

## 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 4 月 23 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21790788

研究課題名（和文） 腫瘍壊死因子の誘導する肺障害における上皮成長因子受容体トランス活性化機構の検討

研究課題名（英文） TNF induced lung injury was protected by EGFR transactivation

## 研究代表者

山岡 利光（YAMAOKA TOSHIMITSU）

昭和大学・腫瘍分子生物学研究所・講師

研究者番号：40384359

研究成果の概要（和文）：EGFR は上皮性悪性腫瘍のみではなく正常肺組織でも発現しており、細胞・組織の恒常性維持という役割を担っている。肺癌治療薬として用いられる EGFR 阻害剤の急性肺障害が大きな問題となっているが、EGFR 阻害剤の正常肺組織に及ぼす影響や肺障害における TNF・EGFR シグナルの関与については、これまで明らかにされていない。本研究では、TNF により誘導される ErbB 受容体のトランス活性化シグナルに焦点を当て、EGFR 阻害剤の正常肺組織に及ぼす影響と肺障害を誘導する分子機構の一端を解明した。さらに、特発性間質性肺炎、肺線維症といった難治性慢性炎症性肺疾患の治療指針に重要な示唆を与えるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：EGFR tyrosine kinase activity protects TNF-induced lung epithelial cells apoptosis and this might be the mechanism of EGFR tyrosine kinase inhibitor (TKI)-induced lung injury. In this study, to the purpose of clarifying the mechanisms, we employed the SPC/TNF-transgenic mice, which over-expressed TNF in alveolar type 2 cells under the control of the human surfactant protein C promoter, resulted in interstitial pneumonia and pulmonary fibrosis chronically. EGFR-TKI, Gefitinib was orally administrated for this mice, then we observed worsened the lung injury. This novel observation has significant implications for understanding the role of EGFR in maintaining human lung epithelial cell homeostasis in an environment of inflammation, injury/repair, such as inflammation-associated carcinogenesis and cancer promotion.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌、肺障害、上皮成長因子受容体、腫瘍壊死因子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 特発性間質性肺炎、肺線維症といった

非特異的慢性炎症性肺疾患は罹患率が高く、その急性増悪は致命率が高い。しかしながら、

この疾患の成因、増悪の機序は今だ解明されておらず、確たる治療法も存在しない。炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF) は、これらの疾患の成因や増悪に中心的な役割を果たしていると推測されている。また、上皮成長因子受容体 (EGFR) を含む ErbB 受容体は TNF によりトランス活性化を受け、細胞をアポトーシスから回避し細胞障害を抑制する事が報告されている。しかし、この分子機構は不明な部分が多い。

(2) EGFR は上皮性悪性腫瘍のみではなく正常肺組織でも発現しており、細胞・組織の恒常性維持という役割を担っている。肺癌治療薬として用いられる EGFR 阻害剤 Gefitinib の急性肺障害が大きな問題となっているが、Gefitinib の正常肺組織に及ぼす影響や肺障害における TNF-EGFR シグナルの関与については、これまで明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

(1) TNF による ErbB 受容体トランス活性化の分子機構を明らかにする。

(2) TNF を肺組織特異的に高発現させたトランスジェニックマウスが肺障害に移行する過程において、TNF による ErbB 受容体トランス活性化シグナルの果たす役割について検討する。

## 3. 研究の方法

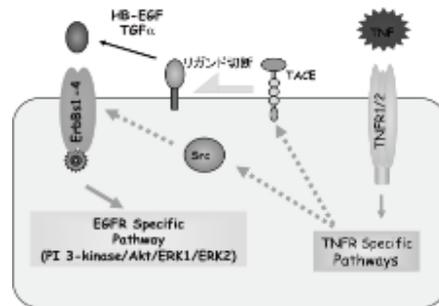
(1) 腫瘍壊死因子 (TNF) が ErbB 受容体をトランス活性化する分子機構について、各種 ErbB 受容体・TNF 受容体の発現プラスミドおよび siRNA の導入細胞を用いて解析を行う。

(2) TNF を肺組織で特異的に発現し、肺組織の慢性炎症・線維化を自然発生するトランスジェニックマウスモデルを用い、マウスの発生からの ErbB 受容体トランス活性化シグナルの変化を経時的に観察することにより、炎症性肺疾患におけるトランス活性化シグナルの関与について解析する。また、同マウスの EGFR 阻害剤による肺組織の炎症の変化を解析する。

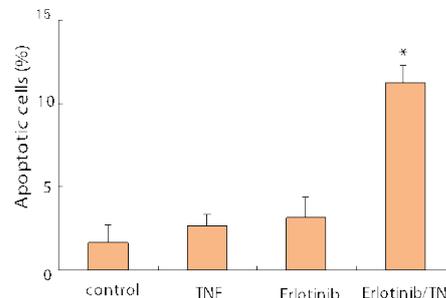
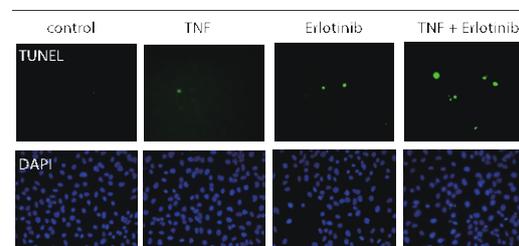
## 4. 研究成果

