

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700978

研究課題名(和文) ゲフィチニブの新規標的GAK阻害による間質性肺炎誘導機序の解析

研究課題名(英文) Pulmonary dysfunction as adverse effect is attributed to the inhibition of the novel gefitinib target GAK.

研究代表者

内藤 陽子(Naito, Yoko)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任研究員

研究者番号：10553026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では上皮成長因子受容体(EGFR)阻害剤ゲフィチニブのがん抑制効果と肺機能障害という副作用の分子機序の解明を目的とし、特にGAK阻害がどのように癌細胞増殖抑制効果と副作用を引き起こすかを解析した。その結果、ゲフィチニブがGAK活性を阻害することや、GAK阻害が異常なEGF-EGFRシグナルを引き起こす機構を明らかにした。また、細胞周期制御におけるGAKとその作用因子の役割を詳細にした。さらに、様々な癌でGAKが高発現していることや、新規GAK阻害剤により癌細胞の増殖を抑制することを見出した。本研究成果は、今後、ゲフィチニブを改良したより安全で効果的な薬剤の開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to reveal the mechanism by which gefitinib (iressa), an inhibitor of epithelial growth factor receptor (EGFR), suppress tumor progression and cause pulmonary alveolar dysfunction as adverse effect. We found that gefitinib inhibited GAK kinase activity and inhibition of GAK activity caused dysregulation of EGF-EGFR signaling by aberrant controlling of phosphorylation and endocytosis. We clarified that GAK expression was increased in several cancer and inhibition of GAK suppressed cancer progression by inducing apoptosis. These results may be useful for development of a gefitinib-derived drug which prevent side effect associated with gefitinib therapy and have a more beneficial effect on tumor suppression.

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

キーワード：ゲフィチニブ 腫瘍抑制 間質性肺炎 GAK

1. 研究開始当初の背景

ゲフィチニブ(イレッサ)は上皮成長因子受容体(EGFR)選択的な分子標的薬であり、EGFR のチロシンキナーゼに対して ATP と競合して結合することで、そのキナーゼ活性を阻害し下流のシグナル伝達を抑制する。実際に臨床的にも、非小細胞肺癌をはじめとする様々な癌において効果を示すことが知られている。しかし、ごくわずかではあるが 0.7%の使用例では、急性肺障害や間質性肺炎などの肺機能不全を引き起こし死に至る事例があり、安全な使用のためには副作用の起こる分子制御機構の早期解明が求められている。

ゲフィチニブによる副作用の原因解明に関して国内外で研究が行われており、副作用を起こす作用点として EGFR に注目しているものがほとんどである。EGFR の遺伝子破壊マウス(ノックアウトマウス)は多くの研究室で樹立・解析が行われており、厳格に影響するものは発生初期で致死となるが、別のノックアウトマウスでは出生するものの上皮や肺、膵臓、腸などの器官形成異常が見られる(Ref1)。この様に、EGFR のノックアウトマウスはその遺伝的背景によって様々な表現型を示すことが報告されているが、これらからも EGFR のみがゲフィチニブの副作用の原因であるというには懐疑的である。そういった中、Brehmer らによってプロテオーム解析によるゲフィチニブの新規標的キナーゼの同定が行われ、EGFR と同程度の阻害効果を示すキナーゼとして CyclinG-associated kinase (GAK)と RICK(RIP2)が報告された(Ref2)。申請者はこのうち GAK に注目した。

申請者は、GAK のキナーゼドメインをコードする遺伝子領域を欠失させたノックアウトマウス (GAK-kinase dead: GAK-kd)を用いた解析により、GAK-kd/-マウスは出生時までには生き延びるが、出生直後に血中酸素飽和濃度が上がらず、肺機能不全を発症して 30 分以内に死亡するといった興味深い表現型を示すことを見出した。この原因を調べるために、帝王切開により摘出した新生児の肺について組織化学的解析を行った。まずヘマトキシリン&エオシン染色を行ったところ、野生型と比較して GAK-kd/-マウスでは肺胞構造が異常になっていることが判明した。さらに組織免疫染色を行ったところ、GAK-kd/-マウスでは間質性肺炎のマーカーとしても用いられるサーファクタントタンパク-A (SP-A) や上皮膜マーカーである E-cadherin の分布が異常であった。これらの結果から、GAK のリン酸化活性が阻害されることによって、肺胞の形態形成や機能に異常をきたすということが明らかとなった。これより申請者は、この GAK-kd/-マウスがゲフィチニブによる急性肺障害といった副作用のモデル系になるのではないかと着想した。

