

EGFR 阻害薬 Gefitinib および Erlotinib による
eIF2 α のリン酸化に関する研究

2015

小山 智志

目次

総論の部

緒言	1
----	---

第一章 Gefitinib および Erlotinib による eIF2 α のリン酸化と肺胞上皮細胞の増殖抑制	5
---	---

第一節 Gefitinib および Erlotinib による小胞体ストレス関連分子の変動	
第二節 Gefitinib および Erlotinib による eIF2 α /ATF4 経路の活性化	
第三節 Gefitinib および Erlotinib による A549 細胞の細胞死と増殖抑制の評価	
第四節 Gefitinib および Erlotinib による eIF2 α のリン酸化に対する TUDCA の影響	
第五節 Gefitinib および Erlotinib による eIF2 α のリン酸化に対する EGFR knockdown の影響	
第六節 PC-9 細胞に対する Gefitinib および Erlotinib の影響	
考察	

第二章 Gefitinib および Erlotinib による eIF2 α リン酸化機序の解析	27
---	----

第一節 リン酸化過程の解析	
第二節 脱リン酸化過程の解析	
第三節 様々な分子標的薬の eIF2 α リン酸化レベルに対する影響	
考察	

結論	42
----	----

謝辞	44
----	----

実験の部

第一章 実験の部	45
----------	----

第二章 実験の部	49
----------	----

論文目録	51
------	----

引用文献	52
------	----

略語表

AARE:	amino acid response element
ALK:	anaplastic lymphoma kinase
ATF4:	activating transcription factor 4
BIM:	Bcl-2 interacting mediator of cell death
BIP:	binding immunoglobulin protein
CHOP:	C/EBP homologous protein
CReP:	constitutive revertor of eIF2 α phosphorylation
DDR2:	discoidin domain receptor 2
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO:	dimethylsulfoxide
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR:	epidermal growth factor receptor
eIF2:	eukaryotic initiation factor 2
EML4:	echinoderm microtubule associated protein like 4
ERSE:	endoplasmic reticulum stress response element
FBS:	fetal bovine serum
FGFR1:	fibroblast growth factor receptor 1
GADD34:	growth arrest and DNA damage 34
GCN2:	general control nonderepressible 2
HEPES:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRD1:	HMG-CoA reductase degradation 1
HRI:	heme regulated inhibitor kinase
HSP70:	heat shock protein 70
IRE1:	inositol requiring kinase 1
KRAS:	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPK:	mitogen activated protein kinase
MET:	mesenchymal epithelial transition factor proto-oncogene
MTT:	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2 <i>H</i> -tetrazolium bromide

PARK2:	Parkinson juvenile disease protein 2
PERK:	protein kinase-R like ER kinase
PKR:	protein kinase RNA-activated
PPP1R:	protein phosphatase 1 regulatory subunits
PP1:	protein phosphatase 1
RET:	rearranged during transfection
ROS1:	c-Ros oncogene 1
RPMI1640:	Roswell Park Memorial Institute 1640
SEL1:	suppressor or enhancer of lin-12 1
STAT3:	signal transducer and activator of transcription 3
TUDCA:	tauroursodeoxycholic acid
uORF:	upstream open reading frame
UPR:	unfolded protein response
UPRE:	unfolded protein response element
XBP1:	X-box binding protein 1

総論の部

緒言

悪性腫瘍は、生体の調和を無視して異常に増殖する性質を獲得した細胞および組織であり、現代社会において世界的に主要な死亡原因の一つとなっている¹。2000年、HanahanとWeinbergは悪性腫瘍が持つ特徴を(1)増殖シグナルの自己充足、(2)増殖抑制シグナルへの不応答、(3)アポトーシスの回避、(4)無制限な複製力、(5)持続的な血管新生、(6)組織への浸潤と転移、の6つに分類した²。さらに2011年、同著者らは近年の悪性腫瘍に対する理解を反映し、(7)エネルギー代謝の異常調節、(8)ゲノムの不安定性と変異、(9)発癌を促進する炎症、(10)免疫系による破壊の回避、の4つの特徴を追加した³。一方、悪性腫瘍の中で、気管、気管支、肺に病変が存在するものを一般に肺癌と総称する。肺癌は癌種別死亡数の中で最も多い悪性腫瘍の一つである¹。肺癌は小細胞癌と非小細胞肺癌の2つに大きく分けられ、肺癌と診断される症例の約85%は組織分類上では扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌などである。

近年、肺癌における癌遺伝子の同定が進み、癌細胞に生じている変異に関する知見が蓄積してきた。例えば、非喫煙者の肺腺癌患者の約半数に epidermal growth factor receptor (*EGFR*) 遺伝子変異があり、20%に anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) 遺伝子の再構成、その他にも Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*) 遺伝子変異や c-Ros oncogene 1 (*ROS1*) 遺伝子の再構成などが報告されている⁴。また、喫煙との関連が深い扁平上皮癌の場合、discoidin domain receptor 2 (*DDR2*) 遺伝子の変異や fibroblast growth factor receptor 1 (*FGFR1*) 遺伝子の増幅などが報告されている⁵。このような研究の進展に伴い、癌細胞が持つ遺伝子変異の産物を作用標的とする分子標的薬の開発が盛んに行われている。*EGFR* 遺伝子変異が陽性の場合には第一世代 *EGFR* 阻害薬である Gefitinib や Erlotinib、第二世代 *EGFR* 阻害薬である Afatinib が選択されている。Echinoderm microtubule associated protein like 4 (*EML4*) -*ALK* 融合遺伝子に対しては Crizotinib が使用されており、その他にも mesenchymal epithelial transition factor proto-oncogene (*MET*) 遺伝子変異や rearranged during transfection (*RET*) 遺伝子などを標的とした既存薬の適応拡大も検討されている⁵。

このような肺癌の持つ変異に対応した治療薬の実現の端緒となったのは、非小細胞

肺癌の治療薬として世界に先駆けて我が国で承認された EGFR 阻害薬 Gefitinib である。Gefitinib が 2002 年に承認された当時の適応症は「手術不能または再発非小細胞肺癌」であったが、一部の患者（いわゆる super responder）においては著明な効果を発揮することが知られていた。アジア人、非喫煙者、腺癌、女性といった患者集団において治療反応性が良好であることが報告され^{6,7}、さらに EGFR 遺伝子変異が Gefitinib の治療反応性の指標となり得ることが発見された^{8,9}。2011 年の再審査において「EGFR 遺伝子変異陽性の手術不能又は再発非小細胞肺癌」に適応症が改められた。また、同じ EGFR 阻害薬として Erlotinib も 2007 年に承認された。EGFR 阻害薬は、EGFR 遺伝子変異による患者選定によって、高い奏効率、高い腫瘍縮小効果を示す^{10,11}。

一方、EGFR 阻害薬は副作用が問題となる。特徴的な副作用としては高頻度に起きる皮疹や下痢があるが、特に重篤な副作用としては間質性肺疾患が挙げられ、その病態は致死的である^{12,13}。間質性肺疾患とは、間質において炎症が起き、肺実質および間質組織が破壊されていく複数の病態の総称である。呼吸困難や乾性咳嗽といった症状を呈し、胸部 X 線 CT 所見としてすりガラス状陰影が認められる。Gefitinib と Erlotinib のどちらにおいても、間質性肺疾患の死亡率は 30%以上と報告されている。このように間質性肺疾患は極めて致死的であるため、EGFR 阻害薬による治療中に間質性肺疾患の兆候が見られた場合には薬物の投与を中断することになり、肺癌治療の継続が困難となる。

EGFR 阻害薬による間質性肺疾患の発症機序は未解明な点が多い。米国 FDA から 2015 年 9 月に承認された Osimertinib (AZD9291) は、EGFR 阻害薬耐性変異である T790M 変異型 EGFR に作用する第三世代 EGFR 阻害薬として開発された。本薬剤は、野生型 EGFR に対する阻害作用は著しく低いにも関わらず間質性肺疾患が報告されている。すなわち、EGFR 阻害薬による間質性肺疾患は EGFR を標的とする作用だけでは説明できない。また、EGFR に関連しないその他の機序として、Gefitinib が炎症を悪化させて急性肺障害を増悪することや choline 取り込みトランスポーターを阻害すること、heat shock protein 70 (HSP70) の関与など様々な報告がなされているが¹⁴⁻¹⁶、依然として間質性肺疾患の発症機序が解明されたとは言い難い。

これらの背景を踏まえ、著者は、EGFR 阻害薬による間質性肺疾患の発症機序の解明を目的として以下の検討を行った。第一章では、小胞体ストレスに関連したシグナ

ルに着目した解析を行い、Gefitinib と Erlotinib が eIF2 α をリン酸化することを見出した。また第二章では、第一章で得られた知見に基づいて、Gefitinib および Erlotinib による eIF2 α のリン酸化機序の解析を試みた。

以下、本研究により得られた結果を論述する。

第一章 Gefitinib および Erlotinib による eIF2 α のリン酸化と肺胞上皮細胞の増殖抑制

肺は、空気中から体内に酸素を取り込み、二酸化炭素を体外に除去する生命活動に必須の呼吸器官である。EGFR 阻害薬投与中に重篤な呼吸困難を呈する間質性肺疾患を発症した患者は、抗癌剤による治療を中断しなければならない。EGFR 阻害薬による間質性肺疾患は投与開始後 2、3 週間以内に発症することが多いため、その使用には「少なくとも投与開始後 4 週間は入院またはそれに準ずる管理の下で、間質性肺炎等の重篤な副作用発現に関する観察を十分に行うこと」が定められている。また、Gefitinib による間質性肺疾患のリスクは、間質性肺疾患の既往を有するか全身状態が不良な高齢の喫煙者において高まる傾向にある¹⁷。非小細胞肺癌患者における間質性肺疾患の背景は複雑であり、喫煙などによる慢性的な組織障害に加え、肺癌自体が肺を障害し、さらに肺癌に対する放射線療法や化学療法による破壊などが重なり、肺の状態が間質性肺疾患を発症しやすい状態となっている。このように障害を受けている肺では組織の修復が盛んに行われていると考えられるが、そのような状態で EGFR 阻害薬を投与すると、肺組織の修復が阻害されることにより間質性肺疾患の発症リスクをさらに増大させると考えられている¹⁸。このような指摘を総合的に考えると、間質性肺疾患が EGFR 阻害薬の投与開始後早期に発症しやすいのは、間質性肺疾患の発症が投与開始時に肺が障害されているか否かに依存するためであり、障害のない健康な肺に対する影響は比較的少ないと推測される。

肺の構造は、気管から気管支および細気管支で分岐し終末細気管支から肺胞へと繋がる樹状構造を成す。肺全体で約 3 億個存在すると言われている肺胞は直径およそ 300 μm の小胞であり、その肺胞壁は主に I 型肺胞上皮細胞と II 型肺胞上皮細胞で覆われている。I 型肺胞上皮細胞は薄く扁平で肺胞表面積の 90% 以上を占めており、ガス交換を担っている。II 型肺胞上皮細胞は立方形の細胞で、肺胞の虚脱を防ぐための各種 surfactant protein を産生、分泌している。一般に、薬物や毒物など肺組織に障害を与える刺激に対して I 型肺胞上皮細胞は II 型肺胞上皮細胞に比べ脆弱であり、I 型肺胞上皮細胞の脱落は多くの気腫病変に見られる所見である¹⁹。そのような場合、II 型肺胞上皮細胞が増殖し、I 型に分化することで肺胞を修復すると言われている²⁰。

以上を考慮すると、EGFR 阻害薬による II 型肺胞上皮細胞の細胞死や増殖抑制に対

する影響について明らかにすることは、EGFR 阻害薬による間質性肺疾患の発症機序の解明において重要であると考えられる。本研究では、ヒト肺胞上皮性でⅡ型肺胞上皮細胞と同様に surfactant protein を産生することや細胞内にラメラ体を形成することが知られており、かつ EGFR 遺伝子が野生型である A549 細胞をⅡ型肺胞上皮細胞のモデルとして用いた。

EGFR 阻害薬は細胞内の cyclin-D1 レベルを低下させ、細胞周期を G1 期で停止させることが知られている²¹⁻²³。Eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) は翻訳開始複合体を形成する分子の一つであるが、その α サブユニット (eIF2 α) のリン酸化は、マウス胚線維芽細胞において cyclin-D1 の発現を減少させると報告されており^{24,25}、細胞内の mRNA からタンパク質への翻訳を抑制することが知られている^{26,27}。2011 年、Namba らは Gefitinib が A549 細胞において HSP70 の翻訳を抑制することを報告した¹⁶。リン酸化 eIF2 α は GDP 結合型 eIF2 を GTP 結合型 eIF2 へと変換する酵素である eIF2B に結合してその働きを阻害することにより、細胞内 GTP 結合型 eIF2 を枯渇させて翻訳を抑制する²⁶。このような eIF2 α のリン酸化から翻訳抑制に至る経路の活性化は、小胞体ストレスに対する主要な細胞応答の一つである²⁷。小胞体ストレスはいくつかの肺障害では原因の一つとして報告されてきた。Surfactant protein C における L188Q 変異は、家族性間質性肺炎の家系から見出された変異であり、マウスⅡ型肺胞上皮細胞において小胞体ストレスを惹起することが示されている^{28,29}。小胞体ストレスは、タバコの煙や除草剤である paraquat といった化合物による肺障害にも関与する^{30,31}。一方、Imatinib、Sorafenib や Dasatinib といったいくつかの分子標的薬では小胞体ストレスを惹起することが報告されている³²⁻³⁴。従って、Gefitinib と Erlotinib による間質性肺疾患の病態にも小胞体ストレスが関与している可能性が考えられた。

以上を踏まえ、本章では、A549 細胞をⅡ型肺胞上皮細胞のモデルとして用い、Gefitinib および Erlotinib が小胞体ストレスに関連したシグナル経路に与える影響と間質性肺疾患の発症との関連性について検討した。

第一節 Gefitinib および Erlotinib による小胞体ストレス関連分子の変動

細胞の小胞体ストレス応答シグナル unfolded protein response (UPR) の関連分子に対する Gefitinib と Erlotinib の影響を検討するため、A549 細胞に両薬物を処置し、24 および 48 時間後の関連遺伝子の mRNA 発現量を real-time PCR 法により定量した。E3 ユビキチンリガーゼである Parkinson juvenile disease protein 2 (*PARK2*)³⁵ およびアポトーシス調節因子である C/EBP homologous protein (*CHOP*)^{36,37} の mRNA 発現は Gefitinib および Erlotinib のどちらの処置によっても有意に上昇した (Figure I-1)。小胞体ストレスによって誘導されるシャペロン分子である binding immunoglobulin protein (*BIP*)^{38,39} の mRNA 発現は、Gefitinib、Erlotinib の処置により一時的に低下したが、48 時間では処置前のレベルまで回復した。E3 ユビキチンリガーゼである HMG-CoA reductase degradation 1 (*HRD1*)⁴⁰ や *HRD1* の安定化因子である suppressor or enhancer of lin-12 1 (*SEL1*)⁴¹ の mRNA 発現は Gefitinib や Erlotinib による影響を受けなかった (Figure I-1)。

