

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790542

研究課題名(和文)がんのAkt経路解析によるEGFR分子標的薬の効果予測およびその増強

研究課題名(英文)Activation of PI3 kinase/Akt pathway enhances degradation of EGFR

研究代表者

栗林 景晶(KURIBAYASHI KAGEAKI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：50381257

研究成果の概要(和文): EGF受容体(EGFR)はチロシンキナーゼ活性を持つ膜貫通型蛋白(RTK)で、EGF、TGF $\alpha$ やneuregulinなどのリガンドが結合すると、Ras、PI3キナーゼやAktの活性化を起こす。その結果、細胞増殖が促進されるため、EGFRの過剰発現は多くの癌種で予後不良因子となっている。本研究では、EGFRに対する分子標的療法の効果増強を目的とし、その分解調節機構を解析した。大腸癌細胞株LS180とSW480を、血清飢餓後EGF刺激し、Akt経路の活性化とEGFRの発現をウェスタンブロットングで調べた。その結果、EGF刺激でAkt経路が活性化し、EGFRの発現は低下した。また、PI3キナーゼをLY294002で阻害すると、EGFRの発現が増強した。さらに、EGFRの発現がEGF以外の刺激による調節を受けているか否かを検討するため、SW480をインスリン、VEGFあるいはHGFで刺激したが、EGFRの発現量に変化を認めなかった。また、AktをsiRNAでノックダウンし、EGFRの発現をEGF刺激前後で調べたところ、EGFRの発現量はAktのそれに左右されなかった。以上の結果は、EGFRの発現量が、EGFRの持つ自己リン酸化活性と、その下流のPI3キナーゼ活性の両者により調節されていることを示唆していた。また、EGFRの発現低下はEGF刺激に特異的であり、インスリン、VEGFあるいはHGFなど、他の刺激因子の影響を受けないことが明らかになった。

研究成果の概要(英文): EGF receptor belongs to the receptor tyrosine kinases family that is activated by the cognate ligand including EGF, TGF $\alpha$ , and neuregulin. EGFR activate its downstream Ras, PI3 kinase and Akt pathway, which results in cell proliferation. Clinically, overexpression of EGFR predicts poor prognosis in many types of cancer. In this study, we analyzed the degradation mechanism of EGFR in order to enhance EGFR-targeted therapy. Akt activation and EGFR reduction took place after stimulating LS180 and SW480 colon cancer cell lines with EGF, confirmed by western blotting. LY294002, PI3 kinase inhibitor, inhibited Akt activation and subsequent EGFR degradation. Activation of PI3 kinase/Akt pathway by VEGF, or HGF did not affect the expression level of EGFR. Silencing of Akt by siRNA did not affect EGFR degradation. These results show EGFR degradation is regulated by PI3 kinase activity and tyrosine kinase activity of EGFR. Moreover, down regulation of EGFR was specific to EGF stimulation and not affected by insulin, VEGF, or HGF.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：EGF 受容体、PI3 キナーゼ、EGF、大腸癌、Akt

1. 研究開始当初の背景

EGF 受容体 (EGFR) は、チロシンキナーゼ活性を持つ膜貫通型蛋白で、EGF、TGF $\alpha$  や neuregulin などのリガンドと結合後、Ras、PI3K、PKB/Akt を活性化し細胞増殖を促進する。EGFR は多くのがん種で過剰発現、点遺伝子変異、欠失変異や再構成を起こし、活性が亢進する。実際、その過剰発現は、頭頸部がん、卵巣がん、子宮頸がん、膀胱がんや食道がんの予後不良因子となっている。

EGFR を標的とした薬剤として、チロシンキナーゼ活性阻害剤 (TKI; Gefitinib, Erlotinib, Lapatinib) やモノクローナル抗体 (Cetuximab, Panitumumab) があり、すでに臨床応用されている。しかし、その治療効果は満足できるものではなく、奏効率はがん全体の 10.2 から 52.0%、食道がんでは 30.6%とされている。