Ref.1: Normanno et al Gene 2006, 2: Brehmer et al Cancer Res. 2005

2. 研究の目的

分子標的薬ゲフィチニブは抗癌治療において有効性を示すが、一部の使用例では間質性肺炎といった重篤な副作用により死亡に至る場合があり、より安全な薬への改良にはその副作用の分子機構の解明が急務である。本研究ではゲフィチニブのがん抑制効果と肺機能障害副作用の起こる分子機構の解明を目的として、特に GAK 阻害を介した癌細胞増殖抑制効果と副作用を誘引する機構を明らかにする。また、服用前診断の開発に向け、GAK の一塩基多型(SNP)とゲフィチニブの副作用との相関についても解析を行う。

3. 研究の方法

(1)ゲフィチニブの GAK キナーゼ活性阻害効果について

ゲフィチニブが GAK リン酸化活性を阻害するかどうかについては、³²P 放射性同位体を用いた *in vitro* キナーゼ活性測定法により確かめた。リン酸化基質には、独自に見出した GAK リン酸化基質 (PP2A B') を用いた。

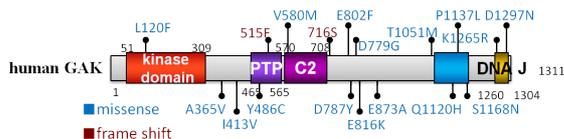
(2)EGF-EGFR シグナルにおける GAK の役割について

EGF-EGFR シグナル活性化状態の解析は、GAK-kd MEF を用いて EGF 刺激時における EGFR や下流シグナル因子 ERK1/2 のリン酸化レベルをウェスタンブロットにより調べた。また、これまでの実験および知見(Ref3-5)より、GAK がクラスリン被覆構造の形成に重要な因子 AP-2 のリン酸化を介してクラスリン依存性エンドサイトーシスを制御するにより EGF-EGFR シグナルを制御しており、この破綻がゲフィチニブによる副作用と相関があると仮定しこれを検証した。まず、GAK による AP2M1 のリン酸化部位 Thr156 を Ala 置換した非リン酸化変異体および Asp 置換した偽リン酸化変異体と野生型 AP2M1 の発現系を構築した。これらを GAK-kd/-MEF に発現させることで、GAK-kd/-MEF で見られた EGFR の恒常的なリン酸化や細胞内取り込みの抑制および下流シグナル伝達の異常といった表現型の回復について調べた。つまり、偽リン酸化変異体で回復すれば GAK が AP2M1 のリン酸化を介して制御を担うということ、さらにどの表現型が回復したかによって GAK がどの機能において役割を果たすかということが明らかとなる。

Ref3: Umeda et.al. Euro.J.Cell Biology 2000, 4: Korolchuk et.al. Traffic 2002, 5: Zhang et.al. Traffic 2005,

(3) GAK 遺伝子の SNP とゲフィチニブによる副作用の相関について

ゲフィチニブの副作用が少数の患者でのみ見られる原因として GAK-SNP に着目した。HapMap 計画等のデータベースによると、GAK 遺伝子内ではアミノ酸変異を伴う SNP は 16 か所同定されている(図 1)。イレッサの服用者で間質性肺炎を併発して死亡した患者の肺癌組織(および周辺の正常部)から抽出したゲノム DNA について GAK コード領域をシークエンスすることにより直接に塩基配列を決定して調べた。これにより、GAK 遺伝子の SNP とゲフィチニブの副作用とに相関が見られるかについて解析を行った。



(図 1)GAK の SNP (数字はアミノ酸数)

(4) GAK のがん細胞増殖抑制における役割について

GAK を標的とするキナーゼの探索には、(1)と同様の *in vitro* キナーゼ活性測定により、今回は GAK を基質として行った。また、細胞分裂期における新規結合因子の探索には、まずがん細胞を薬剤により M 期に同調した細胞と非同調の細胞を用意し、これらの細胞抽出液を用いて免疫沈降を行った。これにより得られた、GAK とその結合因子群を含む沈降物を展開して、特徴的なバンドを質量分析にかけた。また、PP2A を介した機能解析では、同調あるいはガンマ線処理した細胞を用いて、細胞免疫染色や免疫沈降、*in vitro* リン酸化測定を行った。

