

## 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 6月10日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590704

研究課題名（和文） 上皮増殖因子前駆体細胞内ドメインをターゲットとした新規薬剤開発

研究課題名（英文） Potential of new anti-cancer agents targeting the nuclear translocation signaling of HB-EGF C-terminal fragments

研究代表者

谷田 諭史 (TANIDA SATOSHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30528782

研究成果の概要（和文）：【目的】近年進行大腸癌の罹患率は上昇し治療法の開発は急務である。進行大腸癌化学療法において、上皮増殖因子（EGF）を標的とする薬剤の効果は限定的である。HB-EGFを介した細胞増殖機序には、HB-EGF-C末端（HB-EGF-CTF）の核移行後promyelocytic leukemia zinc finger（PLZF）の核外へのくみだしによる増殖シグナルがある。HB-EGF-CTF核移行シグナル抑制薬を網羅的に探索し、HB-EGF-CTF核移行細胞増殖シグナルが大腸癌細胞増殖に果たす役割を検討した。【方法】GST-pull downおよびSurface plasmon resonance アッセイにてPLZFとHB-EGF-CTFの結合部位を特定した。HB-EGF-CTFとPLZFの結合阻害候補化合物探索のために、Alphascreen assayを確立した。細胞増殖は、増殖カーブにて検討し、HB-EGF-CTF、PLZF細胞内局在は蛍光免疫を用いた。【結果】PLZFzinc finger構造5-8がHB-EGF-CTF蛋白との特異的結合部位であった。Alphascreen assay解析結果から12種類の候補化合物、telmisartanおよびcandesartanが得られた。telmisartanは、濃度依存的にTPAによる細胞増殖を抑制した。一方、candesartanは、細胞増殖を抑制しなかった。HB-EGF-CTFおよびPLZFの局在は、telmisartanとcandesartanで前処置後TPA刺激を行うと、TPAによるHB-EGF-CTF核移行は、telmisartanのみで阻害できた。【結論】telmisartanやその誘導体によるHB-EGF-CTF核内移行シグナル抑制は、新たな大腸癌治療戦略になりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Current treatment target toward advanced colorectal cancers is mainly focused on the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling, but its additive effects with chemotherapy are still limited. A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) cleaves the proheparin-binding epidermal growth factor like growth factor (proHB-EGF). And soluble HB-EGF activates EGFR. In parallel, the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF (HB-EGF-CTF) translocate into the inner nuclear membrane, subsequently exerts on the regulation of cell proliferation by binding nuclear promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein, a transcriptional repressor, thereby causing its nuclear export. We hypothesized that the inhibition of HB-EGF-CTF nuclear translocation may be a new strategy in preventing cell proliferation. Methods:12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) was treated to activate ADAM. Nine-thousand chemical compounds were screened for their efficacies in blocking the binding of HB-EGF-CTF to promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) with Alphascreen

system. The obtained candidates were then used to block the binding of HB-EGF-CTF to PLZF in colon cancer cells, HT29 and HCT116. Cell proliferation was investigated with a growth curve assay. The intracellular localization, and association between HB-EGF-CTF and PLZF, was assessed with immunofluorescent staining, and immunoprecipitation and Western blotting, respectively. The effects of obtained candidates on EGFR phosphorylation and on nuclear translocation of HB-EGF-CTF and export of PLZF during the angiotensin II type1 receptor (AT1R) knockdown were also investigated. Results: Telmisartan and candesartan were found to be potential candidates. Telmisartan inhibited TPA-induced cell proliferation stronger than candesartan. Telmisartan, but not candesartan blocked the nuclear translocation of HB-EGF-CTF, and binding of HB-EGF-CTF to PLZF, during TPA stimulation. Both telmisartan and candesartan did not inhibit TPA-induced EGFR phosphorylation, and telmisartan, but not candesartan, inhibited TPA-induced nuclear translocation of HB-EGF-CTF after knockdown of AT1R. Conclusions: The inhibition of HB-EGF-CTF nuclear translocation with telmisartan may be a novel strategy in preventing cell proliferation.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：下部消化管（小腸、大腸）

キーワード：EGFファミリー、HB-EGF核移行シグナル、PLZF、Alphascreen assay

#### 1. 研究開始当初の背景

近年進行大腸癌の罹患率・死亡率は上昇し治療法の開発が急務である。進行大腸癌の化学療法では、上皮増殖因子（EGF）を標的とする薬剤が臨床応用されているが、この効果は、EGF受容体（EGFR）下流分子 K-RAS 変異の存在で減弱する。EGFファミリーである、HB-EGF前駆体を介した細胞増殖機序には、メタロプロテアーゼ（ADAM）活性化後、HB-EGF前駆体のsheddingを介した、HB-EGFによる、EGF受容体リン酸化増殖シグナルとHB-EGF-C末端（HB-EGF-CTF）の核移行を介した、転写抑制因子 promyelocytic leukemia zinc finger（PLZF）等の核外へのくみだしによる増殖促進シグナルがある。大腸癌増殖機序において、HB-EGF-CTF核移行シグナルの関与につ

いては分かっていない。

#### 2. 研究の目的

HB-EGF-CTF核移行シグナルの抑制薬を網羅的に探索し、HB-EGF-CTF核移行細胞増殖シグナルが大腸癌細胞増殖に果たす役割につき検討した。

#### 3. 研究の方法

ADAM12 活性化剤として 12-*O*-tetradecanoylphorbtor-13-acetate (TPA)を使用した。FLAG標識PLZF強発現HT1080細胞株を樹立し、PLZFとEGFRリガンド前駆体（HB-EGF、TGF- $\alpha$ 、Amphireglin (AR), Epreglin) C末端フラグメントとの結合を確認した。次に GST-pull down assay および Surface plasmon resonance (SPR)アッセイにて PLZF と HB-EGF-CTF の結合部位を特定し

た。HB-EGF-CTF と PLZF の結合阻害候補化合物探索のために、先に同定した結合部位蛋白に発色ビーズを付着させ Alphascree assay を確立した。細胞増殖は、増殖カーブ、CCK-8 assay にて検討し、HB-EGF-CTF、PLZF 細胞内局在は蛍光免疫を用いた。EGFR リン酸化については、抗 EGFR 抗体にて免疫沈降後、抗リン酸化抗体にてプロットした。また、Angiotensin II type1 receptor (AT1R) 欠失には RNA 干渉を利用した。

#### 4. 研究成果

Alphascree system は、high through-put screening system である。9000 種類の化合物から HB-EGF-CTF 核移行阻害効果をもつ薬剤を見出した。telmisartan による増殖抑制効果は、HB-EGF-CTF 核移行抑制によることを初めて明らかにした。telmisartan は、高い脂溶性から細胞内への薬剤移行が良好で HB-EGF-CTF と PLZF の結合を直接抑制したと考えられた。以上のことから telmisartan やその誘導体による HB-EGF-CTF 核内移行シグナル抑制は、新たな大腸癌治療戦略になりうると考えられた。

#### 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 7 件)

- ① Ozeki K, Tanida S, Morimoto C, Inoue Y, Mizoshita T, Tsukamoto H, Shimura T, Kataoka H, Kamiya T, Nishiwaki E, Ishiguro H, Higashiyama S, Joh T. Telmisartan inhibits cell proliferation by blocking nuclear translocation of ProHB-EGF C-terminal fragment in colon cancer cells. PLoS One. 査読あり。2013;8(2):e56770. doi: 10.1371/journal.pone.0056770.
- ② Tanida S, Mizoshita T, Mizushima T, Shimura T, Kamiya T, Kataoka H, Joh T. Involvement of cell proliferation induced by dual intracellular signaling of HB-EGF in the development of colitis-associated cancer during ulcerative colitis. Ulcers 査読あり。 volume 2011, 2011, 6 pages. doi:10.1155/2011/457637
- ③ IBD 腸管炎症に関わる炎症性サイトカインによる EGF シグナルを介した大腸細胞増殖機序. 谷田諭史、尾関啓司、塚本宏延、溝下 勤、片岡洋望、神谷 武、城 卓志. 潰瘍 査読なし。38(2), 2011, 135-138.
- ④ HB-EGF-C 末端核移行シグナルをターゲットにした新規薬剤探索と細胞増殖抑制機序. 尾関啓司, 谷田諭史, 溝下 勤, 水島隆史, 志村貴也, 村上賢治, 平田慶和, 片岡洋望, 神谷 武, 福田伸治, 東山繁樹, 城 卓志. 消化器と免疫. 査読なし。47, 2011, 144-146.
- ⑤ Ebi M, Kataoka H, Shimura T, Kubota E, Hirata Y, Mizushima T, Mizoshita T, Tanaka M, Mabuchi M, Tsukamoto H, Tanida S, Kamiya T, Higashiyama S, Joh T. TGF  $\beta$  induces proHB-EGF shedding and EGFR transactivation through ADAM activation in gastric cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 査読あり。19; 402(3) 2010, 449-54. DOI:10.1016/j.bbrc.2010.09.130
- ⑥ Tanida S, Kataoka H, Mizoshita T, Shimura T, Kamiya T, Joh T. Intracellular translocation signaling of HB-EGF carboxy-terminal fragment and mucosal defense through cell proliferation and migration in digestive tracts. Digestion. 査読あり。82(3), 2010, 145-9. DOI:10.1159/000310903
- ⑦ Hirata Y, Ogasawara N, Sasaki M, Mizushima T, Mizoshita T, Shimura T, Mori Y, Kubota E, Wada T, Tanida S,

Kataoka H, Kamiya T, Higashiyama S, Joh T BCL6 degradation caused by the interaction with the C-terminus of proHB-EGF induces cyclin D2 expression in gastric cancers. British Journal of Cancer 査読あり。 100, 2009, 1320-1329. DOI:10.1016/S0016-5085(09)61447-5

[学会発表] (計 9 件)

- ① 大腸癌増殖シグナル HB-EGF-C 末端核移行をターゲットとした新規薬剤探索 尾関啓司、谷田諭史、溝下 勤、塚本宏延、片岡洋望、城 卓志. 第 50 回日本癌治療学会学術集会 2012. 10/25. 横浜
- ② 炎症性サイトカイン (IL-8) による HB-EGF-C 末端核移行シグナルを介した大腸細胞増殖機序 尾関啓司、谷田諭史、溝下 勤、塚本宏延、片岡洋望、城 卓志. 第 40 回日本潰瘍学会 2012. 7/14. 東京
- ③ IBD 腸管炎症に関わる炎症性サイトカインによる EGF-C 末端 signal を介した大腸癌細胞増殖機序 —HB-EGF-CTF シグナル抑制薬網羅的探索から— 尾関啓司、谷田諭史、溝下 勤、塚本宏延、城 卓志. JDDW 2011 2011. 10/20. 福岡
- ④ TGF $\beta$  による ROS および ADAM17 を介した EGF 受容体 transactivation のメカニズムの解析. 海老正秀、片岡洋望、志村貴也、溝下 勤、谷田諭史、平田慶和、神谷 武、水島隆史、東山繁樹、城 卓志. JDDW 2011 2011. 10/20. 福岡
- ⑤ HB-EGF-CTF の核内移行は胃癌浸潤を促進する. 志村貴也、吉田道弘、福田信治、溝下 勤、片岡洋望、東山繁樹、城 卓志. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2011. 10/5. 名古屋
- ⑥ IBD 腸管炎症に関わる炎症性サイトカイン

ンによる EGF signal を介した大腸癌細胞増殖機序 -EGF-C 末端 signal を標的とした新規薬剤探索-、尾関啓司、谷田諭史、溝下 勤、塚本宏延、城 卓志. 第 7 回消化管学会総会 2011. 2/18. 京都

- ⑦ IBD 腸管炎症に関わる炎症性サイトカインによる EGF シグナルを介した大腸細胞増殖機序 - HB-EGF-C 末端シグナルを標的とした網羅的薬剤探索 -. 谷田 諭史、溝下 勤、水島 隆史、城 卓志. 厚生労働省「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」平成 22 年度第 2 回総会 免疫関連バイオマーカーの開発. 2011. 1/28. 東京
- ⑧ TGFbeta induces shedding of proHB-EGF and EGFR transactivation though ADAM activation. 海老正秀、城 卓志、神谷武、片岡洋望、久保田英嗣、溝下 勤、志村貴也、村上賢治、平田慶和、東山繁樹. 第 69 回 日本癌学会総会 English Workshops 2010. 9. 24. 東京
- ⑨ HB-EGF-C 末端核移行シグナルをターゲットにした新規薬剤探索と細胞増殖抑制効果について. 尾関啓司、谷田諭史、福田信治、東山繁樹、城 卓志. 第 47 回日本消化器免疫学会総会 一般演題 2010. 07. 08. 大津

[その他]

ホームページ等  
名古屋市立大学大学院医学研究科消化器代謝内科学ホームページ業績集  
<http://www.ncu-shotai.ac/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷田 諭史 (TANIDA SATOSHI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：30528782

### (2) 研究分担者

城 卓志 (JOH TAKASHI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30231369

片岡 洋望 (KATAOKA HIROMI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・  
准教授  
研究者番号：40381785

(3) 連携研究者

東山 繁樹 (HIGASHIYAMA SHIGEKI)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：60202272