

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 24 年 4 月 4 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790639

研究課題名（和文） EGFRのセリン残基を分子標的とした新規治療薬の開発

研究課題名（英文） Research for new drug which targets EGFR at serine residues.

研究代表者

足立 政治 (ADACHI SEIJI)

岐阜大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：50467205

研究成果の概要（和文）：我々は、緑茶カテキンの成分のひとつである (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) や heat shock protein (HSP)90 阻害剤、anisomycin により p38 MAPK を介した EGFR の 1046/1047 番目のセリン残基のリン酸化が起き、EGFR が internalization (内在化) ののち脱感作されることを見出した。さらに我々は短波長紫外線 (UV-C) が p38 MAPK の活性化を介した EGFR の 1046/1047 番目のセリン残基のリン酸化による EGFR の脱感作により、EGF からの刺激を回避させる働きを有することも見出している。つまり、これら一連の研究は p38 MAPK を介した EGFR のセリン 1046/1047 のリン酸化が、広く EGFR の脱感作に重要であることを示唆するものであり、このリン酸化を標的とした分子標的薬の開発の基礎となるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：We have previously reported that EGCG as well as HSP90 inhibitors or anisomycin cause downregulation of the EGFR via phosphorylation at Ser1046/1047 through p38 MAPK in human cancer cells. Moreover, we demonstrated that short-wave length ultra-violet (UV-C) irradiation induces the removal of EGFR from cell surface that can protect colon cancer cells from oncogenic stimulation of EGF, resulting in cell cycle arrest. Hence, our findings suggest that EGFR at Ser1046/1047 could be a novel molecular target against human colon cancers.

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	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
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：内科系臨床医学・消化器病態学

キーワード：EGFR, EGF, 紫外線, p38 MAPK, セリン残基, リン酸化

1. 研究開始当初の背景

大腸癌をはじめとした各種癌では受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の一つである上皮成長因子 (EGF) 受容体 (EGFR) の発現異常が報告されている。現在までにチロシンのリン酸化の抑制をめざした抗 EGFR 抗体がヒト大腸癌に臨床応用されるようになったが、これは一般に、「EGFR の制御」がすなわち「大腸癌を制御」する、との認識に由来する。そこで我々はこの EGFR の脱感作を導き、かつ「安価で容易に入手可能な薬剤」の開発を目的として、まず緑茶成分のカテキンに着目した。緑茶は世界でもっともポピュラーな飲料物の一つであり、その中でも (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) は、さまざまな癌 (大腸癌、乳癌、前立腺癌など) の発生を予防することが疫学的研究で明らかとなっている。その詳細な作用機序については十分に解明されていなかった。我々は今までに以下のことを見出してきた。「EGCG 投与により細胞膜マイクロドメインである lipid rafts (脂質ラフト) が著明に変化 (ラフト面積の著明な減少) し、EGFR は細胞膜上の活性化の場を失うことにより EGF 結合能が低下、さらに EGFR の二量体の形成が阻害される。その後 EGCG により EGFR は細胞膜から細胞質内に internalization (内在化) を起こす。しかしこれらの過程でチロシンのリン酸化は起こっていないため、細胞増殖シグナルは刺激されない、つまり EGFR は EGCG により内在化されることで脱感作される」。つまり p38 MAPK を介した EGFR の 1046/1047 番目のセリン残基のリン酸化は EGCG による EGFR の脱感作に重要であることを明らかにした。

2. 研究の目的

p38 MAPK を介した EGFR のセリン 1046/1047 のリン酸化を誘導する chemical が新規抗がん剤としての可能性を有すると思われ、まずこのセリンのリン酸化による脱感作のメカニズムを解明することが極めて重要と考えている。まず EGFR のセリン 1046/1047 のリン酸化がどのような役割を果たしているのかを解明する。またこのリン酸化を誘導する他の物質がないか検索を行う。

3. 研究の方法

免疫蛍光標識法およびフローサイトメトリーで局在の検討を行なった。各種分子生物学的検討はウェスタンブロット法などを用いた。また細胞増殖抑制効果への影響について BrdU アッセイ、MTT アッセイを用いて比較検討した。

