

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792196

研究課題名(和文) カテキンによる上皮増殖因子受容体蛋白分解の分子機構解明と口腔癌増殖抑制作用の検討

研究課題名(英文) Molecular mechanism of catechin on epidermal growth factor receptor protein degradation and growth inhibitory effect of oral cancer

研究代表者

吉村 仁志 (Yoshimura, Hitoshi)

福井大学・医学部・講師

研究者番号：40362917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：上皮増殖因子受容体(EGFR)は頭頸部癌の治療における有用な分子標的である。我々は以下の2点について検討した。1. EGCGによるEGFR分解作用の有用性の分子レベルでの評価。血管平滑筋細胞を用い、EGCGの添加によるEGFRへの影響を評価した。EGCGはEGFR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-プロテアソーム経路の活性化によることが示唆された。2. マウス腫瘍移植モデルにおけるEGCGによる腫瘍増殖抑制効果の判定。口腔扁平上皮癌細胞株であるHSC-3をヌードマウス背部皮下に移植した。今後腫瘍体積、アポトーシス、EGFRの発現、リン酸化について評価する。

研究成果の概要(英文)：Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a useful molecular target in the treatment of head and neck cancer. We examined the following points. 1. Evaluation of the molecular level of the utility of EGFR decomposing action by EGCG. We used the vascular smooth muscle cells that highly expressing EGFR. In our results, EGCG reduced the EGFR at the protein level by activation of ubiquitin over proteasome degradation pathway. 2. Determination of tumor growth inhibitory effect of EGCG in mouse tumor xenograft model. The HSC-3 is oral squamous-cell carcinoma cell lines were transplanted into nude mice subcutaneously. Tumor volume, apoptosis, EGFR expression and phosphorylation is planned to evaluate.

研究分野：口腔癌

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や中和抗体などは、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 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。之までにわれわれは、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った。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た。

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上皮増殖因子受容体 (Epidermal growth factor: EGFR) や血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) 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 依存性タンパク質分解) から成なる。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 (EGCG) という構造類似体がある。申請者は EGFR や PDGFR 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した。

3. 研究の方法

実験は以下のように行った。

(1) 細胞培養

EGFR 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) ウエスタンブロット法

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.

PCR 産物(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, ブロットはデンストメーターで測定しその値を, EGFR 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 (NH₄Cl)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 EGFR 抗体あるいは抗 ubiquitin 抗体を添加し 4°C で一晚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 EGFR の蛋白質レベルでの減少を引き起こした.

(2)EGCG は EGFR 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) EGFR 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 EGFR 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) EGFR 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 EGFR の減少が抑制された.

(5) EGFR 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 EGFR 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 EGFR 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 EGFR のユビキチン化はポリユビキチン化であった.

[考察]

EGFR 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. セツキシマブ(アービータックス®)は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り, 現在臨床応用されている, EGFR 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- 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 EGFR 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 EGFR 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 EGFR 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、この反応に関与するユビキチンリガーゼを同定した上で、論文にて発表したいと考えている。

また、分子標的薬の口腔扁平上皮癌細胞株およびマウス腫瘍移植モデルにおける EGCG による作用増強効果の判定も現在実施中である。口腔扁平上皮癌細胞株である SAS, HSC-2, HSC-3, HSC-4 農地最も増殖浸潤能が高かった HSC-3 を選択し、細胞(2×10^6 個/)を担体に入れてヌードマウス背部皮下に移植した。今後、このマウスをコントロール群とカテキン投与群に分け、処理開始して2週間後、炭酸ガスにより安楽死を図り、癌組織を取り出し、4%PFA で固定後、パラフィン包埋を行い、腫瘍体積を評価する。残存腫瘍を切除し標本を作製し TUNEL 染色にて腫瘍のアポトーシスを評価すると共に、免疫染色にて EGFR の発現およびリン酸化、下流のシグナル分子として ERK, AKT のリン酸化について評価する。結果を待って学会報告および論文発表を予定している。

これまで EGFR の特異的モノクローナル抗体やチロシンキナーゼ活性の特異的阻害剤を用いた治療は検討されているが、EGFR の蛋白質分解機構に重点を置いた治療法は検討されておらず、新しい治療戦略としての可能性を検討につながると考えている。

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 0 件)

〔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)

〔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・講師
研究者番号: 40362917

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし