

厚生労働科学研究費委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
分担研究報告書

神経芽腫腫瘍検体の proteome 解析

研究分担者 堺 隆一 国立がん研究センター研究所 難治進行がん研究分野 分野長

研究要旨

神経芽腫において野生型 ALK と結合する蛋白質と質量分析にて半網羅的に同定し、ALK シグナルの調節と神経芽腫の幹細胞特性や治療抵抗性との関わりを解析を行った。エンドサイトーシスに関わるラフト局在蛋白質 Flottillin-1 (FLOT1) は、ALK と結合しその細胞内への取り込みや分解に関わり、ヒト神経芽腫組織の解析においても FLOT1 の発現が低い群で有意に予後不良群であることが分かった。FLOT1 低下による受容体型チロシンキナーゼの活性化は ALK に選択的に認められ、この分子が特に ALK 阻害剤に対する腫瘍の感受性に関わることを明らかにした。また同じく ALK と結合することが明らかになった蛋白質チロシンホスファターゼの SHP2 の発現が ALK に依存した神経芽腫の悪性形質に関わることを示され、その作用機序について解析を進めている。

A．研究目的

神経芽腫における ALK の活性化変異は全体の 7 ~ 8 % 程度であるとみられ、遺伝子増幅と合わせても 10 % 程度である。ALK が活性化した悪性リンパ腫や肺癌においては、ALK 阻害剤が臨床試験にまで進められていて著効を示す例があり、神経芽腫においても遺伝子増幅例では効果があるものの、頻度の高い F1174L など幾つかの変異については ALK 阻害剤の効果を示しにくいとの報告がある。一方これまでの解析で、ALK に遺伝子変異がなくても ALK の蛋白質量が増加している神経芽腫症例は予後が悪いというデータも得ており (Tomiya A et al, Cancer Res 2014)、このようなケースで

は、ALK 阻害剤が効果を示す可能性がある。今後問題になると危惧される薬剤抵抗性などの問題を回避するためにも、神経芽腫で活性化した ALK がもたらすがん化シグナルの正確な理解は極めて重要な課題であると考えられる。複数の神経芽腫細胞・スフェアからリン酸化チロシンを含む蛋白質群をカラム精製し、新規 ALK 結合蛋白質などを中心に質量分析で同定して機能解析を行い ALK 結合分子群の腫瘍特性や治療抵抗性との関わりを包括的に理解することにより、ALK チロシンキナーゼが伝える特別ながん化シグナルの本態を解明し、治療抵抗性を克服する道筋を見出すことを目的とする。

B . 研究方法

ALK 結合蛋白質を同定する最初の試みとして FLAG タグを付加した野生型 ALK を恒常的に発現する神経芽腫細胞株から M2-アガロースによって FLAG タグの着いた蛋白質をプルダウンして、コントロール親株 (TNB-1 細胞) と比較して導入した ALK に特異的に結合する蛋白質を質量分析にて半網羅的に解析してきた。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。Flotillin1 (FLOT1)、PTPN11 (SHP2)、SH2B1 など特異的抗体を入手でき、ALK との結合やリン酸化が確認できたものについて先行して抗体や siRNA を用いた機能解析を進めた。今回新規に見つかった他の分子についても特異的抗体を作成して同様な機能解析に進めつつある。具体的には以下のような解析を中心に、推定される分子特有の機能に対する解析も加える。

・ 神経芽腫の生物学的特性への影響

siRNAによる発現抑制で、増殖能、運動性、細胞増殖能、運動能、スフェア形成能、ソフトアガーコロニー形成能、ヌードマウスでの造腫瘍能などに与える影響を検討する。また、ALKの発現やリン酸化の程度、既知のAkt、Erk1/2などの下流分子の活性化などに与える影響について、それぞれリン酸化特異的抗体を用いて検

討する。

・ 阻害剤感受性への影響

ALK阻害剤TAE684の増殖抑制効果を濃度をふって検討し、各々のALK結合蛋白質の発現抑制がALK阻害剤に対する感受性に与える影響を検討する。

C . 研究結果

神経芽腫でALKに結合するリン酸化蛋白質として同定したFlotillin1 (FLOT1)はそ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から、ALK蛋白質の安定性などとの関わりで機能解析を進めた。その結果、ラフトに局在するFLOT1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が示された。また、神経芽腫で見られるF1174Lなど幾つかの変異に関して、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た。一方で神経芽腫でFLOT1の発現をノックダウンにより抑制すると、細胞運動能、足場非依存性増殖、ヌードマウスにおける造腫瘍能などが増加するという結果も得られた。以上のことからFLOT1の発現低下やFLOT1との結合能が低いALK変異により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可能性が示唆された。この結果は、ALK蛋白質の発現量が遺伝子変異の有無にかかわらず神経芽腫の予後不良に関わるという解析結果とも整合性が有り、今後FLOT1低値の神経芽腫においてALK阻害剤が治療に

有効である可能性について動物モデルなどを用いて検証していく必要がある。

SHP2 (PTPN11) については、ALK自体またはSrcによりチロシンリン酸化を受け、神経芽腫細胞のアポトーシス抑制に関わることが示された。SH2B1については、ALKと結合すること、ALK阻害剤でチロシンリン酸化が落ちること、siRNAによるノックダウンで神経芽腫の運動能などの悪性形質が抑制されることは確認できている。SHP2とSH2B1がそれぞれ蛋白質ホスファターゼとシグナルアダプター分子として、どのようにALKシグナルの調整に関わっているのか現在詳細について解析を進めている。

D . 考察

今回、初めてALKに結合するリン酸化蛋白質として同定したFlotillin1 (FLOT1) は、ヒト神経芽腫組織の解析においても予後不良群の組織で発現は低下しており、FLOT1の発現低下やFLOT1との結合能が低いALK変異により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と悪性化に関わり、このような細胞はcrizotinibなどALK阻害剤に感受性が高い可能性が示唆された。また同じくALKに結合する分子として新たに同定したチロシンホスファターゼSHP2 (PTPN11) は、ドッキング分子ShcCとともにALKと複合体を作り、ALKの活性化シグナルを下流のErkやAktに媒介して神経芽腫の進展を制御していると考えている。ALKのシグナル

を負と正に制御するこの2つのシステムのバランスが、神経芽腫の薬剤感受性、幹細胞性、転移能などの性質にどのように関わるかを、今後他の神経芽腫細胞や幹細胞スフェアなども用いて調べる必要がある。

E . 結論

ALKシグナルの活性化が神経芽腫の進行過程で重要な役割を果たすと考えているが、ALK結合蛋白質の解析で、以前から研究しているShcCや今回新たに見つかったSHP2のようにALKシグナルを正に制御する分子と、FLOT1のようにALKシグナルを負に制御する分子群があることが分かった。生理的にはALK活性がこれらの分子群の巧妙な調節によって制御されていると考えられるが、神経芽腫はそのバランスの破綻した状態と捉えることもできる。今後、神経芽腫の幹細胞性や自然消退において、既に解析した分子を含むALK結合分子群がどのように関与しているのかを明らかにすることによって、阻害剤抵抗性などの壁を乗り越えた新規治療法の開発につながると考える。

G . 研究発表

1. 論文発表

Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K, Yamaguchi H, Sakai R, Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK

membrane association. Cancer
Res.74:3790-3801,2014

Yamaguchi H, Takanashi M, Yoshida N, Ito
Y, Kamata R, Fukami K, Yanagihara K,
Sakai R. Saracatinib impairs the peritoneal
dissemination of diffuse-type gastric
carcinoma cells resistant to Met and FGFR
inhibitors. Cancer Sci.105:528-536,2014

Yamaguchi H, Yoshida H, Takanashi M, Ito
Y, Fukami K, Yanagihara K, Yashiro M,
Sakai R. Stromal fibroblasts mediate
extracellular matrix remodeling and invasion
of scirrhous gastric carcinoma cells.
PlosOne 9(1):e85485,2014

Uekita T, Fujii S, Miyazawa Y, Iwakawa R,
Narisawa-Saito M, Nakashima K, Tsuta K,
Tsuda H, Kiyono T, Yokota J, Sakai R.
Oncogenic Ras/ERK signaling activates
CDCP1 to promote tumor invasion and
metastasis. Mol Cancer
Res.12:1449-1459,2014

2. 学会発表

Tomiyama A, Uekita T, Sakai R: Flotillin1
regulates oncogenic signaling in
neuroblastoma cells through receptor
endocytosis of anaplastic lymphoma kinase.
Advances in Neuroblastoma Research 2014,
2014, Toronto Canada.

山口英樹, 堺隆一: 間質線維芽細胞との
相互作用を標的としたスキルス胃癌治
療薬の探索. 第23回日本がん転移学会
学術集会・総会, 2014, 金沢

白木原琢哉, 堺隆一: スキルス胃癌の
浸潤・腹膜播種へのFGFシグナルの関与.
第23回日本がん転移学会学術集会・総
会, 2014, 金沢

上北尚正, 堺隆一: 小細胞がんにおける
足場非依存性増殖シグナルの解析. 第2
3回日本がん転移学会学術集会・総会,
2014, 金沢

上北尚正, 堺隆一: Ras-ERKシグナルに
よるCDDP1発現誘導を介した癌の浸
潤・転移機構. 第73回日本癌学会学術
総会, 2014, 横浜

中島克彦, 上北尚正, 黒澤仁, 堺隆一:
転移関連タンパク質CDCP1の切断によ
る分泌とその機能. 第73回日本癌学会
学術総会, 2014, 横浜

富山新太, 上北尚正, 山口英樹, 上野英
明, 滝田順子, 佐々木一樹, 中川原章,
森健太郎, 堺隆一: 新規ALK結合蛋白質
であるFlotillin1は、ALKの細胞膜結合の
調節を介してALKシグナルを制御する.
第73回日本癌学会学術総会, 2014, 横
浜

白木原卓哉, 堺隆一: スキルス胃癌の

浸潤・腹膜播種へのFGFシグナルの関与 .
第73回日本癌学会学術総会，2014，横
浜

Sakai R:Regulation of oncogenic signaling
in neuroblastoma through binding partners
of anaplastic lymphoma kinase. 第11回
プロテインホスファターゼ国際カンファ
レンス，2014，仙台

H . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし