

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 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：13401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890074

研究課題名（和文） カテキン類による増殖因子受容体分解と腫瘍増殖抑制の分子機構の解明

研究課題名（英文） study of molecular mechanism of catechin on degradative effect of growth factor receptor and suppressive effect of tumor growth

研究代表者

吉村 仁志 (YOSHIMURA HITOSHI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：40362917

研究成果の概要（和文）：血小板由来増殖因子受容体（PDGFR）は、癌治療の分子標的の一つである。カテキンは抗腫瘍効果を有しており、PDGFR に対する作用について検討した。EGCG は PDGFR 蛋白質量の減少を引き起こし、その減少は蛋白質合成阻害剤により促進され、蛋白質分解阻害剤により抑制された。EGCG と蛋白質分解阻害剤の両者の処理で PDGFR のユビキチン化が認められた。以上より EGCG はユビキチン-プロテアソーム経路の活性化を介して PDGFR を減少させることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Platelet derived growth factor receptor (PDGFR) is one of the molecule target for cancer treatment. Catechin has an anti-tumor effect, and we examined the effect for PDGFR. PDGFR protein was decreased by EGCG treatment. The decrease was promoted by the inhibitor of protein synthesis, and suppressed by the inhibitor of protein degradation. PDGFR ubiquitination was observed by the treatment with EGCG and inhibitor of protein degradation. It was suggested that PDGFR protein was decrease by EGCG treatment through the activation of ubiquitin-proteasome pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2011 年度	1,090,000	327,000	1,417,000
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：癌, シグナル伝達, 蛋白質

1. 研究開始当初の背景

近年の細胞増殖機構の基礎的研究により、癌細胞増殖に関わるプロセスの阻害に着目した分子標的薬の開発が行われている。いくつかの腫瘍においては増殖因子受容体の過剰な発現が、その増殖と形質の維持に重要な役割を演じてお

り、増殖因子受容体タンパク質の酵素活性阻害剤（例；2D1839 (Iressa)）や中和抗体（例；Trastuzumab (Herceptin)）などは、その腫瘍抑制効果が明らかにされると共に臨床での応用が進められている。

緑茶は東洋において最も多く消費されている飲み物であり、疫学的調査によ

り悪性腫瘍の発生率を減少させる事が報告されている。これまでに緑茶成分による悪性腫瘍抑制効果については、基礎的研究により、カテキン類、中でもエピガロカテキン-3-ガレート

(Epigallocatechin-3-gallate: EGCG) に生物学的作用があるとされ、EGCG が PDGF 受容体の酵素活性を阻害し細胞増殖を抑制する、EGCG が EGF 受容体の酵素活性と細胞内情報伝達を抑制する、EGCG が細胞周期の停止とアポトーシスを引き起こす、という報告がなされている。最近われわれは、EGCG は、初代培養の血管平滑筋細胞や線維芽細胞、あるいは cell line の Hela cell (子宮頸癌) や scc9 (扁平上皮癌) において、血小板由来増殖因子受容体 (Platelet-derived growth factor receptor: PDGFR) のタンパク質量の低下を引き起こすことを見いだしている。

2. 研究の目的

EGCG による増殖因子受容体の分解促進作用を示し、その分子機構の検討を行った論文はない。今回申請者が明らかにしたい点は、EGCG による増殖因子受容体タンパク質の減少メカニズムの解明である。また今後そのメカニズムを応用した分子標的薬や治療法の可能性を検討していきたいと考える。

細胞内情報伝達・細胞周期・ストレス応答・転写など細胞の生命活動の維持に重要な役割を演じているタンパク質は、合成と分解の両過程にて厳密に管理されている。細胞外部環境からの細胞増殖に必要な情報を伝達する血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) や上皮増殖因子受容体 (EGFR) は、翻訳後修飾の形でユビキチン・プロテアソームシステムを介した分解機構にて細胞内のタンパク質量の調整を受けており、この機構はユビキチン (Ubiquitin: Ub) 化 (Ub 活性化酵素 (E1), Ub 結合酵素 (E2), Ub リガーゼ (E3) のカスケード反応を介した標的タンパク質への多数のユビキチン分子の枝状の連結とポリユビキチン鎖の形成)、及びプロテアソームによる分解 (プロテアソームによるポリユビキチン鎖の認識と ATP 依存的タンパク質分解) から成る。緑茶中に含まれるカテキン類にはカテキン (catechin) の他にカテキン-3-ガレート (catechin-3-gallate: CG) エピカテキン (epicatechin: EC) エピカテキン-3-ガレート (epicatechin-3-gallate: ECG) エピガロカテキン

