

平成 22 年 4 月 7 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 年-2009 年

課題番号：20790490

研究課題名 (和文) 脂質ラフトを標的とした EGCG による大腸癌予防の研究

研究課題名 (英文)

Targeting of the preventive effect of EGCG ((-)-epigallocatechin-3-gallate) on lipid rafts in colon cancer cells

研究代表者 足立 政治 (SEIJI ADACHI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50467205

研究成果の概要 (和文)：緑茶カテキンの主要成分である EGCG <(-)-epigallocatechin-3-gallate> は、様々な癌 (大腸癌、乳癌、前立腺癌等) の発症を予防することが知られているが、その作用機序の詳細は十分に解明されていない。われわれは今までに EGCG 投与により細胞膜 lipid rafts の形成が阻害され、EGFR は細胞膜上の活性化の場を失うこと (Adachi S et al., *Cancer Res* 2007) を報告してきた。さらに、EGCG により EGFR は細胞膜から細胞質内に内在化し、脱感作されること (Adachi S et al., *Carcinogenesis* 2008)、この EGCG による EGFR の内在化は p38 MAP キナーゼを介した EGFR のセリン残基 (Ser1046/1047) が引き金になっていることを見出した (Adachi S et al., *Carcinogenesis* 2009)。これらの研究成果は EGCG の大腸癌細胞増殖抑制効果の作用メカニズムを明らかにするものであり、EGCG の臨床応用を図る上で極めて重要な知見であると考えている。

研究成果の概要 (英文)：We previously reported that (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) in green tea alters plasma membrane organization and causes internalization of epidermal growth factor receptor (EGFR), resulting in the suppression of colon cancer cell growth. In the present study, we investigated the detailed mechanism underlying EGCG-induced downregulation of EGFR in SW480 colon cancer cells. Prolonged exposure to EGCG caused EGFR degradation, concurrently inducing phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). The inhibition of p38 MAPK by SB203580, a specific p38 MAPK inhibitor, or p38 MAPK-siRNA suppressed the internalization and subsequent degradation of EGFR induced by EGCG. Moreover, EGCG caused phosphorylation of EGFR at Ser1046/1047, a site which is critical for its downregulation and this was also suppressed by SB203580 or siRNA of p38 MAPK. Taken together, our results strongly suggest that phosphorylation of EGFR at serine 1046/1047 via activation of p38 MAPK plays a pivotal role in EGCG-induced downregulation of EGFR in colon cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード： EGCG、EGFR、p38 MAP キナーゼ、脂質ラフト、内在化

1. 研究開始当初の背景

緑茶カテキンである EGCG ((-)-epigallocatechin-3-gallate)は、様々な癌の発生を予防することが知られているが、近年、大腸癌を含めた各種癌において受容体型チロシンキナーゼ (RTK) である epidermal growth factor receptor (EGFR) の発現異常が多く報告されており、さらに EGCG がこれらの受容体の異常活性を抑制することも多数報告されている。しかしその詳細な作用機序について諸説が報告されているものの、いずれも全てを説明できるものではなかった。そこで我々は、報告されている EGCG の機能が多彩であることから、EGCG の標的は単一の蛋白ではなく、より広域に影響するものであると推測し、膜マイクロドメインの一種である脂質ラフト(lipid raft)に着目し、EGCG のラフト構造への影響について調べた。その結果、ヒト大腸癌細胞 HT29, SW480 に EGCG を前投与することによりこのラフト構造は著しく変化(ラフト面積の著明な減少)を起こし、

EGFR が本来の活性化の場を失いリン酸化が抑制されることを世界で初めて報告した (Adachi S et al., *Cancer Res* 2007)。我々は EGCG がこのラフト構造を変化させることでさまざまな膜 RTK の活性化を抑制するのではないかと推測しているが、さらなる詳細な検討を行う必要があった。

2. 研究の目的

以下を検討することでEGCGによる大腸癌発癌予防のメカニズムを解明することとした。

1. EGCG による EGFR 以外の受容体型チロシンキナーゼの脂質ラフトと局在の変化の関係を検討。
2. EGCG による EGFR の internalization のメカニズムの分子生物学的検討を行う。

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

- 1) p38 MAPK により EGFR のセリン残基 (Ser1046/1047) はリン酸化されることを世界で初めて報告した。(Adachi S et al., *Cancer Lett* 2009)
- 2) EGCG による EGFR の内在化は p38 MAP キナーゼを介した EGFR のあるセリン残基 (Ser1046/1047) が引き金になっていることを見出した (Adachi S et al., *Carcinogenesis* 2009)。
- 3) Heat shock protein 阻害剤でも p38 MAP キナーゼを介した EGFR のセリン残基 (Ser1046/1047) のリン酸化が起き、これに続く EGFR の downregulation が誘導された (Adachi S et al., *Oncol Rep* 2010)。

以上の結果から、p38 MAP キナーゼを介した EGFR の 1046/1047 番目のセリン残基のリン酸化が EGFR の脱感作に重要であること、またこの部位のリン酸化を誘導するいくつかの薬物を見い出した。またこのリン酸化が新たな分子標的となる可能性が示唆された。

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 30 件)

1. Adachi S , Yasuda I, Nakashima M, Yamauchi T, Yamauchi J, Natsume H, Moriwaki H, Kozawa O. HSP90 inhibitors induce down-regulation of EGF receptor via p38 MAPK-mediated phosphorylation at

Ser1046/1047 in human pancreatic cancer cells. *Oncol Rep* 査読あり 2010;23:1709-14.

2. 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* 査読あり 2010;36:585-92.
3. Natsume H, Tokuda H, Adachi S, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Minamitani C, Niida S, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T. Rho-kinase limits FGF-2-stimulated VEGF release in osteoblasts. *Bone* 査読あり 2010;46:1068-1074.
4. Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Hanai Y, Takai S, Harada A, Kozawa O. Inhibition by minodronate of basic fibroblast growth factor-stimulated vascular endothelial growth factor synthesis in osteoblast-like cells. *Mol Med Rep* 査読あり 2010;3:167-171.
5. Minamitani C, Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Yamauchi J, Kato K, Natsume H, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T. p70 S6 kinase limits tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 synthesis in osteoblast-like cells. *Mol Cell Endocrinol* 査読あり 2010;315:195-200.
6. Enomoto Y, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Doi T, Niwa M, Akamatsu S, Tokuda H, Yoshimura S, Ogura S, Iwama T, Kozawa O. The involvement of thromboxane A2 in the elevation of soluble CD40 ligand levels in

- atherosclerotic patients *Atherosclerosis* 査読あり 2010;209:414-421.
7. Yasuda Y, Shimizu M, Sakai H, Iwasa J, Kubota M, Adachi S, Osawa Y, Tsurumi H, Hara Y, Moriwaki H. (-)-Epigallocatechin gallate prevents carbon tetrachloride-induced rat hepatic fibrosis by inhibiting the expression of the PDGFRbeta and IGF-1R. *Chem Biol Interact* 査読あり 2010;182:159-164.
 8. Tokuda H, Harada A, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Natsume H, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T, Kozawa O. Roxifene enhances spontaneous microaggregation of platelets through up-regulation of p44/p42 MAP kinase: a case report. *Osteoporosis Int* 査読あり 2010;21:189-93.
 9. Doi T, Adachi S, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato H, Enomoto Y, Minamitani C, Otsuka T, Tokuda H, Akamatsu S, Iwama T, Kozawa O, Ogura S. Antithrombin III suppresses ADP-induced platelet granule secretion: Inhibition of HSP27 phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* 査読あり 2009;489:62-7.
 10. Adachi S, Shimizu M, Shirakami Y, Yamauchi J, Natsume H, Matsushima-Nishiwaki R, To S, Weinstein IB, Moriwaki H and Kozawa O (-)-Epigallocatechin gallate downregulates EGF receptor via its phosphorylation at Ser1046/1047 mediated by p38 MAP kinase in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 査読あり 2009;30:1544-52.
 11. Enomoto Y, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Niwa M, Tokuda H, Akamatsu S, Doi T, Kato H, Yoshimura S, Ogura S, Iwama T, Kozawa O. α B-crystallin suppresses ADP-induced granule secretion from human platelets. *FEBS Lett* 査読あり 2009;583:2464-8.
 12. Natsume H, Mizutani J, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Manamitani C, Tokuda H, Kozawa O, Otsuka T. Involvement of Rho-kinase in TGF- β -stimulated heat shock protein 27 induction in osteoblasts. *Mol Med Rep* 査読あり 2009;3:167-171.
 13. Hanai Y, Adachi S, Yasuda I, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato H, Akamatsu S, Ogura S, Kozawa O, Tokuda H. Level of p38 MAP kinase activation is a biomarker of platelet hyper-aggregation induced by collagen in patients with DM. *Life Sci* 査読あり 2009;26:386-94.
 14. Shirakami Y, Shimizu M, Adachi S, Sakai H, Nakagawa T, Yasuda Y, Tsurumi H, Hara Y, Moriwaki H. (-)-Epigallocatechin gallate suppresses the growth of human hepatocellular carcinoma cells by inhibiting activation of the VEGF/VEGFR axis. *Cancer Sci* 査読あり 2009;100:1957-62.
 15. Adachi S, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Natsume H, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T and Kozawa O. Involvement of Rho-kinase in prostaglandin E1-stimulated VEGF synthesis through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Pro & Other Lipid Med* 査読あり 2009;90:1-6.
 16. Natsume H, Adachi S, Takai S, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Yamauchi J, Kato H, Kato K, Mizutani J, Otsuka T, Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate attenuates the

- induction of HSP27 stimulated by sphingosine 1-phosphate via suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in osteoblasts. *Int J Mol Med* 査読あり 2009; 24:197-203.
17. Yamaguchi S, Tanabe K, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Iida H, Kozawa O, Dohi S. Involvement of Rho-kinase in tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 release from C6 glioma cells. *Neurochem Int* 査読あり 2009;55:438-45.
18. 足立 政治, I. Bernard Weinstein, 森脇久隆. 「緑茶カテキンの大腸癌細胞増殖抑制の新規メカニズム～脂質ラフトでの EGFR pathway の阻害～」 消化器病学の進歩-原点から未来への情報発信- 東京：医学書院 査読なし 2009;404-408.
19. Minamitani C, Otsuka T, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Hanai Y, Mizutani J, Tokuda H, Kozawa O. Involvement of Rho-kinase in sphingosine 1-phosphate-stimulated HSP27 induction in osteoblasts. *Int J Mol Med* 査読あり 2009;24:77-82.
20. Adachi S, Natsume H, Yamauchi J, Matsushima-Nishiwaki R, Joe AK, Moriwaki H, Kozawa O. p38 MAP kinase controls EGF receptor downregulation via phosphorylation at Ser1046/1047. *Cancer Lett* 査読あり 2009;277:108-13.
21. Yamauchi J, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Minamitani C, Natsume H, Mizutani J, Otsuka T, Takeda J, Harada A, Kozawa O, Tokuda H. Tacrolimus but not cyclosporine A enhances FGF-2-induced VEGF release in osteoblasts. *Int J Mol Med* 査読あり 2009;23:267-72.
22. Kuno M, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T, Harada A, Adachi S, Kozawa O, Tokuda H. Rho-kinase inhibitors decrease TGF- β -stimulated VEGF synthesis through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in osteoblasts. *Biochem Pharmacol* 査読あり 2009;77:196-203.
23. Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Natsume H, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T, Tokuda H and Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate reduces platelet-derived growth factor-BB-stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts: suppression of SAPK/JNK. *Mediators Inflamm* 査読あり 2008;29:1808.
24. Tokuda H, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Hanai Y, Adachi S, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T, Kozawa O. Function of Rho-kinase in prostaglandin D(2)-induced interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 査読あり 2008;79:41-6.
25. Minamitani C, Otsuka T, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Hanai Y, Mizutani J, Tokuda H, Kozawa O. Involvement of Rho-kinase in prostaglandin F(2 α)-stimulated interleukin-6 synthesis via p38 mitogen-activated protein kinase in osteoblasts. *Mol Cell Endocrinol* 査読あり 2008;291:27-32.
26. Matsushima-Nishiwaki R, Takai S, Adachi S, Minamitani C, Yasuda E, Noda T, Kato K, Toyoda H, Kaneoka Y, Yamaguchi A, Kumada T, Kozawa O. Phosphorylated heat

- shock protein 27 represses growth of hepatocellular carcinoma via inhibition of extracellular-signal-regulated kinase. *J Biol Chem* 査読あり 2008;283:18852-60.
27. Kato H, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Minamitani C, Otsuka T, Tokuda H, Akamatsu S, Doi T, Ogura S, Kozawa O. HSP27 phosphorylation is correlated with ADP-induced platelet granule secretion. *Arch Biochem Biophys* 査読あり 2008;475:80-6.
28. Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, Adachi S, Hata K, Hirose Y, Tsurumi H, Tanaka T and Moriwaki H. (-)-Epigallocatechin Gallate Suppresses Azoxymethane-Induced Colonic Premalignant Lesions in Male C57BL/KsJ-db/db Mice. *Cancer Prev Res* 査読あり 2008;1:298-304.
29. Adachi S, Nagao T, To S, Joe AK, Shimizu M, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Moriwaki H, Maxfield FR and Weinstein IB. (-)-Epigallocatechin Gallate Causes Internalization of the Epidermal Growth Factor Receptor in human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 査読あり 2008;29:1986-93.

factor receptor via activation of p38 MAPK in colon cancer cells.

Adachi S, To S, Shimizu M, Moriwaki H and Weinstein IB.

30. Simirgiotis MJ, Adachi S, To S, Yang H, Reynertson KA, Basile MJ, Gil RR, Weinstein IB and Kennelly EJ. Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of *Syzygium samarangense* (Wax Jambu). *Food Chemistry* 査読あり 2008;107:813-819.

[学会発表] (計2件)

1. 第94回日本消化器病学会総会 2008年5月8日 福岡 ワークショップ4 緑茶カテキンの大腸癌細胞増殖抑制の新規メカニズム～脂質ラフトでの EGFR pathway の阻害～ 足立政治, I. Bernard Weinstein, 森脇久隆
2. 99th AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting 2008 April (San Diego)
(-)-Epigallocatechin Gallate Induces phosphorylation of Epidermal growth

6. 研究組織

(1)研究代表者:

足立 政治 (SEIJI ADACHI)

岐阜大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 50467205

(2)研究分担者: なし

(3)連携研究者: なし