

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05856

研究課題名（和文）制がん作用を持つ新規プロテインノックダウン化合物の開発

研究課題名（英文）Development of new protein-knockdown compounds possessing tumor-inhibitory activity

研究代表者

渥美 園子（Atsumi, Sonoko）

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：30260136

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：脳腫瘍細胞において、添加後がんタンパクEGFRvIIIの減少が見られたが、Ertredinには予想されたモデュレーター活性は観察されなかった。ErtredinはEGFRvIIIおよびEGFRwtのセリン残基をリン酸化し、膜から細胞質への移動を誘導すること（非定型的飲作用）が明らかになった。また作用機構としてAMPKを介したp38MAPKの活性化が示唆された。EGFRvIII導入脳腫瘍細胞において、高い非定型的飲作用誘導活性を有する類縁体の7MeErtredinはEGFRを標的とする抗体薬物複合体（EGFR-ADC）の活性促進効果を示し、EGFR-ADCの取り込みも増加させると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HER（ヒト上皮成長因子受容体）を過剰発現したがんを標的としてHER2のADCが開発、承認されている。一方、EGFR（HER1）はEGFとの結合後細胞内に取り込まれるが（定型的飲作用）、抗体結合がこれを抑制しADCが細胞内に取り込まれないことが課題である。今回Ertredinおよび7MeErtredinがEGFRvIIIおよびEGFRwtの非定型的飲作用を誘導し、EGFRvIII発現脳腫瘍においてEGFR-ADC活性を促進することを明らかにした。非定型的飲作用がEGFR-ADCの細胞内取り込みを誘導し、その活性促進に利用でき、今後のがん治療への応用が期待されることを示した。

研究成果の概要（英文）：Ertredin was expected to be a protein modulator because of the results in the mouse cells. We investigated the effect of Ertredin on EGFRvIII, an oncoprotein, transfected to human glioblastoma cells. EGFRvIII was decreased after addition of Ertredin in brief time, but ubiquitination of the related protein was not seen. Therefore, Ertredin seemed not having protein modulator activity. On the other hand, Ertredin induced serine phosphorylation and endocytosis of EGFRvIII and EGFRwt (non-canonical endocytosis) in the human glioblastoma cells. In glioblastoma cells transfected with EGFRvIII, 7MeErtredin, a relative of Ertredin, having higher inducible activity of non-canonical endocytosis, promoted the antibody drug complex targeting EGFR (EGFR-ADC) activity.

研究分野：細胞生物学

キーワード：EGFRvIII EFDR-ADC Ertredin

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) EGFRのリガンド受容体部分を欠失したEGFRvIIIは構成的に活性化しており、癌細胞、特に悪性な神経膠芽腫などにおいて顕著に発現しているがん遺伝子である。Ertredinは著者らがマウス細胞でEGFR変異体EGFRvIIIによる3D spheroid形成を抑制する分子として同定した低分子であるが、添加後EGFRvIIIたんぱく質の減少がみられEGFR関連タンパク質のユビキチン化が観察された。そこでErtredinは特定のたんぱく質をユビキチン化させプロテアソーム分解を可能にするタンパク質モデューレーターとして機能する可能性があった。そこでその確認と応用開発が本課題の当初の目的とされた。

(2) 目的達成のためにヒト脳腫瘍細胞にEGFRvIII遺伝子を導入し、Ertredinの活性を検討したところ、EGFRvIIIたんぱく質の減少が見られるものの、ユビキチン化と、プロテアソームにおける分解は見られず、期待されるタンパク質モデューレーター活性は見出されなかった。EGFRvIIIたんぱく質の減少機構を検討したところErtredin添加後セリンのリン酸化が誘導され、細胞質内に取り込まれることが観察され、論文情報(文献1)から、非定型的飲作用が誘導されている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

