

令和元年6月17日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04694

研究課題名(和文)チロシンキナーゼ型受容体の非定型的活性化：がん病態制御における次なる標的

研究課題名(英文) Noncanonical activation of receptor tyrosine kinases: next target mechanisms for cancer progression

研究代表者

櫻井 宏明 (Hiroaki, Sakurai)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：00345571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん悪性化には増殖因子受容体が関与しており、それらを標的とした抗がん剤の開発が進んでいる。本研究では、従来知られている定型的な活性化と全く異なる、新しい活性調節機構を解明を試みた。その結果、肺がんや大腸がんの治療標的分子であるEGFRについて、受容体リガンドによる作用は、リガンドが結合した受容体と結合しなかった受容体がそれぞれ異なった働きをしていることを明らかにした。特に、受容体が結合しなかった受容体が、全く新しい機構で細胞内で機能していることを実証した。また、今後治療への応用が期待されているEphA2受容体についても、がん細胞の運動方向の先端部に局在する機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チロシンキナーゼ型受容体を標的とした、がん分子標的治療が大きく進展している。しかし、その活性化機構には、従来知られている古典的なものに加えて、我々は新しい調節機構の存在を明らかにしている。今回、肺がんや大腸がんの治療標的分子であるEGFRにおいて、二つの目の活性化機構が存在することを見出した。したがって、その活性化機構を標的とした新しい治療戦略の構築に道を拓く研究成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Receptor tyrosine kinases are involved in cancer progression, and are main target molecules for the development of anti-cancer agents. In this study, we tried to elucidate new mechanisms of their activation by focusing on non-canonical activation. We found that EGFR, an oncogene of lung and colorectal cancers, is regulated by two different mechanisms. One is classically known ligand-bound receptor and the other is ligand-unbound receptor monomers. Especially, the unliganded EGFR monomers are endocytosed and then recycled back to the plasma membrane. We also characterized the role of EphA2 receptor in cancer cell migration and found that EphA2 is localized to migrating front via Rab11-containing recycling endosome.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん シグナル伝達 チロシンキナーゼ リン酸化 小胞輸送 EGFR EphA2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

チロシンキナーゼ型受容体 (RTK) はヒトゲノムに 58 種あり、その多くが変異や過剰発現によりがん細胞の増殖を支えている。すでに、肺がんなどに EGFR 阻害剤が、乳がんなどに ErbB2 阻害剤が臨床応用されている。また、RTK 阻害剤や BRAF 阻害剤に対する耐性発現機構として、MET や EGFR などの RTK がバイパス経路として再活性化することが、新たな臨床上的の問題点として浮上している。

RTK 活性化は、チロシンキナーゼ活性に基づく。ところが、データベース検索では、RTK にはリン酸化されるチロシン残基よりもセリン/スレオニン残基が圧倒的に多く、しかもその機能解析は進んでいない。この事実は、未解明の重要な RTK 活性調節機構の存在を示しており、本研究ではセリン/スレオニン残基のリン酸化を非定型的活性化制御と定義し、その機能を解明する。我々はすでに、EGFR/ErbB や EphA について、以下に示すような非定型的活性化に関する先駆的な研究成果を挙げてきた。

(1) EGFR/ErbB ファミリー

我々は炎症によるがん悪性化機構に関する実績があり (JBC 2005/2010/2011, Cancer Res 2006/2007, Clin Cancer Res 2011, Trends Pharmacol Sci 2012) その中で TNF- α が MAPK を介して EGFR/ErbB の非定型的リン酸化を誘導することを発見した (JBC 2007, BBA 2009)。その機能として、C 末端 Ser 残基のリン酸化は EGFR のエンドサイトーシスを介してがん細胞のアポトーシスを抑制すること (Mol Cell Biol 2009) 膜近傍ドメインの Thr 残基のリン酸化は ErbB 受容体共通のフィードバック阻害機構であることを見出した (Cancer Sci 2013, Sci Rep 2016)。また、EGFR 変異肺がん細胞のシスプラチン抵抗性や胃がん細胞のピロリ菌感染に EGFR の非定型的活性化が関与していることを示した (BBRC 2015, Helicobacter 2015)。

(2) EphA ファミリー

EphA2 は、新しいがん分子標的として注目されている (Cancer Discov 2015)。腫瘍内で過剰発現しているにも関わらず、そのリガンドの発現が低いことから、リガンド非依存的な腫瘍促進作用が示唆されてきた (Cancer Cell 2009)。我々は、EphA2 の C 末端側 Ser-897 が、ERK 下流の RSK により直接リン酸化される非定型的活性化経路を見出した。RSK-EphA2 経路は、EGFR や BRAF などの様々なドライバーがん遺伝子により活性化されること、がん細胞の運動能を亢進すること、さらに肺がん患者の予後と負に相関することを報告した (Nat Commun 2015)。

2. 研究の目的

RTK の活性化機構の解明は、がん分子標的治療に大きな発展をもたらしたが、獲得耐性などの新たな問題が生じている。本研究では、がん分子標的治療における次なる標的として、機能未知のまま残されてきた「キナーゼ活性に依存しない非定型的 RTK 活性化機構」を解明する。我々は、上記記載の通り EGFR や EphA2 の非定型的活性化によるがん悪性化機構について、先駆的な研究成果を挙げてきた。本研究では、これら成果を新しい分子標的治療の確立や獲得耐性の克服につなげる。また、非定型的制御が「がん」と「炎症」をつなぐ重要な基点であることを示し、炎症制御と RTK 阻害の併用効果を実証する。本研究は隠された RTK 活性調節機構を解明し、RTK に関する膨大な学術・臨床情報と統合することで、がん治療の新展開をもたらす応用性の高い研究成果を得る。

3. 研究の方法

(1) EGF による EGFR 活性化機構の解析

HeLa 細胞に EGF 刺激し、EGFR のリン酸化を部位特異的なリン酸化抗体を用いたウェスタンブロットで検出した。また、細胞内の挙動は、フローサイトメーターや免疫細胞染色法で観察した。p38 によってリン酸化される EGFR の Ser-1015 の部位特異的リン酸化抗体は、ISAAC 法を用いて作製した (Ozawa T et al, PLoS One, 2012)。種々の低分子キナーゼ阻害剤や siRNA を用いた。

(2) EGFR-vIII 変異体の活性調節機構の解析

ヒトがん細胞で発現している恒常的活性化変異体での検討には、グリオブラストーマ U87-MG に EGFR-vIII 変異体を過剰発現した細胞株を用いた。

(3) EphA2 の細胞内輸送機構の解明

ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 および肺がん細胞株 A549 を用いて、EphA2 の発現および局在をウェスタンブロット、または免疫細胞染色法で観察した。細胞遊走能は、リアルタイムイメージング法を用いた。

4. 研究成果

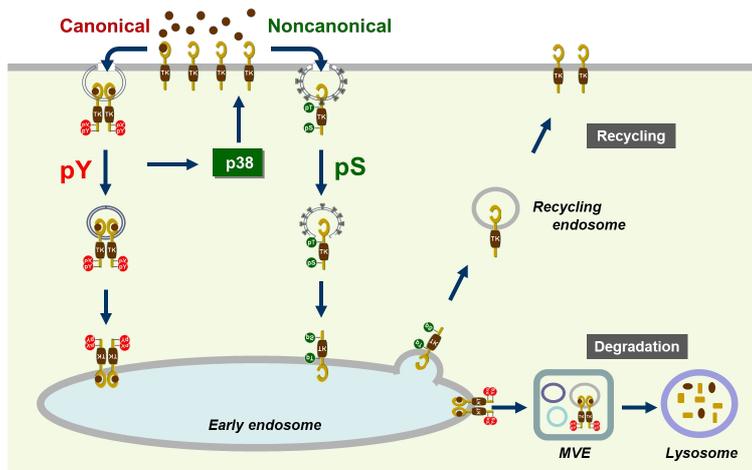
(1) EGF による EGFR 活性化機構の新展開

細胞増殖因子 EGF による EGFR 活性化機構については、これまでに数多くの学術論文がある。EGF が EGFR に結合すると、二量体を形成し、細胞内チロシンキナーゼ活性が誘導され、これが

チロシン残基の自己リン酸化を介して下流にシグナルを伝えるというものである。一方、EGF-EGFR 複合体は細胞内にシグナルを送ると同時に、細胞内にエンドサイトーシスされる。これは、増殖シグナルの維持・終息等の制御に重要である。これまでに知られている主な機構は以下の通りである。1) EGF の結合した EGFR は、複合体のままエンドサイトーシスする。2) 主として、クラスリン介在性エンドサイトーシスが起るが、高濃度 EGF 刺激においてはクラスリン非介在性エンドサイトーシスも起る。3) 初期エンドサームから後期末端サームに運ばれ、最終的にはリソソームで分解を受ける。4) 一部の複合体は、脱リン酸化されることで初期エンドサームからリサイクリングエンドソームに運ばれ、細胞膜へリサイクリングされる。5) EGF 濃度が低い場合は主にリサイクリングが、逆に EGF 濃度が高い場合はリソソーム分解が優先的に起る。このように、リガンド濃度の違いによりエンドサイトーシス後の細胞内挙動が変わることは知られていたが、そのメカニズムは長年不明なままであった。

我々は、炎症性サイトカインが p38 活性化を介して EGFR の C 末端 Ser/Thr 残基をリン酸化(非定型的リン酸化)することで、EGFR のクラスリン介在性エンドサイトーシスを誘導すること、さらに、そのほとんどが脱リン酸化され細胞膜へリサイクルされることを報告している(Nishimura et al, Mol Cell Biol, 2009)。そこで、上記の EGF による EGFR の活性化に伴う細胞内挙動に、p38 を介した制御機構が存在するのではないかと考え、リガンド濃度を変えて様々な解析を行った。その結果、低濃度 EGF (3 ng/mL 程度) 刺激と高濃度 (100 ng/mL) 刺激で、活性化機構に大きな違いがあることがわかった。低濃度 EGF では、チロシンキナーゼが活性化した EGFR はごくわずかであるにもかかわらず、p38 は完全に活性化されていた。したがって、ほとんどの EGFR が p38 によって C 末端に非定型的なリン酸化を受けていた。この時、EGFR はリガンドに結合しておらず、単量体のままクラスリン介在性エンドサイトーシスした。炎症性サイトカインの場合と同様に、この場合はほとんどの EGFR が細胞膜へリサイクリングした。一方、高濃度 EGF では、EGF 結合によりチロシン自己リン酸化している EGFR が圧倒的に多く、p38 は活性化しているにもかかわらずエンドサイトーシスは p38 非依存的であった。また、エンドサイトーシス後は、ほとんどがリソソーム分解された。

以上の結果から、EGF による EGFR 活性化において、従来考えられてきたリガンド結合した EGFR 二量体のエンドサイトーシスだけでなく、p38 によってリン酸化されたリガンド非結合型の単量体 EGFR によるエンドサイトーシスが起っていることがわかった。この二つのエンドサイトーシス機構は刺激するリガンド濃度によってバランスが変化し、低濃度ではリガンド非結合型が、また高濃度ではリガンド結合型が優位となる。さらに、これら二つのエンドサイトーシス機構は、エンドサイトーシス後に異なった輸送機構をたどる。前者は、脱リン酸化後リサイクリングされ、後者はリソソーム分解される。つまり、これまで不明なままであったエンドサイトーシス後の細胞内挙動は、p38 を介した非定型的なエンドサイトーシスを考慮することで全貌解明に大きく近づいたと考えられる。



