

研 究 報 告 書
令和5年度：A課題

2025 年 3 月 31 日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研 究 施 設 国立がん研究センター研究所

住所 東京都 中央区 築地 5-1-1

研究者氏名 小幡 裕希

(研究課題)

ドライバ遺伝子変異キナーゼのオルガネラ局在異常の分子メカニズム

～ ホスホリパーゼ D2 (PLD2) およびその産物の役割 ～

令和6年 3月 18日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しました
のでご報告いたします。

ドライバー遺伝子変異キナーゼのオルガネラ局在異常の分子メカニズム

～ ホスホリパーゼ D2 (PLD2) およびその産物の役割 ～

がん研究センター研究所 がん細胞内トラフィック研究ユニット

ユニット長 小幡 裕希

【目的】 本研究は、がん発症のドライバーの一つである受容体チロシンキナーゼ (receptor tyrosine kinase: RTK) 変異体の異常な細胞内局在の原因と予想されるホスホリパーゼ D2 (phospholipase D2: PLD2) の機能解明を目的としている。これまでに本研究グループは、消化管間質腫瘍 (gastrointestinal stromal tumour: GIST) の発症の主な原因 RTK である KIT 変異体が、プロテインキナーゼ D2 (protein kinase D2: PKD2) に依存してゴルジ領域に停留し、そこで細胞増殖シグナルを発信することを報告した (*Oncogene*, 2017; *Cancer Lett.* 2018; *Cell Reports*, 2023; *JBC*, 2024)。複数知られている PKD2 エフェクターのうち、PLD2 が GIST の KIT 変異体のゴルジ停留の原因であることを示唆するデータを得ており、本研究ではその機能解析を試みた。

【方法】 PKD のエフェクターと予想されるタンパク質に対するインヒビターを GIST 細胞に処理し、KIT の局在に影響を与え、さらに、PKD2 阻害をミミックするものを探索した。リードアウトとして KIT の局在変化を用いるので、免疫蛍光染色と共焦点レーザー顕微鏡による局在解析をおこなった。チロシンリン酸化シグナルの解析、タンパク質間相互作用の解析には、それぞれイムノブロット、共免疫沈降法を実施した。責任分子を明らかにするために、siRNA によるノックダウンで候補化合物の作用のフェノコピーとなるかどうかを検討した。

【結果】 GIST 細胞に対し、複数知られている PKD エフェクターに対するインヒビターを処理した際、PLD 阻害剤である CAY10594 を処理した時に、KIT のゴルジ停留の解除、それに伴うシグナル発信の抑制が認められ、PKD2 抑制の効果をミミックした (図 1A,B)。哺乳細胞で PLD 活性を主に担う PLD1, PLD2 のうち、PLD2 をノックダウンした際に、PLD 阻害剤の効果のフェノコピーとなった。さらに、KIT チロシンキナーゼ阻害剤 (イマチニブ) の処理と

