

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2013～2015
 課題番号：25462686
 研究課題名(和文) 細胞膜脂質構造に着目したEGF受容体内在化を標的とする頭頸部がん治療戦略の確立

 研究課題名(英文) Establishment of a novel strategy for head and neck cancer targeting
 internalization of EGF receptor through alternation of lipid organization

 研究代表者
 藤 賢史 (Toh, Satoshi)

 九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

 研究者番号：20380397

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞増殖因子(EGF)受容体(EGFR)は、様々な癌腫でその進展に関連しており、実臨床においても重要な標的分子となっている。本研究では、EGFR経路を阻害する戦略として、EGFRの内在化を標的とする戦略に関する基礎研究を行った。緑茶カテキンの一種であるEGCGはEGFRの内在化を誘導するが、内在化に関わると考えられるc-srcのリン酸化が観察された。このEGCGによるc-srcのリン酸化はc-srcのパルミトイル化を阻害することで抑制されることから細胞膜へのアンカリングや、細胞膜上での局在が重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：EGFR, which is expressing in various carcinoma cells, plays critical roles of proliferation, invasion and metastasis. Some molecular targeting drugs against EGFR are already applied for cancer patients. In this study, we investigated a mechanism of c-src activation, which might cause internalization of EGFR. EGCG, a constituent of green tea, cause EGFR internalization. This is inhibited by src family kinase inhibitors. Using YCU-H891 cells (head and neck cancer origin), we conducted a EGFR internalization study and found that EGCG induced EGFR internalization was inhibited 2 hydroxypalmitate (N-terminal palmitoylation inhibitor) and G2A-c-src transfection (acting as dominant negative manner about N-terminal palmitoylation of c-src). We also found that EGCG preferentially activate c-src among SFKs. As EGCG and other polyphenol compounds alter lipid organization of membrane, anchoring and localization of c-src might be critical for its activation by EGCG.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：上皮細胞増殖因子受容体

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞増殖因子 (EGF) 受容体 (EGFR) は、種々の癌腫で発現がみられ、その活性化が、発がん、増殖、浸潤、転移といった癌の進展に深く関わっている。既に EGFR を標的とする分子標的薬が臨床応用されている。代表研究者らのこれまでの研究により、天然に存在する化合物が複数のヒト由来の癌細胞株において、上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) の細胞表面からの内在化を誘導し、細胞外からの増殖因子に対する反応を阻害する可能性が示されていた。そのメカニズムとして、src ファミリー蛋白 (SFK) のリン酸化が重要である可能性を示していた。現在臨床応用されている薬剤は EGFR とリガンドの結合阻害やキナーゼ活性を阻害するものである。一方、本研究で注目するのは、EGFR を内在化させるメカニズムで、EGFR を活性化せず内在化させることができれば、リガンド結合を阻害し、細胞内へのシグナルを遮断できる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

(1) SFK の活性化が EGFR 内在化に關与する過程の中で、どのように SFK が活性化することについて明らかにすることを目的とした。
(2) これまでの研究で用いた緑茶カテキンの一つである EGCG 以外の物質 (ポリフェノール類) でも同様の現象が起こるかを検討する。

3. 研究の方法

EGFR を高発現する頭頸部扁平上皮癌細胞株 (YCU-H891) を用いた。SFK のリン酸化はウェスタンブロット法、内在化をみる方法として、細胞膜タンパクビオチン化法をもちいた。

4. 研究成果

(1) EGCG は SFK のリン酸化を誘導する EGFR を発現する細胞株に EGCG 処理を行うと EGFR の内在化が観察されることが分かっていたがその機序は不明であった。EGCG 処理により、細胞膜に主に存在している EGFR は 30 分程度の処理で内在化が観察される。生理的なリガンドの一つである EGF で処理しても同様の内在化が誘導されるが、EGF 処理では EGFR の活性化に引き続き下流のシグナルが活性化される一方、EGCG 処理では活性化は見られず、むしろ細胞増殖は抑制される。これまでの研究で、EGCG 処理後わずか 5 分で SFK のリン酸化が観察され、EGFR 内在化と時間的に符合すること、SFK の阻害剤である PP1 (及び PP2) で EGCG により誘導される EGFR の内在化が抑制されることから、及び、SFK のメンバーの内、c-src が細胞膜のエンドサイトーシスに c-src が関与するとの報告があることから、内在化機序に SFK の活性化が必

