

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03368

研究課題名（和文）慢性炎症とがんをつなぐ増殖因子受容体のオルタナティブ活性化機構の解明

研究課題名（英文）Alternative activation mechanisms of receptor tyrosine kinases in inflammation-induced cancer progression

研究代表者

櫻井 宏明（SAKURAI, Hiroaki）

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授

研究者番号：00345571

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：がんの悪性化進展には、チロシンキナーゼという酵素を持つ受容体群が関与している。これら受容体は、その酵素活性を利用して細胞内に情報を伝える役目があることが広く知られており、それらを標的とした抗がん剤の開発も進んでいる。我々は、酵素活性を必要としないこれら受容体の新たな活性化機構を見出している。本研究においては、その活性化のメカニズムについて新たな知見を得るとともに、新しい治療法への応用を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの薬物治療は大きく進展してきているものの、未だ治療満足度は高くない。我々は、新しい治療法の創成に向けて、がん細胞の増殖や転移に関与する新しい受容体活性化の仕組みを解明することを目指して研究を実施した。その結果、これまでに知られていない、新しい発がんタンパク質の機能を見出すことに成功した。また、この仕組みを利用して、抗体と抗がん剤を結合した抗体薬物複合体の治療への応用が可能であることを実証した。

研究成果の概要（英文）：Receptors with an enzyme activity called tyrosine kinase are involved in the progression of cancer malignancy. It is widely known that these receptors have a role of transmitting signal into cells by utilizing their enzyme activity, and the development of anticancer agents targeting them is also progressing. We have found a new activation mechanism for these receptors that does not require enzymatic activity. In this study, we obtained new knowledge about the mechanism of its activation and applied it to new therapeutic methods.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん シグナル伝達 受容体 増殖因子 キナーゼ EGFR EphA2

1. 研究開始当初の背景

チロシンキナーゼ型受容体 (RTK) の多くが変異や過剰発現によりがんの増殖や転移を誘導する。上皮成長因子受容体 (EGFR) 阻害剤が臨床応用されるなど、RTK は主要ながん分子標的である。また、抗がん剤耐性機序として、EGFR や EphA2 などがバイパス経路として活性化される。キナーゼ活性に依存した古典的活性化機構に比べて、本研究で解析するリガンド結合やキナーゼ活性に依存しないオルタナティブ活性化機構の役割は未解明であり、がん病態制御における次なる標的である (図1)。

我々は、オルタナティブ活性化に関する先駆的な研究成果を挙げてきた (図2)。EGFR においては、p38 による Ser リン酸化が EGFR のエンドサイトーシスを誘導し、がん細胞のアポトーシスを抑制すること、ERK による膜近傍 Thr のリン酸化が EGFR のフィードバック阻害機構であることを示した。また、肺がん細胞のシスプラチン耐性に、EGFR のオルタナティブ活性化が関与していることを示した。また、次世代分子標的として注目されている RTK である EphA2 においては、ERK 下流の RSK を介したオルタナティブ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明らかにした。

腫瘍微小環境内には、がん細胞に加えて炎症・免疫細胞や線維芽細胞などの間質細胞が存在し、それらが産生するサイトカインなどによって慢性的な炎症病態にある。特定の遺伝子変異と慢性炎症反応の相互作用によって、がんの増殖や転移が誘導されると考えられているが、その分子機構には不明な点が多い。慢性炎症によるがん悪性化においても、がん細胞に発現する RTK 活性化が重要であると考えられるが、オルタナティブ活性化の関与については全く解析されていない。

2. 研究の目的

RTK 研究は、リガンド結合や活性化変異によるチロシンキナーゼ活性に基づく古典的なものが主体となっている。ところが、リン酸化データベースを検索すると、RTK にはリン酸化されるチロシン残基よりもセリン/スレオニン残基の方が圧倒的に多い (表1)。サイトカインネットワークや発がんタンパク質によって、腫瘍微小環境では様々な Ser/Thr キナーゼが活性化状態にあることから、がん細胞に発現する多くの RTK はオルタナティブ活性化制御を受けていると考えられる。また、フィードバック制御による分子標的薬耐性においても、オルタナティブ活性化が関与している。つまり、オルタナティブ活性化機構の解明は、がんの慢性炎症病態の理解に必須であり、シグナル伝達学や腫瘍学分野において未解明のまま残された重要な研究課題である。

そこで本研究では、腫瘍微小環境の観点から、炎症シグナルと増殖シグナルを統合する細胞内情報ネットワークとして、RTK のオルタナティブ活性化を解析する。主に、Ser/Thr リン酸化された RTK が、どのような機構で浸潤末端などの機能する場へと運ばれるのかを解明する。これまでのがん研究で見落とされてきたオルタナティブ活性化機構を解明することで、がん悪性化進展に重要な役割を果たす古典的活性化との機能連関という新たな RTK 研究への道を切り拓くことを目的とする。

3. 研究の方法

(1)EGFR のエンドサイトーシス/リサイクリング機構の解明

p38 による Ser-1015/Thr-1017/Ser-1018 のリン酸化が EGFR のエンドサイトーシスを誘導するが、その輸送経路は依然として不明である。我々は、オルタナティブ制御のみを受ける EGFR 変異体 (二量体形成不全、R1m) と古典的制御のみを受ける変異体 (Ser-1015/Thr-1017/Ser-1018 変異、ddm) の作製に成功しており、両者は細胞内で異なった輸送制御を受けると考えられる。そこで、CRISPR/Cas9 システムで EGFR をノックアウトした HeLa 細胞を宿主として、これら変異体を発現する細胞株を樹立する。また、エンドサイトーシスに関連する、クラスリン重鎖やクラスリンのアダプタータンパク質 AP-2 を siRNA でノックダウンした。また、EGFR の細胞内局在は、免疫細胞染色法により解析した。

(2)EGFR 抗体セツキシマブの細胞内送達

増殖因子受容体	従来研究	本研究
	古典的活性化	オルタナティブ活性化
リガンド結合	○	×
キナーゼ活性	○	×
リン酸化残基	Tyr	Ser/Thr

図1. 増殖因子受容体のオルタナティブ活性化

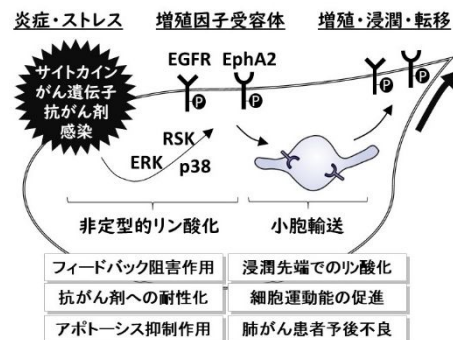
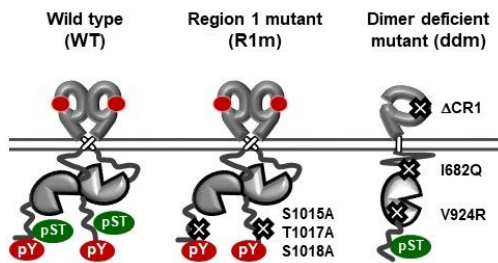


図2. RTKのオルタナティブ活性化によるがん悪性化

表1. RTKのSer/Thrリン酸化部位

	Tyr	Ser/Thr
EGFR	16	40
ErbB2	12	30
EphA2	9	24

* PhosphoSitePlus database



オルタナティブ制御によるエンドサイトーシスを、EGFR を標的とした抗体薬物複合体 (ADC) に応用するため、セツキシマブ処理した細胞を TNF- α やシスプラチンで刺激し、免疫細胞染色法により局在を確かめた。また、リボソーム阻害タンパク質サボリンを結合した二次抗体を用いて、オルタナティブ制御によって内在化したセツキシマブによる細胞傷害性の増強効果を WST-8 試薬を用いて測定した。

(3) EphA2 のオルタナティブ活性化の検出

EphA2 のオルタナティブ制御については、C 末端にある Ser-897 のリン酸化が主な機構である。そこで、リン酸化 Ser-897 を認識する抗体を用いて、主にウェスタンブロット法で活性化を検出した。

4. 研究成果

(1) EGFR のエンドサイトーシス/リサイクリング機構の解明

まず、CRISPR/Cas9 システムを用いて EGFR をノックアウトした HeLa 細胞の樹立を試みた。ゲノム配列を確認した結果、右図に示したように、親株と比べ両アレルにおいて欠損が見られ (赤字) EGFR 遺伝子が破壊されていることを確認した。また、ウェスタンブロット法で EGFR 発現が消失していることを確認した。このように、EGFR ノックアウト細胞の樹立に成功した。次に、このノックアウト細胞に野生型または変異型 EGFR を安定発現した細胞株の樹立を行った。C 末端側に EGFP を融合した EGFR として発現し、G418 による選択を行った結果、野生型および変異体 (R1m、および ddm) を発現する細胞株の樹立に成功した。

```

Parent HeLa cells
<Exons 1-3>
MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCEV
VLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLTALNTVERIPLLENLQIIIRGNMYENSALAV
VLSNYDANKTGLKELPMRNQLQELHGAVRFSNPPALCNVESIQWRDIVSDFSLNMSMDF
QNHLSG

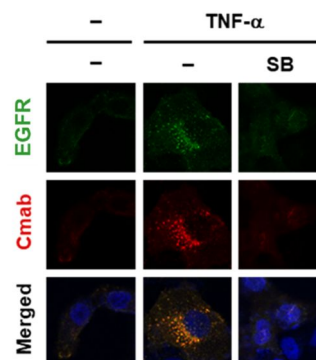
EGFR-KO HeLa cells
<1st allele>
MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCEV
VWVFGNYLCAEEL
<2nd allele>
MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCEV
AWGIWKLPMCRGIMIFPS

```

ddm 細胞を用いて検討した結果、TNF- 刺激によるオルタナティブ制御はすべてクラスリン依存性エンドサイトーシスであることを確認した。クラスリンアダプタータンパク質 AP-2 の関与も認められた。また、p38 阻害剤 SB203580 によって抑制された。一方、R1m 細胞を用いて検討した結果、リガンド結合型の古典的制御においては、クラスリンおよび AP-2、さらに p38 依存性がほとんど認められなかったことから、従来考えられたきたリガンド結合型のクラスリン依存性エンドサイトーシス機構が存在しない可能性が考えられた。あるいは、オルタナティブ制御を受けない EGFR においては、クラスリン非依存性エンドサイトーシスが優先的に起こる可能性が考えられた。現在、他のエンドサイトーシス関連タンパク質の寄与を樹立した細胞を用いて検討しており、リガンド誘発の EGFR エンドサイトーシスの全容を明らかにしたい。

(2) EGFR 抗体セツキシマブの細胞内送達

大腸がん治療に用いられている EGFR に対するモノクローナル抗体セツキシマブを用いた抗体薬物複合体創生に向けて、オルタナティブ制御を応用する試みを行った。その結果、HeLa 細胞を用いて TNF- α やシスプラチン刺激により、セツキシマブ-EGFR 複合体が効率的にエンドサイトーシスすることを明らかにした。このエンドサイトーシスは、p38 阻害剤 SB203580 によって完全に抑制されたこと、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブで抑制されなかったこと、また(1)で使った R1m 細胞では認められなかったことから、オルタナティブ制御による細胞内移行であることがわかった。また、こうした現象は、HeLa 細胞だけでなく、肺がん細胞 (A549、PC-9)、大腸がん細胞 (DLD1) および神経膠芽腫 (U87MG) でも認められた。しかし、HeLa 細胞ではエンドサイトーシスしたものの、60 分後には細胞膜上にリサイクルすることがわかった。リボソーム阻害タンパク質であるサボリンを共役した二次抗体を用いて、本法により細胞毒性が強くなることを見出したことから、本法を用いることで EGFR 標的 ADC の活性上昇が期待できると考えられた。



(3) EphA2 のオルタナティブ活性化の検出

我々はこれまでに、増殖シグナルにおいてチロシンキナーゼ型受容体 EphA2 のオルタナティブ活性化機構として、ERK-RSK を介した EphA2 Ser-897 リン酸化経路を報告している (Zhou et al. Nat. Commun. 2015)。腫瘍内においてがん細胞は様々な細胞ストレスに暴露されていることから、EphA2 リン酸化に対するストレス刺激の影響を検討した。その結果、タンパク質合成阻害剤アニソマイシンや抗がん剤シスプラチンがリン酸化を誘導することがわかった。その活性化経路を調べた結果、p38 が関与していることがわかった。一方、EGF 刺激における EphA2 リン酸化には p38 は関与しておらず、ストレスシグナルに選択的な経路の存在が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Haryuni Ratna, Tanaka Tomohiro, Zhou Yue, Yokoyama Satoru, Sakurai Hiroaki	4. 巻 20
2. 論文標題 ERK α -mediated negative feedback regulation of oncogenic EGFRvIII in glioblastoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 2477 ~ 2482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.11760	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 周越、櫻井 宏明	4. 巻 92
2. 論文標題 細胞内から受容体型チロシンキナーゼを活性化する仕組み	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 420 ~ 430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920420	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 Tanaka Tomohiro, Zhou Yue, Sakurai Hiroaki	4. 巻 64
2. 論文標題 A new mechanism of EGFR activation identified by Phos-tag band shift analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Electrophoresis Letters	6. 最初と最後の頁 45 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2198/electroph.64.45	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 Xu X., Eshima S., Kato S., Fisher D.E., Sakurai H., Hayakawa Y., and Yokoyama S.	4. 巻 19
2. 論文標題 Rational combination therapy for melanoma with dinaciclib by targeting BAK-dependent cell death.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol. Cancer Ther.	6. 最初と最後の頁 627-636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-19-0451	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24件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 周越、山畑伊織、山村朋弘、横山悟、櫻井宏明
2. 発表標題 Non-canonical activation of EphA2 induces cell migration via Rab11 and Rab11-FIP1.
3. 学会等名 第29回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋篤司、早川芳弘、櫻井宏明、横山悟
2. 発表標題 悪性黒色腫におけるSOX10を介したPD-L1発現制御機構
3. 学会等名 第19回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフォーラム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩原宏幸、岩田悠輔、名取香奈子、小澤龍彦、周越、定清直、横山悟、櫻井宏明
2. 発表標題 SrcによるTAB1リン酸化：酸化ストレスの新しいシグナル経路
3. 学会等名 フォーラム2020 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoru Yokoyama, Atsushi Takahashi, Yue Zhou, Yoshihiro Hayakawa, Hiroaki Sakurai
2. 発表標題 SOX10 negatively regulates PD-L1 expression in melanoma
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yue Zhou, Ryota Oki, Iori Yamahata, Satoru Yokoyama, Sakurai Hiroaki
2. 発表標題 Regulation of cancer cell malignancy via MK2-RSK-EphA2 axis.
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋篤司、横山悟、早川芳弘、櫻井宏明
2. 発表標題 悪性黒色腫におけるSOX10を介したPD-L1の発現制御機構
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 周越、横山悟、櫻井宏明
2. 発表標題 ストレス応答キナーゼp38によるRSK-EphA2経路の制御機構
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 周越、大木良太、田中章裕、山畑伊織、横山悟、櫻井宏明
2. 発表標題 Regulation of cancer cell motility via p38-MK2-RSK-EphA2 axis .
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋隼一郎, 中村施央里, 周越, 横山 悟, 櫻井宏明
2. 発表標題 p38 を介した Cetuximab-EGFR 複合体の効率的なエンドサイトーシス
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 周越, 大木良太, 田中章裕, 山畑伊織, 横山悟, 櫻井宏明
2. 発表標題 p38-MK2-RSKを介したEphA2の非定型的活性化制御
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大沼逸美, 岩田悠輔, 岩原宏幸, 中田真衣, 名取香奈子, 周越, 横山悟, 櫻井宏明
2. 発表標題 酸化ストレスによるTAB1チロシンリン酸化の分子機構
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田裕敬, 周越, 櫻井宏明, 横山悟
2. 発表標題 PTEN欠損によるBRAFV600E変異依存的な細胞運動亢進
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋篤司, 早川芳弘, 櫻井宏明, 横山悟
2. 発表標題 悪性黒色腫におけるSOX10を介したPD-L1発現制御機構
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岸奈央, 高橋隼一郎, 周越, 横山悟, 櫻井宏明
2. 発表標題 大気汚染物質9,10-PQによるチロシンキナーゼ型受容体の非定型的リン酸化
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田勝也, 福司弥生, 周越, 横山悟, 櫻井宏明
2. 発表標題 GIST細胞におけるRSK阻害剤BI-D1870のKIT発現抑制による細胞増殖抑制効果
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山悟, 早川芳弘, 櫻井宏明
2. 発表標題 CDK2/9阻害剤DinaciclibによるBAKを介した抗悪性黒色腫効果と新規併用療法の提案
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井宏明
2. 発表標題 Phos- tag解析から見えてきた新しいEGFR活性化機構
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会・第70回日本電気泳動学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山悟，岩上雄亮，櫻井宏明，早川芳弘
2. 発表標題 STAMBPIは、SLUGタンパク質の安定性を調節し、悪性黒色腫の転移を制御する
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山 悟，早川芳弘，櫻井宏明
2. 発表標題 白斑誘導物質ロドデノールによる抗悪性黒色腫効果の検討
3. 学会等名 フォーラム2019 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 周 越，山畑伊織，山村朋弘，横山 悟，櫻井宏明
2. 発表標題 非定型的活性型EphA2による細胞遊走促進は小胞遊走関連タンパクRab11に依存する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田勝也, 福司弥生, 周 越, 横山 悟, 櫻井宏明
2. 発表標題 消化管間質腫瘍細胞におけるRSK阻害剤BI-D1870のKIT発現抑制による細胞増殖抑制効果
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

1. 発表者名 佐藤弘樹, 高橋篤司, 横山 悟, 櫻井宏明
2. 発表標題 悪性黒色腫におけるSOX10を介したPD-L1の発現制御機構
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

1. 発表者名 地子愛佳里, 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

1. 発表者名 周 越, 山畑伊織, 山村朋弘, 横山 悟, 櫻井宏明
2. 発表標題 RSK-EphA2経路によって誘導される細胞遊走はRab11とRab11-FIP1に依存する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗体のエンドサイトーシスを促進するための方策	発明者 櫻井宏明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-030391	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	横山 悟 (YOKOYAMA Satoru) (90613498)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・准教授 (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of Pittsburgh	Harvard University		