

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

培養ヒト乳癌細胞 MDA-MB-468 における  
放射線による ERK 活性化とその機序の解析

指導教官 細井 義夫 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

生体物理医学専攻

氏名 李 智平

### [背景と目的]

細胞の放射線感受性に関する研究において、近年細胞膜に存在する増殖因子受容体の一つ epidermal growth factor receptor (EGFR) の放射線による活性化が注目されている。放射線による EGFR の活性化の生理的な意味としては放射線感受性と細胞増殖に影響を及ぼすことである。EGFR と放射線感受性の関係については①EGFR 過剰発現細胞が放射線抵抗性で、② EGFR を過剰発現していない細胞に EGFR 遺伝子を導入し過剰発現させると細胞は放射線抵抗性になり、③ EGFR 阻害剤、EGFR 阻害抗体、dominant negative EGFR により EGFR を阻害すると細胞は放射線感受性になることから、放射線による EGFR の活性化は細胞を放射線抵抗性に導くものと考えられる。このため、EGFR が放射線感受性予測の新たな指標となる可能性や、EGFR 阻害剤による放射線増感の可能性が考えられている。

EGFR は、通常 EGF 等のリガンドが結合し、EGFR の受容体チロシンキナーゼにより自己リン酸化を起こす。EGF による EGFR のリン酸化では serine、threonine、

tyrosine のリン酸化が起こるが、放射線によるリン酸化では tyrosine のみがリン酸化されて serine や threonine のリン酸化は起こらないことから、放射線による EGFR の活性化はリガンドが結合した場合と異なるものと考えられる。EGFR からの情報伝達経路としては、放射線により Grb2、Sos、Ras、Raf-1、Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ )、ERK1/2 (Thr202/Tyr204)、p90 ribosomal S6kinase (p90RSK)、CREB 等の活性化が起こることが報告されている。また、EGFR の阻害剤である AG1478 が照射後の ERK1/2 (Thr202/Tyr204) リン酸化亢進を阻害することから、ERK1/2 (Thr202/Tyr204) の活性化は EGFR を介したものと考えられている。

このように、放射線により EGFR、ERK1/2 (Thr202/Tyr204) の活性化が起こり、細胞が放射線抵抗性になることが報告されているが、放射線による EGFR/ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 活性化の機序は明らかではない。本研究は放射線による EGFR/ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 活性化の機序を明らかにすることを目的とした。

#### [材料と方法]

1. 試薬と抗体: recombinant human epidermal growth factor (EGF) と vanadate は和光純薬工業株式会社(大阪、日本)から、EGFR 阻害剤 4-(3-Chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (AG1478)、Src 阻害剤 (4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo[3,4-D]pyrimidine (PP2) 及び PTP 阻害剤 bis(N,N-Dimethylhydroxamido)hydroxovanadate (DMHV) は Calbiochem (La Jolla, CA) から、phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) 阻害剤 wortmannin は Sigma (Saint Louis, MO) からそれぞれ購入した。抗 phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 抗体、抗 phospho-EGFR (Tyr845) 抗体、抗 phospho-EGFR (Tyr992) 抗体、抗 phospho-EGFR (Tyr1045) 抗体、抗 phospho-EGFR (Tyr1068) 抗体、抗 phospho-SHP-2 (Tyr542) 抗体、抗 SHP-2 抗体、抗 phospho-Src (Tyr416) 抗体、抗 phospho-PTP $\alpha$  (Tyr789) 抗体、抗 phospho-Akt (Ser473) 抗体、抗 Akt 抗体は Cell Signaling Technology (Beverly, MA) から購入した。抗 phospholipase C (PLC) $\gamma$ -1 抗体は Upstate (Lake Placid, NY) から購入した。抗 Src 抗体は Oncogene

Research Products (San Diego, CA) から購入した。抗 EGFR 抗体と抗活性化 EGFR 抗体は Transduction Laboratories (Lexington, KY) から購入した。抗  $\beta$ -actin 抗体は Sigma から購入した。本研究に使われた MDA-MB-468 細胞は American Type Culture Collection (Rockville, MD) から購入した。

2. 細胞培養とサンプル回収：MDA-MB-468 細胞は EGFR を過剰発現している。細胞培養は minimum essential medium (MEM) (Sigma, St. Louis, MO) に 10% fetal bovine serum (FBS) を加えた培地を用いて行った。 $5 \times 10^5$  個の細胞を直径 60mm の dish に播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の インキュベーターで培養し、培地を途中で交換することなく、4 日後に実験に用いた。

3. Western blotting: 細胞は electrophoresis sample buffer [62.5 mM Tris (pH 6.8), 2% SDS, 5% glycerol, 0.003% bromophenol blue, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol] で溶解し、5 分間 100°C で処理した後 15,000 rpm で 10 分間遠心した後、上清を細胞溶解液として Western blotting に用いた。細胞溶解液は 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis により電気泳動し、polyvinylidene difluoride membranes (Milipore Corporation, Bedford, MA) に transfer した。抗体により membrane を処理した後、ECL Plus™ Western blotting detection reagents (Amersham Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ) を用いて検出を行った。