4. 研究成果

文献検索上から短波長紫外線 (UV-C) に着目した。UV-C は、一般には皮膚がんの原因物質といわれているが、癌治療への応用も試みられている。そこで、我々は大腸がん細胞および膵がん細胞に対する UV-C の殺細胞および細胞増殖抑制効果、UV-C による EGFR の脱感作 (内在化および分解) への影響、EGFR の各種リン酸化、その下流の細胞内情報伝達機構への影響について検討した。その結果 UV-C により殺細胞効果と細胞増殖能の低下に並行して EGFR の内在化が誘導された。また UV-C により EGFR のセリン残基 (Ser1046/1047) のリン酸化亢進および EGFR の分解を認めた。さらに UV-C は p38 MAPK のリン酸化を惹起し、siRNA 等で p38 MAPK を阻害すると EGFR のセリン残基のリン酸化および EGFR の内在化が

抑制された。つまり、UV-C は p38 MAPK を賦活し EGFR のセリン残基をリン酸化した後、EGFR の脱感作を引き起こす、という EGF による脱感作とは異なるメカニズムを見出した。またこの現象は HSP90 阻害剤でも同様に見られ、EGCG と合わせ EGFR のセリン残基のリン酸化による脱感作は普遍的なものである可能性が強まった。このセリン残基は新たな分子標的となる可能性が高く、特に UV-C を臨床応用する試みが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Kawaguchi J, **Adachi S**, Yasuda I, Yamauchi T, Yoshioka T, Itani M, Kozawa O, Moriwaki H. UVC irradiation suppresses platelet-derived growth factor-BB-induced migration in human pancreatic cancer cells. *Oncol Rep* 2012;27:935-9. 査読有
2. Iwashita T, Yasuda I, Doi S, Ando N, Nakashima M, **Adachi S**, Hirose Y, Mukai T, Iwata K, Tomita E, Itoi T, Moriwaki H. Use of Samples from Endoscopic, Ultrasound-Guided, 19-Gauge, Fine-Needle Aspiration in Diagnosis of Autoimmune Pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10:316-22. 査読有
3. Yasuda I, Goto N, Tsurumi H, Nakashima M, Doi S, Iwashita T, Kanemura N, Kasahara S, **Adachi S**, Hara T, Shimizu M, Takami T, Moriwaki H. Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy for diagnosis of lymphoproliferative disorders: Feasibility of immunohistological, flow cytometric, and cytogenetic assessments. *Am J Gastroenterol* 2012;107:397-404. 査読有
4. Nakashima M, **Adachi S**, Yasuda I, Yamauchi T, Kawaguchi J, Itani M, Yoshioka T, Matsushima-Nishiwaki R, Hirose Y, Kozawa O, Moriwaki H. Phosphorylation status of heat shock protein 27 plays a key role in gemcitabine-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* 2011 27;313:218-25. 査読有
5. **Adachi S**, Yasuda I, Kawaguchi J, Yamauchi T, Nakashima M, Itani M, Nakamura M, Yoshioka T, Moriwaki H, Kozawa O. Ultraviolet enhances the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine by activation of 5' AMP-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2011 414:53-59. 査読有
6. Yamauchi T, **Adachi S**, Yasuda I, Nakashima M, Kawaguchi J, Yoshioka T, Hirose Y, Kozawa O, Moriwaki H. Ultra-violet irradiation induces apoptosis via mitochondrial pathway in pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 2011;39:1375-80. 査読有
7. **Adachi S**, Yasuda I, Nakashima M, Yamauchi T, Kawaguchi J, Shimizu M, Itani M, Nakamura M, Nishii Y, Yoshioka T, Hirose Y, Okano Y, Moriwaki H, Kozawa O. Ultraviolet irradiation can induce evasion of colon cancer cells from stimulation of epidermal growth factor. *J Biol Chem* 2011;286:26178-26187. 査読有
8. Yamauchi T, **Adachi S**, Yasuda I, Nakashima M, Kawaguchi J, Nishii Y, Yoshioka T, Okano Y, Hirose Y, Kozawa O, Moriwaki H. UV-C irradiation induces downregulation of EGF receptor via phosphorylation at serine

- 1046/1047 in human pancreatic cancer cells. *Radiation Res* 2011;176:565-74. 査読有
9. Nakashima M, Adachi S, Yasuda I, Yamauchi T, Kawaguchi J, Hanamatsu T, Yoshioka T, Okano Y, Hirose Y, Kozawa O, Moriwaki H. Inhibition of Rho-associated coiled-coil containing protein kinase enhances the activation of epidermal growth factor receptor in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer* 2011;10:79. 査読有
10. Doi S, Yasuda I, Nakashima M, Kawaguchi J, Yamauchi T, Iwashita T, Toda K, Adachi S, Shimizu M, Tsurumi H, Moriwaki H. EUS-FNA of Lesions near the Aortoiliac Bifurcation via an Upper Gastrointestinal Approach. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:1717-20. 査読有
11. Shimizu M, Adachi S, Masuda M, Kozawa O, Moriwaki H. Cancer chemoprevention with green tea catechins by targeting receptor tyrosine kinases. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55:832-43. 査読有
12. 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; 540148:1-7. 査読有
13. Adachi S, Yasuda I, Nakashima M, Yamauchi T, Yoshioka T, Okano Y, Moriwaki H, Kozawa O. Rho-kinase inhibitor upregulates migration by altering focal adhesion formation via the Akt pathway in colon cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2011;650:145-150. 査読有
14. Kitagawa J, Hara T, Tsurumi H, Ninomiya S, Ogawa K, Adachi S, Kanemura N, Kasahara S, Shimizu M, Moriwaki H. Synergistic growth inhibition in HL-60 cells by the combination of acyclic retinoid and vitamin K2. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;137:779-787. 査読有
15. Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, Yasuda Y, Kubota M, Adachi S, Tsurumi H, Hara Y, Moriwaki H. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits growth and activation of the VEGF/VEGFR axis in human colorectal cancer cells. *Chem Biol Interact* 2010;14:185:247-52. 査読有
16. Adachi S, Yasuda I, Nakashima M, Yamauchi T, Moriwaki H, Kozawa O. HSP90 inhibitors induce down-regulation of EGF receptor via p38 MAPK-mediated phosphorylation at Ser1046/7 in human pancreatic cancer cells. *Oncol Rep* 2010;23:1709-14. 査読有
17. Nakashima M, Adachi S, Yasuda I, Yamauchi T, Kozawa O, Moriwaki H. Rho-kinase regulates negatively the epidermal growth factor-stimulated colon cancer cell proliferation. *Int J Oncol* 2010;36:585-92. 査読有
- [学会発表] (計7件)
1. JDDW2011 (第53回消化器病学会大会) 2011. 10月 福岡 パネルディスカッション 10 消化器疾患における分子標的治療; ROCK/Rho-kinase による大腸がんの抑制機能について～新規治療標的の可能性～ 足立政治、森脇久隆、小澤修
2. 第42回 日本膵臓学会総会 2011年7月29日～30日 弘前 膵がんの細胞増殖能における Rho-kinase の役割; 足立政治、中島賢憲、安田一朗、山内貴裕、河口順二、森脇久隆、小澤修
3. 第42回 日本膵臓学会総会 2011年7月29日～30日 弘前 膵がん細胞に対する短波長

紫外線 (UV-C) 照射の腫瘍増殖抑制効果の検討; 山内貴裕、足立政治、安田一朗、中島賢憲、河口順二、小澤修、森脇久隆

4. 第 42 回 日本膵臓学会総会 2011 年 7 月 29 日～30 日 弘前 膵がん細胞に対する短波長紫外線のアポトーシス誘導効果についての検討; 河口順二、足立政治、山内貴裕、安田一朗、中島賢憲、小澤修、森脇久隆

5. 2010 JDDW 日本消化器病学会大会 (横浜, 2010. 10. 13) Heat shock protein 90 阻害剤の膵がん治療への応用; 足立政治、安田一朗、中島賢憲、山内貴裕、森脇久隆、小澤修

6. **Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society 2010 *JPS Symposium 2*** (Fukuoka, 2010. 7. 11) Heat shock protein 90 inhibitors as a possible new candidate for the treatment of human pancreatic cancer; Seiji Adachi, Ichiro Yasuda, Masanori Nakashima, Takahiro Yamauchi, Hisataka Moriwaki and Osamu Kozawa.

7. 101th AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting (Washington DC, 2010. 4. 21) Phosphorylation of epidermal growth factor receptor at Ser1046/1047 by p38 mitogen-activated protein kinase plays a critical role in its downregulation in cancer cells; Seiji Adachi, Masanori Nakashima, Takahiro Yamauchi, Yohei

Shirakami, Masahito Shimizu, Ichiro Yasuda, Hisataka Moriwaki and Osamu Kozawa.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 政治 (ADACHI SEIJI)

岐阜大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号 : 50467205

(2) 研究分担者 : なし