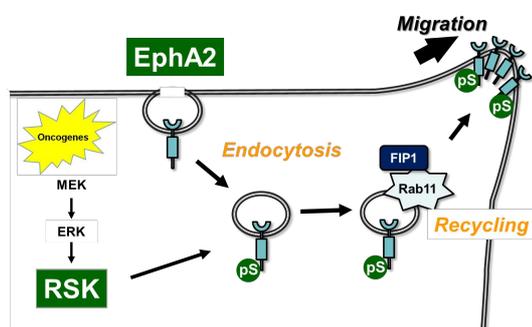
(2) EGFR-vIII 変異体の活性調節機構の解析

HeLa 細胞を用いた野生型 EGFR の検討を進展させるため、グリオブラストーマで高頻度に発現する EGFR-vIII 変異体について検討を加えた。この変異体は、細胞外ドメインに欠失があり、リガンド非依存的に活性化していることがわかっている。そこで、この細胞を炎症性サイトカインで刺激した結果、野生型と同様に p38 を介して EGFR Ser-1015 のリン酸化が強く誘導された。したがって、活性化変異を有する EGFR においても、同様のエンドサイトーシス機構が働いている可能性が考えられた。

(3) EphA2 の細胞内輸送機構の解明

EphA2 は、細胞遊走末端であるラメリポディア様構造に局在化していることがわかっている。そこで、その局在化メカニズムを、EphA2 が恒常的に高発現している MDA-MB-231 細胞を用いて解析した。小胞輸送の阻害剤モネンシンを用いて検討した結果、先端部への局在化が阻害され、核周辺部に集積した。その後、阻害剤を除いたところ、すぐに先端部への集積を認めたことから、先端部には核周辺部から小胞輸送を介して運ばれていると考えられた。そこで、リサイクリングエンドソームマーカーである Rab11 と共染色した結果、両者が遊走先端部と各周辺部で共局在した。さらに、siRNA により Rab11 およびそのアダプタータンパク質 Rab11FIP1 をノックダウンした結果、EphA2 の局在化が抑制された。

細胞遊走能について検討を行った。まず、EphA2 をノックダウンした結果、細胞遊走能が顕著に抑制された。そこで、小胞輸送の役割を解析した結果、モネンシンにより細胞遊走能が阻害された。さらに、Rab11 や Rab11FIP1 のノックダウンによっても遊走能が阻害されたことから、EphA2 の細胞先端部への輸送が細胞運動能を制御していることがわかった。次に、EphA2 の Ser-897 リン酸化の果たす役割について検討した。まず、細胞染色により、リン酸化された EphA2 は細胞先端部へ局在化していた。この部位のリン酸化を行っている RSK の阻害剤である BI-D1870 を処理した結果、速やかに脱リン酸化され、細胞遊走能の低下が認められた。したがって、リン酸化された EphA2 が先端部へ局在化することが重要であることがわかった。



RSK の阻害剤である BI-D1870 を処理した結果、速やかに脱リン酸化され、細胞遊走能の低下が認められた。したがって、リン酸化された EphA2 が先端部へ局在化することが重要であることがわかった。

次いで、細胞遊走能に関わる上皮間葉転換(EMT)との関係を解析した。A549 細胞に TGF- β を 48 時間処理し、EMT を誘導した。その結果、EphA2 の発現自体の誘導が認められ、リン酸化 EphA2 も増加した。この時、EphA2 およびリン酸化 EphA2 で細胞を染色した結果、ともに細胞先端部に局在化した。そこで、MDA-MB-231 細胞と同様の検討を行ったところ、EMT 化した A549 細胞でも、Rab11 が関与するリサイクリングエンドソームを介して輸送されていることがわかった。