要であるとの仮説をたてた。

まず SFK が活性化する条件として、細胞を EGF, EGCG で処理し SFK (Y416) を認識する抗体でプロットした (図 1)。その結果、SFK の活性化が確認された。活性化した蛋白分子量はわずかに異なっており、SFK のファミリー蛋白の中で異なるファミリー蛋白がリン酸化された可能性が示唆された。

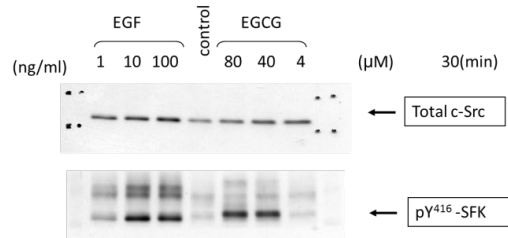


図 1 EGF, EGCG による SFK のリン酸化

(2) EGCG は SFK のうち c-src をリン酸化する EGCG 処理した細胞の cell lysate を抗 c-src 抗体で免疫沈降し、抗 pY⁴¹⁶-SFK 抗体でプロットした (図 2)。その結果、EGCG では c-src のリン酸化が確認された。同様の実験を主要な SFK メンバーである fyn, yes で行ったところ、EGCG でのリン酸化は確認できなかった。このことから、EGCG は SFK メンバーのうち、c-src をリン酸化すると考えられた

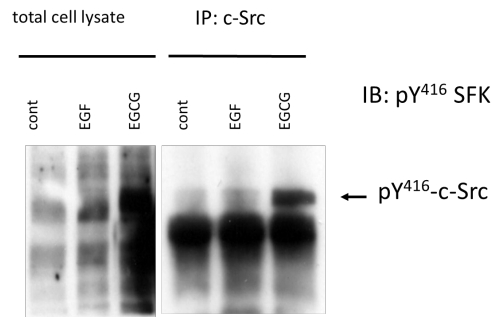


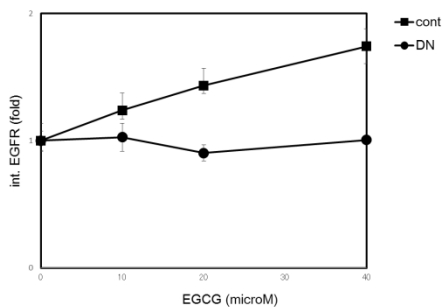
図 2 EGCG 処理で c-src がリン酸化される

(3) c-src のアシル化を阻害すると EGCG 誘導性の EGFR 内在化が阻害される c-src は N 末端に翻訳後付加されたアシル基 (ミリストイル基) により細胞膜に結合している。他方、他の SFK の多くでは、その N 末端はミリストイル基とパルミトイル基の dual acylation で修飾されている。EGCG はアシル基の結合の重要な足場となっている細胞膜の脂質構造を変化させる可能性があり、このことが c-src の活性化の鍵となっていることが予想された。これまでの研究で N 末端のミリストイル化を阻害する 2-hydroxypalmitate (2HM) で処理したところ、EGCG による c-src の活性化は抑制された。2HM は他の SFK のパルミトイル化も同時に阻害するため、本研究では更に c-src のミリスト

イル化に関して dominant negative (DN) に作用すると考えられる G2A c-src を一過性に発現させ、EGFR の内在化を比較した(図 3)。その結果、G2A c-src 導入細胞では、EGCG による EGFR の内在化が抑制されることが示された。

c-src の N 末端のアミノ酸配列は翻訳後修飾であるミリスチル化に重要で、これを阻害することで細胞膜へのアンカリングができなくなることが予想される。

以上から、EGCG による c-src の活性化は細胞膜への結合、あるいは、細胞膜上の局在が重要であることが示唆された。

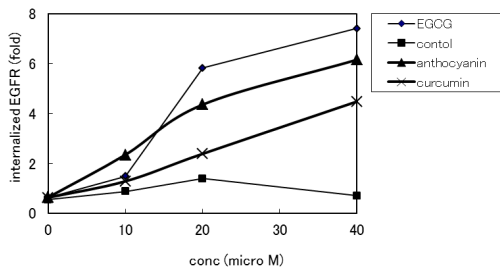


(図 3)EGCG 処理で誘導される EGFR 内在化は DN-c-src で抑制される

(4)EGCG 以外のポリフェノール類でも EGFR の内在化を誘導する

Curcumin, anthocyanin はいずれもポリフェノール化合物であり、研究者らのプレリミナルな研究で細胞膜脂質構造を変化させる可能性を示していた。そこで、これらの物質で EGFR の内在化が誘導されるか否かを検証した。

