



Title	Gefitinib ( “Iressa” , ZD1839) inhibits SN38-triggered EGF signals and IL-8 production in gastric cancer cells
Author(s)	岸田, 修
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45510">https://hdl.handle.net/11094/45510</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	きし だ おさむ 岸 田 修
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 9 2 7 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学 位 論 文 名	Gefitinib ("Iressa", ZD1839) inhibits SN38-triggered EGF signals and IL-8 production in gastric cancer cells (ゲフィチニブ(イレッサ、ZD1839)は胃癌細胞株において SN38 による EGF シグナル増強作用および IL-8 誘導作用を抑制する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 下村伊一郎  (副査) 教 授 林 紀夫 教 授 門田 守人

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目的〕

EGF シグナルは癌の増殖、浸潤、転移、アポトーシス阻止に重要な役割を果たしており EGF 受容体 (EGFR) は癌治療の分子標的として着目されている。一方、抗癌剤に対する癌細胞のストレス応答は抗癌剤抵抗性に関わるシグナルを惹起する可能性が示唆されているが、抗癌剤そのものが癌細胞の EGF シグナルに影響を及ぼすか否かは明らかでなかった。そこで、本研究では抗癌剤が胃癌細胞株の EGF シグナルに及ぼす影響とそのメカニズムを明らかにし、さらに抗癌剤と EGFR 阻害剤との併用効果を検討することを目的とした。

#### 〔方法ならびに成績〕

- 胃癌治療に使用される 5 種類の抗癌剤 (CPT-11 の活性体 SN38、CDDP、Taxol、5FU、DNR) の IC<sub>50</sub> (50% 細胞増殖阻止濃度) を MTT assay により算定し、これに基づいた濃度の抗癌剤を胃癌細胞株 AGS に添加した。抗 EGFR 抗体による免疫沈降法および抗チロシンリン酸化抗体を用いた Western blot 法による解析の結果、SN38 が EGFR のチロシンリン酸化を誘導し易い事が分かった。この現象は他の胃癌細胞株 (MKN28・74) においても認められた。
- この機序を明らかにするために細胞内メディエーターとして H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と PKC (protein kinase C) に着目した。① SN38 による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生を H<sub>2</sub>-DCFDA プローブを用いて FACScan で解析した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の産生は SN38 添加後早期に認められ、1 時間以内にピークを示し以後漸減した。② SN38 による EGFR のリン酸化と EGFR リガンド TGF- $\alpha$  のタンパク分泌における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> およびメタロプロテアーゼの関与を調べるために、抗酸化剤 NAC (N-acetyl-L-cysteine) とメタロプロテアーゼ阻害剤 (GM6001、TAPI-2) を用いた。Western blot 法および ELISA 法による検討の結果、いずれの阻害剤もこれらを抑制した。③ SN38 がリン酸化 PKC を誘導するかを Western blot 法で検討したところ、classical PKC ( $\alpha/\beta$  II)、novel PKC ( $\delta$ )、atypical PKC ( $\zeta/\lambda$ ) の各種リン酸化 PKC アイソフォームが誘導された。また、PKC 阻害剤 (GF109203X、Go6976、Rottlerin) は SN38 による EGFR リン酸化と TGF- $\alpha$  タンパク分泌を部分的に抑制した。④ SN38 誘導リン酸化 PKC の細胞内 translocation における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の関与を調べるために、

SN38 単独添加時と抗酸化剤 NAC 併用時とを比較した。これらを添加後回収したタンパクを超遠心で膜分画と細胞質分画に分類し、抗 phospho-pan-PKC 抗体を用いて Western blot 法で検討した。その結果、NAC 併用 SN38 はリン酸化 PKC の細胞質から細胞膜への著明な translocation を誘導したが、SN38 単独ではこれが部分的に抑制された。以上より SN38 が EGFR を活性化する機序として、 $H_2O_2$  の産生およびリン酸化 PKC の細胞膜への translocation (部分的に  $H_2O_2$  により抑制) を介したメタロプロテアーゼの活性化と、それに続く膜型 EGFR リガンドの shedding が関与していることが示唆された。

3. 続いて、SN38 が EGFR の活性化を介して細胞の分化増殖に関わる EGFR リガンドを誘導するかを検討した。AR・HB-EGF は mRNA レベルで、TGF- $\alpha$  は転写後発現調節を受けるのでそれぞれ Northern blot 法と ELISA 法で解析した。いずれも SN38 により発現が誘導されたが、これらは EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 gefitinib の併用により抑制された。さらに、血管新生因子で胃癌の予後規定因子でもある IL-8 の誘導に関して検討した。IL-8 の発現は mRNA・タンパクいずれのレベルでも認められ、これらは gefitinib の併用により抑制された。また IL-8 のプロモーター領域には転写因子 NF- $\kappa$ B・AP-1 の結合部位があるので核タンパクの DNA 結合活性を EMSA 法で検討した。SN38 はいずれの転写因子の DNA 結合活性も増加させたが、これらは gefitinib の併用により抑制された。

#### 〔総括〕

SN38 (CPT-11 の活性体) は、胃癌細胞株において  $H_2O_2$  の生成および PKC の誘導を介して EGF 受容体を活性化し、生存シグナルを誘導した。Gefitinib はこれらのシグナルを抑制するので、CPT-11 単独と比較して Gefitinib の併用により抗腫瘍効果が高まると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、抗癌剤が EGF 受容体 (EGFR) の活性化を介して、抗癌剤感受性低下に関わるシグナルを惹起する可能性があることを、胃癌細胞株を用いて初めて明らかにした。本研究により、SN38 (CPT-11 の活性体) が EGFR を活性化し易いこと、この機序として、活性酸素の産生および PKC の誘導を介したメタロプロテアーゼの活性化と、それに続く膜型 EGFR リガンドの shedding が関与していることが明らかとなった。さらに、EGFR 活性化を介して EGFR リガンドや血管新生因子 IL-8 が誘導されることが示された。一方、EGFR 阻害剤 Gefitinib の併用は、これら SN38 誘導生存シグナルの抑制により、CPT-11 感受性を高める可能性が示唆された。本研究は、抗癌剤感受性低下に関する新たな機序を提唱すると共に、その克服法まで言及されている点が優れており、学位に値すると考える。