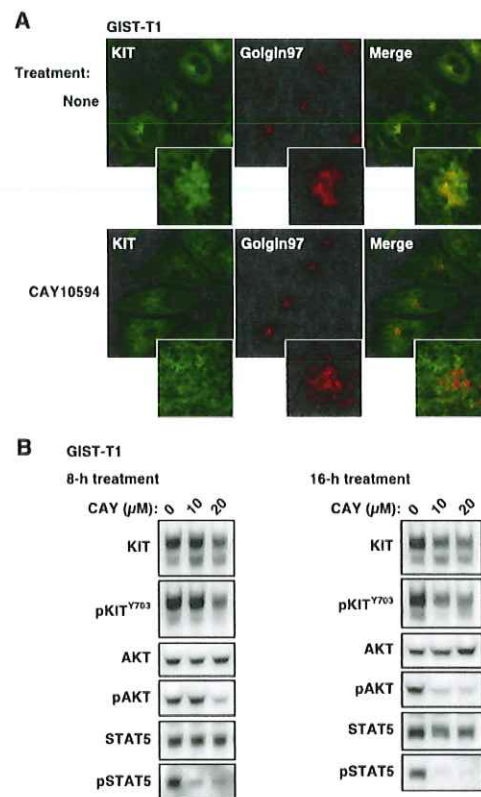
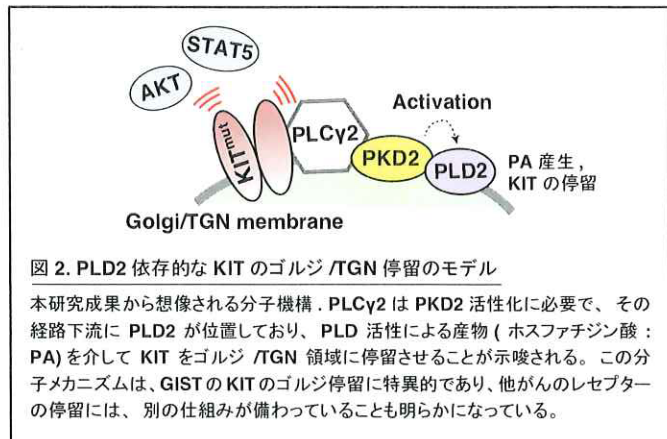


図 1. PLD2 阻害による KIT のゴルジ/TGN からのリリース

(A,B) PLD2 阻害剤 (CAY10594) により、GIST-T1 細胞の KIT 変異体は、ゴルジ/TGN からリリースされ、この時、下流の AKT や STAT5 等の活性化が抑制される。PLD 阻害時の KIT のタンパク質レベルの低下は、リソソームへの移行・それに伴う分解であることが確認されている。これら結果は、他 PLD 阻害剤や PLD2 ノックダウンの結果から支持される。PLD2 は KIT をゴルジにトラップし、増殖シグナル維持の原因となることが示唆される。

共免疫沈降法を組み合わせ、KITとPLD2が物理的に相互作用しており、また、KITがPKD2を介してPLD2を活性化することを明らかにした。即ち、GISTのKITは、PKD2-PLD2経路を活性化し、KIT自身をゴルジ停留させていることが示唆された(図2)。一方、PKD2-PLD2経路は、急性骨髄性白血病、胃がん、肺がん等のRTK(FLT3, MET等)のゴルジ停留およびそこでの活性化においては機能しておらず、それぞれのがんのRTKに対して停留機構が備わっていることが明らかになった。



【考察】 PKD-PLD 経路の活性化は、ゴルジ体における輸送キャリア形成を促し、タンパク質輸送を担うと考えられてきたが、本研究で、その調節破綻がチロシンキナーゼのゴルジ停留の原因となることが示唆された(国際科学誌にて査読中)。一方で、他のがんのRTKのゴルジ停留にはPLDは関係しないことが明確なので、その理由についても今後明らかにしていきたい。

【文献】

Obata Y, Natsume M, Shiina I, Takahashi T & Nishida T. Golgi retention of KIT in gastrointestinal stromal tumour cells is phospholipase D activity-dependent. *bioRxiv* (2025) <https://doi.org/10.1101/2025.03.02.640696>

Obata Y & Nishida T. Golgi Retention and Oncogenic Signaling of KIT Tyrosine Kinase in Gastrointestinal Stromal Tumor. *Springer series of Subcellular Biochemistry*, Chapter 18, “The Golgi Network” *In Press*.

Natsume M, Niwa M...Nishida T, Shiina I & Obata Y. Brefeldin A and M-COPA block the export of RTKs from the endoplasmic reticulum via simultaneous inactivation of ARF1, ARF4, and ARF5. *J. Biol. Chem.* 300, 107327 (2024)

Obata Y, Kurokawa K, Tojima T, *et al.* Golgi retention and oncogenic KIT signaling via PLCγ2-PKD2-PI4KIIIβ activation in gastrointestinal stromal tumor cells. *Cell Reports*, 42, 113035 (2023)