EphA2 の Ser-897 リン酸化の分子機構の解析をさらに進めた。通常の増殖シグナルに加えて、ストレス応答によってもリン酸化されることがわかった。そこで、p38 の関与を検討した。p38 阻害剤である SB203580 を処理した結果、TNF- α 刺激によるリン酸化が一部抑制された。また、p38 を強く活性化させるアニソマイシンやシスプラチン等の刺激の場合は、p38 の寄与率が高くなった。一方、EGF 刺激の場合は、p38 の寄与はほとんどなかった。siRNA によって p38 をノックダウンした場合でも同様の結果が得られた。さらに、これらストレスシグナルによる EphA2 のリン酸化は、すべて RSK 阻害剤 BI-D1870 によって阻害されたことから、p38 から RSK を介してリン酸化が誘導されていると考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Kawasaki K., Sakimura A., Park C.M., Tomaru R., Tanaka T., Ozawa T., Zhou Y., Narita K., Kishi H., Muraguchi A., and Sakurai H.: Feedback control of ErbB2 via ERK-mediated phosphorylation of a conserved threonine in the juxtamembrane domain. *Sci. Rep.* 6: 31502, 2016. DOI: 10.1038/srep31502.

Park C.M., Kawasaki Y., Refaat A., and Sakurai H.: Mechanisms for DNA-damaging agent-induced inactivation of ErbB2 and ErbB3 via the ERK and p38 pathways. *Oncol. Lett.* 15: 1758-1762, 2018. DOI: 10.3892/ol.2017.7532.

Kato S., Yokoyama S., Hayakawa Y., Luhui L., Iwakami Y., Sakurai H., and Saiki I.: P38 pathway as a key downstream signal of connective tissue growth factor to regulate metastatic potential in non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci.* 107: 1416-1421, 2016. DOI: 10.1111/cas.13009.

Tanaka T., Zhou Y., Ozawa T., Okizono R., Banba A., Yamamura T. Oga E. Muraguchi A., and Sakurai H.: Ligand-activated epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling governs endocytic trafficking of unliganded receptor monomers by non-canonical phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 293: 2288-2301, 2018. DOI: 10.1074/jbc.M117.811299.

Tanaka T., Ozawa T., Oga E., Muraguchi A., and Sakurai H.: Cisplatin-induced non-canonical endocytosis of EGFR via p38 phosphorylation of C-terminal region containing Ser-1015 in non-small cell lung cancer cells. *Oncol. Lett.* 15: 9251-9256, 2018. DOI: 10.3892/ol.2018.8485.

Zhou Y. and Sakurai H.: Emerging and diverse functions of the EphA2 noncanonical pathway in cancer progression. *Biol. Pharm. Bull.* 40: 1616-1624, 2017. DOI: 10.1248/bpb.b17-00446.

Haryuni R.D., Watabe S., Yamaguchi A., Fukushi Y., Tanaka T., Kawasaki Y., Zhou Y., Yokoyama S., and Sakurai H.: Negative feedback regulation of ErbB4 tyrosine kinase activity by ERK-mediated non-canonical phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 514: 456-461, 2019. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.04.125.

櫻井宏明: チロシンキナーゼ型受容体の非定型的活性化: がん病態制御の次なる標的, 薬学雑誌, 137: 141-144, 2017. DOI: 10.1248/yakushi.16-00229-4.

[学会発表](計 20 件)

渡邊啓, 笹岡俊一郎, Alaa Refaat, 山田直樹, 周 越, 櫻井宏明. 非小細胞肺癌における FGFR-EphA2 経路による EGFR 阻害剤耐性化. 日本生化学会北陸支部第 34 回支部大会; 2016.

櫻井宏明 河崎優希 ERK を介した ErbB2 非定型的リン酸化によるフィードバック阻害機構.