最近我々が、14 種類のヒト食道がん細胞株を用い、EGFR の発現レベルと抗がん剤 (5FU、CBDCA、Taxol) 感受性との関係を調べたところ、逆相関関係が存在した。また、これらの細胞株の EGFR 発現レベルと、Akt のリン酸化を指標とした Akt 経路の活性化との間に、逆相関関係 ( $r=-0.42$ ) があることも見出した (unpublished data)。さらに、これらの細胞株を EGF で刺激すると、PKB/Akt がリン酸化され EGFR の発現量が減少した。また、細胞株 TE8 と TT では、EGF 刺激前からすでに Akt 経路が活性化しており、EGFR の発現は低かった (unpublished data)。これらの結果は、PI3 キナーゼ/Akt 経路から EGFR へ negative feed back loop が存在することを、示唆していた。

2. 研究の目的

本研究では、PI3 キナーゼ/Akt 経路が、EGFR の分解に及ぼす影響とその機序を検討し、EGFR に対する分子標的療法の効果増強を

る。

3. 研究の方法

(1) 試薬

Insulin、rhVEGF と rhHGF は、Sigma Aldrich 社から購入した。rhEGF と抗 Ran 抗体は Becton Dickinson 社、抗 EGFR 抗体は Cell Signaling 社、抗 pAkt 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社から、それぞれ購入した。

(2) 細胞培養

大腸癌細胞株 LS180 と SW480 は、10%FCS 加 DMEM 培地を用い、37、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

(2) ウエスタンブロット

EGFR は 6%Tris-Glycine ゲル、pAkt および Ran は 4-20% Tris-Glycine ゲルを用い、電気泳動した。ニトロセルロースメンブレンに転写後、一次抗体と HRP 結合二次抗体を反応させた。洗浄後、ECL Advance (GE Healthcare) で発色し、ChemiDoc XRS system (Bio-Rad Laboratories) で検出した。

(3) siRNA の導入

Akt に対する siRNA (5'-GCA CCU UCA UUG GCU ACA A-3') の導入は、Amaxa 社の NucleofectorII で行った。比較対照に用いた non-silencing control siRNA は、QIAGEN 社から購入した。

(4) 免疫蛍光染色

SW480 細胞を一晩血清飢餓状態で培養し、各種条件下で刺激後、50%メタノールで固定した。抗 EGFR 抗体および FITC 結合抗ウサギ二次抗体と反応後、Hoechst33342 で核を対比染色した。標本は、Biozero BZ-8100 (Keyence) で観察した。

4. 研究成果

(1) PI3 キナーゼ阻害剤 LY294002 は、EGFR の分解を抑制する。

まず、EGF 刺激による EGFR の分解に、PI3 キナーゼ/Akt 経路が関与しているか否か検討

した。LY294002 処理あるいは未処理の血清飢餓した大腸癌細胞を、EGF で 30 分刺激し、EGFR のウェスタンブロットを行った (図 1)。

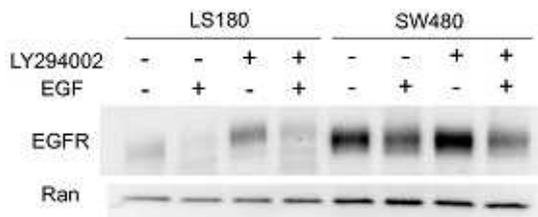


図 1 PI3 キナーゼ阻害剤 LY294002 が EGFR の分解へ及ぼす影響

EGF 刺激で EGFR は分解されたが、LY294002 処理細胞では未処理細胞と比較し、その程度は少なかった。この結果から、PI3 キナーゼ/Akt 経路が EGFR の分解を促進していることが、示唆された。

(2) LY294002 は、濃度および時間依存性に EGFR の分解を抑制する。

SW480 細胞を、各種濃度および時間 LY294002 で処理し、EGFR の発現量を検討した。その結果、濃度 (図 2) および時間 (図 3) 依存性に、LY294002 は EGFR の分解を抑制した。

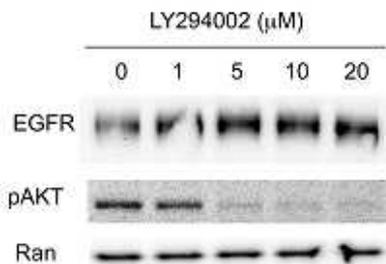


図 2 各種濃度の LY294002 添加が EGFR の分解へ及ぼす影響

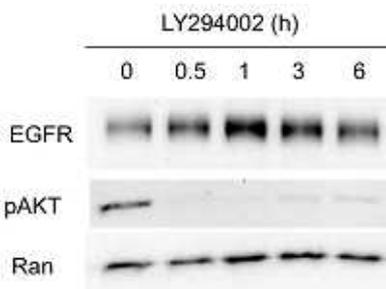


図 3 LY294002 による処理時間が EGFR の分解へ及ぼす影響

(3) Akt の siRNA は、EGFR の分解に影響しない。

LY294002 は PI3 キナーゼと、その下流に存在する Akt 経路の両者を抑制する。EGFR の分解に関与しているのが、そのいずれかを調べる

目的で、Akt を siRNA でノックダウンし、EGFR の発現量変化を解析した (図 4)。Akt をノックアウトしても、EGFR の分解は抑制されなかった。すなわち、EGFR の分解は、PI3 キナーゼによる調節を受けているものと考えられた。



図 4 siAkt で Akt 経路を抑制しても、EGFR 量に変化はみられない

(4) EGFR の分解は、他の PI3 キナーゼ活性化因子による影響を受けない。

EGFR の分解に、他の PI3 キナーゼ活性化因子 (インスリン、HGF や VEGF) が関与しているか否かを、蛍光免疫染色法で検討した。図 5 に示すように、血清飢餓させた SW480 細胞を EGF で刺激すると、EGFR の細胞内 (ライソソーム) 移動がみられた。

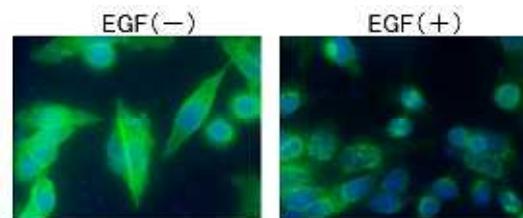


図 5 EGF 刺激による、EGFR の局在変化

同様に、SW480 細胞をインスリン、HGF あるいは VEGF で刺激したが、EGFR の細胞内への移動は起こらなかった (図 6)。

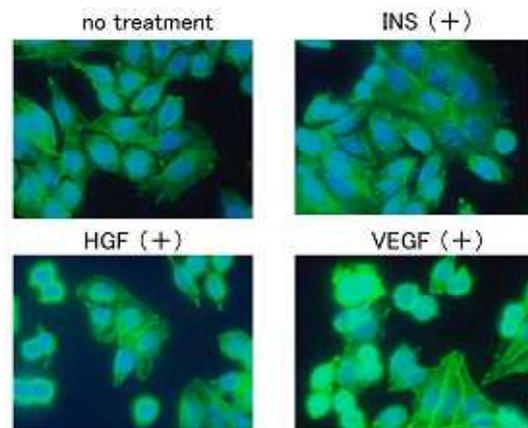


図 6 各種増殖因子刺激後の、EGFR の局在

以上の結果、EGFR の分解は EGF 刺激に特異的であり、活性化された PI3 キナーゼにより促進することが、明らかとなった。

## 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9件)

1. Tanabe H., Kuribayashi K., Tsuji N., Tanaka M., Kobayashi D., Watanabe N. Sesamin induces autophagy in colon cancer cells by reducing tyrosine phosphorylation of EphA1 and EphB2. *Int J Oncol*; 2011. Epub ahead of print. 査読有
2. Onoda C., Kuribayashi K., Nirasawa S., Tsuji N., Tanaka M., Kobayashi D., Watanabe N. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in gastric cancer cell-lines by down-regulating survivin expression. *Int J Oncol*; 2011; 38: 1403-8. 査読有
3. Kobayashi D, Kuribayashi K., Tanaka M., Watanabe N. SALL4 is essential for cancer cell proliferation and is overexpressed at early stages in breast cancer. *Int J Oncol*; 2011; 38: 933-9. 査読有
4. Goto M, Kuribayashi K., Umemori Y, Ohe Y, Asanuma K, Tanaka M, Kobayashi D, Watanabe N. High prevalence of human anti-mouse antibodies in the serum of colorectal cancer patients. *Anticancer Res* 2010; 10, 4353-6. 査読有
5. Umemori Y, Ohe Y, Kuribayashi K., Tsuji N, Nishidate T, Kameshima H, Hirata K, Watanabe N. Evaluating the utility of N1, N8-diacetylspermine and N1, N12-diacetylspermidine in urine as tumor markers for breast and colorectal cancers. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 1894-1899. 査読有
6. Nirasawa S, Kobayashi D, Tsuji N, Kuribayashi K., Watanabe N. Diagnostic relevance of overexpressed Nanog gene in early lung cancers. *Oncol Rep*; 2009; 22: 587-91. 査読有
7. Saeki M, Kobayashi D, Tsuji N, Kuribayashi K., Watanabe N. Diagnostic importance of overexpression of Bmi-1 mRNA in early breast cancers. *Int J Oncol* 2009; 35: 511-5. 査読有
8. Kondoh T, Kobayashi D, Tsuji N, Kuribayashi K., Watanabe N. Overexpression of serine threonine tyrosine kinase 1/novel oncogene with kinase domain mRNA in patients with acute leukemia. *Exp Hematol*; 2009; 37: 824-30. 査読有
9. Moriai M, Tsuji N, Kobayashi D, Kuribayashi K., Watanabe N. Down-regulation of hTERT expression plays an important role in 15-deoxy- $\Delta$ 12, 14-prostaglandin J2-induced apoptosis in cancer cells. *Int J Oncol*; 2009; 34: 1363-72. 査読有

[学会発表](計5件)

1. 小野田千紘、栗林景晶、田中真樹、小林大介、渡邊直樹. 緑茶カテキン(EGCG)による癌細胞増殖抑制機序の解析. 第57回日本臨床検査医学会学術集会, 2010, 東京.
2. 田辺宏美、栗林景晶、辻直樹、渡邊直樹. ゴマリグナン由来 Sesamin の癌細胞増殖抑制機序の解析. 第50回日本臨床化学会年次学術集会, 2010, 甲府.
3. 栗林景晶, 大江由衣, 梅森祥央, 浅沼康一, 佐藤和昭, 田中真樹, 小林大介, 渡邊直樹. 腫瘍マーカーとしてのジアセチルスペルミンとジアセチルスペルミジンの評価. 第57回日本臨床検査医学会学術集会, 2010, 東京.
4. 栗林景晶, 渡邊直樹. 抗癌剤は p53 による TRAIL の誘導を惹起し、癌細胞をアポトーシスに導く. 第56回日本臨床検査医学会学術集会, 2009, 札幌.
5. Kuribayashi K., Krigsfeld G, Wang W,

Mayes PA, Dicker DT, Wu GS, Watanabe N, El-Deiry WS. TNFSF10 (TRAIL), a p53 target gene that mediates p53-dependent cell death. 第68回日本癌学会学術総会, 2009, 横浜.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

栗林 景晶 (KURIBAYASHI KAGEAKI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：50381257