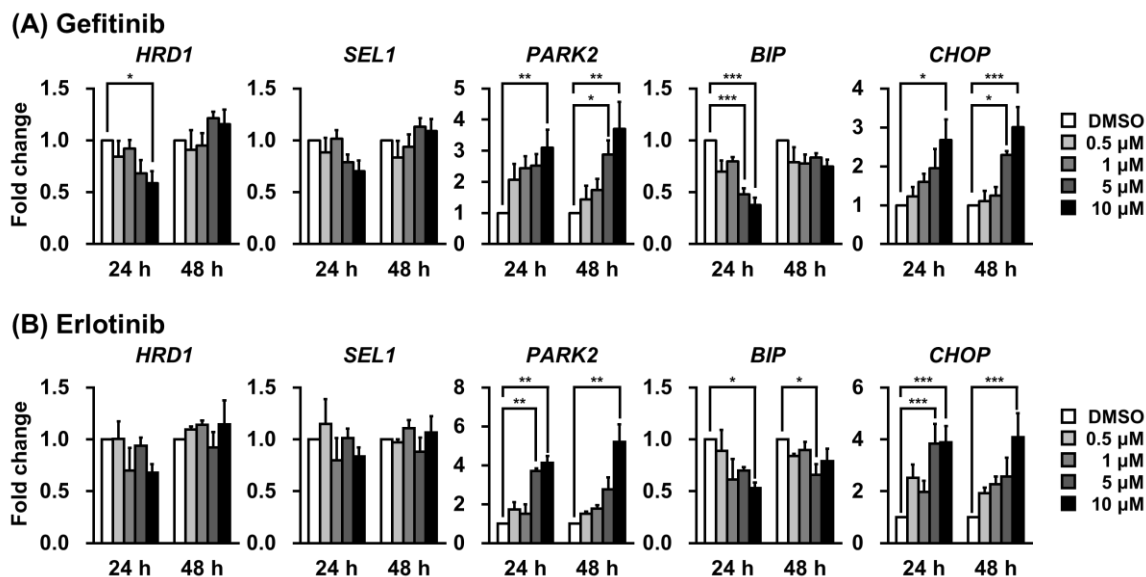


Figure I-1. mRNA expression of UPR-related genes in A549 cells treated with (A) gefitinib and (B) erlotinib.

A549 cells were treated with gefitinib or erlotinib (0.5-10 μM) for 24 and 48 h accordingly. Each mRNA expression level was normalized to *18S rRNA* level, and plotted relative to the control value (designated as 1.0). Data are expressed as means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. Asterisks indicate significant differences from DMSO group (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$, one-way ANOVA with Dunnett's test).

10 μ M の Gefitinib および Erlotinib を処置した A549 細胞において、CHOP のタンパク質発現は薬物処置の3時間後から僅かに上昇し、6 から 12 時間後をピークとして、その後低下した (Figure I-2)。一方、Bip に関してはタンパク質発現量の変動は見られなかった。*PARK2* 遺伝子によりコードされる Parkin は検出できなかった。これは、A549 細胞における Parkin の発現量が低く、検出限界以下であったためと考えられた。小胞体ストレスを誘導する tunicamycin は、A549 細胞における CHOP および Bip のタンパク質発現を顕著に増加させた (Figure I-2)。

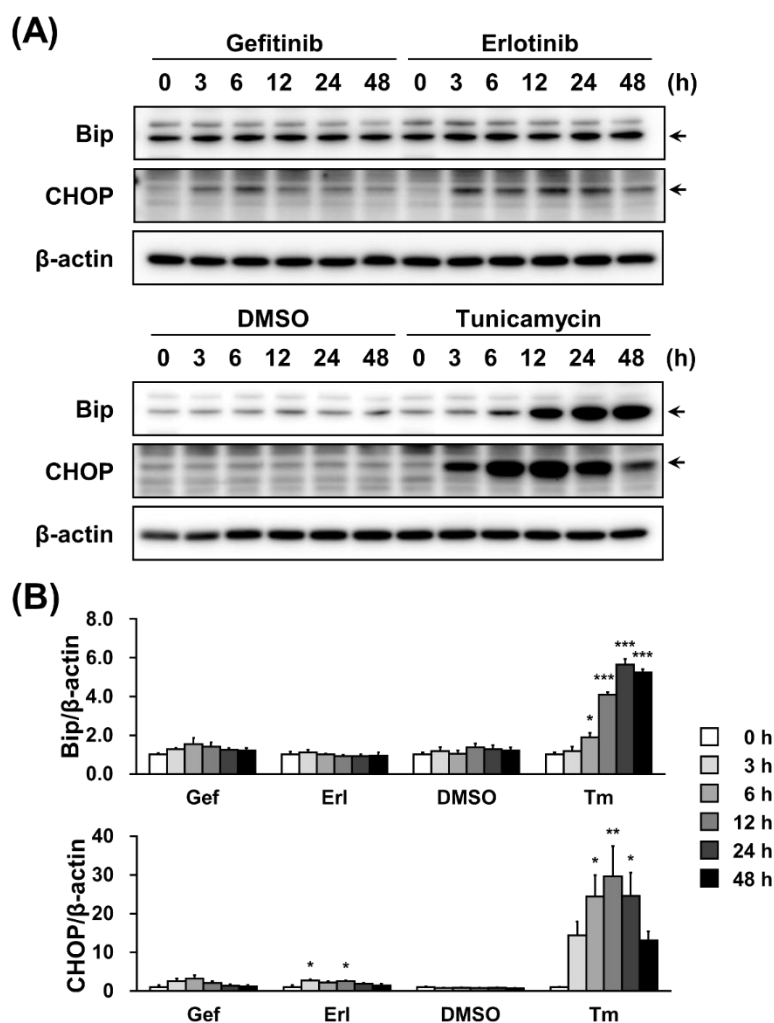


Figure I-2. Bip and CHOP expression in A549 cells treated with gefitinib and erlotinib.

A549 cells were treated with gefitinib (10 μ M), erlotinib (10 μ M) or tunicamycin (2.5 μ g/mL) for indicated times. Whole-cell lysates were analyzed by immunoblotting using antibodies specific for KDEL, CHOP or β -actin. (A) Representative images of three independent experiments are shown. (B) Quantitative data are expressed as means \pm S.E.M. Asterisks indicate significant differences from 0 h group (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, one-way ANOVA with Dunnett's test).

第二節 Gefitinib および Erlotinib による eIF2 α /ATF4 経路の活性化

転写因子である activating transcription factor 4 (ATF4) は *CHOP* と *PARK2* の両遺伝子が共通に持つ上流プロモーターである amino acid response element (AARE) を標的とするため^{42,43}、Gefitinib と Erlotinib が protein kinase-R like ER kinase (PERK) /eIF2 α /ATF4 経路を活性化するか検討した。Gefitinib と Erlotinib のどちらも A549 細胞において eIF2 α のリン酸化を亢進させ、それに遅れて ATF4 の誘導を引き起こした (Figure I-3)。

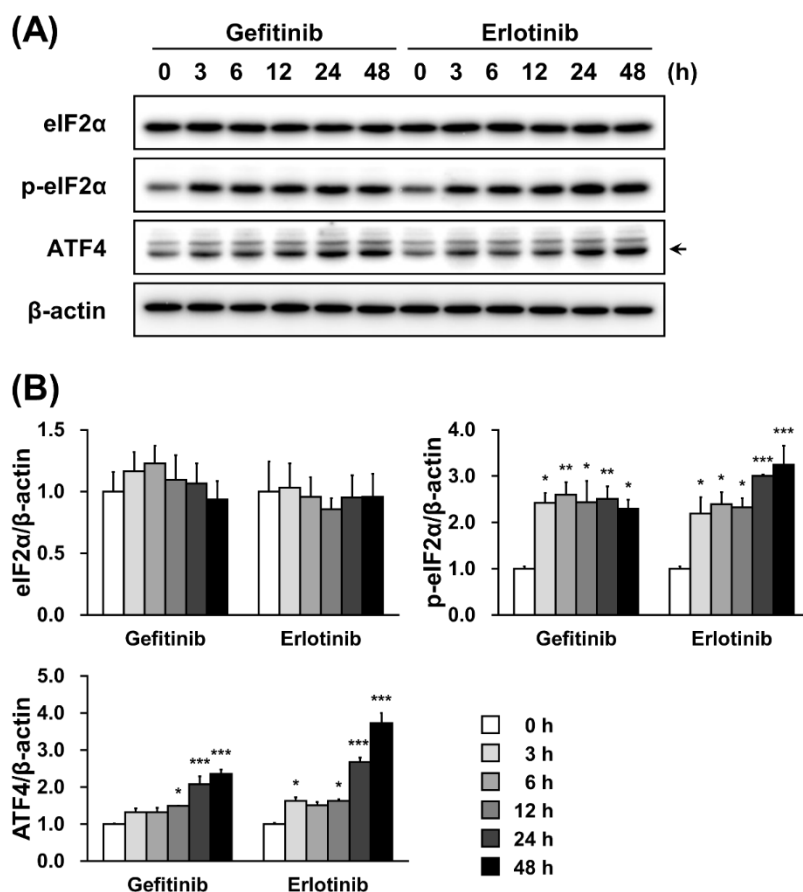


Figure I-3. Activation of eIF2 α and ATF4 by gefitinib and erlotinib.

A549 cells were treated with gefitinib (10 μ M) or erlotinib (10 μ M) for indicated times. Whole-cell lysates were analyzed by immunoblotting using antibodies specific for eIF2 α , phospho-eIF2 α , ATF4 or β -actin. (A) Representative images of three independent experiments are shown. (B) Quantitative data are expressed as means \pm S.E.M. Asterisks indicate significant differences from 0 h group (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$, one-way ANOVA with Dunnett's test).

小胞体ストレスのセンサー分子の一つである PERK は^{44,45}、自己リン酸化して活性化すると電気泳動におけるゲル移動度が変化し、バンドが上方へとシフトすることが知られている⁴⁶。この現象は、A549 細胞に tunicamycin を処置した場合には見られたが、Gefitinib と Erlotinib を処置した際には認められなかった (Figure I-4)。

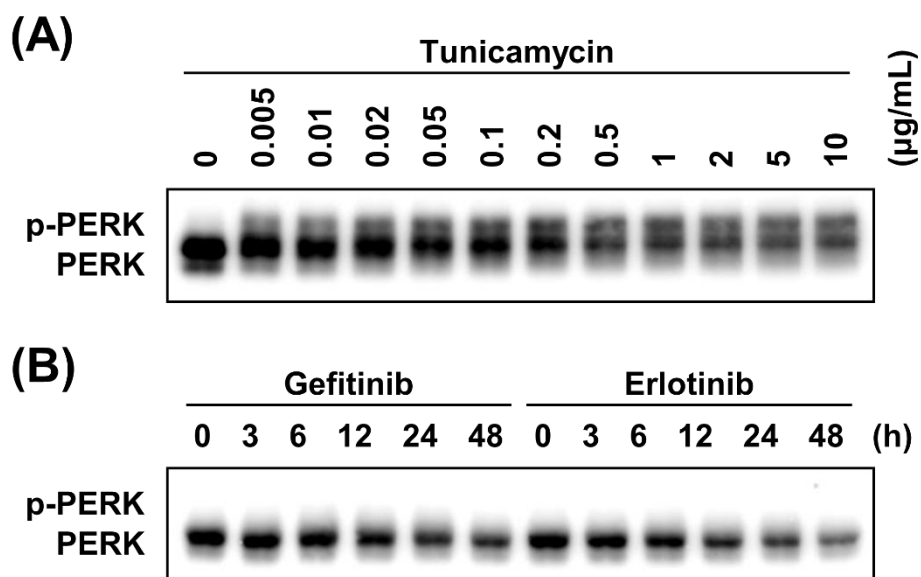


Figure I-4. PERK in A549 cells treated with gefitinib and erlotinib.

A549 cells were treated with (A) tunicamycin (0.005-10 µg/mL) for 6 h and (B) gefitinib (10 µM) or erlotinib (10 µM) for indicated times. Whole-cell lysates were analyzed by immunoblotting using antibody specific for PERK. Representative images of three independent experiments are shown.

第三節 Gefitinib および Erlotinib による A549 細胞の細胞死と増殖抑制の評価

アポトーシス調節因子である CHOP によるシグナルは caspase-3 の活性化を引き起こすため⁴⁷、A549 細胞において見られた Gefitinib と Erlotinib による CHOP の僅かな誘導が caspase-3 を活性化するのかどうかについて検討した。Western blot の結果、Gefitinib と Erlotinib を処置した A549 細胞において cleaved caspase-3 は検出されなかった (Figure I-5)。Tunicamycin を処置した場合には、cleaved caspase-3 は観察され、CHOP の変動と一致していた。また Gefitinib と Erlotinib を処置した A549 細胞において細胞死が起きているか検証したところ、trypan blue、FITC-Annexin V、Ethidium Homodimer III による染色のいずれの場合にも、アポトーシスやネクローシスといった細胞死は観察されなかった (Figure I-5)。

