

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 3日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591910

研究課題名（和文） 上皮細胞増殖因子受容体の内在化を標的とした新しい頭頸部がんの治療戦略に関する研究

研究課題名（英文） A Nobel strategy for head and neck cancer by internalization of epidermal growth factor receptor

研究代表者

藤 賢史 (TOH SATOSHI)

九州大学・大学病院（講師）

研究者番号：20380397

研究成果の概要（和文）：

上皮細胞増殖因子受容体（EGFR）は種々の癌腫において増殖、浸潤、転移など臨床的な癌の進展に変わっていることが知られており、これを標的とした薬剤が既に臨床応用されている。本研究では、EGFRの活性化を阻害する戦略として、EGFRの内在化を標的することを想定し、その機序に関する基礎研究を行った。頭頸部扁平上皮癌由来の細胞株 YCU-H891 細胞において、緑茶由来カテキン EGCG は EGFR の内在化を誘導する。EGCG 処理により非受容体型チロシンリン酸化酵素である c-src が活性化し、この活性化を阻害すると、EGFR の内在化も抑制されることが示された。

研究成果の概要（英文）：

EGFR is expressed in various carcinoma cells and plays critical roles of proliferation, invasion and metastasis. Some molecular targeting drugs against EGFR are already applied for cancer patients. In this study, we investigated a mechanism of internalization of EGFR as novel strategy of targeting EGFR pathway.

Although the precise mechanism of ligand-induced EGFR internalization is still unclear, some reports suggest that a src family non-receptor tyrosine kinase (SFK) may play a role in this process. Therefore, we hypothesized that a src family kinase may also play a role in EGCG-induced EGFR internalization. Using YCU-H891 cells, we conducted a time course study and found that EGCG can activate c-src in a dose- and time-dependent manner. Activation was detected with as low as 1 μ M of EGCG and within 10min. This time course is consistent with our previous findings that EGCG can induce EGFR internalization within 30 min. Next, we investigated the effect of EGCG on the level of cell surface EGFR using a quantitative ELISA assay, and found that EGCG 40 μ M causes a significant decrease in the amount of cell surface EGFR. This reduction was partially rescued by the src kinase specific inhibitor PP1. We confirmed these findings using fluorescence microscopy by demonstrating that combined treatment with EGCG and PP1 decreased the amount of internalized vesicles containing EGFR.

c-Src is anchoring to plasma membrane through its N-terminal acyl group. EGCG alternate lipid organization of plasma membrane, therefore we investigated whether c-src is essential for internalization of EGFR. Inhibition of N-terminal acylation effectively reduce phosphorylation of c-src and also inhibited EGCG induced EGFR internalization.

Taken together with these findings, alternation of lipid organization could regulate EGFR internalization through c-src activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部外科学

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞増殖因子(EGF)受容体EGFRは、種々の癌腫で発現がみられ、その活性化が、発がん、増殖、浸潤、転移といった癌の進展に深く関わっている。近年、EGFRを標的とする分子標的薬が開発され、臨床応用されている。代表研究者のこれまでの研究により、天然に存在する化合物が複数のヒト由来の癌細胞株において、上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)の細胞表面からの内在化を誘導し、細胞外からの増殖因子に対する反応を阻害する可能性が示されていた。

2. 研究の目的

本研究では、特にEGFRが高発現しているとされる頭頸部癌に焦点を絞り、EGFRの内在化のメカニズムの一部を明らかにすることを目的とした。具体的には、これまでの研究代表者らのプレリミナルな研究で示唆されていたc-srcの活性化とEGFRの内在化の関係に注目し、その関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

EGFRを高発現する頭頸部扁平上皮癌細胞株(YCU-H891)を用いた。

Srcのリン酸化はウェスタンブロット法、内在化をみる方法として、蛍光免疫染色法、および細胞膜タンパクビオチン化法をもちいた。

4. 研究成果

(1)緑茶由来カテキンEGCGによるEGFRの内在化機序

EGFRを発現する細胞株にEGCG処理を行うとEGFRの内在化が観察される(図1)ことが分かっていたがその機序は不明であった。EGCG処理により、細胞膜に主に存在しているEGFRは30分程度の処理で内在化が観察される。生理的なリガンドの一つであるEGFで処理しても同様の内在化が誘導されるが、EGF処理ではEGFRの活性化に引き続き下流のシグナルが活性化されるが、EGCGではEGFRの活性化を伴わず、下流のシグナルも動かない点が大きな差異である。

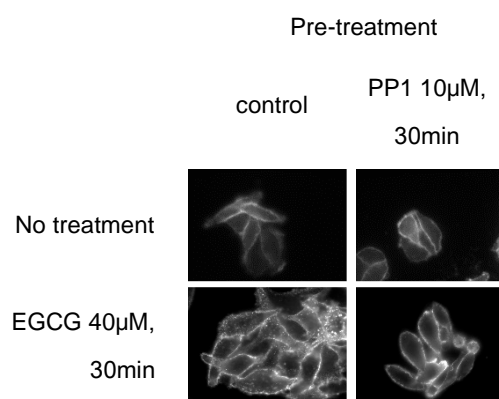


図1 EGCGによるEGFRの内在化(蛍光免疫染色) EGCG処理により細胞表面のEGFRが内在化するが、この内在化はc-src活性化阻害剤であるPP1で前処理すると観察されなくなる。

膜蛋白の内在化（エンドサイトーシス）のメカニズムについては未だ不明な点が多く、議論のあるところであるが、いくつかの提唱されているメカニズムにおいて、c-src が共通に関与していることが報告されている。そこで、c-src に注目し、まず本研究では、EGCG 処理により c-src が一過性に活性化（Y418 リン酸化）するこかを検討した(図2)。その結果、活性化は5分後から観察された。

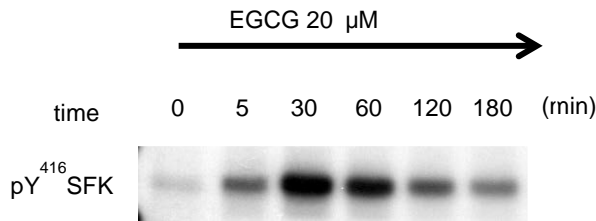


図2 EGCG (20 μM)処理による src のリン酸化 EGCG20 μM で30分処理後の経時的な活性化の変化

この c-src の活性化は EGCG 処理の濃度にも依存する。一方、他の src ファミリータンパクである fyn や yes の活性化はほとんど観察されないことが判明した。同様の活性化は、他のポリフェノール化合物でも観察されるが、EGCG より低い活性化であった。

(2)src ファミリーリン酸化阻害剤である PP-1,2 処理や、dominant negative 変異体、siRNA の導入により、EGCG による EGFR 内在化が抑制されることが判明した。すなわち、c-src の活性化が、EGFR の内在化に重要であることが示唆された(図1, 3)。

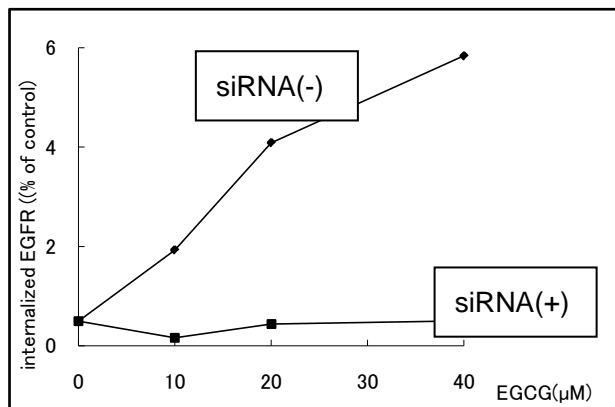


図3 EGCG 処理による EGFR の内在化 (c-src siRNA 処理の有無)

(2)EGCG による c-src 活性化の機序 c-src は N 末端に翻訳後付加されたアシル基（パルミトイル基）により細胞膜に結合している。EGCG はアシル基の結合の重要な足場となっている細胞膜の脂質構造を変化させることが知られており、細胞膜上での局在が重要である可能性があった。そこで、N 末端のパルミトイル化を阻害する薬剤で処理したところ、EGCG による c-src の活性化は抑制され(図4)、EGFR の内在化は観察されなくなった。

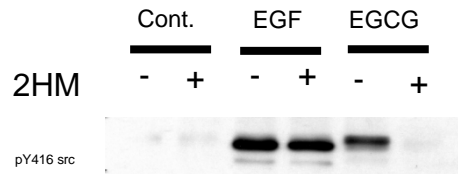


図4 パルミトイル化阻害剤2HMによるEGCGによる src のリン酸化が抑制

以上から、EGCG による c-src の活性化は細胞膜への結合が重要であり、細胞膜の脂質構造に依存していることが推察された。

(4)当初の計画では、EGFR の内在化が EGFR 経路をブロックし、癌治療上の新たな標的をなり得るかを検討することであったので、その一つの指標として細胞の形態変化を観察した。EGF のような増殖因子刺激により、上皮細胞の一部は細胞接着性が低下し、遊走能が増加することが知られている。この変化は、上皮間葉移行 (EMT) の概念で説明され、がんの浸潤、転移に関連した事象として注目されている。

研究に用いた YCU-H891 細胞株は、通常の培養環境では細胞接着性がよく、集塊を形成する。EGF 処理を行うと、短時間の内に (<60分) 接着性が低下し、類円形の細胞形態に変化した。この変化は、EGCG で処理することにより、阻害されたが、前述の 2HM 処理により、この阻害が観察されなくなった。このことは、EGFR 経路が活性化することにより誘導される EMT が、EGCG により阻害され、この際、c-src の活性化が重要である可能性を示唆する結果であると考えらえらる (図5)。

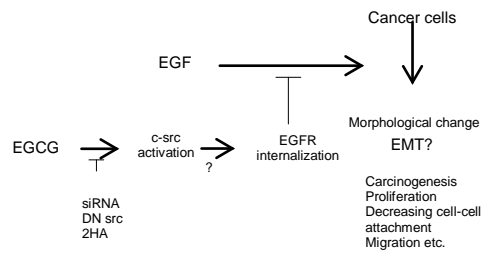


図5 EGFR 経路と形態変化、及びこの系に及ぼす EGCG, EGFR 内在化の機序モデル

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 3 件)

- (1) Muneyuki Masuda, Satoshi Toh, Takahiro Wakasaki, Masumi Suzui and Andrew K Joe. Somatic evolution of head and neck cancer - biological robustness and latent vulnerability. Molecular Oncology. In press. (査読あり)
- (2) Nakashima T, Yasumatsu R, Toh S, Shiratsuchi H, Kamitani T, Shioyama Y, Nakamura K, Komune S. Advanced maxillary sinus cancer treated with concurrent chemoradiotherapy with intra-arterial cisplatin/docetaxel and oral s-1: own experience and literature review. Case Rep Oncol. 2011 Sep;4(3):492-8. (査読あり)
- (3) Masuda M, Wakasaki T, Toh S, Shimizu M, Adachi S. Chemoprevention of Head and Neck Cancer by Green Tea Extract: EGCG-The Role of EGFR Signaling and "Lipid Raft". J Oncol. 2011;2011:540148. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 藤賢史 頭頸部がんに対する分子標的治療. 日本耳鼻咽喉科学会九州連合地方部会学術講演会 (2012年7月14日、宮崎県宮崎市)
- (2) Satoshi Toh, Torahiko Nakashima, Shizuo Komue EGCG Induce Internalization of EGF Receptor.

- 8th International Conference of Head and Neck Cancer (2012年7月21-25日、トロント、カナダ)
- (3) 藤賢史、白土秀樹、中島寅彦、小宗静男 上皮細胞増殖因子受容体の内在化に關与する c-src の活性化の機序 第 35 回日本頭頸部癌学会学術講演会 (2011年6月9-10日、愛知県名古屋市)

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤賢史 (TOH SATOSHI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：20380397

(2) 研究分担者

中島寅彦 (NAKASHIMA TORAHIKO)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：00284505