4. X線照射方法：X線照射は島津 X線発生装置 HF350 (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用い、200kV-20mA で、0.5mm Cu+1.0mmAl の フィルターを用いて行った。照射は室温で行い、線量率 1.36Gy/min であった。

#### [結果と考察]

MDA-MB-468 細胞において、0.5-10Gy 放射線により ERK1/2 (Thr202/Tyr204) のリン酸化は照射 2-5 分後と 6 時間後の 2 相性に亢進し、放射線による ERK1/2 (Thr202/Tyr204) の活性化が示唆された。また、これらのリン酸化亢進は EGFR 阻害剤 AG1478 により阻害されたことから、EGFR を介した情報伝達経路に基づいたものが考えられる。しかし、EGFR からの情報伝達経路の活性化に重要

なりリン酸化部位である Tyr845、 Tyr992、 Tyr1045、 Tyr1068 のリン酸化状態を調べた結果、Tyr845、 Tyr1068 のリン酸化亢進が照射後 6 時間後にだけ認められ、ERK1/2 (Thr202/Tyr204) のような 2 相性リン酸化は認められなかった。この結果は、放射線により EGFR のリン酸化が亢進するというこれまでの報告と矛盾する。その原因は、これまでの報告では抗 EGFR 抗体を用いて EGFR を免疫沈降した後に抗 phospho-tyrosine 抗体を用いてリン酸化を検出しているのに対して、本研究ではリン酸化された EGFR の Tyr845、 Tyr992、 Tyr1045、 Tyr1068 に対する特異的な抗体を用いた点が挙げられる。本研究で用いた方法は、これまでの研究における非特異的 tyrosine リン酸化評価する方法より正確と考えられる。

SHP-2 (Tyr542) の照射後のリン酸化タイムコースは放射線による ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 活性化のタイムコースとほぼ一致していることと、SHP-2 が EGFR を活性化する方向に制御することから SHP-2 (Tyr542) の活性化が ERK1/2 (Thr202/Tyr204) の活性化に関与していることが考えられる。さらに、SHP-2 (Tyr542) と ERK1/2 (Thr202/Tyr204) のリン酸化亢進が Src 阻害剤 PP2 によって阻害されることから、SHP-2 (Tyr542) と ERK1/2 (Thr202/Tyr204) の活性化が Src に依存しているものであることが示唆された。

Src は活性制御に関する 2 つの重要なリン酸化部位を持ち、Tyr416 がリン酸化されると活性化され、Tyr527 がリン酸化されると不活性化される。PTP $\alpha$  は Src (Tyr527) を脱リン酸化し、Src を活性化することが報告されている。本研究では、PTP $\alpha$  は照射 1-6 時間後に Tyr789 のリン酸化が亢進し活性化することが示唆された。Src (Tyr416) のリン酸化も照射 1-6 時間後に亢進することから、PTP $\alpha$  による Src が活性化される可能性が考えられた。更に、SHP-2 は Src をリン酸化することなく活性化することが報告されている。Src (Tyr416) のリン酸化は照射後 2-5 分後に変化が認められなかったが、SHP-2 が Src をリン酸化することなく、活性化している可能性が考えられた。

UV や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は PTP を阻害して EGFR の transactivation を介して ERK1/2 (Thr202/Tyr204) を活性化することが報告されていることから、放射線も

同様な機序により ERK1/2 (Thr202/Tyr204) を活性化している可能性が考えられる。この可能性を検討するために、PTP 阻害剤 DMHV により PTP を不活性化した場合の、EGFR や ERK1/2 (Thr202/Tyr204) のリン酸化状態に及ぼす影響を検討した。低濃度 (6.25-25  $\mu$ M) の DMHV は EGFR (Tyr845) と EGFR (Tyr1068) のリン酸化を低下させたにもかかわらず ERK1/2 (Thr202/Tyr204) のリン酸化を亢進させた。DMHV による ERK1/2 (Thr202/Tyr204) のリン酸化亢進は EGFR 阻害剤 AG1478 と Src 阻害剤 PP2 によって阻害されたことから、EGFR、Src を介した情報伝達経路によるものと考えられる。これらの現象は放射線により誘導された現象と非常によく似ている。このため、軽度の PTP 阻害が放射線により誘導されている可能性が考えられる。

本研究では、放射線照射 2-5 分後に SHP-2 (Tyr542)、ERK1/2 (Thr202/Tyr204) のリン酸化が認められ、Src 阻害剤 PP2 が SHP-2 (Tyr542) と ERK1/2 (Thr202/Tyr204) のリン酸化を阻害し、EGFR 阻害剤 AG1478 が ERK1/2 (Thr202/Tyr204) のリン酸化を阻害することから、放射線による ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 活性化の機序が Src に依存した EGFR の transactivation を介したものであることを明らかにされた。

今後の研究課題としては、放射線が Src 活性に及ぼす影響とその機序を解明していくことが重要である。放射線による EGFR の活性化が細胞を放射線抵抗性にすることから、EGFR とその上流のシグナル伝達経路を解明することが新たな放射線増感剤の開発につながるものと期待される。