

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08366

研究課題名(和文) Thrリン酸化によるErbBフィードバック制御解明によるがん分子標的薬耐性克服

研究課題名(英文) ErbB family feedback regulation via a conserved Thr phosphorylation

研究代表者

河崎 優希 (Kawasaki, Yuki)

高崎健康福祉大学・薬学部・講師

研究者番号：30432107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の増殖を担う受容体型チロシンキナーゼのErbBファミリーの活性調節機構の解明は、がん悪性化克服やがん分子標的薬感受性に寄与する。本研究では、ErbBファミリーにおいて膜近傍領域の保存されたスレオニンがErbB下流のERK経路を介してリン酸化されることによりErbB自己リン酸化チロシンが抑制される新規なフィードバック制御のファミリー間での共通性を明らかにするとともに、ErbBフィードバック制御の分子機構の一端を明らかにした。さらに、がん細胞変異型ErbBにおいては、フィードバック制御に抵抗性を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、チロシンキナーゼ型受容体ErbBファミリーにおいて保存された膜近傍領域のスレオニンリン酸化を介した新規なフィードバック制御による活性調節機構を示した。さらに、がん細胞変異型のErbBではこのフィードバック制御に抵抗性を示すことを明らかにした。患者におけるがん分子標的薬感受性の違いや分子標的薬獲得耐性はがん分子標的治療の障害となっている。がん細胞の増殖を担うErbBファミリーの活性調節機構の解明は、効率的ながん分子標的治療や分子標的薬に対する耐性克服への発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：ErbB family receptor tyrosine kinase play a critical role for cell growth. In some type of cancer cells, ErbB mutations and amplification induce cancer cell growth. To clarify ErbB regulatory mechanisms are important for overcoming cancer. In this study, new ErbB family feedback regulation was revealed, in which, juxtamembrane domain located conserved Thr was phosphorylated via ERK pathway and then autophosphorylated ErbB tyrosine was reduced. And the involvement of tyrosine phosphatases in this regulation was revealed. Furthermore, oncogenic ErbB mutants showed resistance to feedback regulation.

研究分野：分子生物学

キーワード：ErbB チロシンキナーゼ リン酸化 がん シグナル伝達 分子標的

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の ErbB ファミリーは、EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4 から構成されている。ErbB ファミリーは、ホモ二量体やヘテロ二量体を形成し活性化する。EGFR は肺がん細胞などで、ErbB2 や ErbB3 は乳がん細胞などで過剰発現や遺伝子変異により、異常な細胞増殖シグナルを細胞内に伝達する。肺がん治療に用いられる分子標的薬である EGFR-チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) のゲフィチニブは、活性変異型 EGFR (キナーゼドメインの欠損変異 (exon19del) や点変異 (L858R)) に対して選択的に阻害効果を示す。しかし、他の RTK によるバイパス経路を介した ErbB 下流の活性化や二次変異 (EGFR T790M) などによる獲得耐性が治療の障害となっている。したがって、ErbB 活性調節機構の解明は、ErbB-TKI に対する獲得耐性の克服に必須である。

ErbB はチロシン自己リン酸化により活性化することから、その活性調節機構はチロシンリン酸化を中心に解析されてきた。活性型二量体 ErbB は、機能的に区別されるレシーバーとアクチベーターによって非対称的に形成される。二量体はアクチベーターのキナーゼドメイン C-lobe とレシーバーのキナーゼドメイン N-lobe の会合により、非対称的に形成される。そこにレシーバーの膜近傍領域が相互作用して二量体がさらに安定化され、チロシンキナーゼ活性が誘導され、細胞増殖などを担う下流シグナルを惹起する。これまでに研究代表者らは、野生型 EGFR 非対称性ホモ二量体において、レシーバー EGFR の膜近傍領域に位置する 669 番目のスレオニン (Thr-669) が EGFR 下流の ERK によりリン酸化されると、自己リン酸化チロシンが抑制される新規な EGFR フィードバック制御機構を報告した (Cancer Sci, 2013)。さらに、ErbB2 と ErbB3 のヘテロ二量体において ErbB2 の膜近傍領域 Thr リン酸化によるフィードバック制御の可能性を見出し、アミノ酸配列の相同性から Thr リン酸化を介したフィードバック制御が ErbB ファミリー間で共通した活性調節機構である可能性が示唆された。本研究による ErbB ファミリーの Thr リン酸化によるフィードバック制御の分子的解明は、がん悪性化抑制や分子標的薬獲得耐性の克服に向けた重要な知見となる。

2. 研究の目的

本研究では、がん細胞における ErbB ファミリーの Thr リン酸化を介したフィードバック制御および分子機構解明を目的とする。

3. 研究の方法

ErbB2 と ErbB3 を高発現するヒト乳がん細胞株 BT474 細胞や MDA-MB-453 細胞や EGFR を高発現する MDA-MB468 細胞および ErbB 変異体の過剰発現系を用いてウエスタンブロット法および phos-tag ウエスタンブロット法で解析を行った。

4. 研究成果

1) ErbB ファミリーの膜近傍領域 Thr リン酸化によるフィードバック制御の解明

ErbB2 と ErbB3 を高発現するヒト乳がん細胞株 BT474 細胞において、ERK の活性化により ErbB2 の膜近傍領域に存在する 677 番目の Thr (Thr-677) がリン酸化されると ErbB2 と ErbB3 の自己リン酸化チロシンが抑制されることを見出した (Scientific Reports, 2016)。ErbB2 の Thr-677 をリン酸化されないアラニンに置換した変異体では、ERK の活性化に伴う ErbB2 と ErbB3 の自己リン酸化チロシンの抑制は起こらなかった。ErbB2 と ErbB3 のヘテロ二量体において、ErbB3 はキナーゼ活性を持たないことから ErbB2 がレシーバーとして機能し、ErbB3 がアクチベーターとして機能すると考えられる。ErbB2/ErbB3 ヘテロ二量体において、レシーバーとして機能する ErbB2 Thr-677 のリン酸化によるフィードバック制御を明らかにした (Scientific Reports 2016)。さらに、ErbB4 の Thr-674 が ERK 経路を介してリン酸化されることにより ErbB4 の自己リン酸化チロシンが抑制されるフィードバック制御を明らかにした (Biochemical and Biophysical Research Communications 2019)。ErbB ファミリーにおいて膜近傍領域に存在する Thr 付近のアミノ酸配列の相同性は高く、保存された Thr のリン酸化による ErbB フィードバック制御の共通性が明らかになった。

2) ErbB フィードバック制御による ErbB 下流経路の抑制

ErbB フィードバック制御の生理的意義の検証のため、ErbB 下流経路に与える影響を解析した。その結果、ErbB フィードバック制御による ErbB の自己リン酸化チロシンの抑制に伴い下流経路 Akt の活性が抑制されることが明らかになった (Scientific Reports 2016)。

3) ErbB フィードバック制御の分子機構解明

ErbB フィードバック制御の分子機構としてチロシン脱リン酸化に着目し解析を行った。チロシン脱リン酸化酵素阻害剤存在下では、ErbB フィードバック制御による ErbB 自己リン酸化チロシンの抑制が低下したことから、ErbB フィードバック制御にはチロシン脱リン酸化酵素が関与することを明らかになった (Scientific Reports 2016)。分子同定のためにチロシン脱リン酸化

酵素に対する特異的な阻害剤や siRNA を用いた解析から EGFR ホモ二量体と ErbB2/ErbB3 ヘテロ二量体においては、異なるチロシン脱リン酸化酵素の関与が示唆された（論文準備中）。

4) がん変異型 ErbB におけるフィードバック制御の解明

がん細胞によっては ErbB の変異により ErbB 活性変化が生じていることがある。組換え体を用いた解析から、がん変異型 ErbB4 (P1033S) においてはフィードバック制御が減弱したことから、フィードバック制御のがん細胞における恒常的なチロシン自己リン酸化への関与が示唆された（Biochemical and Biophysical Research Communications 2019）。また、がん変異型 ErbB2 においてもフィードバック制御への関与が示唆された。

4) DNA 障害性抗がん剤による ErbB フィードバック制御の解明

シスプラチンやドキソルビシンは DNA に作用する抗がん剤であるが、細胞内シグナル伝達に与える影響の詳細は不明であった。シスプラチンやドキソルビシンを添加したがん細胞株において、ERK 経路の活性化により ErbB2 と ErbB3 の自己リン酸化チロシンが抑制されたことから、抗がん剤シスプラチン、ドキソルビシンによる ErbB フィードバック制御が明らかとなった（Oncology Letters 2019）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawasaki Y., Sakimura A., Park C.M., Tomaru R., Tanaka T., Ozawa T., Zhou Y., Narita K., Kishi H., Muraguchi A., Sakurai H.	4. 巻 6
2. 論文標題 Feedback control of ErbB2 via ERK-mediated phosphorylation of a conserved threonine in the juxtamembrane domain.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep31502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Park C.M., Kawasaki Y., Refaat A., Sakurai H.	4. 巻 15
2. 論文標題 Two different mechanisms for DNA-damaging agent-induced inactivation of ErbB2 and ErbB3 via ERK and p38 pathways	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1758-1762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2017.7532	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Haryuni RD., Watabe S., Yamaguchi A., Fukushi Y., Tanaka T., Kawasaki Y., Zhou Y., Yokoyama S., Sakurai H.	4. 巻 514
2. 論文標題 Negative feedback regulation of ErbB4 tyrosine kinase activity by ERK-mediated non-canonical phosphorylation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 456-461
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.04.125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kawasaki Y., Sakurai H.
2. 発表標題 ERK-mediated feedback regulation of ErbB family via the conserved Thr phosphorylation
3. 学会等名 The Third International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haryuni R.D., Watabe S., Yamaguchi A., Fukushi Y., Kawasaki Y., Sakurai H.
2. 発表標題 Negative feedback regulation of ErbB4 receptor tyrosine kinase by non-canonical phosphorylation at threonine-674 and serine-1026
3. 学会等名 The Third International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河崎優希, 池ヶ谷真吾, 馬場絢子, 地子愛佳理, 櫻井宏明
2. 発表標題 ErbB2/ErbB3ヘテロ二量体におけるERK経路を介した新規ErbB2リン酸化部位の探索
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河崎優希, 櫻井宏明
2. 発表標題 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
3. 学会等名 フォーラム2017 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山口麻子, 渡部聡子, 福司弥生, 田中智大, 河崎優希, 櫻井宏明
2. 発表標題 Negative feedback control of ErbB4 by tyrosine kinase independent non-canonical phosphorylation
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河崎優希、櫻井宏明
2. 発表標題 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
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池ヶ谷真吾、馬場絢子、河崎優希、櫻井宏明
2. 発表標題 ErbB2/ErbB3ヘテロダイマーのMAPKを介したリン酸化制御機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawasaki Y., Sakurai H.
2. 発表標題 Down-regulation of ErbB2/ErbB3 heterodimer via ERK-mediated phosphorylation of ErbB2 Thr-677 in the juxtamembrane domain
3. 学会等名 The 12th International Conference on Protein Phosphatase (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 櫻井宏明、河崎優希
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第20回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 渡部聡子、山口麻子、福司弥生、田中智大、河崎優希、櫻井宏明
2. 発表標題 Roles of tyrosine kinase-independent phosphorylation of ErbB4
3. 学会等名 第75回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 馬場絢子、池ヶ谷真吾、河崎優希、櫻井宏明
2. 発表標題 ErbB2/Erb3ヘテロダイマーのMAPKを介したリン酸化制御機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第128回例会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 地子愛佳理、池ヶ谷真吾、馬場絢子、河崎優希、周越、櫻井宏明
2. 発表標題 ErbB2/3ヘテロダイマーにおける新たな非定型的リン酸化部位の同定
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第131回例会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----