その結果、比較的高濃度では EGFR の内在化が誘導されることが示された。



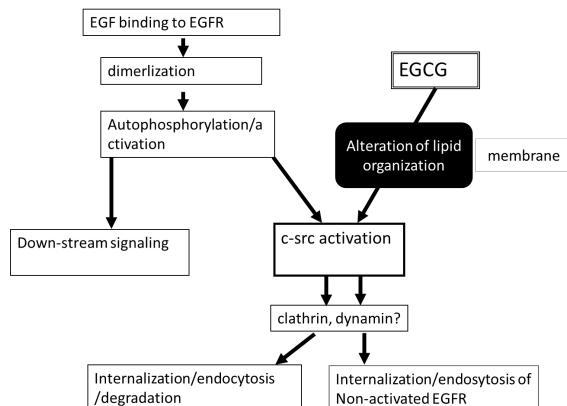
(図 4)各種ポリフェノール化合物による EGFR の内在化

(5)細胞膜脂質構造と EGFR の内在化
細胞膜脂質構造を変化させる物質による処理により EGFR の内在化を誘導することを示した。本研究ではその機序の一部に c-src が関与する可能性が示された。

直接的な内在化の機序は未だ明らかでないが、c-src の細胞膜上の局在の変化がその活性化や EGFR の内在化に関係しているものと推察される。

EGCG は細胞に様々な影響を及ぼすが、その一つが細胞膜脂質構造の変化である。EGFR のような細胞膜貫通型の蛋白や c-src のような細胞膜にアシル基を介して結合する蛋白は、細胞膜上に平均的に分散しているのではなく、細胞膜上で集合・離散を繰り返しており、その集合状態がタンパク間の相互作用(結合、リン酸化)に重要であるとの説がある。この集合体を筏に例え、"lipid raft" と称するが、EGCG (及びポリフェノール化合物など)はこの脂質構造を変化させることで、lipid raft に影響を与え、結果、EGFR 経路のシグナルを遮断したり、内在化を誘導する可能性があるのではないかと考えられた。

疫学的な研究では、EGCG を多く含む緑茶の摂取量は、一部の悪性腫瘍の発症や進展に対して負の相関があるとの報告があり、何らかの機序により生体内で抗腫瘍効果を発する可能性が示唆されている。しかし、多くの基礎研究に用いられる EGCG の濃度は、生体内で達成するには極めて高濃度であることから、EGCG やその他の化合物が臨床的な濃度で EGFR の内在化を誘導するとは考えにくい。この観点からは、本研究で観察された c-src の一過性の活性化は 1 μ M でも確認されており、このことが臨床的に観察される抗腫瘍効果と関連がある可能性があるものと考えられる。このように惹起された c-src のリン酸化はその下流の様々なシグナルを活性化するが、これが clathrin, dynamin, あるいはその他の EGFR (及びその他の受容体型チロシンリン酸化酵素、膜結合型蛋白など)の内在化に関連するタンパク群に作用する可能性があると考えられる。



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2件)

1. Nakano T, Yamamoto H, Nakashima T, Nishijima T, Satoh M, Hatanaka Y, Shiratsuchi H, Yasumatsu R, Toh S, Komune S, Oda Y. Molecular subclassification determined by human papillomavirus and epidermal growth factor receptor status is associated with the prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma. Hum Pathol. 2016 Apr;50:51-61

2. Yamauchi M, Nakano T, Nakashima T, Yasumatsu R, Hashimoto K, Toh S, Shiratsuchi H, Oda Y, Komune S. Interferon Inducible IFI16 Expression in p16 Positive Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx. ISRN Otolaryngol. 2013 Jul 11;2013:263271.

〔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〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤 賢史 (TOH SATOSHI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：20380397

(2)研究分担者

中島 寅彦 (NAKASHIMA TORAHIKO)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：00284505