

抗がん剤抵抗性の新規メカニズムの解明

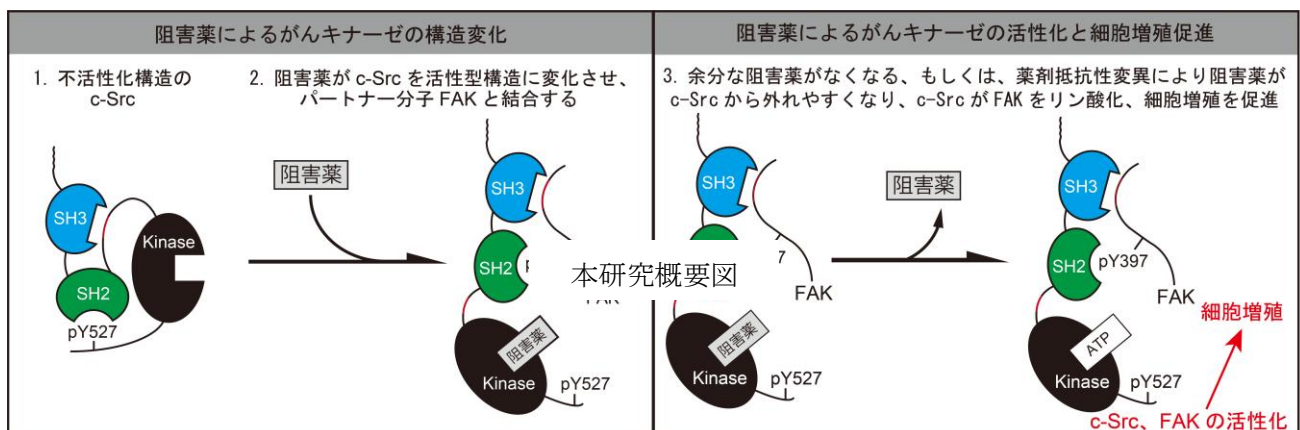
—薬剤抵抗性がん細胞は抗がん剤により増殖する—

概要

京都大学大学院医学研究科 神経・細胞薬理学分野 樋口牧郎研究員、渡邊直樹教授および血液・腫瘍内科学 高折晃史教授らの研究グループは、がん治療抵抗性の新たな分子メカニズムを発見しました。

治療抵抗性がん細胞の出現はがん化学療法において大きな課題であり、その分子メカニズムには多くの謎が残されています。本研究グループは、がん細胞の増殖を促進すると考えられている c-Src と呼ばれるチロシンキナーゼ⁽¹⁾ に注目しました。近年、がん細胞の増殖に関与するキナーゼの活性を阻害する分子標的薬が数多く開発されています。本研究では、蛍光顕微鏡を用いたライブセルイメージングによって、キナーゼ阻害薬⁽²⁾ が c-Src に結合すると c-Src の分子構造が不活性型から活性型へ変化することを見い出しました。さらに、治療抵抗性変異をもつ c-Src に対しキナーゼ阻害薬は効果を失うだけでなく、キナーゼ阻害薬がかえって変異体 c-Src を活性化し、がん細胞の増殖を促進することを明らかにしました。本研究成果は、治療抵抗性のしくみを解明し、より効果的な抗がん作用をもつキナーゼ阻害薬の開発の基盤になると期待されます。

本成果は、2021年3月24日に国際学術誌「Cell Reports」にオンライン掲載されました。



1. 背景

がん化学療法では、がん関連キナーゼに対する抗がん剤であるキナーゼ阻害薬が様々な種類のがん治療において用いられています。しかし、キナーゼ阻害薬の有効性は必ずしも高くありません。その原因として、阻害薬が作用しにくい抵抗性変異を標的キナーゼが獲得することや、阻害薬が効かない別のがん関連キナーゼの活性化が考えられてきました。私たちはがん細胞の薬剤耐性獲得のメカニズムを知るために、世界で最初に同定されたがん関連キナーゼである c-Src に注目しました。c-Src は様々な増殖因子受容体や細胞接着分子と協働し、細胞の増殖や浸潤を促進することが知られ、キナーゼ阻害薬の抵抗性にも関与することが示されています。そのため、c-Src にも効果をもつ多目標キナーゼ阻害薬が複数開発されてきました。しかし、c-Src への阻害作用が治療効果を高めるかについては明確になっておらず、また、競合阻害薬への抵抗性獲得のメカニズムに関しても解明されていませんでした。

2. 研究手法・成果

c-Src は自身の分子内相互作用により不活性型構造となり、他の分子に対して作用しません。この自己抑制機能が解除された活性型 c-Src はパートナー分子と結合し、細胞増殖や浸潤を促進するシグナル伝達を行います。私たちは、緑色蛍光タンパク質である EGFP を付けた c-Src (c-Src-EGFP) を細胞に発現させ、Src 阻害薬が及ぼす影響を蛍光顕微鏡で観察しました。不活性型 c-Src は細胞膜上に存在しますが、活性型 c-Src は接着斑と呼ばれる細胞内構造に移動することが知られています。私たちの実験により、細胞膜に局在していた c-Src-EGFP が阻害薬により接着斑へ移動することが明らかになりました (図 1)。また、受容体チロシンキナーゼを標的としながら、c-Src にも親和性を示す阻害薬も c-Src-EGFP の接着斑への移動を引き起こしました。顕微鏡による観察と精製したタンパク質を用いた実験により、阻害薬が c-Src を活性型構造に変化させ、阻害薬と c-Src の複合体が c-Src の結合基質である FAK と結合することで接着斑へ移動することが明らかになりました (図 2)。

低親和性の Src 阻害薬を用いた場合では、阻害薬を投与後に洗い流すことによって、c-Src/FAK 複合体から阻害薬が外れて c-Src が FAK をリン酸化することで活性化し、活性化された FAK は細胞増殖シグナルを促進することを明らかにしました (図 2)。これは、阻害薬がかえって標的であるキナーゼを活性化し細胞増殖を促進させることを示しています。一般に、薬剤抵抗性変異を獲得したキナーゼには、阻害薬が結合しにくくなることが知られています。そこで、高親和性の阻害薬を用いた場合でも、薬剤抵抗性変異をもつ c-Src が存在すれば、逆説的に細胞増殖シグナルが活性化されるのではないかと仮説を立てました。細胞がもつ SRC 遺伝子に薬剤抵抗性変異を導入したヒトがん細胞株を樹立し、この仮説を検証したところ、高親和性の Src 阻害薬が変異体 c-Src をもつ細胞においてのみ FAK を活性化し、細胞増殖を促進することが明らかになりました (図 2)。

3. 波及効果、今後の予定

本研究により、阻害薬による c-Src シグナルの逆説的活性化機構は、多目標キナーゼ阻害薬ががん治療において十分な効果を示していないことの要因である可能性が示唆されました。これまで一般に、薬剤抵抗性変異は阻害薬を単に無効化するものと捉えられてきました。しかし、本研究によって、阻害薬と結合しにくくなる変異が標的キナーゼに生じると、阻害薬が逆説的にキナーゼを活性化することが明らかになりました。このことは、キナーゼ阻害薬に抵抗性を示すがんに対する治療戦略を考え直す必要があることを示しています。現時点では、臨床において c-Src の変異による治療抵抗性はほとんど確認されていません。しかし、キナーゼ阻

害薬を長期に用いた場合などにおいて、一部のがん細胞に治療薬が増殖を促進する変異が生じる可能性を注意深く調査することが、今後は必要となると考えられます。また、阻害薬が標的キナーゼにアロステリックな作用⁽³⁾を及ぼし、自己抑制的な構造をほどくことが c-Src 以外の複数のがん関連キナーゼにおいても報告されており、阻害薬による逆説的な細胞増殖シグナルの活性化は、他のキナーゼの変異を介する可能性も考慮していく必要があります。キナーゼ阻害薬が及ぼす標的分子へのアロステリック作用をより深く理解することで、より効果的な抗がん剤開発への波及が期待されます。

<用語解説>

(1) **キナーゼ**：アデノシン三リン酸 (ATP) などに含まれるリン酸基をターゲット分子に付与する (リン酸化する) ことで、ターゲット分子の機能を変化させる酵素です。様々なキナーゼが細胞増殖に関わっていますが、遺伝子変異などによるキナーゼの機能異常が細胞のがん化を引き起こすことが知られています。

(2) **キナーゼ阻害薬**：がんの原因となるキナーゼの変異の多くは、キナーゼの活性を高め細胞増殖を促進するシグナル伝達経路を活性化します。キナーゼ阻害薬 (ATP 競合阻害薬) は、キナーゼの ATP 結合部位に競合的に結合することで、がんに関与するキナーゼによるリン酸化を妨げ、過度なシグナル伝達を抑制しがん細胞の増殖を抑制します。

(3) **アロステリックな作用**：酵素の構造が他の物質 (アロステリック因子) の結合によって変化することをアロステリック作用といいます。アロステリック因子の多くは、酵素の基質結合部位とは異なる部位 (アロステリック部位) に結合し、基質との結合や酵素活性を変化させることが知られています。本研究においては阻害薬がアロステリック因子であること、ATP 結合部位がアロステリック部位として働くことが示されました。

4. 研究プロジェクトについて

日本学術振興会 科学研究費 (JP19H01020) および科学技術振興機構 (JPMJCR15G5) の支援を受けて実施されました。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Paradoxical activation of c-Src as a drug-resistant mechanism

(薬剤抵抗性メカニズムとしての c-Src の逆説的活性化)

著者：Makio Higuchi, Kenichi Ishiyama, Masahiro Maruoka, Ryosuke Kanamori,
Akifumi Takaori-Kondo and Naoki Watanabe

掲載誌：Cell Reports DOI：10.1016/j.celrep.2021.108876

<参考図表>

阻害薬投与前

阻害薬投与後

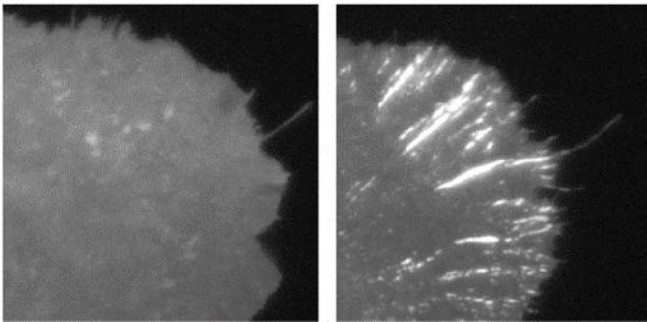


図1：キナーゼ阻害薬投与後にみられる c-Src の接着斑への局在変化

キナーゼ阻害薬は、がんの治療に用いられます。そのなかには、がん細胞の増殖・浸潤に関与するチロシンキナーゼ c-Src に対する阻害作用を併せもつものも開発されてきました。本研究では、c-Src に作用するキナーゼ阻害薬を投与すると、通常は細胞膜上に均一に局在する c-Src (GFP で標識) が接着斑 (細胞が細胞外マトリクスと接着するための構造) に速やかに移動し、顕著に局在することが明らかとなりました。このことが引き金となって、いくつかの条件下で、キナーゼ阻害薬が接着依存的な細胞増殖シグナルを活性化することで、がん細胞の増殖をかえって助長する逆説的な作用をもつことが明らかとなりました (図2 参照)。

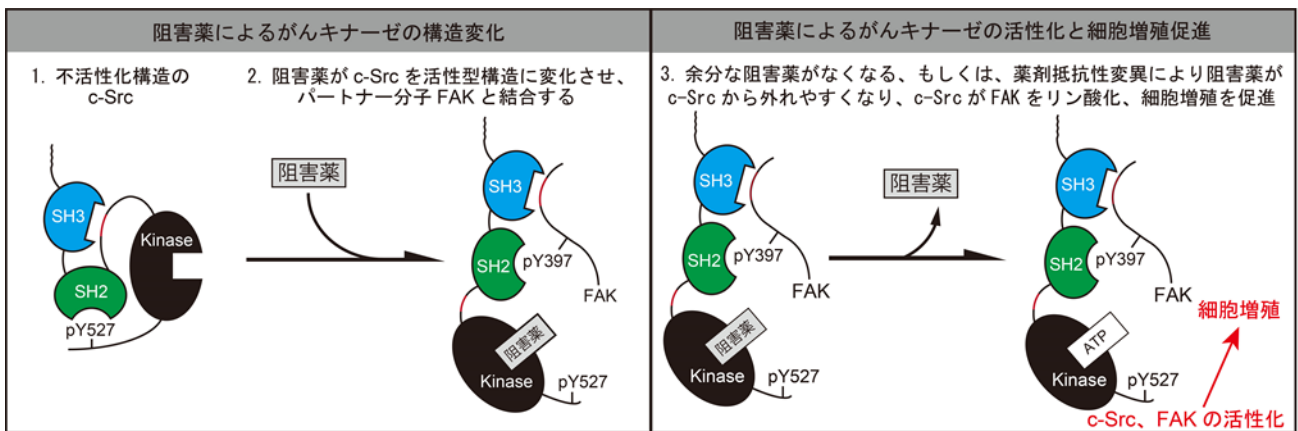


図2：阻害薬による c-Src 逆説的活性化モデル