(1) 上皮成長因子受容体 (EGFR) は、腫瘍壊死因子 (TNF) によりトランス活性化を受ける。EGFR と TNF の下流シグナルは、オーバーラップすることから、「TNF が制御する細胞生存に EGFR のトランス活性化が関与する」との仮説から検討を行った。気道上皮細胞 BEAS-2B と肺腺癌細胞 NCI-H292 では、TNF による EGFR のトランス活性化は、TNF の濃度依存的であり、さらに TNF 接触後 15 分を最高に 4 時間後以上も持続した。また、EGFR 阻害剤によりこのトランス活性化は抑制された。TNF と EGFR 阻害剤の同時接触で有意なアポトーシスの誘導が確認された。さらに、このトランス活性化は、TACE 阻害剤で抑制された。この機序に関与する EGFR のリガンドの発現を

ELISA 法で確認したところ、BEAS-2B 細胞では HB-EGF、NCI-H292 細胞では Amphiregulin の有意な発現の誘導が確認され siRNA TACE の遺伝子導入で、これらの因子の発現が有意に抑制された。以上より、「TNF は、TACE により HB-EGF や Amphiregulin を介して EGFR を活性化し TNF が誘導するアポトーシスを制御している」と推察された。



BEAS-2B cells



(2) 肺組織で TNF を過剰に発現する SPC/TNF トランスジェニックマウスモデルを用いて、EGFR-TKI が肺組織をアポトーシスに誘導する機序を検討した。SPC/TNF マウスに EGFR-TKI であるゲフィチニブを 100mg/kg あるいは 200mg/kg で 14 日間経口投与し、その後、肺組織を摘出した。SPC/TNF トランスジェニックマウスの肺組織は、ゲフィチニブ投与により非投与群に比較して有意にアポトーシスが誘導された。同時に炎症細胞の著しい浸潤による間質の肥厚が H-E 染色で確認された (Fig. 1)。また、ゲフィチニブの投与により EGFR のリン酸化が阻害され、下流シグナル伝達因子である AKT, MAPK の抑制が確認された (Fig. 2)。さらに、アポトーシス誘導因子である P38MAPK のリン酸化が MKK3/6 を介して誘導され、ASK1/p38MAPK を介したアポトーシス誘導機構の存在が示唆された。本研

究は EGFR の炎症、組織傷害や修復における役割の解明に寄与すると期待される。

Fig.1 SPC/TNF トランスジェニックマウスの肺組織の H-E 染色

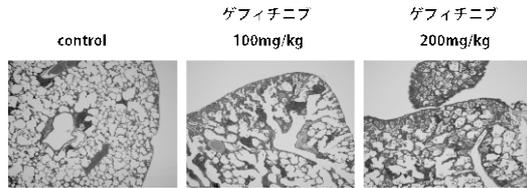
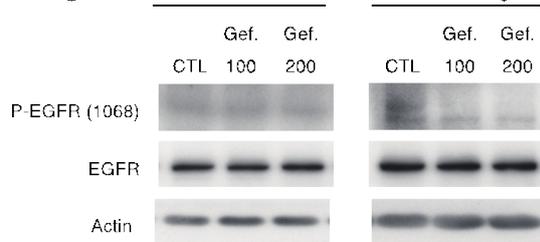


Fig.2



## 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 2 件)

- ① 山岡利光, 大森亨. EGFR 阻害剤の耐性と克服 (The mechanisms of resistance to EGFR-TKIs and challenges to overcome resistance in EGFR mutant Non-small cell lung cancer) 癌と化学療法、査読有、2012、39 巻 6 号 857-862
- ② Yamaoka T, Frey MR, Dise RS, Bernard JK, Polk DB. Specific epidermal growth factor receptor autophosphorylation sites promote mouse colon epithelial cell chemotaxis and restitution. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 査読有、2011. 301(2):G368-76.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Toshimitsu Yamaoka, Mark Frey, D. Brent Polk, Yasunari Oki, Yasunori Murata, Tomohide Sugiyama, Sojiro Kusumoto, Hiroo Ishida, Takao Shirai, Masanao Nakashima, Kentaro Okuda, Tsukasa Ohnishi, Takashi Hirose, Tohru Ohmori and Mitsuru Adachi. Specific epidermal growth factor receptor autophosphorylation sites promote epithelial cell chemotaxis and restitution. 103rd Annual Meeting of American Association for Cancer Research (2012, 04, Chicago)
- ② 山岡 利光, 村田 泰規, 大木 康成, 楠本 壮二郎, 杉山 智英, 白井 崇生,

中 嶋 賢 尚, 奥 田 健 太 郎, 大 西 司, 大 森 亨, 廣 瀬 敬, 足 立 満. 気 道 上 皮 細 胞 と 非 小 細 胞 肺 癌 細 胞 に お け る TACE を 介 し た TNF に よ る EGFR の ト ラ ンス 活 性 化 機 序 の 検 討. 日 本 呼 吸 器 学 会 学 術 講 演 会 (2012. 03、神 戸)

- ③ 山岡利光, 大木康成, 楠本壮二郎, 杉山智英, 白井崇生, 中嶋賢尚, 奥田健太郎, 廣瀬敬, 大森亨, 大西司, 足立満 気道上皮細胞と非小細胞肺癌細胞における TACE/EGFR-リガンドを介した TNF による EGFR のトランス活性化の機序 検 討 (TNF transactivates phospho-tyrosine 1068 of EGFR through TACE/EGFR-ligand dependent mechanism) 第 7 0 回 日 本 癌 学 会 総 会 (2011. 09、大阪)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
<http://www10.showa-u.ac.jp/~molonco/index/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 利光 (YAMAOKA TOSHIMITSU)

昭和大学・腫瘍分子生物学研究所・講師

研究者番号：40384359

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：