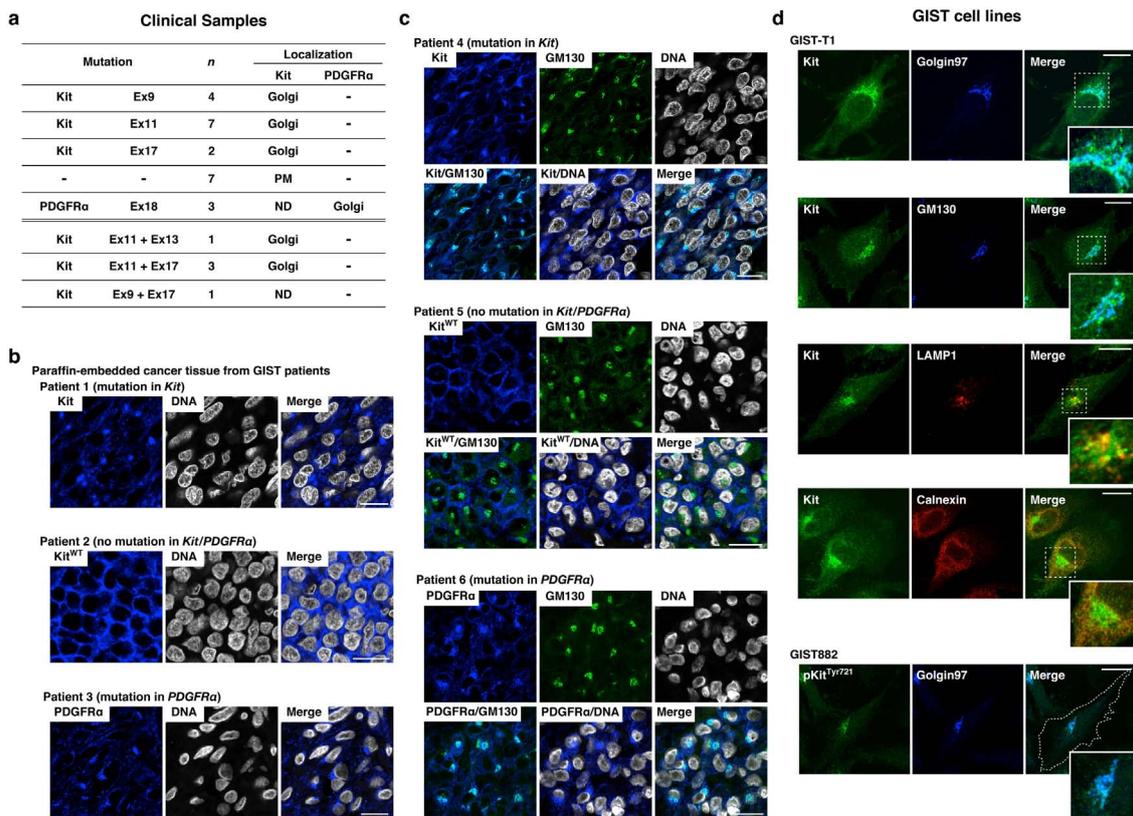


Fig. 2. Cellular localization of mutated KIT

a) Summary of *KIT* and *PDGFRA* mutations and intracellular localization of KIT and PDGFRA tyrosine kinases in clinical samples.

b) and c) Typical examples of KIT and PDGFRA localization.

d) Cellular localization of KIT tyrosine kinase in GIST cell lines.

Bars indicate 20  $\mu$  m.

## 2. 細胞株を用いた解析

GIST 細胞株 (GIST T1 と GIST882) でも、KIT や PDGFRA チロシンキナーゼは変異があるとゴルジに集積し、変異が無いと細胞膜に集積していた。耐性型二次遺伝子変異を持つ GIST 細胞株も KIT はゴルジに集積し活性化していた (Fig. 2)。

KIT 阻害剤であるイマチニブを加えると変異 KIT の自己リン酸化と下流細胞内シグナル伝達系の活性化は消失し、KIT は変異があっても、ゴルジ集積は無くなり細胞膜に集積していた (Fig. 3)。則、変異 KIT は、ゴルジで自己リン酸化=活性化が起こった時にのみゴルジに停留していた。次に、ゴルジでの糖鎖修飾の影響を見た。糖鎖修飾を阻害しても、KIT の活性化とゴルジ集積は変化しなかった。ゴルジ⇒細胞膜の輸送阻害剤である monensin の添加による KIT のゴルジ集積とそこでの KIT 活性化にも変化を認めなかった。また、幾つかの下流のシグナル伝達系の阻害剤を投与したが (ATK-mTOR、STAT5、MEK-Erk 阻害剤)、何れの薬剤も KIT の集積部位をゴルジから変化させることは無かった。

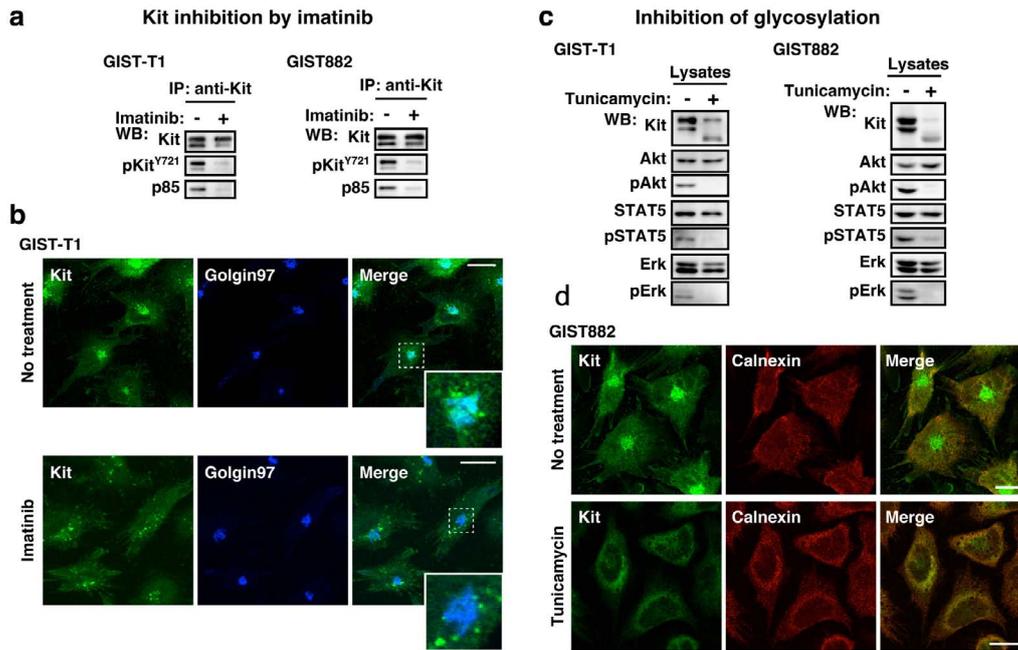


Fig. 3. Effects of imatinib and glycosylation on intracellular KIT localization  
 a) and b) Changes in cellular localization of KIT tyrosine kinase by imatinib.  
 c) and d) Effects of inhibition of glycosylation on cellular localization of KIT kinase.  
 a) and c) are western blotting, and b) and d) are confocal microscopic pictures. Bars indicate 20  $\mu$  m.

### 3. 細胞内イマチニブの動態と集積部位

イマチニブ自体は弱いながらも蛍光 (290 nm 励起、540 nm のエミッション) を持つとされている。しかし、現在の測定機器感度では直接イマチニブ濃度を測定することは困難である。そこで、Fig.1 の様な蛍光残基 BODIPY 付きイマチニブや NBD 付きイマチニブを合成して、GIST 細胞株と共焦点顕微鏡並びに SCLIM を用いて細胞内動態や集積部位を測定した。これら蛍光残基を付けたイマチニブは細胞膜から細胞質に取り込まれると、迅速にエンドソームと一部小胞体へ集積していた。この集積は BODIPY 自体や NBD 自体とは異なること、BODIPY 付きイマチニブや NBD 付きイマチニブがイマチニブよりは  $IC_{50}$  が一桁高いものの同様に KIT チロシンキナーゼを阻害することから、イマチニブと同様の細胞内動態を示すことが推測された。さらに、Turn On 手法を用い細胞内で自動的に BODIPY 付きイマチニブを合成させることで、イマチニブ分布をみてもエンドソームと一部小胞体へ集積していた。逆に言えば、イマチニブのゴルジ集積は見られず、ゴルジでのイマチニブ分布は細胞質と同程度に低いことが推測された。

## 考 察

正常の KIT は主に細胞膜表面上に発現し、SCF と結合して二量体を形成し自己リン酸化を生じ、下流の細胞内シグナル伝達系を活性化することで、増殖シグナル等を発する。その後 endocytosis を受けてエンドソームで処理され活性が消失し、細胞へのシグナルもなくなる。一方、遺伝子変異を持つことで SCF の結合なしに自己リン酸化と細胞内へのシグナルを発する変異 KIT は、マスト細胞腫での変異 KIT 活性化は endosome で、GIST 細胞では変異 KIT はトランスゴルジで起こっている。これまでの論文をレビューすると、変異チロシンキナーゼ活性化が腫瘍化に関連する場合、これら腫瘍以外では肺癌の変異 EGFR、肝癌の変異 MET は endosome でキナーゼ活性化が起こり、急性骨髄性白血病の変異 FLT3 (missense mutation や ITD)、多発性骨髄腫の変異 FGFR3 は GIST と同様にゴルジに集積して活性化している。この様に変異キナーゼは、wild type キナーゼが活性化する場所とは異なる細胞内部位で活性化していることがある。その部位は大きく分けて、ゴルジと endosome が多いようである。この細胞内チロシンキナーゼ活性化部位に関しては、GIST 細胞に変異 EGFR を transfection すると endosome に分布し、EGFR 肺癌に変異 KIT を

transfection するとゴルジ体へ集積し活性化した。ゴルジ体で留まる場合は、チロシンキナーゼがゴルジ体で完全活性化し、下流のシグナル伝達系もフルに活性化しており、ゴルジ体を越えて endosome に分布する場合は、キナーゼのリン酸化は起こっても完全活性化には至らず、下流のシグナル伝達系も全てが活性化していない様である。以上から、ゴルジ体滞留には KIT チロシンキナーゼが自己リン酸化し、下流シグナル伝達系が活性化している必要があることが推測された。則、KIT 活性化（リン酸化）があるとゴルジでの輸送タンパクとの結合が外れ（或いは特定のゴルジタンパクと結合し）、ゴルジから細胞膜への vesicular transport に乗らないようになり、リン酸化 KIT がゴルジに留まるものと推測される。現在この輸送或いは結合タンパク質の特定と詳細な分子メカニズムの解明に取り組んでいる。

一方、KIT 阻害剤～イマチニブの細胞内動態を、蛍光色素を付けたイマチニブや Turn On 用のイマチニブを GIST 細胞に投与することで細胞内の薬剤動態と集積を見ると、「イマチニブ」は細胞膜をエンドサイトーシス以外のメカニズムで通過した後、速やかに細胞質を移動し、主にエンドソームに分布、一部は小胞体と思われる細胞内小器官にも分布していた。今回の研究の場合、蛍光色素を付けた「イマチニブ」であっても、或いは Turn On 用の「イマチニブ」であっても、本来のイマチニブとは一部構造が異なる。従って、これら修飾されたイマチニブが KIT を阻害するというだけでは、KIT と同じ細胞内動態を示しているとは言い切れず、今後、何らかの方法で細胞内のイマチニブを直接測定する必要がある。これまでラマン法を用いて細胞内イマチニブ動態と分布や集積を見た報告があるが、この実験では通常臨床的に使うイマチニブ濃度の約 1000 倍近い濃度を用いており、生理的条件下での測定とは言えない。より鋭敏な、そして正確に細胞内薬剤分布が測定可能な測定法が求められている。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、理化学研究所光量子工学研究領域の黒川量雄と伊藤細胞制御科学研究室の眞鍋史乃、及び国立がん研究センター先端医療開発センター新薬開発分野の安永正浩である。本稿を終えるにあたり、本研究を御支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文献

- 1) Roskoski R Jr. Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase—the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338(3):1307-15. PMID: 16226710 DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.09.150
- 2) Obata Y, Toyoshima S, Wakamatsu E, Suzuki S, Ogawa S, Esumi H, Abe R. Oncogenic Kit signals on endolysosomes and endoplasmic reticulum are essential for neoplastic mast cell proliferation. *Nat Commun.* 2014;5:5715. PMID: 25493654 PMCID: PMC4284665 DOI: 10.1038/ncomms6715
- 3) 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.* 2017;36(26):3661-3672. PMID: 28192400 DOI: 10.1038/onc.2016.519
- 4) Zhang X, Dong T, Li Q, Liu X, Li L, Chen S, Lei X. Second Generation TQ-Ligation for Cell Organelle Imaging. *ACS Chem Biol.* 2015;10(7):1676-83. PMID: 25901763 DOI: 10.1021/acscchembio.5b00193