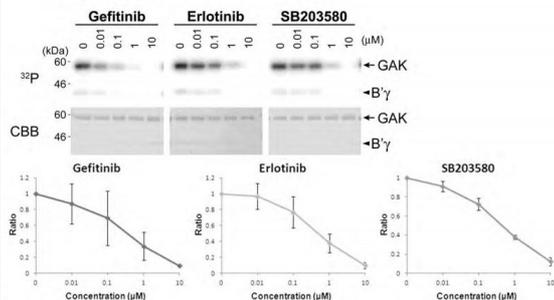
(5) GAK の臨床的特徴と GAK の阻害によるがん細胞抑制効果について

GAK の癌における特徴を調べるために、ヒト前立腺全摘除術サンプルを用いて免疫染色を行うことで発現レベルを調べた。また、癌細胞株における発現レベルは、それぞれの細胞抽出液をウェスタンブロットすることで調べた。また、癌細胞抑制効果については、細胞カウントにより癌細胞の増殖を調べたり、ウェスタンブロットによりカスパーゼ活性化を調べることでアポトーシスの誘導を解析した。

4. 研究成果

(1) ゲフィチニブの GAK キナーゼ活性阻害効果について

ゲフィチニブによって GAK のリン酸化活性が阻害されるかについて、*in vitro* キナーゼ活性測定より調べた。他にも、ゲフィチニブと同様に EGFR を阻害することが知られるエルロチニブについてもその効果を調べた。その結果、ゲフィチニブおよびエルロチニブとも有意に GAK 活性を阻害することが明らかとなった(図 2)。

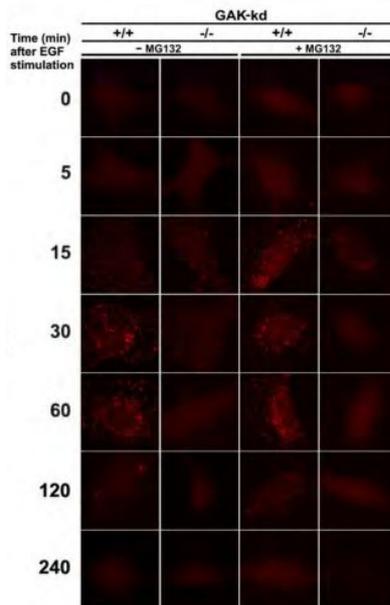


(図 2)キナーゼ活性測定

(2) EGF-EGFR シグナルにおける GAK の役割について

GAK 阻害による EGFR シグナルの活性化への影響を、EGFR や下流シグナル因子の ERK のリン酸化状態を調べることにより検討したところ、GAK-kd-/-MEF では野生型と比較して、恒常的に EGFR が過剰にリン酸化されており、ERK のリン酸化のタイミングにも差が見られた。これについてより詳細にするために、まずリン酸化阻害剤を用いて同様に調べたところ、EGFR の Tyr 残基が過剰リン酸化されていることから、Ser/Thr キナーゼである GAK は何らかの因子を介して EGFR 活性化を調節していることが明らかとなった。

また、EGFR の機能制御にはエンドサイトーシスによる細胞内取り込みも寄与するが、GAK-kd MEF では野生型と比較して EGF 刺激時の EGFR の細胞内取り込みが阻害された(図 3)。



(図 3)GAK-kd-/-MEF では EGFR の細胞内取り込みが阻害されている。

そこで GAK が AP-2 のリン酸化を介したエンドサイトーシスを制御するかについて、GAK の AP2M1 リン酸化部位変異体を GAK-kd MEF に発現させて EGFR の細胞内取り込み異常が回復するか調べたが、顕著な差は見られなかった。これは、AP2M1 が GAK 以外にもリン酸化される可能性や、GAK が全く別の機構で EGF-EGFR シグナルを制御することが考えられた。

