

113. イマチニブ耐性 GIST での Kit シグナリングの新規阻害戦略

小幡 裕希

東京理科大学 生命医科学研究所 免疫生物学研究部門

Key words : 消化管間質細胞腫 (GIST), Kit チロシンキナーゼ, ゴルジ体, PI3K-Akt 経路, STAT5

緒 言

消化管間質細胞腫 (gastrointestinal stromal tumor: GIST) の 85% のケースで Kit レセプターチロシンキナーゼの活性化変異が認められる。そのため、手術不能・再発症例では Kit 阻害剤イマチニブが投与され、患者の寿命は飛躍的に延びた。しかしながら、投与後 2 年半程度でイマチニブ抵抗型変異を獲得した Kit を発現するようになり、これが制圧できておらず、喫緊の課題となっている。また、そもそも Kit 変異体が GIST 細胞内で「いつ・どこで」シグナル伝達するかが不明である。近年、我々は、Kit 変異が原因で無限増殖するマスト細胞腫において、Kit はエンドリソソームに集積し、そこから増殖シグナルを発信することを見出した¹⁻³⁾ (図 5C 左参照)。そこで、本研究では、GIST における Kit 変異体の細胞内局在と増殖シグナルの関係の解析を試み、その理解を応用したイマチニブ抵抗型 Kit の阻害戦略を見出したので、ここに報告する。

方法および結果

本研究には、GIST の腫瘍切片および複数の患者から樹立された GIST 細胞株を用い (図 1A)、① 免疫染色法と共焦点レーザー顕微鏡で Kit 変異体の細胞内局在、② 増殖シグナルの変化をウェスタンブロットおよび共免疫沈降法で解析した。

1. GIST における Kit 変異体のゴルジ体への異常局在

最初に、患者の原発巣から樹立された GIST 細胞株 (イマチニブ感受性) を抗 Kit 抗体で免疫染色し、局在解析をおこなった。興味深いことに、どの GIST 細胞株においても Kit 変異体の大部分はゴルジ体に局在しており、細胞膜には認められなかった (図 1B)。次に、この核近傍領域を同定するために、オルガネラマーカーとの共染色を試みた。Kit 変異体の局在は、小胞体のカルネキシンやリソソームの LAMP1 とは一致せず、ゴルジマーカー golgin97 と有意に一致した (図 1C)。すなわち、GIST において Kit 変異体はゴルジ体に集積することが明らかとなった。さらに、GIST 患者の腫瘍切片を蛍光イメージングし、臨床標本においても Kit のゴルジ局在が確認された (図 2)。GIST 細胞に発現させた野生型 Kit は細胞膜に局在することを確認したので、Kit のゴルジへの集積は変異に依存することも明らかにした。

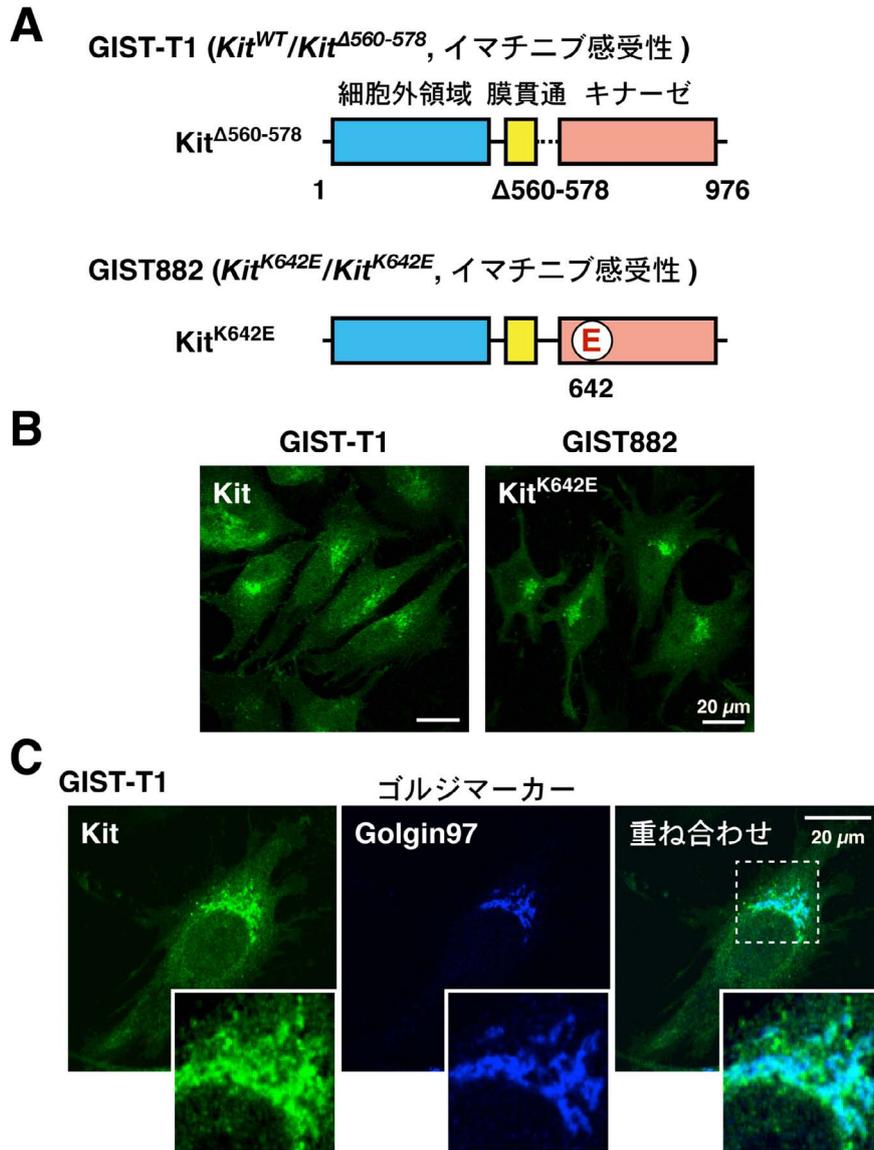


図1. 変異型 Kit の異常局在

(A) GIST に発現する Kit 変異体の構造模式図。Kit は、細胞外・膜貫通・キナーゼ領域から構成される。GIST-T1 の Kit には欠失、GIST882 には K642E 変異が認められ、Kit が恒常的に活性化している。(B) GIST における Kit 変異体の局在。GIST 細胞株において、Kit は核近傍に集積していた。(C) Kit (緑) が集積する核近傍領域は、ゴルジマーカ- (青) と一致した。

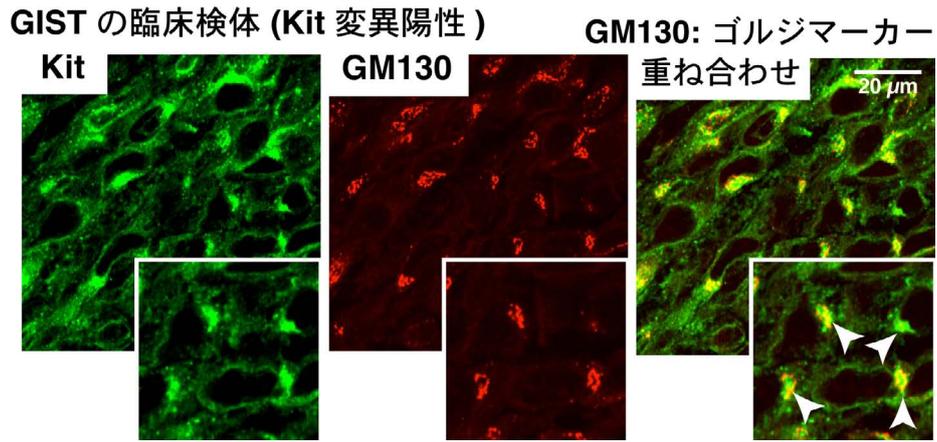


図 2. GIST の腫瘍切片の臨床標本における Kit の局在解析

Kit 変異陽性の患者の GIST 切片の Kit (緑) とゴルジマーカ (赤) を免疫蛍光染色した。細胞株と同様に、臨床標本においても Kit はゴルジ体に集積していた。矢頭はゴルジ領域を示す。

2. GIST における Kit 活性のイメージング

次に、Kit の活性化の指標である自己リン酸化部位を特異的に認識する抗体によって、Kit 活性のイメージングを試みた。図 3A に示すように、Kit の活性化が起こっている領域は核近傍に局限していた。さらに、共染色により、その領域がゴルジ体であることが明らかとなった (図 3B)。また、ゴルジ以外に分布する Kit は、脱リン酸化が優位に起こっていることが確認されている。以上の結果は、GIST の Kit 変異体は、ゴルジ体のみで活性化していることを示唆する。

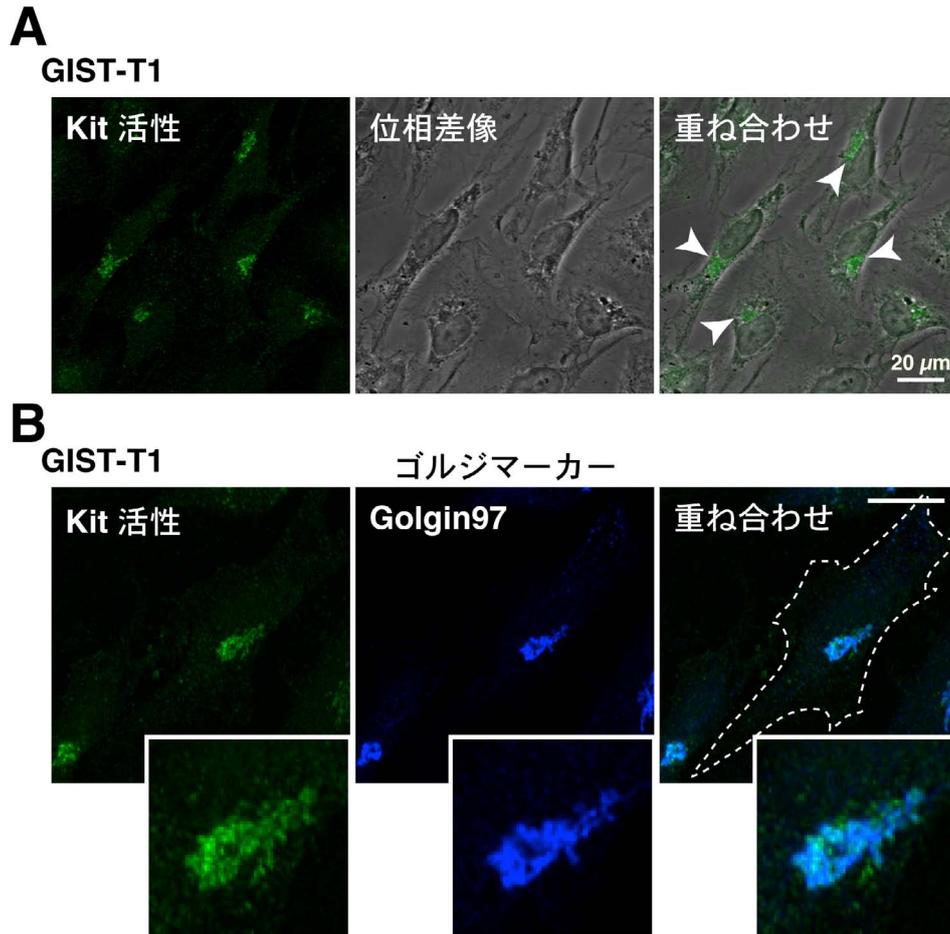


図3. Kit 活性の蛍光イメージング

(A) Kit の活性化の指標である自己リン酸化部位に対する抗体で免疫染色した。矢頭は核近傍領域を示す。GIST 細胞株において、Kit 活性は核近傍のみに限局して認められた。
 (B) Kit が活性化している領域は、ゴルジマーカー（青）と一致していたことから、GIST の Kit はゴルジ体のみで活性化していることが示唆される。

3. GIST の Kit 変異体はゴルジ体から増殖シグナルを発信する

これまで、他の研究グループによって、Kit は PI3K-Akt 経路、STAT 転写因子、Erk を活性化し、細胞を増殖に導くことが明らかにされている。そこで、GIST の Kit 変異体が、それら下流分子をゴルジ体で活性化しているかを検討した。Kit は、小胞体で生合成された後にゴルジ体に輸送されるので（図 5C 参照）、小胞体→ゴルジの輸送を阻害するプレフェルジン A (brefeldin A: BFA) を処理した時の増殖シグナルへの影響を調べた。図 4A に示すように、BFA を処理した時、Kit のゴルジ局在の減少および小胞体マーカーカルネキシンとの共局在の増加が認められ、この処理により、Kit の小胞体からの排出が抑制されたものと考えられる。図 4B には、その時のウェスタンブロットティングの結果を示した。BFA を処理した時、Kit の活性化の指標であるリン酸化が減少し、それに伴い、Akt、STAT5、Erk のリン酸化が顕著に抑制された（Kit のバンドが下方にシフトしているのはゴルジでの糖鎖修飾が起きないため）。さらに、ゴルジ体からの排出を抑制するモノネシンを処理した時、Kit 活性および Akt、STAT5、Erk の活性化には影響が無かった（図 4C）。すなわち、GIST において Kit 変異体はゴルジ体で増殖シグナルを発信し、細胞を無限増殖に導くことが明らかとなった（図 5C 右参照）。

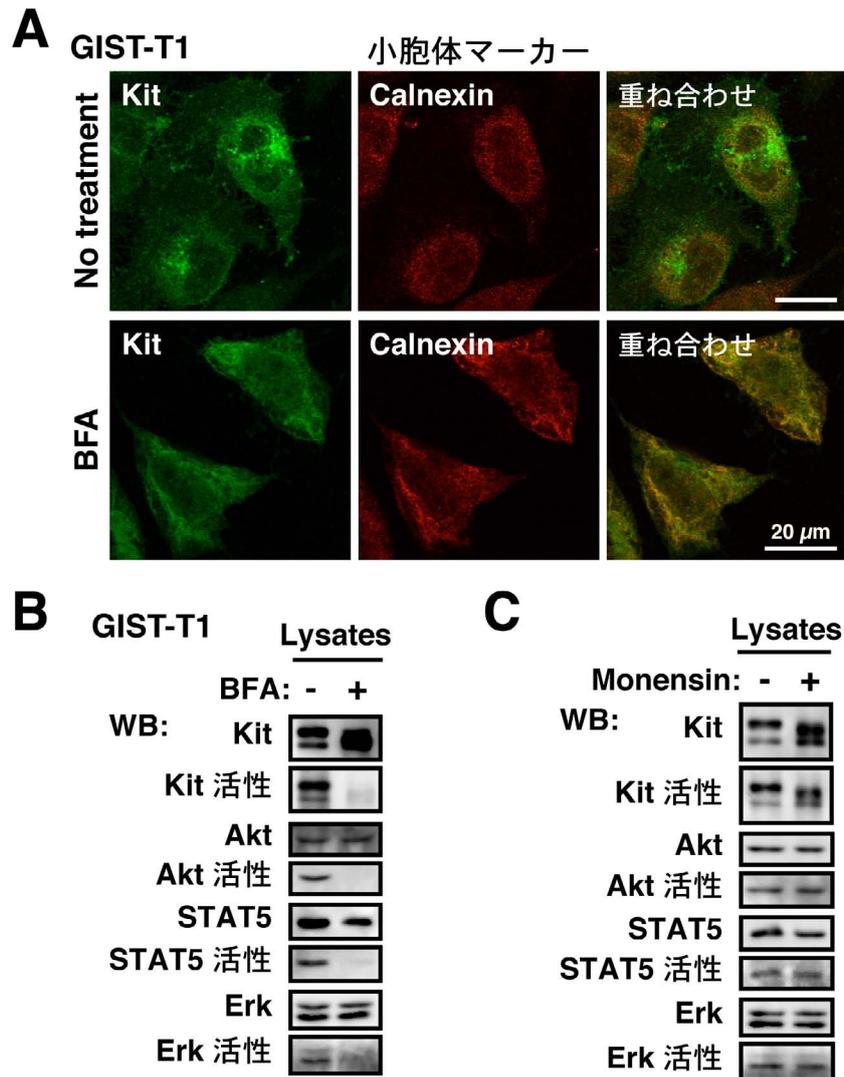


図 4. GIST の Kit 変異体はゴルジ体から増殖シグナルを発信する

(A) GIST 細胞株に小胞体-ゴルジの輸送阻害剤ブレフェルジン A (BFA) を処理した。この処理によって Kit のゴルジ局在が消失し、小胞体マーカーとの共局在が有意に増加した。(B) BFA を処理した時、Kit 活性、Akt、STAT5、Erk の活性化が顕著に抑制された。(C) ゴルジ体からの排出阻害剤モネンシンを処理しても、Kit シグナルには影響無いため、GIST の Kit は増殖シグナルを起こすためにゴルジ体に局在するだけで十分であることが示唆される。

4. GIST におけるイマチニブ抵抗型 Kit による増殖シグナル

では、イマチニブ抵抗型変異を持つ Kit もゴルジ体で増殖シグナリングを起こすのだろうか。最後に、イマチニブ抵抗型 Kit を発現する耐性株における検討をおこなった。興味深いことに、イマチニブ抵抗型 Kit もゴルジ体に集積し、そのみで活性化していた (図 5A)。さらに、BFA で小胞体からの排出をブロックした時、増殖シグナルは顕著に抑制された (図 5B)。これらの結果から、イマチニブへの抵抗性の有無にかかわらず、GIST における Kit 変異体はゴルジ体から増殖シグナルを発信することが明らかとなった^{4,5)}。重要なことに、イマチニブ抵抗型 Kit 変異体であっても、ゴルジ体に移動させなければ、増殖シグナルを起こすことができないことから、現在我々は、この局在メカニズムを標的とした阻害剤が耐性克服戦術の一つとなるものと考え⁶⁾、検討をおこなっている。