(epigallocatechin: EGC) エピガロカテキン-3-ガレート (epigallocatechin-3-gallate: EGCG) という構造類似体がある。申請者は PDGFR や EGFR をよく発現している正常細胞 (初代培養細胞) において EGCG が増殖因子受容体タンパク質のユビキチン化とプロテアソームによる分解にどのような影響を与えているのかを詳細に検討する。

3. 研究の方法

実験は以下のように行った。

(1) 細胞培養

PDGFR を高度に発現しているラット血管平滑筋細胞を、10% fetal calf serum (FCS) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) にて培養し、48 時間シラムスタベーションにて血清刺激を除去後に実験に用いた。

(2) ウェスタンブロット法

EGCG を添加した細胞に細胞溶解液 (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM EDTA, 2 mM EGTA, 10 mM sodium pyrophosphate, 50 mM NaF, 20 μM zinc acetate, 2 mM Na₃VO₄, 5 μg/ml leupeptin, protease inhibitor cocktail) を加え超音波処理にて破碎し、SDS-PAGE サンプル緩衝液 (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% mercaptoethanol, 10% glycerol and 0.01% bromophenol blue) にて処理した後に、7.5-12.5% SDS-PAGE にて展開し PVDF 膜に転写した。PVDF 膜は 5% スキムミルクを含むトリス緩衝液にて前処理した後に 1 次抗体 (1:1000 希釈) にて標識し、続いて horseradish peroxidase 標識 2 次抗体 (1:5000 希釈) を反応させ、BM chemiluminescence blotting substrate を用いた化学検出法にて調べた。

(3) RT-PCR 法

細胞に EGCG を添加後にトータル RNA を acid guanidium-phenol-chloroform (AGPC) 法にて抽出し、reverse transcriptase (ReverTra Ace, TOYOBO) と oligo dT primers (Invitrogen) を用いて cDNA へ逆転写した。プライマーは次のものを用いた。

PDGFR-β :

5' -gtggactccgatacttactatg-3' (sense primer)

5' -acctgcagcttgaatgagagctg-3' (antisense primer)

GAPDH :

5' -accacagtccatgccatcac-3' (sense primer)

5' -tccaccaccctgttgctgta-3' (antisense primer)

PCR 産物 (PDGFR- β ; 644bp, GAPDH; 452bp) はエチジウムブロミドを含む 2% アガロースゲルにて電気泳動し評価した。

(4) 蛋白質合成阻害

細胞をタンパク質合成阻害剤である cycloheximide (CHX) にて 30 分前処理を行った後に, EGCG を添加の有無の条件で処理した。処理した細胞の溶解液をウエスタンブロット法にて解析し, プロットはデンシトメーターで測定しその値を, PDGFR- β 蛋白量とした。

(5) プロテアソーム及びライソソーム阻害

細胞をプロテアソーム阻害剤である Z-Leu-Leu-Leu-CHO (MG132) と lactacystin, あるいはライソソーム阻害剤である ammonium chloride (NH_4Cl) と chloroquine にて 30 分前処理した後に EGCG を添加し, ウエスタンブロット法にて評価した。

(6) 免疫沈降法

処理した細胞のライセートに抗 PDGFR- β 抗体あるいは抗 ubiquitin 抗体を添加し 4°C で一晩反応させた後に免疫複合体を Protein A Sepharose™ CL-4B にて回収しウエスタンブロット法にて評価した。

(7) 統計学的解析

全ての統計学的検討は Stat View 5.0 を用いて行い, Student's t-test にて $P < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

実験の結果

(1) 実験に用いたカテキン類において, EGCG のみが PDGFR- β の蛋白質レベルでの減少を引き起こした。

(2) EGCG は PDGFR- β を 50 μM の濃度で添加 2 時間後より蛋白質レベルにて減少させ, また 6 時間後より mRNA レベルで減少させた。

(3) PDGFR- β 蛋白質レベルでの減少が, 蛋白質の分解促進かあるいは合成抑制であるのかを確認するため, 蛋白質合成阻害剤である CHX を添加し調べた結果, 合成系が止められても 6 時間では PDGFR- β は大きく減少しないこと, また EGCG との併用で減少における相乗作用があることから, EGCG は分解を促進していると考えられた。

(4) PDGFR- β の分解はまずプロテアソ-

ームにて行われ, その後にライソソームで行われる。それぞれの阻害剤を添加して調べた結果, いずれの系統の阻害剤でも EGCG による PDGFR- β の減少が抑制された。

(5) PDGFR- β は細胞膜上にてユビキチン化を受けた後にプロテアソームに移動し分解されるが, 免疫沈降法にて調べた結果, EGCG は PDGFR- β のユビキチン化を促進することが明らかとなった。またプロテアソーム阻害剤にて分解を抑制するとさらにユビキチン化された PDGFR- β の増加を認めた。ユビキチン化にはモノユビキチン化とポリユビキチン化があるが EGCG による PDGFR- β のユビキチン化はポリユビキチン化であった。

(6) PDGFR には α と β のアイソフォームがあるが β だけではなく α も EGCG による減少を認めた。

考察

血小板由来増殖因子受容体 (platelet-derived growth factor receptor: PDGFR) は頭頸部癌を含む様々な腫瘍にて高度に発現が認められており, リガンドである PDGF が結合することにより 2 量体を形成し, 自身のもつチロシンキナーゼ活性により自己リン酸化と活性化を引き起こすことで細胞の増殖や遊走を導くシグナルを伝達する。PDGFR のチロシンキナーゼ阻害作用を有するメシル酸イマチニブ (グリベック®) は *in vitro* において頭頸部扁平上皮癌の腫瘍細胞に対する増殖抑制効果があることから, PDGFR は頭頸部癌の治療における分子標的としての有用性が検討されている。

緑茶成分に含まれるカテキン類の中で主成分となる EGCG は抗酸化作用を有していることが知られており, 活性酸素種により影響を受けると考えられる癌や心血管疾患や神経変性疾患などに対する有用性が基礎・臨床研究により報告されている。抗腫瘍効果については動物実験では皮膚癌, 乳癌, 前立腺癌, 肺癌などにおいて有効性が認められ, また *in vitro* の実験では抗酸化だけでなく抗増殖作用やアポトーシス促進作用を引き起こすことが示されている。

我々はこれまでに A7r5 細胞においてカテキン類の中でも EGCG は PDGF-BB が誘導する細胞増殖や早期応答遺伝子 *c-fos*, *c-jun* の遺伝子発現を抑制し, また PDGF-BB が誘導する PDGFR- β のリン酸化やその下流シグナル分子である ERK1/2 や Akt のリン酸化を抑制するこ

とを報告している。今回我々は PDGFR 蛋白質レベルでの検討を行い, EGCG はユビキチン・プロテアソーム系を介した分解を促進することが明らかになった。

ユビキチンは 76 個のアミノ酸から成る小さな蛋白質(翻訳後修飾分子)であり, 活性化酵素(E1), 転移酵素(E2), 連結酵素(E3)から構成された複合酵素系(ユビキチンシステム)によって標的蛋白質に共有結合する。さらにこの E1-E2-E3 カスケード反応を繰り返すことにより多数のユビキチン鎖がつながったポリユビキチン鎖が形成される。このポリユビキチン鎖は ATP 依存性プロテアーゼである 26S プロテアソームの分解シグナルとなり標的蛋白質が迅速に分解される。通常 PDGFR はリガンド結合により活性化を受けると細胞膜上にてユビキチン化を受け, インターナリゼーションにより細胞内へと取り込まれ, 細胞内でプロテアソームとリソソームを経て分解される。今後 EGCG による PDGFR のユビキチン化促進の作用メカニズムについて検証を行うとともに, 頭頸部扁平上皮癌の腫瘍細胞での有効性を評価していく予定である。

まとめ

EGCG は PDGFR を蛋白質レベルにて減少させこれは生理的蛋白質分解機構であるユビキチン-プロテアソーム分解経路の活性化によることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① エピガロカテキン-3-ガレートによる血小板由来増殖因子受容体分解作用に関する検討 吉村仁志, 飛田尚慶, 植野高章, 関根浄治, 佐野和生 第 55 回社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会 2010 年 10 月 16-18 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○ 取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 仁志 (YOSHIMURA HITOSHI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号: 40362917

(2) 研究分担者

なし