

平成21年6月1日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19590063
 研究課題名 (和文) TNF- α シグナルと EGF シグナルの交差干渉における TAK1 キナーゼの役割
 研究課題名 (英文) ROLE OF TAK1 IN CROSS INTERFERENCE BETWEEN TNF- α AND EGF SIGNALING PATHWAYS
 研究代表者
 櫻井 宏明 (SAKURAI HIROAKI)
 富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授
 研究者番号：00345571

研究成果の概要：増殖因子 EGF 受容体ファミリーは、肺がん、乳がんをはじめ多くのがん細胞で過剰発現や変異等が報告されており、がん悪性化に密接に関与している。一方、サイトカイン TNF- α はストレス応答シグナルを活性化し、がん細胞の生存や転移などに密接に関与している。本研究では、TNF- α シグナルと EGF シグナルが TAK1 キナーゼを介して相互に影響しあい、それぞれのシグナルに対して抑制的に作用することを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：EGF、TNF- α 、TAK1、リン酸化、がん

1. 研究開始当初の背景

(1) シグナル伝達研究の進展により、がん治療において特定の分子を標的とした治療法の開発が加速しており、チロシンキナーゼ型の増殖因子受容体が注目されている。特に、ErbB (EGFR) 受容体ファミリーは、肺がん、乳がんをはじめ多くのがん細胞で過剰発現や変異等が報告されており、がん悪性化に密接に関与している。実際、EGFR や ErbB2 を標的とした治療法 (チロシンキナーゼ阻害剤や中和抗体) が確立され、がん分子標的治療のさきがけとして臨床利用に至っている。しかし、一部のがんで高い有効性を示しているに

も関わらず、その治療成績は未だ不十分である。したがって、より治療効果を高めるためにその活性化制御機構の基礎解析を行うとともに、それを基盤とした新たな治療戦略の構築が求められている。

(2) 分子生物学的な解析により発がん過程やがん悪性化における炎症反応の重要性が分子レベルで解明されつつある。炎症反応の中心である TNF- α シグナル伝達系は、NF- κ B や JNK/p38 MAPK などのストレス応答シグナルを活性化し、がん細胞のアポトーシス制御や転移などに密接に関与していることが明らかにされてきた。炎症反応の制御は、新た

ながん分子標的治療法の確立に向けて期待される領域である。

(3) 成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) の発がん遺伝子産物 Tax は、細胞内の様々な分子と相互作用し、多岐にわたるシグナル伝達経路の異常を引き起こす。特に、上述のストレスシグナル伝達系を活性化し、感染 T 細胞のがん化を誘導する。その結果生じる成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATLL) は、現在も予後不良の悪性疾患であり、その治療戦略の構築が期待されている。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者らは、TNF- α シグナル伝達系の基礎解析を行い、特に MAP3K の一つである TAK1 の果たす役割について、次に示す基礎研究を進めてきた。①TNF- α による NF- κ B 活性化における TAK1 の関与、②TNF- α による TAK1 活性化における Thr-187 リン酸化の重要性、③TAK1 により活性化された IKK による NF- κ B p65 のリン酸化、④T および B リンパ球における TAK1 の役割。さらに、がん細胞内の炎症シグナルの制御によるがん悪性化機構の解析、およびそれらを応用した新しい分子標的治療法の確立に向けての検討を行っている。これまでに、TNF- α のがん転移促進効果における TAK1 の重要性、TAK1 を標的とした TRAIL 誘発アポトーシスの増強効果について報告した。

(2) ErbB 受容体シグナルのがん転移機構における役割についても検討を進め、肝細胞がんの肝内転移を EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 gefitinib が阻害すること、およびその機構として TNF- α による EGFR のトランス活性化が関与していることを報告している。また、TNF- α により EGFR が一時的に抑制されることを見出し、それには TAK1-p38 経路が関与していることを明らかにしている。

(3) 以上のように、研究代表者は TNF- α を中心に炎症シグナルの基礎解析を進め、それを基盤としてがん悪性化機構の解析や分子標的治療への応用へ向けて研究を進展させようとしている。その中心課題として、TNF- α シグナルと ErbB 受容体シグナルの交差干渉の解析を位置付けている。本研究においては、増殖因子受容体シグナルと炎症性サイトカインシグナルの協調的、あるいは相反的な作用を分子レベルで解析する。特に、TAK1 の活性化の果たす役割に焦点をあてる。また、がん悪性化モデル実験系においてその検証を行うことを目指す。