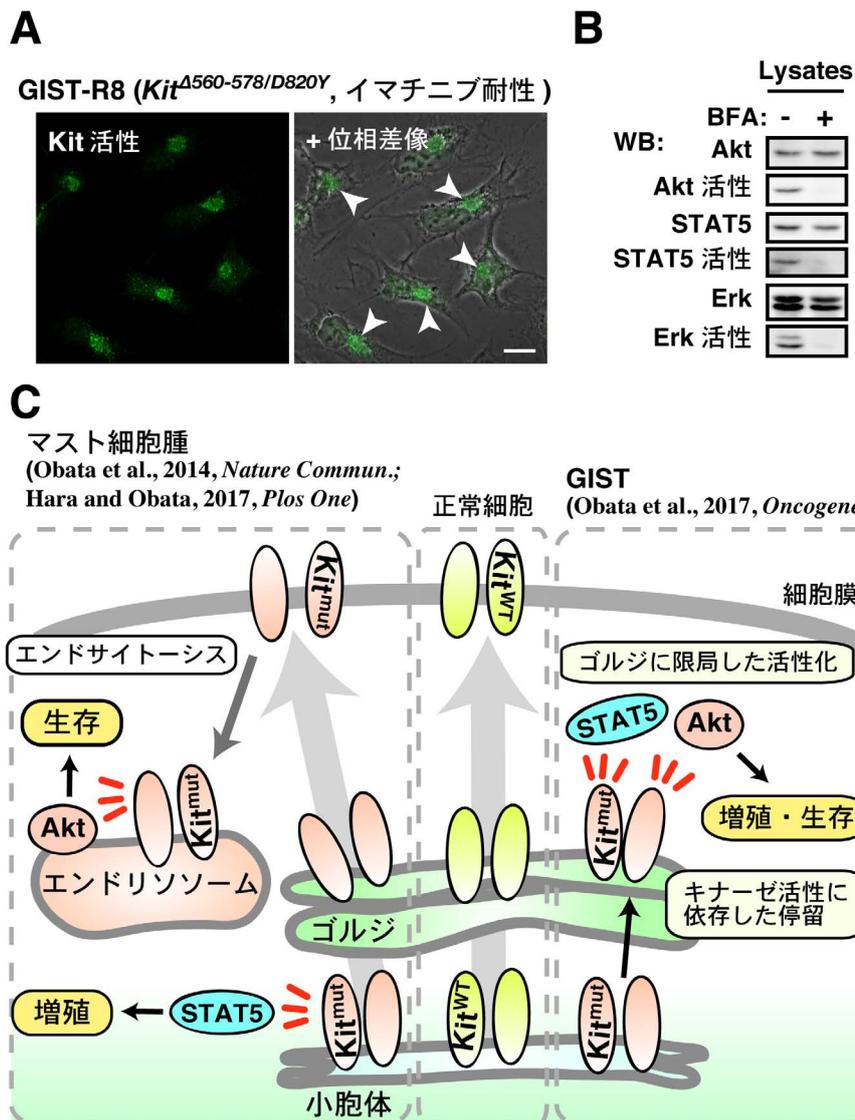


図 5. イマチニブ抵抗型 Kit もゴルジ体で増殖シグナルを起こす

(A) イマチニブ抵抗型変異を持つ Kit を発現する細胞株においても Kit はゴルジ (矢頭) のみで活性化していた。Scale Bar: 20 μ m. (B) BFA を処理しゴルジ体への輸送を抑制した時、イマチニブ抵抗型 Kit による Akt、STAT5、Erk の活性化が抑制され、ゴルジでの増殖シグナルが示唆される。(C) マスト細胞腫・GIST における Kit シグナルのモデル。両腫瘍における kit シグナルが起こるオルガネラは明らかに異なる。

考 察

GIST・マスト細胞腫において、Kit 変異体は細胞膜ではなくオルガネラをシグナリングプラットフォームとすることが示唆される (図 5C)。また、同じ Kit 変異体なのにもかかわらず、がん種が異なることでシグナルの場が異なることは非常に興味深い。今後は、「① 何故、Kit 変異体がゴルジ体やエンドリソソームなどのオルガネラをシグナルプラットフォームとするのか」、「② Kit の局在について GIST とマスト細胞腫の間の違いをもたらし機構」、「③ 他のがんにおける変異レセプター (EGF レセプターや Flt3 の変異体など) もオルガネラでシグナル伝達するのか」、「④ 変異型レセプターの異常局在を考慮に入れた創薬」について研究を進めていきたい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京理科大学の江角浩安博士、国立がん研究センター中央病院の西田俊朗博士、大阪大学医学部の高橋剛博士、大阪警察病院の辻本正彦博士、Harvard Medical School の Jonathan Fletcher 博士です。本研究を遂行するにあたり、ご支援を賜り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) 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. *Nature Commun.* 2014 ;5: 5715. doi: 10.1038/ncomms6715.
- 2) 小幡裕希, 豊島翔太, 若松 英, 小川修平, 江角浩安, 安部 良. マスト細胞をがん化に導くシグナル伝達は細胞膜ではなく「エンドリソソーム」, 「小胞体」で起こる. *臨床免疫・アレルギー科*, 科学評論社, 東京 2015 年 第 64 巻 第 4 号 p380-385.
- 3) Toyoshima S, Wakamatsu E, Ishida Y, Obata Y, Kurashima Y, Kiyono H, Abe R. The spleen is the site where mast cells are induced in the development of food allergy. *Int Immunol.* 2017 Jan 1;29(1):31-45. doi: 10.1093/intimm/dxx005. PMID: 28177443.
- 4) 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: 3661-3672. doi: 10.1038/onc.2016.519.
- 5) 小幡裕希, 消化管間質細胞腫の Kit 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*, 2017, 第 34 巻 第 7 号 p44-49.
- 6) 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.* 2017; doi: 10.1371/journal.pone.0175514.