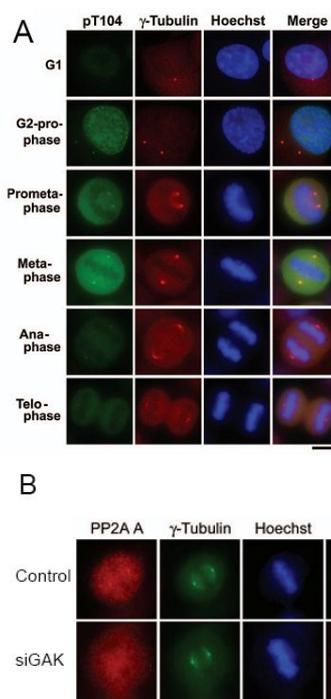
(3) GAK 遺伝子の SNP とゲフィチニブによる副作用の相関について

ゲフィチニブの副作用はごく少数の患者でのみ見られるが、この原因として GAK 遺伝子内の SNP に着目し解析を行った。ゲフィチニブ服用者で間質性肺炎を併発して死亡した患者の肺癌組織由来のゲノム DNA を用い、アミノ酸変異を伴う 16 個の SNP と副作用との連関を調べたが、これらの内では特徴的な GAK-SNP は見付かっていない。

(4) GAK のがん細胞増殖抑制における役割について

ゲフィチニブの GAK 阻害による癌細胞増殖抑制機構を調べるために、GAK が細胞増殖においてどのようなシグナル伝達を担っているのか解析した。これまでの解析より、GAK のキナーゼ活性阻害により、EGFR のリン酸化状態や下流のシグナル伝達の異常が見られたことから、GAK が EGF/EGFR シグナル制御に寄与すると考えられる。GAK のアミノ酸配列には、EGFR と相同なチロシンリン酸化モチーフが存在するため、これを標的とするキナーゼ X1, X2 が GAK をリン酸化する可能性がある。また、我々はこれまでに GAK が細胞周期の M 期の進行に寄与することを明らかにしたことより、この細胞周期進行に関与する PLK, Aurora, Cdc2 などのキナーゼについても GAK を基質とするかについて調べた。この結果、キナーゼ X1, X2 および複数の細胞周期進行関連キナーゼについて GAK を標的とすることが判明した。キナーゼ以外にも、GAK がどのような因子と相互作用しているかについて質量分析を行うことにより調べた。その結果で得られた、候補となる因子との相互作用についての詳細な解析は今後の課題である。

また、我々はこれまでに GAK のリン酸化標的として、細胞周期制御において重要な役割を担う脱リン酸化酵素 PP2A の調節サブユニット B' を同定しそのリン酸化部位を決定した。本研究では、細胞増殖制御における GAK による PP2A B' のリン酸化の意義について解析を行った。細胞免疫染色によりリン酸化 B' は細胞分裂期の中心体や DNA 損傷時の核内フォーカスに局在することを見出した。さらに生化学的解析などにより、このリン酸化が PP2A ホロ酵素の親和性の増加や細胞内分布、脱リン酸化活性の促進を制御することを見出した(図 4)。このような PP2A 機能制御により細胞増殖を調節していることが判明した。



(図 4) PP2A 制御を介した細胞周期制御

(5) GAK の臨床的特徴と GAK 阻害によるがん抑制効果につて

GAK の臨床的特徴を調べるべく、ヒト前立腺全摘除術サンプルを用いて免疫染色を行ったところ、悪性度依存的に GAK が高発現していることが明らかとなった。また、前立腺癌以外にも様々な癌細胞株において GAK が高発現していた。これらのことから、GAK 阻害が癌細胞の増殖抑制に寄与する可能性についても平行して解析を行ったところ、ゲフィチニブと異なる薬剤による GAK 阻害が、カスパーゼの上昇を介して癌細胞のアポトーシスを誘導する可能性が明らかになった。

本研究では、ゲフィチニブによる GAK 阻害が間質性肺炎誘導に寄与する可能性について、どのような分子機構により起こされるのかを解析した。加えて、GAK の細胞増殖制御における役割と癌細胞抑制に対する効果についても明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Naito Y, Yabuta N, Sato J, Ohno S, Sakata M, Kasama T, Ikawa M, Nojima H.

“Recruitment of cyclin G2 to promyelocytic leukemia nuclear bodies promotes dephosphorylation of H2AX following treatment with ionizing radiation.”

Cell Cycle. 査読有り 2013; 12(11):1773-84. doi: 10.4161/cc.24878.

[学会発表](計 0 件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

内藤 陽子 (Naito Yoko)

大阪大学医学系研究科免疫細胞生物学

研究者番号: 10553026

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし