

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390363

研究課題名（和文） リン酸化キナーゼのプロテオーム解析による肺腺癌の治療標的分子の同定

研究課題名（英文） Identification of molecular targets for lung adenocarcinoma treatment through proteome analysis of phosphorylated kinases

研究代表者

桜田 晃（SAKURADA AKIRA）

東北大学・病院・助教

研究者番号：60360872

研究成果の概要（和文）：

肺腺癌細胞においてリン酸化蛋白を質量分析計を用いてスクリーニングし、EGFR 遺伝子に強く制御を受けている複数のタンパク質を同定した。これらの蛋白質が肺癌の進展に関与するかどうか検討するため、同定された蛋白のひとつである GRLF1/p190A RhoGAP の機能を解析した。本蛋白が肺癌細胞の増殖に関与することが示され、今後の治療標的の候補となり得ると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Phosphorylation of protein is important in signal transduction. We screened phosphorylated proteins in lung adenocarcinoma cell by using mass spectrometry to identify molecular targets for lung cancer treatment. Some proteins, including GFRF1 / p190 A RhoGAP, were strongly controlled by EGFR protein. Functional analysis revealed that GFRF1 / p190 A RhoGAP protein controls lung cancer cell proliferation through regulating MEK/ERK pathway. This protein could be a candidate of molecular treatment of lung adenocarcinoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
21年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
22年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：

科研費の分科・細目：胸部外科

キーワード：肺癌、EGFR 遺伝子、キナーゼ、プロテオーム、リン酸化、

1. 研究開始当初の背景

肺腺癌において EGFR 遺伝子のキナーゼドメインに高率に変異が起こっていることが 2004 年に報告され、同時に同変異を有する患者において EGFR-TKI が著効することが明らかになった。一方、EGFR-TKI に対する耐性が新たな臨床上の問題となった。これを克服するには、EGFR による情報伝達を理

解し、新たな治療標的分子を同定することが有益である。

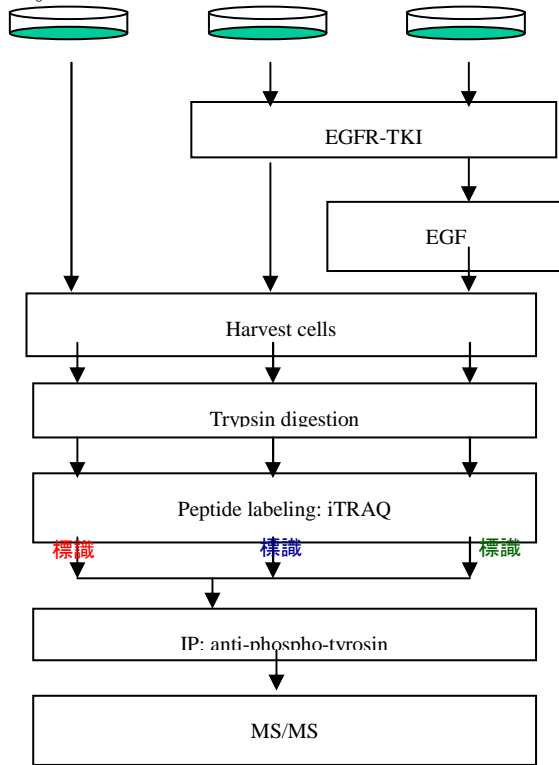
2. 研究の目的

肺腺癌において EGFR を起点としてチロシンのリン酸化を介する情報伝達経路を明らかにすることを通じて癌細胞の進展増殖に関与する分子を同定する。

3. 研究の方法

(1) リン酸化チロシンを標的とした質量分析計による蛋白群の同定

EGFR に変異を有する肺腺癌細胞株を用いて、EGFR-TKI の投与前後で蛋白を回収した。標識試薬でそれぞれの蛋白を標識した後、抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降を行い、得られた蛋白を質量分析計 (MS/MS LS) で解析を行った。



(2) 同定された蛋白の機能解析

上記で得られた蛋白の中で p190A RhoA GAP/GRLF1 に着目し、肺癌細胞の増殖に関与しているかどうか解析を行った。ウェスタンブロット、siRNA によるノックダウンなどにより、肺癌細胞における同蛋白の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) リン酸化チロシンを標的とした質量分析計による質量分析によりリン酸化チロシンを含む蛋白を多数同定した。主なものを表に示す。EGFR 自身の他、細胞接着に関与する蛋白が複数同定された。肺癌細胞における機能の解析が必要であると考えられた。

同定した蛋白の中から、標識に用いた試薬により、EGFR-TKI によるチロシンのリン酸化を判定量的に評価した。その結果、著明に抑制されるリン酸化チロシンを内部に持つ蛋白が複数認められた。EGFR においては、Y1068、Y1173、Y1086 いずれも著明なリン酸化の抑制が認められた。EGFR 以外にも複数の蛋白において EGFR-TKI 投与に

より同様に蛋白内に存在するチロシンのリン酸化抑制が認められた。これらの中で、細胞増殖に関連する可能性のあるものを選択し、肺癌細胞に果たす役割を解析することとした。

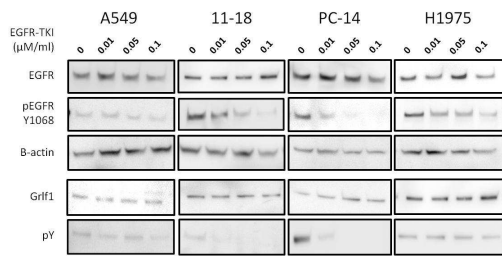
蛋白名	ペプチド配列
Catenin delta-1	SLDNNYSTPNER
Cell division protein kinase 3	IGEGTYGVWYK KVEKIGEGTYGVWYK
DLG1	RDNEVDGQDYHFVWSR
DLG3	STTTGHLIYK
EGFR	GSHQISLDNPDYQQDFFPK GSTAENAEYLR EAKPNGIFKGSTAENAEYLR
FAK	YMEDSTYYK
GSK3beta	QLVRGEPNVS YICSR
G6PDG	VQPFNEAVYTK
MUC1	YVPPSS TDRSPYEK
Paxillin	VGEEEHVYSFPNK
Plakophilin4	NNYALNTATYAEPIRPIQYR
Plakophilin3	GQYHTLQAGFSSR
Syndecan1	QANGGAYQKPRKQEEFYA

(2) p190A Rho GAP/GRLF1 の機能解析

上記蛋白の 1 つとして p190A RhoGAP/GRLF1 に着目した。本蛋白をコードする遺伝子は、19q13.3 に存在する。質量 172KDa の蛋白であり、正常細胞では Rho タンパク質活性を調節して、細胞骨格の再構成や、転写の調節に関与すると報告されている。In vitro では、p190A RhoGAP/GRLF1 は、特に RhoA への関与が指摘されており、活性型である GTP 結合型 RhoA を、不活性型の GDP 結合型 RhoA へ変換することから、tumour suppressor とする報告もあるが、肺癌細胞での機能は不明である。

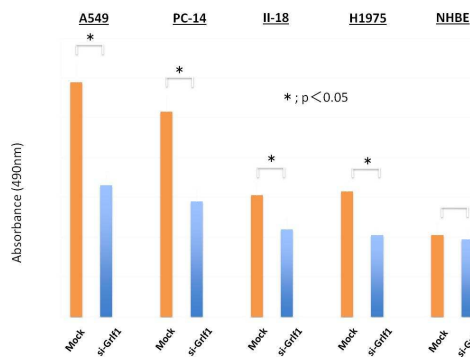
今回の検討で、p190A RhoGAP/GRLF1 内部のチロシン (Y1105) のリン酸化が EGFR-TKI の投与によって抑制される結果が得られた。本蛋白は、これまでの報告では、直接 EGFR の情報伝達経路には含まれていないため、まず、EGFR 経路の調節を受けているかどうか確認するために、ウェスタンブロットで、EGFR-TKI の投与前後で p190A Rho GAP/GRLF1 のリン酸化の程度を調べ、p190A Rho GAP/GRLF1 のリン酸化が EGFR のリン酸化によって調節されていることを確認した。p190A Rho GAP/GRLF1 に対する抗リン酸化抗体はまだ存在しないため、抗リン酸化チロシン抗体を用いた免疫沈降を行って、ウェスタンブロットを行った (下図)。その結果、野生型 EGFR を有する A549 細胞リン酸化チロシンを有する p190A Rho GAP/GRLF1 の量は大きな変動が見られなかったのに対し、EGFR キナーゼドメインに変異を有する 11-18 細胞 (L858R mutation) と PC14 細胞 (exon19 の short deletion) では、リン酸化チロシンを含む同蛋白の量が EGFR-TKI の投与により著明に減少しており、この動向は EGFR のリン酸化 (Y1068) と同様であった。一方、EGFR-TKI 耐性変異とされる T790M を有する H1975 細胞

では、A549 細胞と同様に、EGFR-TKI の投与によって p190A Rho GAP/GRLF1 に含まれるチロシンのリン酸化には変化が認められなかった。



以上のように EGFR-TKI の投与により EGFR のリン酸化と連動した動態を示すことから、直接の mediator は不明であるものの、p190A RhoGAP/GRLF1 は EGFR による調節を受けているものと考えられた。

siRNA によるノックダウンを行い、p190A RhoGAP/GRLF1 の肺癌細胞増殖に及ぼす影響を MTS アッセイを用いて検討した。正常気管支上皮ではノックダウンにより細胞増殖に変化が見られなかったのに対し、p190A Rho GAP/GRLF1 をノックダウンした肺癌細胞ではいずれにおいても増殖の抑制が示された（下図）。この効果は、野生型 EGFR を有する細胞 (A549) と EGFR-TKI 耐性の変異を有する細胞 (H1975) おいても認められた。

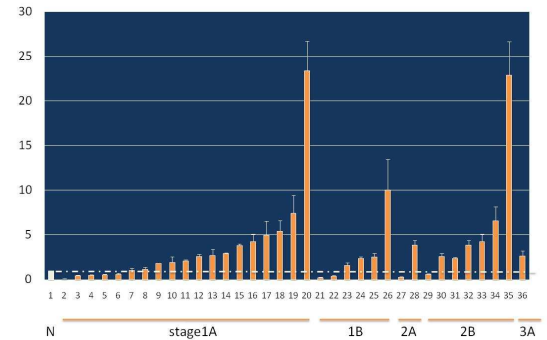


これにより、p190A RhoGAP/GRLF1 が肺癌細胞の増殖において重要な役割を担っている可能性が示唆された。本蛋白のノックアウトにより EGFR 遺伝子の変異の有無にかかわらず増殖抑制効果が認められることから、EGFR とは別の治療標的となり得る可能性も考えられた。

また、本蛋白の下流に位置するとされる MEK, ERK 蛋白のリン酸化について、EGFR-TKI の濃度を変えて投与しウェスタンブロットで確認した。MEK, ERK のリン酸化状態が p190A Rho GAP/GRLF1 のリン酸化と同じ動態を示すことを確認した。細胞増殖機能の少な

くとも一部は、p190A RhoGAP/GRLF1 のシグナル伝達経路下流に存在する、MEK-ERK 経路によって調節されているものと考えられた。

さらに、肺腺癌の臨床検体を用いて p190A Rho GAP/GRLF1 の mRNA の発現量を Q-PCR を用いて定量した。ほとんどの症例において、同遺伝子の mRNA の発現量が正常肺組織（図中番号 1 のカラム）よりも亢進していた（下図）。また、発現量は病期とは一定の相関が見られなかった。



以上より、p190A Rho GAP/GRLF1 は mRNA レベルで発現の亢進を通じて、癌化の早期の段階から肺腺癌の発生進展に影響を与えている可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 10 件）

1. Tsao MS, Sakurada A, et al. Prognostic and predictive value of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutation status and gene copy number for adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol, 査読有、6 巻、2010 年、139-147
2. Lara-Guerra H, Sakurada A, et al. Phase II study of preoperative gefitinib in clinical stage I non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol, 査読有、27 巻、2009 年、6229-6236
3. Endo C, Sakurada A, et al. Results of long-term follow-up of photodynamic therapy for roentgenographically occult bronchogenic squamous cell carcinoma. Chest, 査読有、136 巻、2009 年、369-357
4. Endo C, Sakurada A, et al. Immunocytochemical evaluation of large cell neuroendocrine carcinoma of

the lung、Acta Cytol、53 卷、査読有、2009 年、36-40

5. Sakurada A, Tsao MS, Predictive biomarkers for EGFR therapy, IDrugs、査読有、12 卷、2009 年、34-38
6. Gu Z, Mitsui H, Sakurada A, et al. The methylation status of FBXW7 beta-form correlates with histological subtype in human thymoma.、Biochem Biophys Res Commun、査読有、377 卷、2008 年、685-688
7. Zhu CQ, Sakurada A, et al. Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21., J Clin Oncol、査読有、26 卷、2008 年、4268-4275
8. Oza AM, Sakurada A, et al. Phase II study of erlotinib in recurrent or metastatic endometrial cancer: NCIC IND-148.、J Clin Oncol、査読有、26 卷、2008 年、4319-4325
9. Sakurada A, Lara-Guerra H, et al.、Tissue heterogeneity of EGFR mutation in lung adenocarcinoma.、J Thorac Oncol、査読有、3 卷、2008 年、527-529
10. Yamanaka S, Gu Z, Sakurada A, et al.、siRNA targeting against EGFR, a promising candidate for a novel therapeutic application to lung adenocarcinoma.、Pathology、査読有、75 卷、2008 年、2-8

[学会発表] (計 4 件)

1. 野津田泰嗣、桜田 晃、遠藤千頭ほか、肺癌細胞における p190-A RhoGAP の役割について、日本肺癌学会総会、2010 年 11 月 3 日、広島
2. Sakurada A, Endo C, et al. Surgical outcome of the patients with adenoidcystic carcinoma、World Conference for Bronchology 2010、2010 年 6 月 14 日、Budapest, Hungary
3. 桜田 晃、野津田泰嗣、遠藤千頭、ほか、肺腺癌におけるリン酸化チロシンを標的

とした網羅的解析 (シンポジウム)、日本呼吸器外科学会総会、2010 年 5 月 14 日、仙台

4. Sakurada A, Notsuda H, Endo C, et al.、Prognostic impact of visceral pleural involvement in patients with lung cancer、13th World Congress on Lung Cancer、2009 年 8 月 1 日、San Francisco, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桜田 晃 (SAKURADA AKIRA)
東北大学・病院・助教
研究者番号：60360872

(2) 研究分担者

遠藤 千頭 (ENDO CHIAKI)
東北大学・病院・講師
研究者番号：80333813

(3) 連携研究者

()

研究者番号：