第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会；2016。
櫻井宏明，横山悟，早川芳弘，矢野聖二，小泉桂一，済木育夫。EphA2 チロシンキナーゼ型受容体の非定型的活性化による細胞運動能の制御。第 25 回がん転移学会学術集会；2016。
田中智大，周越，櫻井宏明。EGF シグナルにおける p38 によるリガンド非結合型 EGFR の非定型的輸送制御。第 76 回日本癌学会学術総会；2016。
渡部聡子，山口麻子，福司弥生，田中智大，河崎優希，櫻井宏明。チロシンキナーゼ非依存的な ErbB4 リン酸化の役割。第 76 回日本癌学会学術総会；2016。
田中智大，周越，櫻井宏明。リガンド刺激時にリガンドが結合しなかった EGFR は MAPK を介して細胞内から制御される。第 39 回日本分子生物学会年会；2016。
河崎優希，崎村綾香，朴哲珉，周越，都丸里佳，成田香織，小澤龍彦，村口篤，櫻井宏明。ErbB2/ErbB3 ヘテロ二量体における ERK を介した ErbB2 Thr-677 リン酸化によるフィードバック制御。第 39 回日本分子生物学会年会；2016。
田中智大，周越，櫻井宏明。リガンド刺激時にリガンドが結合しなかった EGFR は MAPK を介して細胞内から制御される。第 39 回日本分子生物学会年会；2016。
河崎優希，崎村綾香，朴哲珉，周越，都丸里佳，成田香織，小澤龍彦，村口篤，櫻井宏明。ErbB2/ErbB3 ヘテロ二量体における ERK を介した ErbB2 Thr-677 リン酸化によるフィードバック制御。第 39 回日本分子生物学会年会；2016。
田中智大，櫻井宏明。リガンド刺激下の EGFR 活性化制御の新展開。大学院生シンポジウム「薬学がん研究の発展と未来を先導する若手がん研究者の挑戦」。日本薬学会第 137 年会；2017。
河崎優希，櫻井宏明。がん細胞における ErbB ファミリーの膜近傍領域スレオニンリン酸化による活性調節機構。フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー；2017。
山口麻子，渡部聡子，福司弥生，田中智大，河崎優希，櫻井宏明。チロシンキナーゼ非依存的なリン酸化による ErbB4 のフィードバック阻害機構。第 76 回日本癌学会学術総会；2017。
大賀英司，田中智大，小澤龍彦，村口篤，櫻井宏明。p38 活性化は EGFR Ser-1015 リン酸化を介したエンドサイトーシスを誘導する。2017 年度生命科学系学会合同年次大会；2017。
河崎優希，櫻井宏明。チロシン脱リン酸化酵素を介した受容体型チロシンキナーゼ ErbB ファミリーフィードバックの制御。2017 年度生命科学系学会合同年次大会；2017。
山村朋弘，渡邊 啓，田中智大，周越，櫻井宏明。上皮間葉転換に伴う EphA2 の発現と局在化機構の解析。日本薬学会第 138 年会；2018。
山畑伊織，櫻井宏明。小胞関連タンパク質 Rab11 による EphA2 局在化を介した細胞遊走機構。第 27 回日本がん転移学会学術集会；2018。
山畑伊織，山村朋弘，周越，櫻井宏明。がん細胞の遊走における小胞輸送関連タンパク質 Rab11 による EphA2 局在化の役割。第 17 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2018。
Haryuni RD, Watabe S, Yamaguchi A, Fukushi Y, Kawasaki Y, Sakurai H. Negative feedback regulation of ErbB4 receptor tyrosine kinase by non-canonical phosphorylation at threonine-674 and serine-1026. 第 77 回日本癌学会学術総会；2018。
山村朋弘，山畑伊織，田中智大，周越，櫻井宏明。上皮間葉転換に伴う EphA2 の発現および局在化機構。第 41 回日本分子生物学会年会；2018。
河崎優希，池ヶ谷真吾，馬場絢子，地子愛佳理，櫻井宏明。ErbB2/ErbB3 ヘテロ二量体における ERK を介した新規 ErbB2 リン酸化部位の探索。第 41 回日本分子生物学会年会；2018。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) がん細胞生物学研究室ホームページ
<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/cliche2/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：小澤龍彦

ローマ字氏名：Tatsuhiko Ozawa

所属研究機関名：富山大学

部局名：大学院医学薬学研究部 (医学)

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：10432105

(2)連携研究者

連携研究者氏名：河崎優希

ローマ字氏名：Yuki Kawasaki

所属研究機関名：富山大学

部局名：大学院医学薬学研究部（薬学）

職名：助教

研究者番号（8桁）：30432107

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。