

Title	Gefitinib-sensitive EGFR lacking residues 746-750 exhibits hypophosphorylation at tyrosine residue 1045, hypoubiquitination and impaired endocytosis.
Author(s)	古川, 貢
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47407
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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	ふる 古 かわ 川 みつぎ 貢
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 0 9 3 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学 位 論 文 名	Gefitinib-sensitive EGFR lacking residues 746-750 exhibits hypophosphorylation at tyrosine residue 1045, hypoubiquitination and impaired endocytosis. (ゲフィチニブ感受性に関与するアミノ酸 746-750 残基を欠いた変異型上皮成長因子受容体はチロシン残基 1045 位のリン酸化とユビキチン化が減弱しエンドサイトーシスが障害される。)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 川瀬 一郎 (副査) 教 授 金倉 譲 教 授 仲野 徹

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

非小細胞肺癌 (NSCLC) の分子標的薬である gefitinib (イレッサ) に対する感受性と相關する上皮成長因子受容体 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) の変異型がいくつか報告されている。その変異型 EGFR のうち、特に頻度の高いアミノ酸 746-750 を欠いた EGFR を中心にその生化学的特性を解析し、アミノ酸 858 の点変異型 EGFR の下流シグナルとの相違についても一部解析を加えた。

〔方法ならびに成績〕

内因性の EGFR を発現していないマウス線維芽細胞株 NR6 を親株として、野生型 EGFR を発現する NE99、NE2002 (前者が強発現)、746-750 を欠いた (del746-750) EGFR (欠失型 EGFR) を発現する NR/Del、858 の点変異 (L858R) した EGFR を発現する NR858 を作成し解析した。また野生型 EGFR、del746-750 を有する EGFR、L858R を有する EGFR をそれぞれの発現ベクターを一過性にサル腎臓由来の COS-7 に発現させ、併せて解析した。EGFR 下流シグナルやリン酸化パターン、EGFR のユビキチン化などは適宜免疫沈降法も用いながらウェスタンブロッティング法で解析した。また細胞表面の蛋白解析のためビオチンで標識してストレプトアビジンで検出した。

(1) EGFR の下流シグナル: NR6 を親株とする NE99、NE2002、NR/Del、NR858 の EGF 刺激後の EGFR の下流シグナルである Erk、Akt、STAT5 のリン酸化を解析したところ、STAT5 のシグナルは弱く明らかな差は見出せなかったが、Erk、Akt に関しては NR/Del が NE99、NE2002 に比べてピークは弱いものの、リン酸化の遷延化が見られた。それに対して NR858 は NE99、NE2002 と大きな違いは認めなかった。

(2) EGFR のリン酸化パターン: EGF 刺激による EGFR のチロシン残基の自己リン酸化パターンを解析した。NR/Del は NE2002 と比べて EGFR のチロシン残基 845 が EGF 刺激前よりリン酸化されていること、残基 992 と 1068 で EGF 刺激後のピークが弱いこと、残基 1045 では EGF 刺激後もリン酸化がみられなかった。一方 NR858 ではチロ

シン残基 1068 と 1045 について解析したが NE99 との違いは認めなかった。COS-7 を用いた検討でも、欠失型 EGFR では EGF 刺激後のチロシン残基 1045 のリン酸化を認めなかった。

(3) EGFR の膜滞在、ユビキチン化：欠失型 EGFR と野生型 EGFR でリン酸化の程度に相違のあったチロシン残基 1045 は EGFR のユビキチン化や分解、エンドサイトーシスなどに関与する Cbl 蛋白の主な結合部位である。今回の検討では欠失型 EGFR と内因性 Cbl の関連は明らかにできなかったが、NE2002 と NR/Del や COS-7 を用いた検討では、EGF 刺激後の EGFR の分解について欠失型 EGFR が野生型 EGFR と比べて遷延化し、ビオチンを用いた細胞膜表面上 EGFR の解析において EGF 刺激後のエンドサイトーシスが障害されていることを明らかにした。また COS-7 を用いた検討で野生型 EGFR を発現させた細胞は EGF 刺激後のユビキチン化が増強するのに対し、欠失型 EGFR を発現させた細胞では EGF 刺激後欠失型 EGFR のユビキチン化は増強しなかった。一方 858 の点変異 (L858R) した EGFR に関して COS-7 を用いて EGFR の分解について解析したが、野生型 EGFR を比べて大きな違いは認めなかった。

〔総括〕

チロシン残基 1045 のリン酸化が減弱することによって、ユビキチン化やエンドサイトーシスが障害され、下流シグナルである Erk と Akt のリン酸化が遷延化することが 746-750 を欠く変異型 EGFR の独特のシグナル異常に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

非小細胞肺癌の分子標的薬である gefitinib (イレッサ) に対する感受性と相関する上皮成長因子受容体 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) の変異型がいくつか報告されているが、その生化学的特徴を解明することは臨床的にも新たな治療の開発に結びつくことが期待される。この研究では欠失型 EGFR (del746-750) ではチロシン残基 1045 のリン酸化が減弱することによって、ユビキチン化やエンドサイトーシスが障害され、下流シグナルである Erk と Akt のリン酸化が遷延化することが示されたが、同じくイレッサと感受性を認める点変異型 EGFR (L858R) ではこのような減少は認められなかった。以上より 746-750 を欠く変異型 EGFR は独特のシグナル異常に関与している可能性が示唆され、これらの生化学的特徴を提示したことは意義深く、学位授与に値するものと考えられる。