

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590071

研究課題名(和文)がん微小環境におけるTNF-TAK1シグナルはなぜ転移を促進するのか

研究課題名(英文)Role of TNF-TAK1 signaling pathway in tumor microenvironments of metastasis

研究代表者

櫻井 宏明 (Sakurai, Hiroaki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：00345571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：TNF-によるEphA2のリン酸化制御について解析した結果、TAK1-ERK下流のRSK1/2がSer-897を直接リン酸化することがわかった。Ser-897リン酸化が恒常的に誘導されているヒト乳がん細胞株において、RSK-EphA2経路が遊走・浸潤能を誘導した。さらに、ヒト肺がん組織を用いてRSK-EphA2の局在を検討したところ、リン酸化EphA2 Ser-897とリン酸化RSKが同じ細胞に認められ、RSK-EphA2経路の活性化が生命予後と負の相関を示すことを明らかにした。以上のことから、RSK-EphA2経路はがん細胞運動を調節し、がんの悪性化に関わることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Crosstalk between inflammatory signaling pathways and receptor tyrosine kinases has been revealed as an indicator of cancer malignant progression. In the present study, we focus on EphA2 receptor tyrosine kinase. It has been reported that ligand-independent phosphorylation of EphA2 at Ser-897 is induced by Akt. We show that inflammatory cytokines promote RSK-, not Akt-, dependent phosphorylation of EphA2 at Ser-897. The RSK-EphA2 signaling pathway controls cell migration and invasion of metastatic breast cancer cells. Moreover, Ser-897-phosphorylated EphA2 co-localizes with phosphorylated active form of RSK in various human tumor specimens, and this double positivity is related to poor survival in lung cancer patients, especially those with a smoking history. These results indicate that the phosphorylation of EphA2 at Ser-897 is controlled by RSK and the RSK-EphA2 axis might contribute to cell motility and promote tumor malignant progression.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：チロシンキナーゼ型受容体 TNF TAK1 EphA2 RSK Helicobacter pylori EGFR

1. 研究開始当初の背景

(1) TNF- α は炎症反応の主役としての地位が確立されているが、がんとTNF- α の関係は腫瘍壊死因子という名前から単純には受け入れられてこなかった。しかし、最近になりようやくTNF- α の腫瘍促進作用がクローズアップされるようになってきた。TNF- α の腫瘍促進効果は、腫瘍内の間質細胞(繊維芽細胞、リンパ球、骨髄由来細胞など)やがん細胞自身から産生される比較的少量のTNF- α の機能を見ていると考えられる。つまり、間質細胞とがん細胞の相互作用が様々な面からがん転移を促進しており、この多くのプロセスにTNF- α が重要な役割を果たしていると考えられている。

(2) 研究代表者は、TNF- α シグナルの鍵分子であるTAK1について、炎症・免疫シグナルやがん悪性化における役割を中心に、重要な研究実績を挙げてきた。例えば、TNF- α シグナル伝達経路におけるTAK1によるNF- κ B活性化機構の研究やEGFRシグナルとの機能的相互作用の研究は、炎症シグナル分野で先駆的な研究として評価されている。また、がん転移やウイルス発がん機構などのがん悪性化に関する研究領域へも展開してきた。

2. 研究の目的

(1) がん微小環境におけるがん細胞と間質細胞との相互作用には、それら細胞から分泌される炎症性サイトカインや増殖因子などが複合的に関与している。本研究では、がん微小環境という複雑系をTNF- α の作用点から、特にTAK1活性化を基本的な炎症シグナルと位置づけて理解することを目指す。

(2) 増殖因子受容体であるチロシンキナーゼ型受容体(RTK)はヒトゲノムに58種コードされており、様々ながん腫において活性化変異が起こっている。したがって、RTKの活性調節機構を解明することは、発がんおよびがん悪性化の分子機構を理解するために重要である。

(3) 我々は、TNF- α シグナルの下流で、EGFRがチロシンキナーゼ活性およびリガンド非依存的に制御されていることを報告してきた(参考文献)。TAK1下流シグナルにおいて、ERKがThr-669をリン酸化することによりEGFRのチロシンキナーゼ活性が抑制されること、またp38を介してSer-1046/1047がリン酸化されることによりEGFRのクラスリン依存性エンドサイトーシスが起ることを報告している。そこで、本研究では、ピロリ菌感染によるEGFR制御機構を解析した。また、クラスリン依存性エンドサイトーシスに参与するアダプター分子Eps15のリン酸化制御に着いて検討した。

(4) RTKの一つであるEphA2は、EGFな

どの増殖因子シグナルによりAktを介してSer-897がリン酸化されることで、リガンド非依存的に細胞運動能を制御していることが知られている。そこで、本研究では、TNF- α を介したTAK1活性化がEphA2を制御している可能性を調べた。

3. 研究の方法

(1) ヒト胃がん細胞株AGSおよびMKN45にピロリ菌を感染させた。その後、経時的に細胞抽出液を調製し、ウェスタンブロット法にてEGFRのリン酸化などを解析した。また、EGFRのエンドサイトーシスは、フローサイトメトリーまたは免疫蛍光染色により解析した。

(2) Eps15のリン酸化部位の同定は、質量分析計を用いて行った。また、リン酸化部位特異的抗体を作製し、ウェスタンブロット法で解析した。さらに、Eps15のエンドサイトーシスにおける役割を解析するため、siRNAによるノックダウンを行った。

(3) EphA2のリン酸化に関する研究は、HeLa細胞、肺がん細胞、メラノーマおよびグリオーマを用いた。これら細胞をTNF- α やEGFなどで刺激し、ウェスタンブロット法でEphA2 Ser-897リン酸化を評価した。また、ERK阻害剤U0126やRSK阻害剤BI-D1870を用いた。さらに、siRNA法によりTAK1やRSKをノックダウンした。

(4) ヒト乳がん細胞株MDA-MB-231細胞を用いて細胞遊走能を評価した。Wound healingアッセイやチャンバーを用いたinvasionアッセイを行った。また、リン酸化型EphA2の細胞内局在は、免疫蛍光染色で解析した。

(5) ヒト腫瘍組織アレイ、およびEGFR活性化変異のあるヒト肺がん組織を用いて、EphA2およびRSKのリン酸化を免疫組織化学染色にて解析した。また、Kaplan-Meier法にて、両者の染色結果と患者予後の相関を調べた。

4. 研究成果

(1) ピロリ菌感染30分後から、EGFRのThr-669とSer-1046/1047のリン酸化が誘導された。これらリン酸化は、それぞれERKおよびp38を介しており、EGFRのチロシン自己リン酸化は全く認められなかったことからリガンドおよびチロシンキナーゼ活性に非依存的であることが分かった。さらに、p38を介したシグナルは、EGFRの一時的なエンドサイトーシスを誘導した。以上の結果より、胃がん細胞においてピロリ菌感染によりEGFRのSer/Thrリン酸化が誘導されることが分かった(図1)。これらの結果はピロリ菌によるEGFR制御の新しい制御機構を示しており、今後その機能解析が必要である。

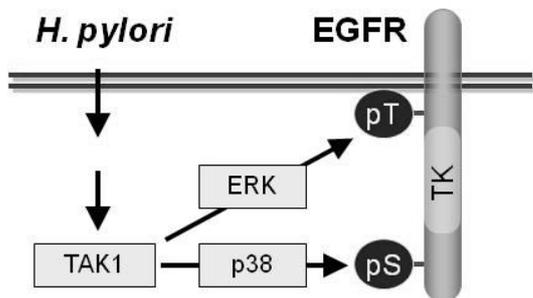


図1. ピロリ菌によるEGFRリン酸化経路

(2) HeLa細胞をTNF- α 刺激したサンプルを質量分析計で解析した結果、Eps15のSer-796がリン酸化されたペプチド断片が検出された。そこで、Ser-796特異的なリン酸化抗体を作製しウェスタンブロット法で解析した結果、内在性Eps15のSer-796のリン酸化起こることが確認できた。リン酸化は刺激後すぐに誘導され、p38経路を介して起こっていることが分かった。p38はEGFRのエンドサイトーシスを誘導することから、Eps15のリン酸化がクラスリン非依存的なエンドサイトーシスに関与していると期待されたが、siRNAによるノックダウンの結果、EGFRのエンドサイトーシスに関する直接的な結果は得られなかった。

