

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860611

研究課題名(和文)肺サーファクタント蛋白質のEGFシグナル制御を介した抗腫瘍作用の解明と臨床応用

研究課題名(英文)The mechanisms of EGF signaling suppression by pulmonary surfactant protein.

研究代表者

長谷川 喜弘 (Hasegawa, Yoshihiro)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90643180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らはSP-DがEGFRの糖鎖に結合し、EGFRのリガンド結合を阻害することで、EGFシグナルを抑制することを報告した。本研究課題では、SP-AもEGFRのリガンド結合を阻害し、EGFシグナルを抑制することを示した。またSP-AはSP-Dとは異なり、糖鎖を介さずにEGFRに結合することを明らかにした。SP-AとSP-Dの抗腫瘍作用の機序を解明することが、肺がんに対する新たな治療戦略につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Our previous study has indicated that SP-D suppresses EGF signaling by interfering with the ligand-binding to EGFR. SP-D directly binds to the N-glycans of EGFR by lectin activity. In this study, we indicated that SP-A also downregulated EGF signaling by inhibiting ligand-binding to EGFR. In addition, we found that SP-A directly bound to EGFR, but not via N-glycans. Elucidating the antitumor effects of SP-A and SP-D may provide important clues for establishing new therapeutic strategies for lung cancer.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺サーファクタント蛋白質 EGFR 肺がん

1. 研究開始当初の背景

肺サーファクタントは肺胞型細胞で合成され、肺胞および気管支の表面を覆うリポ蛋白質で、肺胞虚脱を防ぐとともに、呼吸器の生体防御を担っている。生体防御レクチンである肺サーファクタント蛋白質 (SP-A と SP-D: 肺コレクチン) は自然免疫において中心的な役割を果たしている。一方で、肺コレクチンが抗腫瘍作用を持つことを示唆する臨床報告があるが、その詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。

上皮増殖因子受容体 (EGFR) は様々ながん細胞に過剰発現しており、EGFR チロシンリン酸化阻害薬 (EGFR-TKI) は非小細胞肺癌において実用化されている。しかし効果が EGFR のチロシンキナーゼドメインに遺伝子変異を有する症例に限られることや、奏効例もやがて耐性を獲得するといった問題がある。

研究代表者らの最近の研究で SP-D が EGFR の高マンノース型の N 型糖鎖に結合することで、EGFR のリガンド結合を阻害し、EGF シグナルを抑制し抗腫瘍作用をもたらすことが明らかになった。これまでの予備実験において、SP-A もヒト肺腺がん細胞の EGF シグナルを抑制し、細胞増殖・遊走・浸潤を抑制することを確認しており、SP-A も抗腫瘍活性を有することが示唆される。

2. 研究の目的

本研究課題では、SP-A と SP-D が EGFR の糖鎖を介して下流シグナルを抑制する分子機構の全貌を明らかにした上で、生体内における作用を検討し、治療応用への基盤となる研究を行うことを目的とした。具体的には以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1) 予備実験で得られている SP-A の肺がん細胞に対する EGF シグナル抑制効果、細胞増殖・遊走・浸潤能抑制効果について、再現性

があるかを確認する。

(2) SP-A の EGF シグナル抑制効果は SP-D と同様にリガンド結合阻害によるものなのか、糖鎖を介するものなのか、作用機序を明らかにする。

(3) SP-D の EGF シグナル抑制効果においては糖鎖認識領域が重要であることが明らかにされたが、SP-A についても作用部位を特定する。

(4) SP-A KO マウスに対してマウス肺がん細胞を移植することで、生体内における SP-A の抗腫瘍作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) リコンビナント SP-A、SP-D および EGFR 細胞外ドメインの調整

SP-A と SP-D は CHOK1 細胞を用いたグルタミン合成酵素増幅系で発現させ、培養液中に分泌された SP-A や SP-D をマンノースセファロースカラムで分離精製した。EGFR の細胞外ドメイン (soluble EGFR = sEGFR) は Flp-In システムによって CHOK1 細胞に発現させ、培養上清を回収し、Ni キレート HisTrap カラムクロマトグラフィー、Mono Q カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィー、Superose 6 10/300 GL カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって分離精製した。

(2) SP-A の EGF シグナル抑制作用の検討

肺腺がん細胞株 A549 細胞、H441 細胞を SP-A とブレインキュバートした後に EGF 刺激を行い、細胞ライセートを回収し、ウェスタンブロットングによって、EGFR、Erk、Akt のリン酸化を評価した。細胞増殖能については WST-1 アッセイ、遊走能と浸潤能についてはトランスウェルダブルチャンバーア

ッセイを用いて評価した。

(3) SP-A の EGF シグナル抑制効果の作用機序の解析

A549 細胞を SP-A とプレインキュベートした後に ^{125}I -EGF を添加し、scatchard 解析を行うことで、SP-A が EGF と細胞膜上の EGFR の結合を阻害するかを検討した。

(4) SP-A と EGFR の相互作用の解析

SP-A と sEGFR との直接的な相互作用をリガンドプロットング、酵素免疫測定法(ELISA)、表面プラズモン共鳴センサーを用いて解析した。また結合バッファーへの EDTA やマンノースの添加、N-グリコペプチダーゼ F による sEGFR の糖鎖除去処理が両者の結合に影響を与えるかを検討した。

(5) SP-A 作用点の特定

大量に生成したリコンビナント SP-A をリジルエンドペプチダーゼで消化し、HPLC でペプチド断端を分離した上で、質量分析でペプチドを特定した。精製した SP-A 由来ペプチドを A549 細胞に添加し、EGF シグナルや細胞増殖への影響を検討した。

(6) マウス肺がんモデルにおける SP-A の抗腫瘍作用の検討

マウス肺がん細胞株 LLC 細胞を SP-A KO マウスへ皮下移植し、形成された腫瘍径を野生型マウスと比較した。

4. 研究成果

(1) SP-A の EGF シグナル抑制作用の検討

SP-A は A549 細胞、H441 細胞の EGFR 自己リン酸化と下流シグナルを抑制することが確かめられた。また A549 細胞の増殖、遊走、浸潤を抑制することも確認できた。

(2) SP-A の EGF シグナル抑制効果の作用機

序の解析

^{125}I -EGF を用いた結合アッセイより SP-A は EGF と EGFR の結合飽和度を濃度依存性に抑制することがわかった。SP-A の EGF シグナル抑制作用は SP-D と同様にリガンド結合の阻害というメカニズムであることが示唆された。

(3) SP-A と EGFR の相互作用の解析

リガンドプロットング、ELISA、表面プラズモン共鳴センサーによる解析で、SP-A と sEGFR が直接結合することが明らかになった。両者の結合は EDTA、マンノース、sEGFR の糖鎖除去処理によって抑制されなかった。SP-A と sEGFR の結合は、SP-D とは異なり、SP-A の糖鎖認識領域と EGFR の糖鎖を介したのではないことが示唆された。

(4) SP-A 作用点の特定

SP-A と EGFR の相互作用は糖鎖を介さないと考えられたため、SP-A 由来ペプチドを精製し、作用点の特定を試みた。しかし、いずれの SP-A 由来ペプチドも EGF シグナル抑制作用や肺がん細胞増殖抑制作用を認めなかった。SP-A の EGF シグナル抑制作用には SP-A の立体構造が重要である可能性が示唆された。

(5) マウス肺がんモデルにおける SP-A の抗腫瘍作用の検討

野生型マウスと SP-A KO マウスに形成された皮下腫瘍径は SP-A KO マウスにおいて大きい傾向にあった。検討数が少ないため、今後も継続していく必要がある。また形成した腫瘍の免疫染色により EGFR リン酸化の解析を試みたが、数種類の抗体を用いても、明瞭な染色が困難であった。

(6) 今後の展望

本研究課題により、SP-A が EGFR のリガ

ンド結合を阻害することにより、EGF シグナルを抑制し、肺がん細胞の増殖・遊走・浸潤を抑制することが明らかになった。SP-D は糖鎖認識領域を介して、EGFR の糖鎖に結合するのに対して、SP-A では糖鎖を介さずに EGFR に結合することが分かった。SP-A 由来ペプチドでは EGF シグナル抑制作用を認めないことから、SP-A の立体構造が重要である可能性が示唆された。また SP-A KO マウスを用いた検討では、生体内においても SP-A の抗腫瘍作用が重要である可能性が示唆されている。

今後は SP-A KO マウスによる検討を継続すると共に、リコンビナント SP-A をマウス肺がんモデルへ投与し、抗腫瘍作用をもたらすことができるのかを解析していきたい。EGFR は肺がん治療において最も重要な標的分子であるが、本申請課題で検討した現象は EGFR-TKI に感受性がない細胞（EGFR 遺伝子変異が陰性の細胞）で認められている。そのため、EGFR 遺伝子変異が陰性である肺がん症例の治療に結びつく可能性がある。さらに EGFR-TKI で問題となる副作用についても、SP-A と SP-D は宿主由来のものであるため、副作用の少ない新規薬剤となる可能性がある。

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6件)

- (1) Hasegawa Y, Takahashi M, Ariki S, Asakawa D, Tajiri M, Wada Y, Yamaguchi Y, Nishitani C, Takamiya R, Saito A, Uehara Y, Hashimoto J, Kurimura Y, Takahashi H, Kuroki Y Surfactant protein D suppresses lung cancer progression by downregulation of epidermal growth factor signaling. *Oncogene*, 34: 838-45 (2015) (査読有)

DOI: 10.1038/onc.2014.20. Epub 2014 Mar 10.

- (2) 長谷川喜弘, 高橋素子, 有木茂, 高宮里奈, 上原康昭, 橋本次郎, 和田芳直, 高橋弘毅, 黒木由夫 肺サーファクタント蛋白質のEGFシグナル制御を介した抗腫瘍作用. *分子呼吸器病*, 19: P.107-111 (2015) (査読無)

- (3) Hasegawa Y The mechanisms of epidermal growth factor signaling suppression by pulmonary surfactant protein D. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 26: 159-165 (2014) (査読有)

DOI: 10.4052/tigg.26.159

〔学会発表〕(計9件)

- (1) 長谷川喜弘, 高橋素子, 有木茂, 高宮里奈, 上原康昭, 橋本次郎, 和田芳直, 高橋弘毅, 黒木由夫. SP-A と SP-D による EGF シグナル制御を介した抗腫瘍作用. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会, 2015 年 4 月 16 日 ~ 19 日, 東京国際フォーラム (東京)
- (2) 長谷川喜弘, 高橋素子. 肺サーファクタント蛋白質 A および D による EGFR の機能制御メカニズム. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8 日 ~ 10 日, 名古屋国際会議場 (名古屋)

- (3) Yoshihiro Hasegawa, Motoko Takahashi, Shigeru Ariki, Rina Takamiya, Yasuaki Uehara, Jiro Hashimoto, Hiroki Takahashi and Yoshio Kuroki. Surfactant Proteins A And D Suppress Lung Cancer Progression By Downregulation Of EGF Signaling. American Thoracic Society International Conference (ATS 2014), May 16-21, 2014, San Diego (USA)

(4) 長谷川喜弘, 高橋素子, 有木茂, 高宮里奈, 上原康昭, 橋本次郎, 高橋弘毅, 黒木由夫. 肺サーファクタント蛋白質の EGF シグナル制御を介した抗腫瘍作用. 第 13 回肺サーファクタント分子病態研究会, 2014 年 6 月 21 日, 札幌医科大学記念ホール (札幌)

(5) 長谷川喜弘, 高橋素子, 有木茂, 高宮里奈, 上原康昭, 橋本次郎, 浅川大樹, 田尻道子, 和田芳直, 高橋弘毅, 黒木由夫. 肺サーファクタント蛋白質 A と D による EGF シグナルの抑制作用. 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 15 日 ~ 10 月 18 日, 国立京都国際会館 (京都)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 喜弘

(HASEGAWA YOSHIHIRO)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 90643180

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

高橋 素子 (MOTOKO TAKAHASHI)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 00303941