(1) EGFRは通常リガンドとの結合後チロシンリン酸化が起こり細胞内に取り込まれる(定型的飲作用)が、非定型的な飲作用としてp38MAPK等によるセリンリン酸化後にも細胞内移行することが知られている。EGFRvIIIもまた非定型飲作用により細胞内移行するとされている。非定型的飲作用はEGFRを標的とした抗体薬物複合体の細胞内取り込みを誘導し、その活性促進に利用できると考えられる。そこで本研究の新しい目的として、ErtredinがEGFRvIIIの非定型的な飲作用を誘導しているかを確認することとした。またEGFRwt(野生型)に対しても非定型的な飲作用を誘導できるかどうかを検討すること、さらにその機構を明らかにすることとした。

(2) EGFRを標的とし、広くがん治療に有効と考えられる新しい治療法のEGFR-ADC(抗体薬物複合体)は細胞内に取り込まれにくいという課題がある。非定型的飲作用はEGFR-ADC取り込みを誘導し、活性促進を行う可能性がある。Ertredin類がEGFR-ADCの活性に対する影響についてEGFRvIII並びにEGFRwt過剰発現細胞を用いて検討し、非定型的飲作用並びにErtredin類のADC治療における応用可能性について考察した。

3. 研究の方法

(1) EGFRvIIIの非定型的飲作用の誘導には、野生型EGFRタンパク質の1015番目に対応するセリン残基のリン酸化が必要である。そこでEGFRvIII過剰発現細胞にErtredin類を添加し、EGFRvIIIのリン酸化および細胞内局在性をイムノブロットやイムノステインにより検討した。また、阻害剤及びsiRNAを用いたたんぱく質活性ならびに発現制御を行い、機構検討を行った。

(2) EGFR-ADCを購入しEGFRvIII発現細胞に対する抑制作用に対するErtredinの作用を検討した。

4. 研究成果

(1) 神経膠芽腫(U87MG/EGFRvIII)においてErtredinが非定型的飲作用の誘導に重要と考えられてEGFRvIIIのSer(1015)のリン酸化を誘導した(図2)。またErtredinの添加でp38MAPKのリン酸化の増加が見られた。そしてSer(1015)リン酸化の誘導はp38MAPK阻害剤のSB203580のより阻害され(Lane 5)、p38MAPKが重要と考えられた。またSer(1015)のリン酸化はp38MAPK活性化剤のAnisomycinのみ添加でも誘導が見られた(Lane 6)。

図2 ErtredinによるEGFRvIII Ser(1015)リン酸化誘導

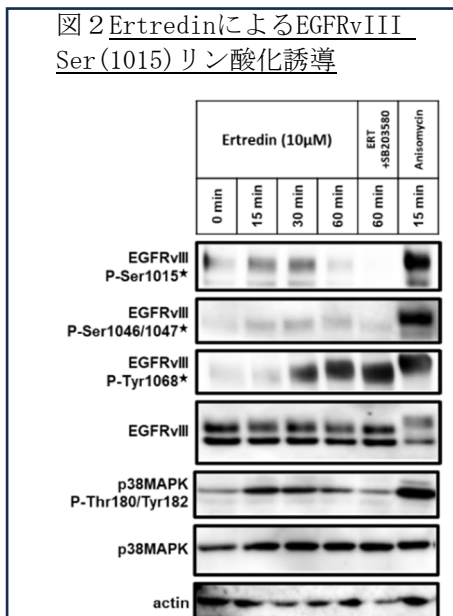
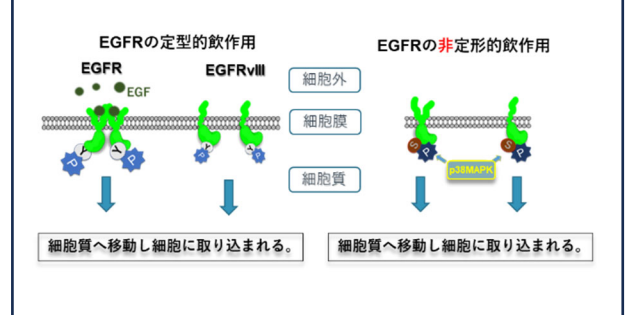


図1 EGFRの定型的飲作用と非定型的飲作用



(2) 神経膠芽腫においてErtredinはEGFRvIIIの細胞質移行を検討したところ、免疫染色後の共焦点画像により細胞質EGFRvIIIはErtredin添加により増加(図3-①)、細胞膜EGFRvIIIはErtredin添加により減少した(図3-②)。細胞膜EGFRvIIIの減少はフローサイトメトリーでも確認された(図3-③)。Ertredinによる細胞質移行はSB203580のより阻害された。一方Anisomycinのみの添加で誘導が見られた。

図3-① 細胞質EGFRvIIIはErtredin添加により増加

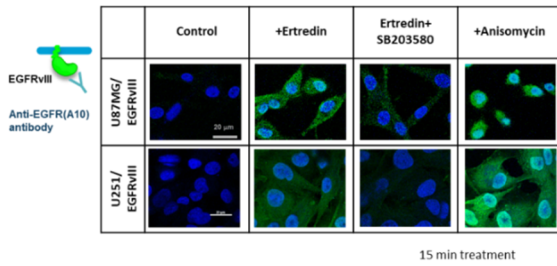


図3-② 細胞膜EGFRvIIIはErtredin添加により減少

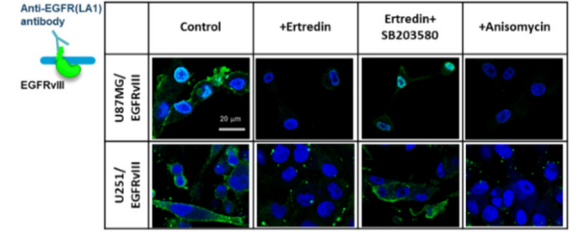
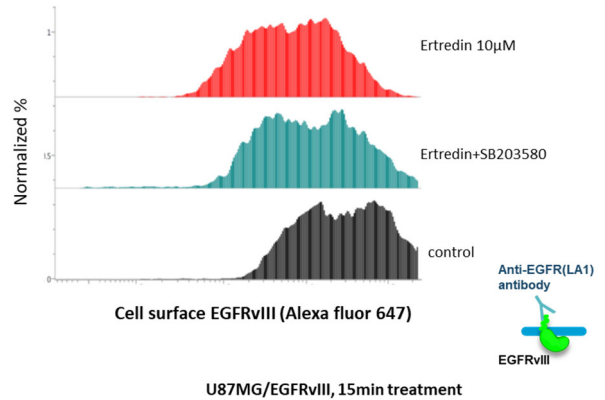


図3-③ 細胞膜EGFRvIIIはErtredin添加により減少



(3) 非定型的飲作用に重要なSer1015のリン酸化を行うことが知られているp38alpha (MAPK14) をsiRNAで抑制し、EGFRvIIIのSer (1015) のリン酸化誘導の機構を検討した。siRNAによりp38alpha発現は抑制された(図4-①)。p38alphaの抑制によりErtredinによる非定型的飲作用に重要なSer1015のリン酸化は阻害された。(図4-②)。

図4-① siRNAによるp38α (MAPK14) 発現抑制

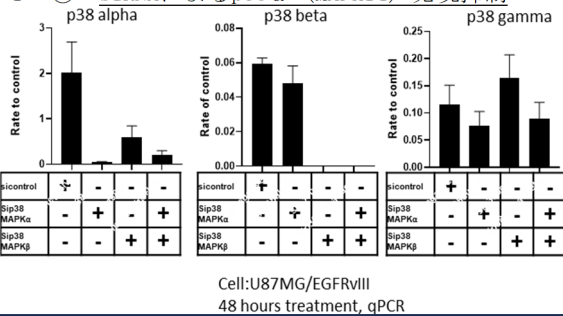


図4-② p38抑制によるEGFRvIIISer (1015) リン酸化5阻害

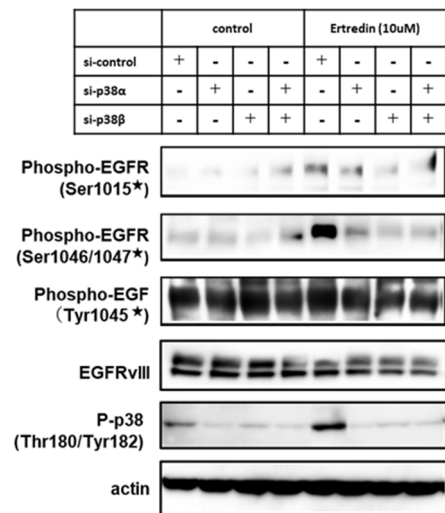


図5-① 7MeErtredinによるEGFRvIII Ser

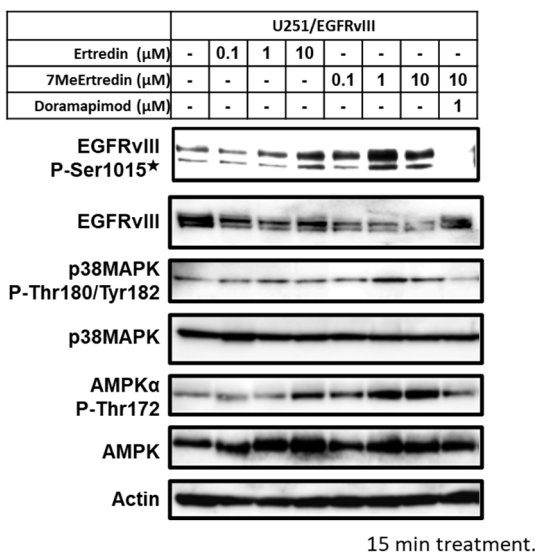
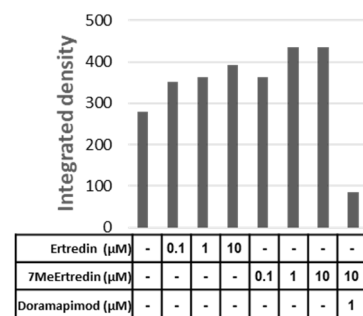
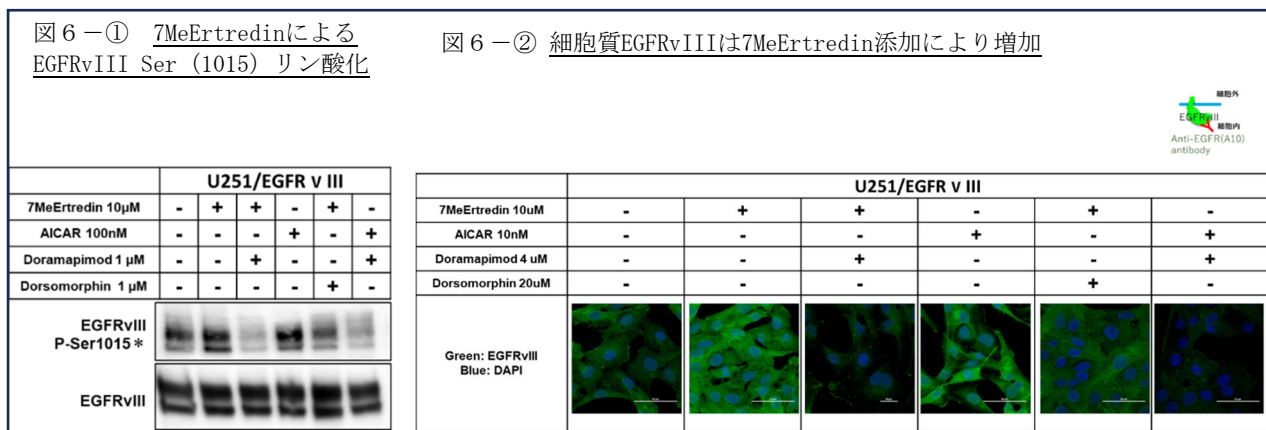


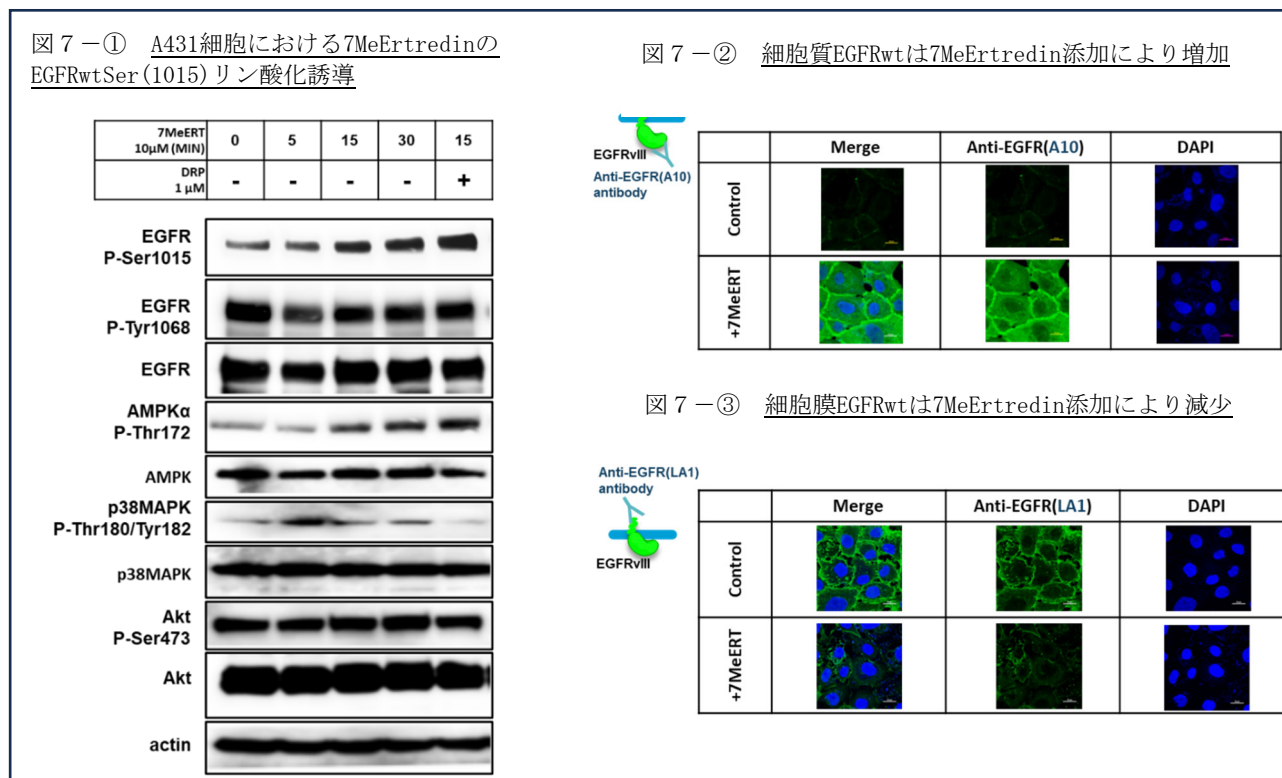
図5-② EGFR-Ser1015リン酸化



(4) EGFRvIIIのSer (1015) リン酸化誘導活性についてErtredinと比較検討したところ7MeErtredinに高いEGFRvIIIセリンリン酸化活性が見られた。またEGFRvIIIのリン酸化誘導とともにp38MAPKおよびAMPKのリン酸化が検出された。7MeErtredinによるSer1015のリン酸化はp38MAPKの阻害剤Doramapimodにより抑制された(図5-①, ②, Lane8)。7MeErtredinによるEGFRvIII Ser (1015) リン酸化はAMPK阻害剤のDorsomorphinにより阻害され(図6-①, Lane5)、AMPK活性化剤のAICAR単独添加で促進された(同, Lane4)、そしてSer1015のリン酸化の促進と阻害の状態はEGFRvIIIの細胞質内移行と相関していた(図6-②)

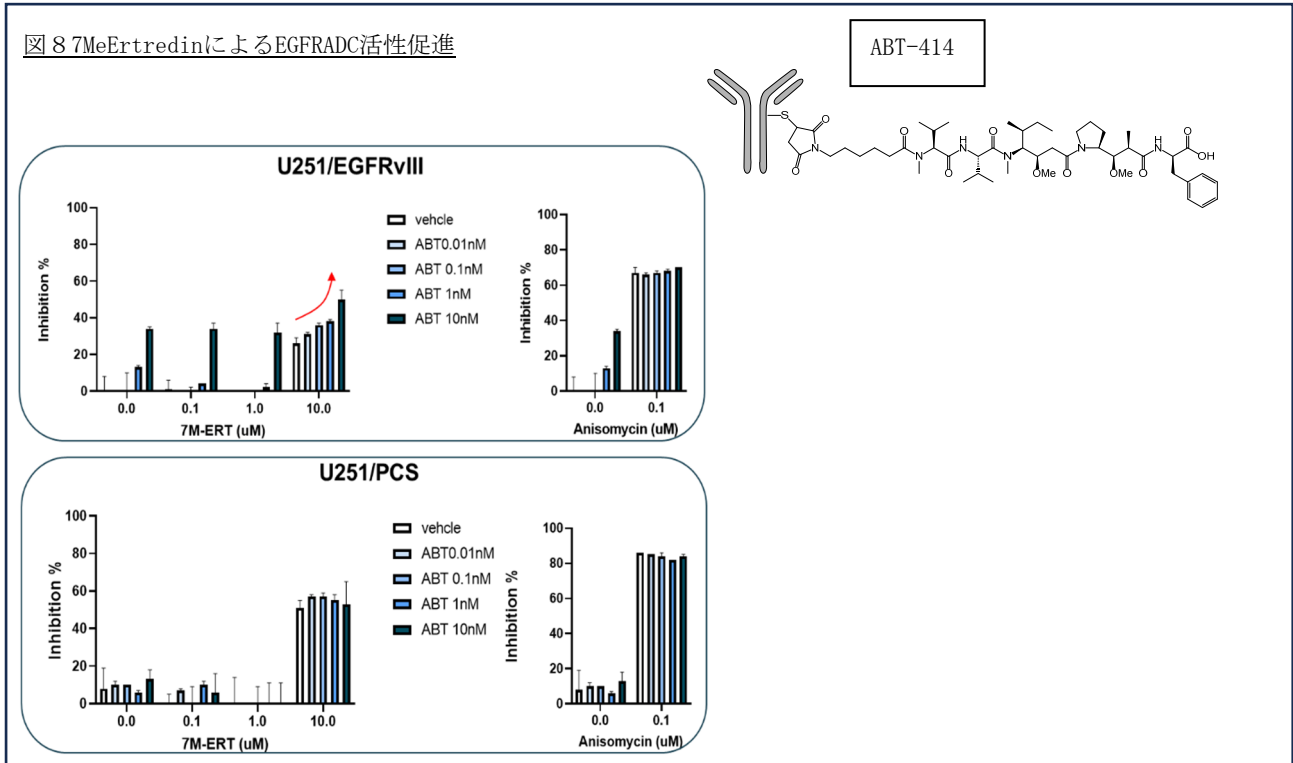


(5) EGFRwt(野生型)の過剰発現細胞A431を用いて7MeErtredinのEGFRwtのSer (1015) リン酸化誘導および細胞質移行誘導について検討した(図7)。7MeErtredin添加後EGFRwtのSer (1015) リン酸化誘導および細胞質内移行が観察された(図7-①, ②, ③)。また7MeErtredin添加後AMPKのリン酸化が誘導された。



(6) これまでの結果から7MeErtredinはErtredinより高い非定型的飲作用を示すことが分かった。非定型的飲作用によりEGFRの細胞質移行が起こることから、7MeErtredinはEGFR-ADCの作用を促進させる可能性がある。そこでEGFRvIII過剰発現神経膠芽腫についてEGFR-ADCのABT-414の活性に対し7MeErtredinがどのような活性を示すのかを検討した。EGFRvIII発現細胞(U251/EGFRvIII)において7MeErtredinはEGFR-ADC(ABT414)の活性を促進した(図8)一方ベクターコントロール細胞

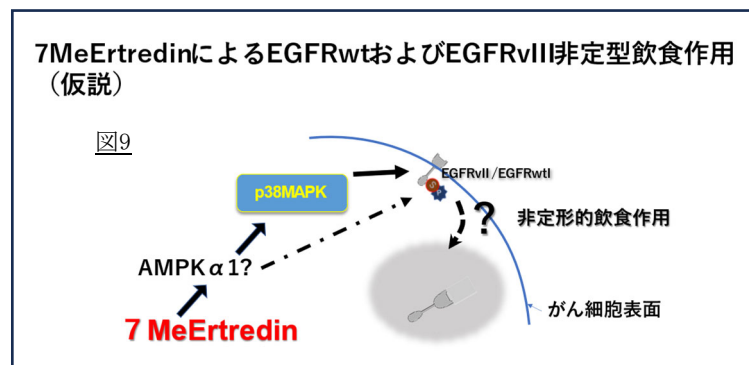
(U251/PCS) においてEGFR-ADC活性の促進は見られなかった。



(7) (考察と展望) 今回の結果からErtredin類はEGFRvIIIおよびEGFRwt過剰発現細胞においてP-Ser(1015)のリン酸化を促進し非定型的飲作用を誘導した。Ertredin類の非定型的飲作用にはEGFRvIII発現神経膠芽腫においてはp38MAPK14が重要と考えられた。一方EGFRwt過剰発現A431細胞においてはp38阻害剤およびsiRNAによるp38抑制後のリン酸化抑制が見られず、別経路で非定型的飲作用が誘導される可能性がある。AMPK阻害剤またはsiRNAでAMPK α 1を抑制後7MeErtredinによるSerリン酸化が抑制されたことからAMPKが関わっていると考えられる。AMPKのリン酸化はErtredin類添加後に検討した細胞すべてで検出された。Ser1015リン酸化はAICAR単独で誘導され、Ertredin類によるDorsomorphinで阻害されることからErtredinがAMPKを介してリン酸化を誘導していると考えられる。AMPKの下流にp38MAPKが存在することが報告されているが、A431の結果から他の経路で(または直接)EGFRwtをリン酸化が起こる可能性がある。考えられる作用機作は図9に示した。Ertredinの直接の標的的研究は韓国の共同研究者とともに進展し、明らかになってきたが、ミトコンドリアに存在し(私信)、AMPK活性化を行う可能性があり今回の結果と一致する。また、EGFR-ADCを使用した今回の結果からEGFRvIIIおよびEGFRwtの非定型的飲作用を誘導する物質がEGFRvIII発現細胞においてEGFR-ADC活性を促進させる可能性が示唆された。結果をまとめて論文投稿予定である。

(引用文献)

- (1) Takahashi JI *etal.* (2022) *Scientific Report* 22:11561
- (2) Pokhrel RH *etal.* (2021) *Mol. Cancer* 20 : 133



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayamitsu Adachi1, Chisato Nosaka, Sonoko Atsumi, Koichi Nakae, Yoji Umezawa, Ryuichi Sawa, Yumiko Kubota, Chie Nakane, Masabumi Shibuya, Yoshio Nishimura	4. 巻 74
2. 論文標題 Structure-activity relationships of natural quinone vegfrecine analogs with potent activity against VEGFR-1 and -2 tyrosine kinases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 734 -742
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-021-00445-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渥美園子, 野坂千里, 川田学, 澁谷正史, 内藤幹彦
2. 発表標題 ErtredinによるユピキチルヒストンH2Bの細胞内局在性変化等について
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渥美園子, 野坂千里, 小野寺威文, 大石智一, 百瀬功, 山崎洋子, 川田学, 澁谷正史, 内藤幹彦
2. 発表標題 Ertredin reduces EGFRvIII protein level and suppresses spheroid formation in the human glioblastoma cells..
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渥美園子, 野坂千里, 川田学, 澁谷正史, 内藤幹彦, 櫻井宏明
2. 発表標題 Ertredin類縁体によるEGFRの非定型的な作用誘導とADC活性増強効果
3. 学会等名 第27回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

IMC微生物化学研究所HP
<https://www.bikaken.or.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------