(3) HeLa細胞をTNF- α 刺激したところ、EphA2 Ser-897のリン酸化が強く誘導された。EphA2リガンドのephrin-A1刺激ではEphA2のチロシン自己リン酸化が誘導されたのに対して、TNF- α ではチロシンリン酸化は認められなかったことから、チロシンキナーゼ非依存的にSer-897リン酸化が誘導されることが分かった。また、TAK1を過剰発現してもSer-897リン酸化が誘導された。増殖因子によるSer-897リン酸化がAktを介していると報告されていることから、PI3KおよびAkt阻害剤の効果を検討した結果、全く阻害されなかった。そこで、上記報告で使用されているグリオーマ細胞株U87-MGおよびTG98を用いて検討したが、この場合も阻害剤は効果を示さなかったことから、Aktが責任キナーゼでないと考えられた。そこで、TNF- α 下流シグナル経路の阻害剤を検討した結果、MEK阻害剤U0126とERK下流に位置するRSKの阻害剤BI-D1870がSer-897のリン酸化を完全に阻害した。siRNAを用いた検討によっても同様の効果が認められた。以上の結果から、炎症性サイトカインや増殖因子によるSer-897のリン酸化は、RSKが担っていると考えられた。

(4) RSK-EphA2経路の細胞運動能における役割を解析するため、乳がん細胞株MDA-MB-231細胞を用いた。この細胞は、EphA2を過剰発現しており、恒常的にRSKによってSer-897がリン酸化されていた。ま

ず、RSK阻害剤の効果を検討した結果、ラメリポディア様の構造が消失し、細胞遊走能と浸潤能が顕著に抑制された。また、リン酸化EphA2の細胞内局在を検討した結果、ラメリポディア様の構造に選択的に検出された。次に、EphA2をsiRNAでノックダウンした結果、細胞遊走が顕著に阻害された。この効果は、キナーゼ活性を持たない変異EphA2 (Ser-897は存在)により解除されたが、Ser-897をAlaに変異したEphA2では解除できなかった。以上の結果から、がん細胞の運動能にRSK-EphA2経路が重要な役割を果たしていることがわかった(図2)。

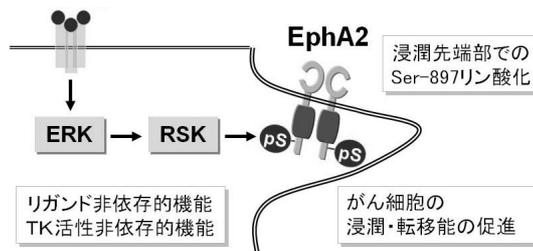


図2. RSKによるEphA2のリン酸化経路

(5) RSK-EphA2経路がどのようなオンコジーンシグナルの下流で機能しているのかについて検討した。まず、メラノーマ細胞株では、BRAF-V600E変異を持つ細胞株の中で、EphA2を発現している細胞では恒常的なSer-897リン酸化が起こっていた。これらのリン酸化は、BRAF阻害剤vemurafenibで顕著に阻害された。NRAS変異を持つ細胞株では、vemurafenibは効かなかった。しかし、これらすべての細胞株で、RSK阻害剤がSer-897リン酸化を阻害した。

次に、非小細胞肺癌細胞株を用いて検討した。EGFRエキソン19欠失を持つ細胞株およびEML4-ALKを発現する細胞株では、それぞれgefitinibおよびcrizotinibがSer-897リン酸化を顕著に抑制した。また、KRAS変異を持つA549細胞を含めてすべての非小細胞肺癌細胞株において、RSK阻害剤がSer-897リン酸化を阻害した。

(5) ヒト組織アレイを免疫組織化学染色した結果、肺腺がんや肺扁平上皮がん組織などでリン酸化EphA2とリン酸化RSKが共局在していた。EGFRエキソン19欠失を持つ肺がん患者組織においても同様の染色像が認められた。リン酸化EphA2は主に細胞膜に、リン酸化RSKは主に細胞質と核に染色され、それぞれの細胞内局在を反映した染色像が得られた。そこで、肺がん組織アレイを用いて予後関連の検討を行った結果、EphA2とRSKともに陽性患者の予後が著しく悪いことが分かった。

<引用文献>

Nishimura M., Shin M.S., Singhirunnosorn P., Suzuki S., Kawanishi M., Koizumi K., Saiki I., and Sakurai H.: TAK1-mediated serine/threonine phosphorylation of epidermal growth factor receptor via p38/extracellular signal-regulated kinase: NF- κ B-independent survival pathways in tumor necrosis factor alpha signaling. *Mol. Cell. Biol.* 29: 5529-5539, 2009.

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 39 件)

Zhou Y., Yamada N., Tanaka T., Hori T., Yokoyama S., Hayakawa Y., Yano S., Fukuoka J., Koizumi K., Saiki I., Sakurai H.: Crucial roles of RSK in cell motility by catalyzing serine phosphorylation of EphA2. *Nat. Commun.* 6: 7679, 2015.

DOI: 10.1038/ncomms7679.

Zaidi S.F., Refaat A., Zhou Y., Shin M.S., Muhammad J.S., Saiki I., Sakurai H., Sugiyama T.: Helicobacter pylori induces serine phosphorylation of EGFR via novel TAK1-p38 activation pathway in an HB-EGF-independent manner. *Helicobacter* (in press), 2015.

DOI: 10.1111/hel.12215.

Refaat A., Aminullah, Zhou Y., Kawanishi M., Shin M.S., Abdelhamed S., Tomaru R., Koizumi K., Yokoyama S., Saiki I., Sakurai H.: Role of tyrosine kinase-independent phosphorylation of EGFR with activating mutation in cisplatin-treated lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458: 856-861, 2015.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.044.

Zhou Y., Tanaka T., Sugiyama N., Yokoyama S., Kawasaki Y., Sakuma T., Ishihama Y., Saiki I., Sakurai H.: p38-Mediated phosphorylation of Eps15 endocytic adaptor protein. *FEBS Lett.* 588: 131-137, 2014.

DOI: 10.1016/j.febslet.2013.11.020.

Sato K., Shin M.S., Sakimura A., Zhou Y., Tanaka T., Kawanishi M., Kawasaki Y., Yokoyama S., Koizumi K., Saiki I., Sakurai H.: Inverse correlation between Thr-669 and constitutive tyrosine phosphorylation in the asymmetric epidermal growth factor receptor dimer conformation. *Cancer Sci.* 104: 1315-1322, 2013.

DOI: 10.1111/cas.12225

[学会発表](計 25 件)

周越, 山田直樹, 田中智大, 櫻井宏明: RSK-EphA2 シグナルを介したがん細胞運動の制御機構. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014, 11, 25-27, 横浜.

山田直樹, 周越, 河崎優希, 櫻井宏明: 炎症シグナルにおける EphA 受容体のリン酸化制御. 第 13 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2014, 2014, 9, 20-21, 富山.

周越, 山田直樹, 田中智大, 櫻井宏明: RSK-EphA2 シグナルを介したがん細胞運動の制御機構. 第 23 回日本がん転移学会学術集会, 2014, 7, 10-11, 金沢.

櫻井宏明, 田中智大: リガンドシグナルによるリガンド非結合型 EGFR のフィードバック制御. 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2014, 6, 25-27, 仙台.

Sakurai H.: Ligand-induced feedback control of unliganded EGFR via MAPK pathways in receptor trafficking and signaling. 2014 Spring Annual Convention of Pharmaceutical Society of Korea, 2014, 4, 17-18, Seoul, Korea.

山田直樹, 周越, 田中智大, 河崎優希, 佐久間勉, 櫻井宏明: 炎症シグナルを介した EphA2 のリン酸化制御. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013, 12, 3-6, 神戸.

田中智大, 周越, 河崎優希, 佐久間勉, 櫻井宏明: リガンドによる EGFR 活性化制御におけるセリン/スレオニンリン酸化の役割. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013, 12, 3-6, 神戸.

Zhou Y., Tanaka T., Kawasaki Y., Sakuma T., Sakurai H.: Molecular mechanism of phosphorylation of EphA2 induced by inflammatory signal. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013, 10, 3-5, 横浜.

周越, 田中智大, 河崎優希, 佐久間勉, 櫻井宏明: TNF- α による Eps15 のリン酸化制御. 第 12 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2013, 2013, 9, 14-15, 東京.

田中智大, 櫻井宏明: セリン/スレオニン残基のリン酸化による EGF 受容体の活性化制御. 第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2013, 6, 12-14, 京都.

櫻井宏明: 炎症シグナルによるチロシンキナーゼ型受容体の活性調節機構. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「シグナル伝達と解析技術のあらたな潮流」, 2013, 3, 4-5, 大阪.

崎村綾香, 佐藤佳奈絵, 申明淑, 済木育夫, 櫻井宏明: ERK を介した Thr-669 リン酸化による EGFR チロシンキナーゼのフィードバック阻害. 第 35 回日本分子生物学会年会. 2012, 12, 11-14, 福岡.

周越, 櫻井宏明: TNF- α による EGFR のエンドサイトーシスの分子機構. 第 35 回日本分子生物学会年会. 2012, 12, 11-14, 福岡.

田中智大, 周越, 申明淑, 河崎優希, 佐久間勉, 済木育夫, 櫻井宏明: リガンド濃度に依存した EGF 受容体の多次元のリン酸化制御, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, 9, 19-21, 札幌.

櫻井宏明, 済木育夫: TAK1 を標的としたがん治療法の確立に向けて, 第 20 回日本がん転移学会学術集会, 2012, 7, 12-13, 広島.

櫻井宏明, 済木育夫: Thr-669 リン酸化による EGFR チロシンキナーゼのフィードバック阻害機構, 第 16 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2012, 6, 27-29, 北九州.

Shin M-S., Sato K., Sakimura A., Koizumi K., Saiki I., Sakurai H.: ERK-mediated Thr-669 phosphorylation of EGFR down-regulates its constitutive tyrosine phosphorylation in human breast cancer cells. 第 34 回日本分子生物学会年会. 2011, 12, 13-16, 横浜.

河西美保, 申明淑, 佐藤佳奈絵, 小泉桂一, 済木育夫, 櫻井宏明: 活性変異型 EGFR を発現するヒト非小細胞肺がん細胞における EGFR セリン・スレオニン残基のリン酸化機構, 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011, 10, 3-5, 名古屋.

河西美保, 小泉桂一, 済木育夫, 櫻井宏明: 活性変異型 EGFR を発現するヒト非小細胞肺がん細胞における EGFR セリン・スレオニン残基のリン酸化機構, 第 15 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2011, 6, 22-24, 東京.

Shin M.S., Nishimura M., Singhirunnusorn P., Suzuki S., Kawanishi M, Koizumi K., Saiki I., Sakurai H.: TAK1-mediated serine/threonine phosphorylation of EGFR via p38/ERK: NF- κ B-independent survival pathways in TNF- α signaling. 13th International TNF Conference, 2011, 5, 15-18, Hyogo, Japan.

〔その他〕

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/cliche2/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 宏明 (SAKURAI HIROAKI)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・
教授
研究者番号：00345571

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

済木 育夫 (SAIKI IKUO)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授