(4) Tax が発現している HTLV-1 感染細胞では、NF- κ B や MAPK が恒常的に活性化している。しかしながら、その活性化の制御機構については不明な点が多い。そこで、本研究では、サイトカインシグナルでは NF- κ B や MAPK の活

性化に関与している TAK1 の果たす役割に注目し、HTLV-1 による ATLL 発症に関与する基礎的な解析を進め、新たな治療標的の探索を目指す。

3. 研究の方法

(1) TNF- α シグナルと EGF シグナルの交差干渉に関する研究は、HeLa 細胞を用いて行なった。細胞を TNF- α または EGF で刺激し、細胞内のシグナル伝達経路の活性化を、リン酸化抗体を用いたウェスタンブロット法で検討した。また、EGFR の細胞内局在については、抗 EGFR 抗体を用いたフローサイトメーター解析、あるいは GFP 融合 EGFR を発現した細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(2) ErbB 受容体とがん転移に関して研究を進めるため、マウスメラノーマ細胞株 B16-BL6 細胞を用いて検討した。この細胞は、ErbB3 を過剰発現しており、そのリガンドである Heregulin (HRG) 刺激による転移能の誘導に焦点をあてた。また、HRG 刺激によって ErbB3 と EGFR が二量体形成している可能性を、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 PD153035 を用いて検討した。

(3) ATLL の解析は、HTLV-1 が感染している T 細胞株を用いて行なった。主に、Tax を発現していない ED40515 (-) および MT-1 細胞、Tax 発現細胞である HuT-102 および MT-2 を用いた。HTLV-1 に感染していない T 細胞株として Jurkat 細胞を用いた。細胞内のシグナル伝達分子の活性化については、(1)と同様にウェスタンブロット法で解析した。

4. 研究成果

(1) TNF- α の EGF シグナルへ及ぼす効果。我々はこれまでに、TNF- α シグナル伝達系において、TAK1 が MAPK および NF- κ B 活性化を引き起こすことを明らかにしてきた。最近 TNF- α 刺激によって EGFR がトランス活性化することが報告されていたため、この可能性を HeLa 細胞にて検証することにした。

①細胞を TNF- α 刺激すると、EGFR がリン酸化されていることを見出した。興味深いことに、このリン酸化は、EGFR チロシンキナーゼ活性に依存せず、膜結合型 EGFR リガンドの切断による EGFR のトランス活性化とは全く異なった機構であることが明らかになった。逆に、TNF- α による EGFR のリン酸化は EGF による EGFR のリン酸化に抑制的に作用した。

②EGFR のリン酸化部位の同定を進めるため、既存のチロシン残基のリン酸化を調べた結果、本来のリガンドである EGF では強くリン酸化が誘導されたのに対して、TNF- α 刺激では全くチロシンリン酸化は認められなかった。このことは、①に示した EGFR リン酸化

が EGFR チロシンキナーゼに依存しないことと一致した。したがって、TNF- α によるリン酸化部位は、セリンまたはスレオニン残基ではないかと考えられた。そこで、過剰発現系を用いて検討した結果、Thr-669 と Ser-1046/7 がリン酸化部位である可能性が示唆された。そこで、これら残基のリン酸化抗体を用いて検討した結果、TNF- α によるリン酸化部位が、これら両残基であることが確認された。リン酸化は、刺激後 10 分で明確に認められ、その後 60 分後には脱リン酸化された。また、このリン酸化は、肺がん細胞株 A549 や前立腺がん細胞株 DU-145 でも確認された。興味深いことに、EGF 刺激でも Thr-669 はリン酸化されたが、Ser-1046/7 のリン酸化はほとんど認められなかった。

③Thr-669 と Ser-1046/7 のリン酸化にいたるシグナル伝達系の解析を行った結果、両残基とも TAK1 を介してリン酸化されていた。TAK1 の下流で、ERK を介して Thr-669 が、p38 を介して Ser-1046/7 がリン酸化されていた。

④リン酸化の生理機能を解析するため、刺激後の細胞内局在を検討した。その結果、TNF- α 刺激後速やかに細胞内にエンドサイトーシスすることを見出した。①に記載した TNF- α による EGF シグナルの抑制機構は、EGFR のエンドサイトーシスによると推定された。エンドサイトーシスには、p38 を介した Ser-1046/7 のリン酸化が関与していたが、Thr-669 のリン酸化は関与しなかった。さらに、Ser-1046/7 の脱リン酸化後、再び細胞膜にリサイクルされた。この一時的な細胞内局在の役割について検討した結果、TNF- α によって誘導されるアポトーシスに対する抑制シグナルとなっていることが判明した。EGFR 経路は、TAK1 の下流で抗アポトーシス経路として有名な NF- κ B 経路とは全く独立したシグナル伝達系であることも確認した。したがって、TAK1 の下流には EGFR 経路と NF- κ B 経路の二つの抗アポトーシス経路が存在することが明らかになった。

(2) EGF の TNF- α シグナルへ及ぼす効果。

TNF- α 刺激と同様に、EGF によっても JNK/p38 が活性化される。EGF によって TAK1 は活性化されず、MAPK 活性化にも TAK1 は関与していなかった。ところが、EGF は TAK1 と結合している活性化因子 TAB1 および TAB2 のリン酸化を誘導した。TAB1 のリン酸化は p38 を介していること、TAB2 のリン酸化は p38 を介していないことを見出した。TAB1 のリン酸化部位として Ser-423 および Thr-431 であることを明らかにした。これらリン酸化部位は、TNF- α シグナル伝達系における p38 による TAK1 活性のフィードバック阻害に関わっていることが知られていた。そこで、あらかじめ EGF でこれら TAB1 リン酸化を誘導しておく、その後の TNF- α による TAK1 活性化が阻害さ

れることを見出した。また、TAK1 下流の NF- κ B 活性化も EGF の前処理によって抑制された。

(1) の結果と合わせて、TNF- α シグナルと EGF シグナルはお互い阻害し合うという現象 (交差干渉) があることを見出した (図 1)。このように、細胞外に存在するリガンドは、それぞれの受容体を介して細胞内にシグナルを伝えるが、腫瘍内などの微小環境では、細胞は複数のリガンドに常に暴露されていると予想される。したがって、複数リガンドによる細胞の刺激、あるいはそれらの時間差刺激が細胞に与える効果を調べる必要性があると考えられる。今後、TNF- α シグナルと EGF シグナルの交差干渉をモデル系として、複数リガンド刺激のシグナル伝達機構の解析を進めていく予定である。

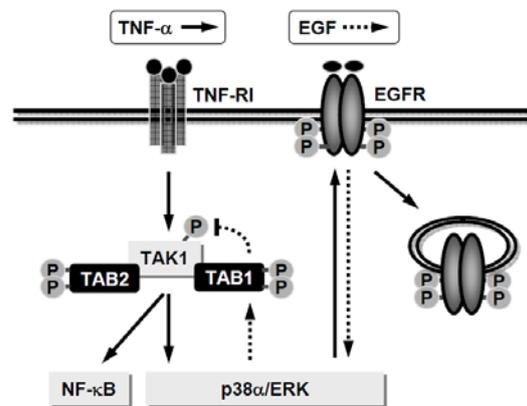


図 1. TNF- α シグナルと EGF シグナルの交差干渉

(3) ErbB3/EGFR による転移能の誘導。

B16-BL6 細胞を HRG 刺激すると、in vitro 細胞浸潤能が促進した。この効果は、EGFR チロシンキナーゼ活性に依存していた。同様に、HRG 刺激した細胞を静脈内に移植する肺転移モデルにおいて、EGFR チロシンキナーゼ依存的に転移能が促進した。転移能の亢進は、細胞を皮下に同所性に移植する自然肺転移モデルにおいても同様の結果が得られた。したがって、ErbB3/EGFR ヘテロダイマー形成が、メラノーマの肺転移の亢進に関与していることを見出した。

(4) HTLV-1 Tax による恒常的 TAK1 活性化

HTLV-1 感染細胞の TAK1 活性化について、我々が独自に作製した Thr-187 に対するリン酸化抗体を用いて検討した結果、Tax 発現細胞においてのみ TAK1 が強く活性化されていることが明らかになった。これには、Tax によって TAK1 活性化因子の一つである TAB2 の発現誘導が関与していた。この恒常的 TAK1 活性化の下流シグナルに対する効果を検討した結果、予想に反して NF- κ B 活性化には関与していなかった。一方、JNK および p38 の恒常

的活性化に重要であることが明らかになった。さらに、JNKの下流で転写因子 ATF-2 の活性化が起こっていることを見出した。以上のように、Tax 依存的に恒常的 TAK1 活性化が起こっていることを見出した。今後は、他のシグナル伝達系に果たす TAK1 の果たす役割を解析する予定にしている。

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 7 件)

- ① Shin M.S., Singhirunnusorn P., Sugishima Y., Nishimura M., Suzuki S., Koizumi K., Saiki I., and Sakurai H.: Cross interference with TNF- α -induced TAK1 activation via EGFR-mediated p38 phosphorylation of TAK1-binding protein 1. *Biochim. Biophys. Acta* in press.
- ② Isono T., Kim C.J., Ando Y., Sakurai H., Okada Y., Inoue H.: Suppression of cell invasiveness by periostin via TAB1/TAK1. *Int. J. Oncol.* in press.
- ③ Minoda Y., Sakurai H., Kobayashi T., Yoshimura A., and Takaesu G.: An F-box protein FBXW5 negatively regulates TAK1 MAPKKK in the IL-1 β signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381: 412-417, 2009.
- ④ Kamiyama H., Usui T., Sakurai H., Shoji M., Hayashi Y., Takeya H., and Osada H.: Epoxyquinol B, a naturally occurring pentaketide dimer, inhibits NF- κ B signaling by crosslinking TAK1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 1894-1900, 2008.
- ⑤ Ueno Y., Sakurai H., Tsunoda S., Matsuo M., Choo M.K., Koizumi K., and Saiki I.: Heregulin-induced activation of ErbB3 by EGFR tyrosine kinase activity promotes tumor growth and metastasis in melanoma cells. *Int. J. Cancer* 123: 340-347, 2008.
- ⑥ Suzuki S., Singhirunnusorn P., Mori A., Yamaoka S., Kitajima I., Saiki I., and Sakurai H.: Constitutive activation of TAK1 by HTLV-1 Tax-dependent overexpression of TAB2 induces activation of JNK-ATF2, but not IKK-NF- κ B. *J. Biol. Chem.* 282: 25177-25181, 2007.
- ⑦ Singhirunnusorn P., Ueno Y., Matsuo M., Suzuki S., Saiki I., and Sakurai H.: Transient suppression of ligand-

mediated activation of epidermal growth factor receptor by TNF- α through the TAK1-p38 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 282: 12698-12706, 2007.

[学会発表] (計 20 件)

- ① 鈴木俊輔, 周越, 高崎一朗, Pattama Singhirunnusorn, 田淵圭章, 山岡昇司, 小泉桂一, 済木育夫, 櫻井宏明: Tax陽性 HTLV-1 感染細胞における恒常的 TAK1 活性化の生理機能解析, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会・合同大会 (BMB2008), 2008, 12, 9-12, 神戸.
- ② 櫻井宏明: TAK1 ストレス応答シグナルによるがん悪性化の分子機構, 第 11 回癌と骨病変研究会, 2008. 11. 28, 東京.
- ③ Sakurai H.: Physiological functions of constitutive TAK1 activation in Tax-positive HTLV-I-infected cells. JCA-AACR Joint Symposium "NF- κ B is a Novel Molecular Target of Cancer/Leukemia" 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008, 10, 28-30, 名古屋.
- ④ Isono T., Kim C.-J., Sakurai H., Okada Y., Inoue H.: Periostin associates with TAB1 to activate TAK1 and suppresses cell invasiveness. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008, 10, 28-30, 名古屋.
- ⑤ Yamazaki K., Gohda J., Kanayama A., Sakurai H., Inoue J.: Site-specific Lys-63-linked polyubiquitination of TAK1 plays a critical role in inducing the TRAF6-MEKK3-TAK1 complex formation to activate TAK1. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008, 10, 28-30, 名古屋.
- ⑥ Nishimura M., Shin M-S., Singhirunnusorn P., Sugishima Y., Suzuki S., Koizumi K., Saiki I., Sakurai H.: Cross interference with TNF- α -Induced TAK1 activation via EGFR-mediated p38 phosphorylation of TAK1-binding protein 1. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008, 10, 28-30, 名古屋.
- ⑦ 櫻井宏明, 小泉桂一, 済木育夫: HTLV-1 Tax による恒常的 TAK1 活性化と細胞内シグナル伝達における役割, 第 12 回がん分子標的治療研究会総会, 2008, 6, 26-27, 東京.
- ⑧ 申明淑, Pattama Singhirunnusorn, 杉嶋祐巳子, 西村美紀, 鈴木俊輔, 小泉桂一, 済木育夫, 櫻井宏明: p38 α を介する EGF シグナルと TNF- α シグナルの交差干渉とその分子機構, 第 26 回日本生化学会北陸支部会, 2008, 5, 30, 金沢.
- ⑨ 鈴木俊輔, Pattama Singhirunnusorn, 森昭憲, 山岡昇司, 北島勲, 済木育夫, 櫻井宏明: HTLV-1 Tax による恒常的 TAK1 活性化とその細胞内シグナル機構における役割,

第 30 回日本分子生物学年会・第 80 回日本生化学会大会・合同大会, 2007, 12, 11-15, 横浜.

- ⑩申 明淑, Singhirunnusorn Pattama, 杉島 祐巳子, 鈴木俊輔, 済木育夫, 櫻井宏明: p38 α を介するEGFシグナルとTNF- α シグナルの交差干渉とその分子機構, 第 30 回日本分子生物学年会・第 80 回日本生化学会大会・合同大会, 2007, 12, 11-15, 横浜.
- ⑪Isono T., Kim C-J., Sakurai H., Okada Y. and Inoue H.: Periostin activates TAK1 and suppresses cell invasiveness. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007, 10, 3-5, 横浜.
- ⑫Kamiyama H., Kakeya H., Usui T., Sakurai H., Shoji M., Hayashi Y. and Osada H.: Epoxyquinol B inhibits activation of transcription factor NF- κ B signaling through the inhibition of TAK1 activity. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007, 10, 3-5, 横浜.
- ⑬Suzuki S., Singhirunnusorn P., Mori A., Yamaoka S., Kitajima I., Saiki I. and Sakurai H.: Constitutive activation of TAK1 by HTLV-1 Tax-dependent overexpression of TAB2 induces activation of JNK-ATF2. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007, 10, 3-5, 横浜.
- ⑭Singhirunnusorn P., Ueno Y., Matsuo M., Suzuki S., Saiki I. and Sakurai H.: Transient suppression of ligand-mediated activation of EGFR by TNF- α through the TAK1-p38 signaling pathway. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007, 10, 3-5, 横浜.
- ⑮Ueno Y., Sakurai H., Tsunoda S., Choo M-K., Matsuo M., Koizumi K. and Saiki I.: Heregulin-induced activation of ErbB3 and EGFR promotes tumor growth and metastasis in B16-BL6 melanoma cells. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007, 10, 3-5, 横浜.
- ⑯Sakurai H.: Role of TAK1 in cytokine signaling and cancer progression. International Symposium on NanoBio-Sciences, 2007, 8, 20, Seoul.
- ⑰Min-Kyung Choo, 櫻井宏明, 小泉桂一, 済木育夫: HUVECの管腔形成におけるTAK1 ストレス応答シグナルの役割, 第 16 回がん転移学会学術総会, 2007, 7, 9-10, 富山.
- ⑱上野陽子, 櫻井宏明, Min-Kyung Choo, 小泉桂一, 済木育夫: B16-BL6 メラノーマ細胞におけるEGFR/ErbB3 活性化を介した転移能の亢進, 第 16 回がん転移学会学術総会, 2007, 7, 9-10, 富山.
- ⑲櫻井宏明, 済木育夫: TNF- α によるリガン

ド依存性EGFR活性化の抑制とその分子機構, 第 11 回がん分子標的治療研究会総会, 2007, 7, 5-6, 大阪.

- ⑳櫻井宏明: TAK1 シグナルによるがん悪性化の分子機構, 支部奨励賞受賞講演, 第 25 回日本生化学会北陸支部会, 2007, 5, 26, 金沢.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 宏明 (SAKURAI HIROAKI)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授
研究者番号: 00345571

(2) 研究分担者

済木 育夫 (SAIKI IKUO)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授
研究者番号: 80133776

(3) 連携研究者

該当なし