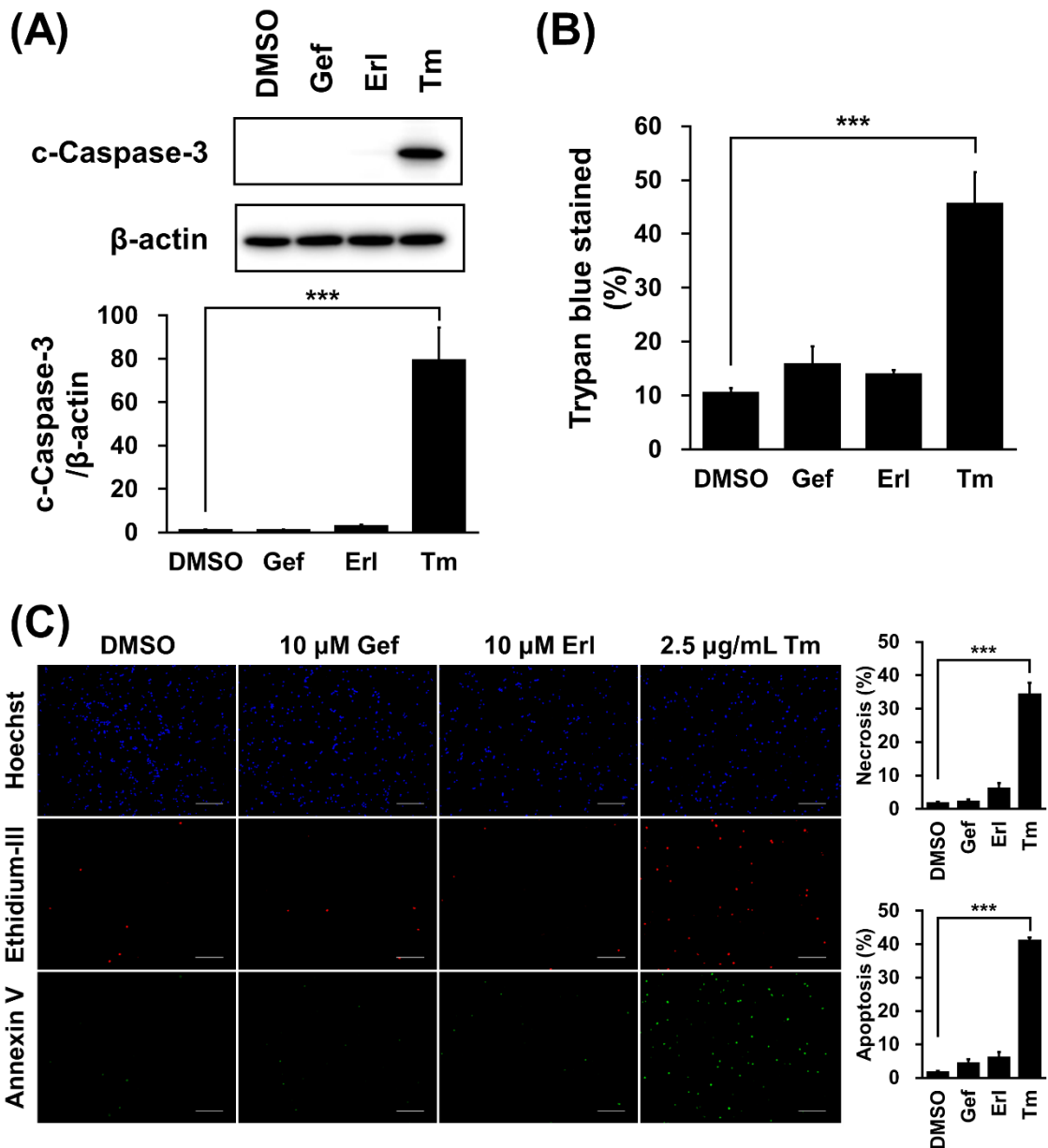


Figure I-5. A549 cell viability after treatment with gefitinib and erlotinib.

A549 cells were treated with gefitinib (10 μ M), erlotinib (10 μ M) or tunicamycin (2.5 μ g/mL) for 48 h. (A) Whole-cell lysates were analyzed by immunoblotting using antibodies specific for cleaved caspase-3 or β -actin. (B) Rates of trypan blue stained cells were estimated from three independent experiments and expressed as means \pm S.E.M. (C) Cells were stained with Hoechst33342, Ethidium Homodimer III or FITC-Annexin V (Magnification \times 100, scale bar; 200 μ m). Representative images of three independent experiments are shown. Quantitative data are expressed as means \pm S.E.M. Asterisks indicate significant differences from DMSO group (***, $p < 0.001$, one-way ANOVA with Dunnett's test).

EGFR 阻害薬は cyclin-D1 の発現量を低下させ、G1 期停止を引き起こすため²¹⁻²³、Gefitinib と Erlotinib による A549 細胞の増殖抑制効果と cyclin-D1 発現量の変動について検討した。その結果、両薬物ともに A549 細胞の増殖を濃度依存的に抑制した (Figure I-6)。また、cyclin-D1 の発現量は薬物処置 3 時間後から有意に低下した (Figure I-7)。

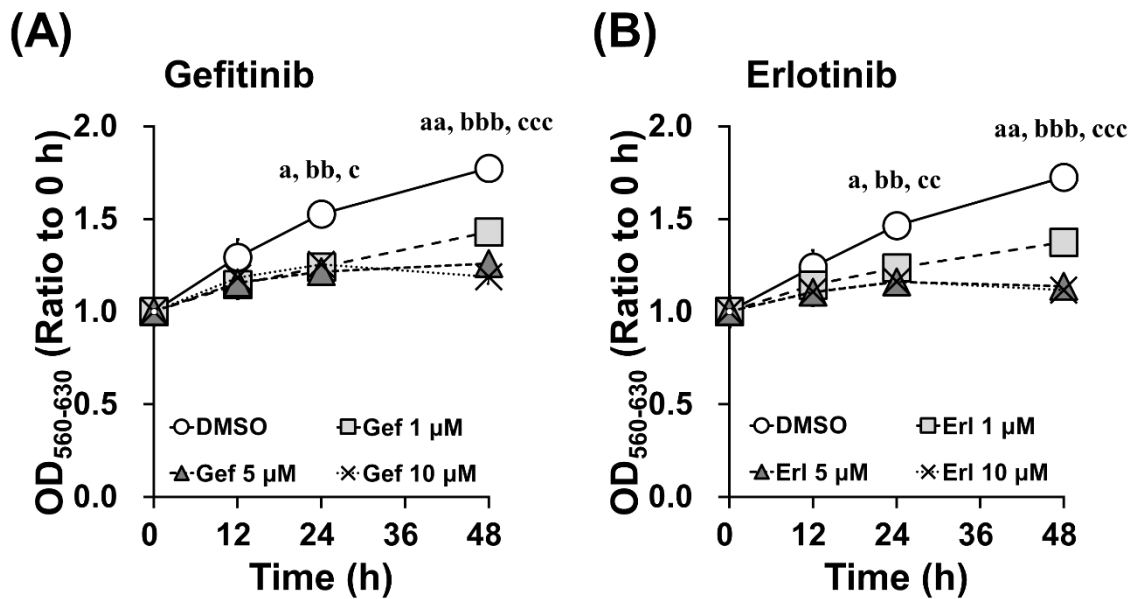


Figure I-6. Growth inhibition of A549 cells by (A) gefitinib and (B) erlotinib.

A549 cells were treated with gefitinib or erlotinib (1-10 μM). Cell counts were estimated by MTT assay. Data are expressed as means ± S.E.M. of three independent experiments. Each symbol indicates significant differences from DMSO group; a; $p < 0.05$, aa; $p < 0.01$ (DMSO vs. 1 μM), bb; $p < 0.01$, bbb; $p < 0.001$ (DMSO vs. 5 μM), c; $p < 0.05$, cc; $p < 0.01$, ccc; $p < 0.001$ (DMSO vs. 10 μM), one-way ANOVA with Dunnett's test.

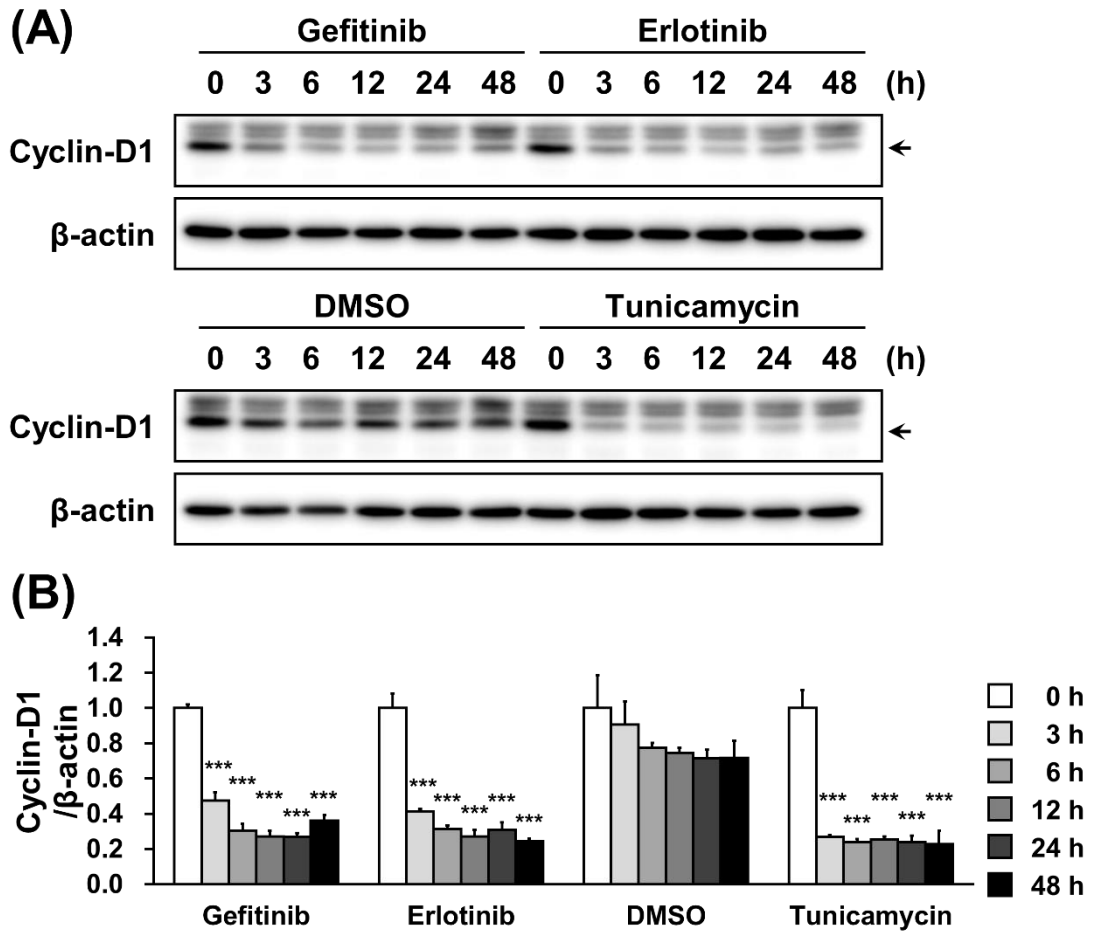


Figure I-7. Cyclin-D1 expression in A549 cells treated with gefitinib and erlotinib.

A549 cells were treated with gefitinib or erlotinib (10 μ M) for indicated times. Whole-cell lysates were analyzed by immunoblotting using antibodies specific for cyclin-D1 or β -actin. (A) Representative images of three independent experiments are shown. (B) Quantitative data are expressed as means \pm S.E.M. Asterisks indicate significant differences from 0 h group (***; $p < 0.001$, one-way ANOVA with Dunnett's test).

第四節 Gefitinib および Erlotinib による eIF2 α のリン酸化に対する TUDCA の影響

細胞内の eIF2 α のリン酸化は cyclin-D1 の発現量の低下を引き起こすと報告されている^{24,25}。そこで、eIF2 α のリン酸化レベルを抑制する tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) を用いて^{48,49}、EGFR 阻害薬による eIF2 α のリン酸化と cyclin-D1 の発現量の低下および細胞増殖の抑制との関連性について検討した。TUDCA は Gefitinib および Erlotinib によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇を抑制するとともに、両薬物による cyclin-D1 の発現低下を軽減した (Figure I-8)。Cyclin-D1 の結果と同様に、TUDCA は Gefitinib と Erlotinib による A549 細胞の増殖抑制を濃度依存的に緩和した (Figure I-9)。

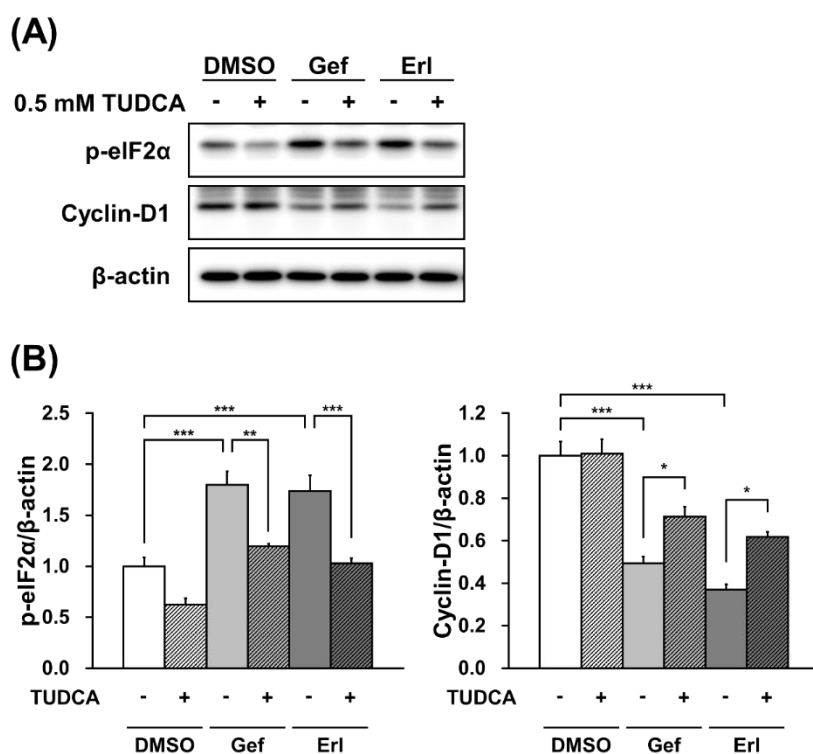


Figure I-8. Effects of TUDCA on eIF2 α phosphorylation and cyclin-D1 reduction in A549 cells treated with gefitinib and erlotinib.

A549 cells were treated with gefitinib or erlotinib (10 μ M) with/without TUDCA (0.5 mM) for 3 h. Whole-cell lysates were analyzed by immunoblotting using antibodies specific for phospho-eIF2 α , cyclin-D1 or β -actin. (A) Representative images of five independent experiments are shown. (B) Quantitative data are expressed as means \pm S.E.M. Asterisks indicate significant differences between two groups (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$, one-way ANOVA with Tukey-Kramer's test).

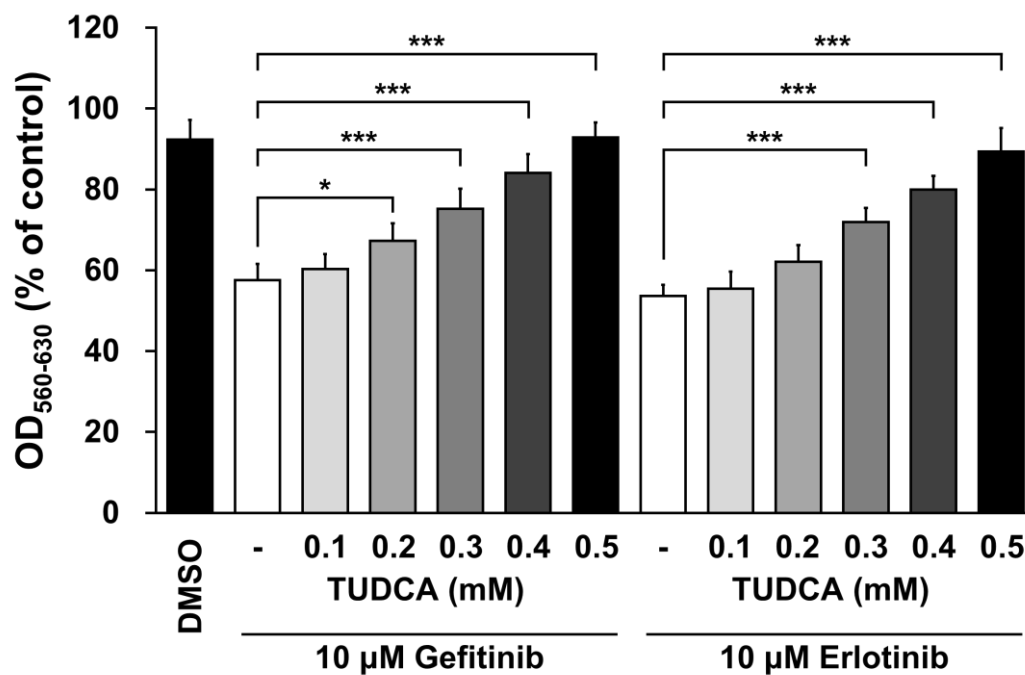


Figure I-9. Effects of TUDCA on A549 cell growth inhibition induced by gefitinib and erlotinib. A549 cells were treated with gefitinib or erlotinib (10 μM). Cell counts were estimated by MTT assay. Data are expressed as means ± S.E.M. of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences between two groups (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$, one-way ANOVA with Tukey-Kramer's test).

第五節 Gefitinib および Erlotinib による eIF2 α のリン酸化に対する EGFR knockdown の影響

次に、Gefitinib と Erlotinib による eIF2 α のリン酸化が EGFR に対する作用によるのか否かについて siRNA を用いて検証した。EGFR に対する siRNA は顕著に EGFR の発現を抑制したが、その条件下においても Gefitinib と Erlotinib を処置した A549 細胞では eIF2 α のリン酸化が観察された (Figure I-10)。Gefitinib と Erlotinib による cyclin-D1 の低下は EGFR の knockdown により完全には解消されなかった (Figure I-10)。

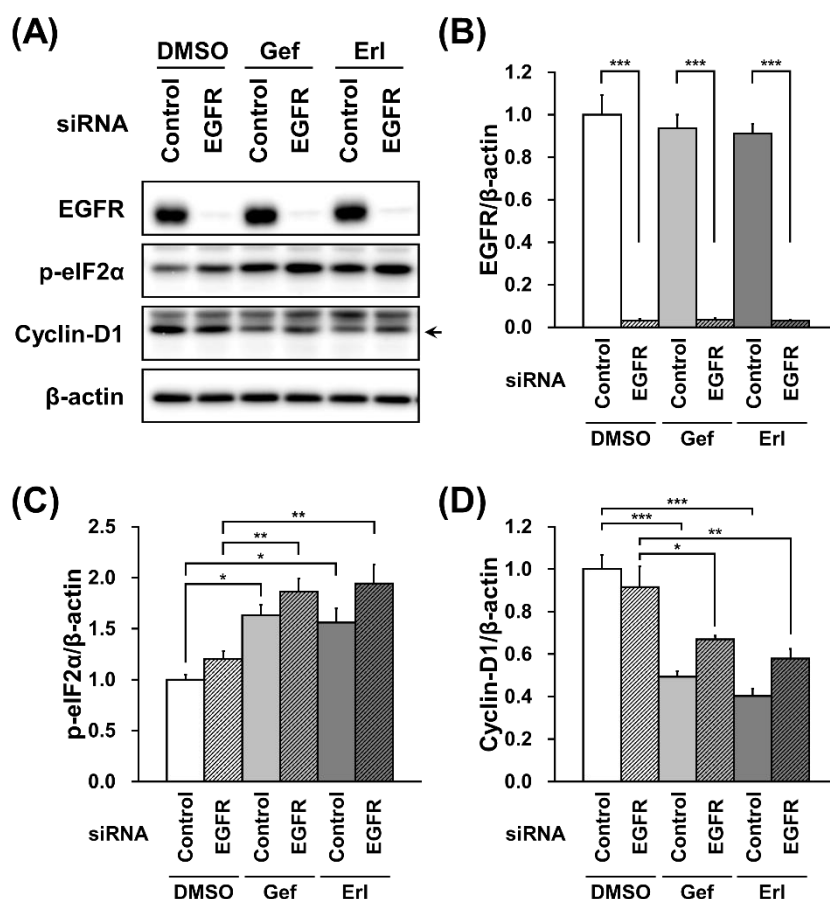


Figure I-10. Effects of EGFR knockdown on eIF2 α phosphorylation and cyclin-D1 reduction in A549 cells treated with gefitinib and erlotinib.

A549 cells were transfected with 50 pmol of siRNA against *EGFR* or control siRNA for 48 h before treatment with gefitinib or erlotinib (10 μ M) for further 3 h. Whole-cell lysates were analyzed by immunoblotting using antibodies specific for (B) EGFR, (C) phospho-eIF2 α , (D) cyclin-D1 or β -actin. (A) Representative images of five independent experiments are shown. Quantitative data are expressed as means \pm S.E.M. Asterisks indicate significant differences between two groups (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$, one-way ANOVA with Tukey-Kramer's test).

第六節 PC-9 細胞に対する Gefitinib および Erlotinib の影響

Gefitinib と Erlotinib による eIF2 α のリン酸化が、これらの薬物が適応となる非小細胞肺癌の細胞においても生じるか検討した。EGFR 遺伝子変異のうち、exon19 欠失変異および exon21 の L858R 点突然変異の 2 つは全体の約 85% を占めており、前者は 45% と最も多い^{4,50}。本節では exon19 欠失変異を有する肺腺癌細胞株である PC-9 細胞を用いて検討を行った⁵¹。PC-9 細胞に Gefitinib と Erlotinib を処置した後、蛍光色素による染色を行ったところ、両薬物が PC-9 細胞にアポトーシスやネクローシスといった細胞死を引き起こすことが確認できた (Figure I-11)。また、PC-9 細胞では両薬物の処置後に顕著な細胞数の減少が観察された (Figure I-12)。

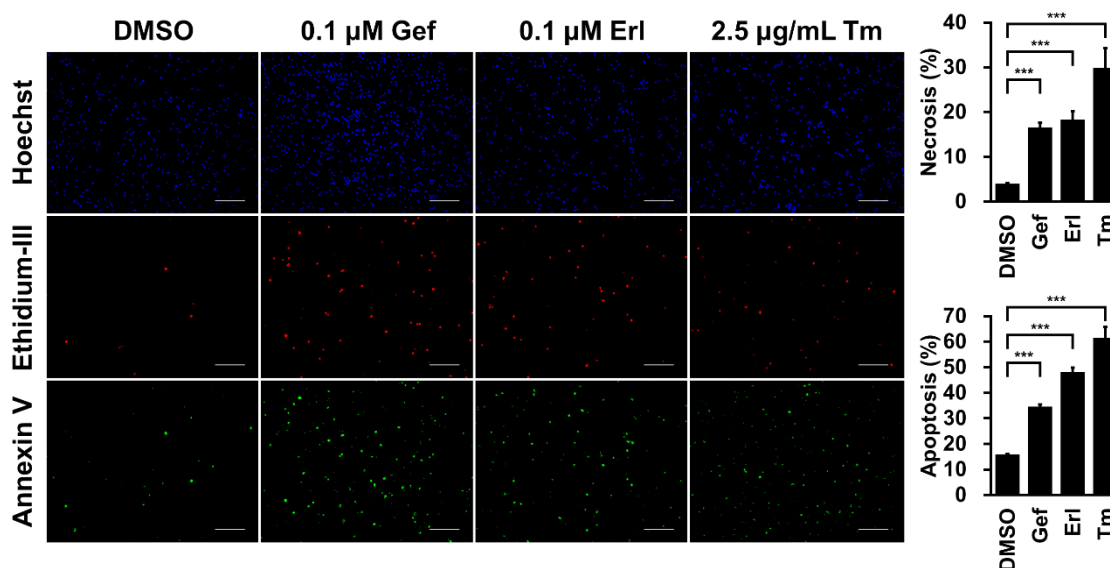


Figure I-11. PC-9 cell viability after treatment with gefitinib and erlotinib.

PC-9 cells were treated with gefitinib (0.1 μ M), erlotinib (0.1 μ M) or tunicamycin (2.5 μ g/mL) for 24 h. Cells were stained with Hoechst33342, Ethidium Homodimer III or FITC-Annexin V (Magnification \times 100, scale bar; 200 μ m). Representative images of three independent experiments are shown. Quantitative data are expressed as means \pm S.E.M. Asterisks indicate significant differences from DMSO group (***, $p < 0.001$, one-way ANOVA with Dunnett's test).

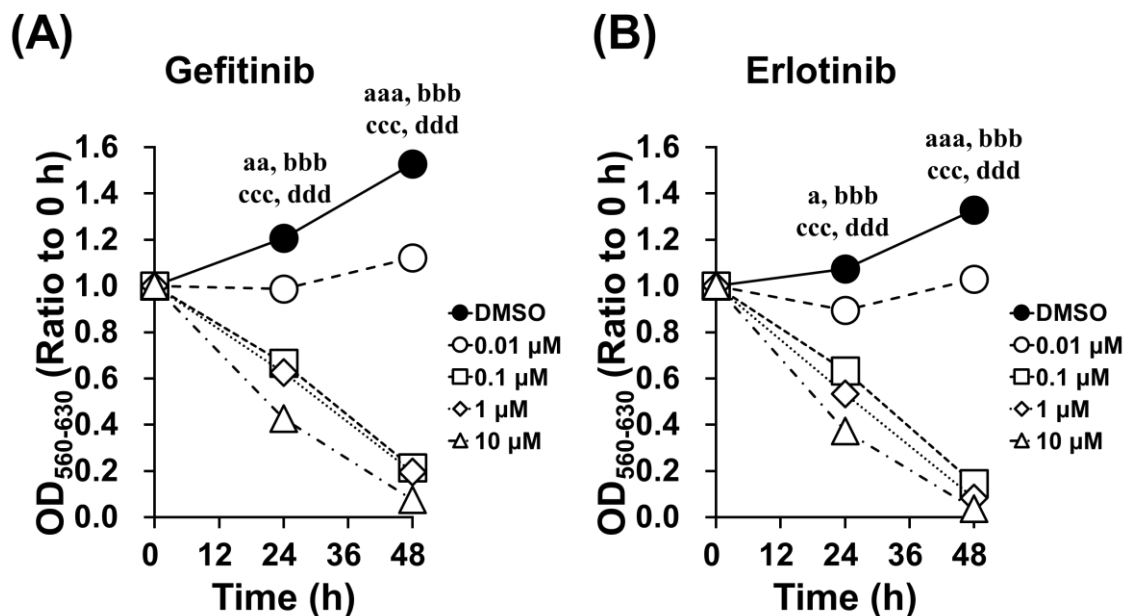


Figure I-12. Relative number of PC-9 cells treated with (A) gefitinib and (B) erlotinib.

PC-9 cells were treated with gefitinib or erlotinib (0.01-10 μM). Cell counts were estimated by MTT assay. Data are expressed as means ± S.E.M. of three independent experiments. Each symbol indicates significant differences from DMSO group; a; $p < 0.05$, aa; $p < 0.01$, aaa; $p < 0.001$ (DMSO vs. 0.01 μM), bbb; $p < 0.001$ (DMSO vs. 0.1 μM), ccc; $p < 0.001$ (DMSO vs. 1 μM), ddd; $p < 0.001$ (DMSO vs. 10 μM), one-way ANOVA with Dunnett's test.

次に、PC-9細胞においても Gefitinib と Erlotinib による eIF2α のリン酸化と cyclin-D1 の低下が起こるか検証したところ、A549細胞と同様に薬物処置後3時間からリン酸化 eIF2α レベルの上昇と cyclin-D1 の発現量の低下が見られた (Figure I-13)。PC-9細胞における TUDCA の効果について検討したところ、TUDCA は Gefitinib による eIF2α のリン酸化を抑制せず、Erlotinib による eIF2α のリン酸化を抑制する傾向を示したが、両者ともに有意な差は示さなかった (Figure I-14)。TUDCA は Gefitinib と Erlotinib による cyclin-D1 量の低下を軽減しなかった (Figure I-14)。さらに、Gefitinib と Erlotinib による PC-9細胞数の減少に関しても、TUDCA による保護効果は見られなかった (Figure I-15)。

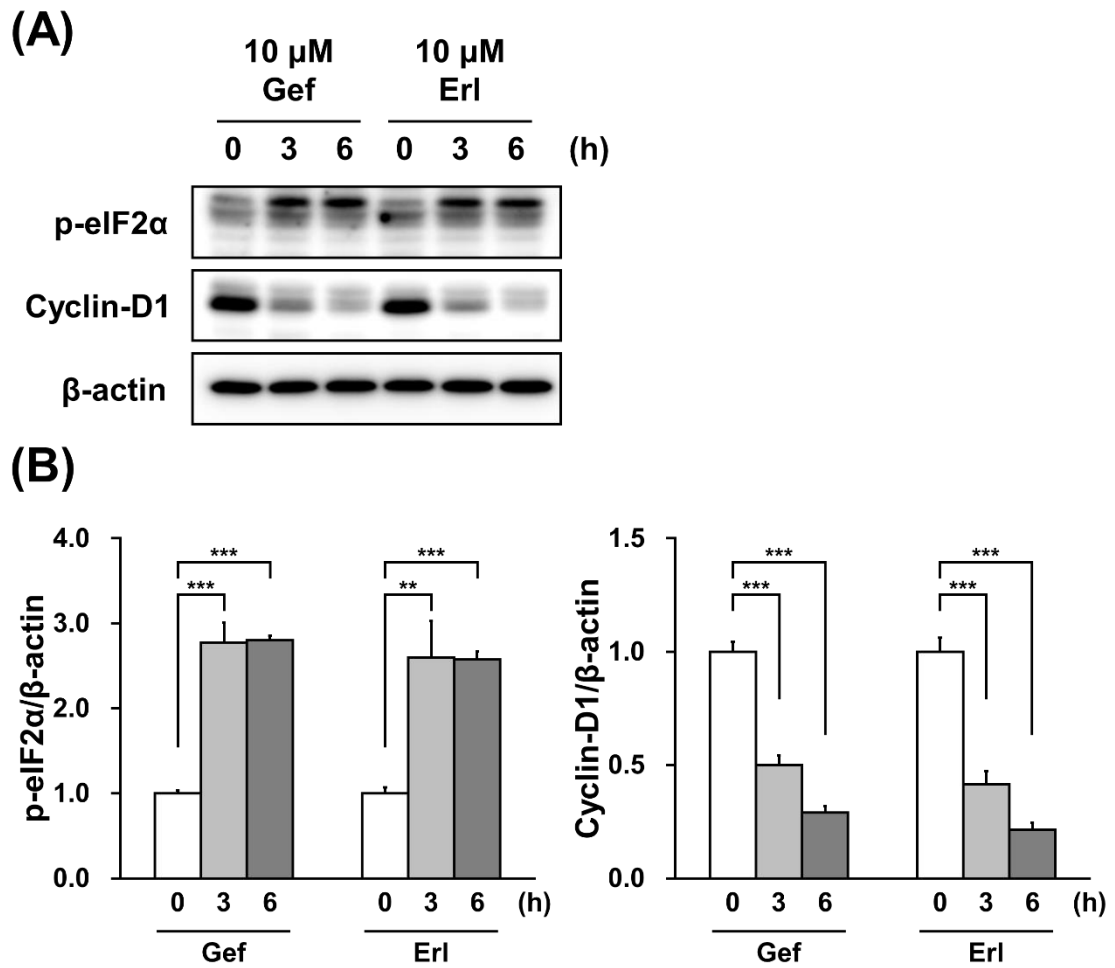


Figure I-13. Phospho-eIF2 α and cyclin-D1 levels in PC-9 cells treated with gefitinib and erlotinib. PC-9 cells were treated with gefitinib or erlotinib (10 μ M) for indicated times. Whole-cell lysates were analyzed by immunoblotting using antibodies specific for cyclin-D1 or β -actin. (A) Representative images of three independent experiments are shown. (B) Quantitative data are expressed as means \pm S.E.M. Asterisks indicate significant differences from 0 h group (**; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$, one-way ANOVA with Dunnett's test).

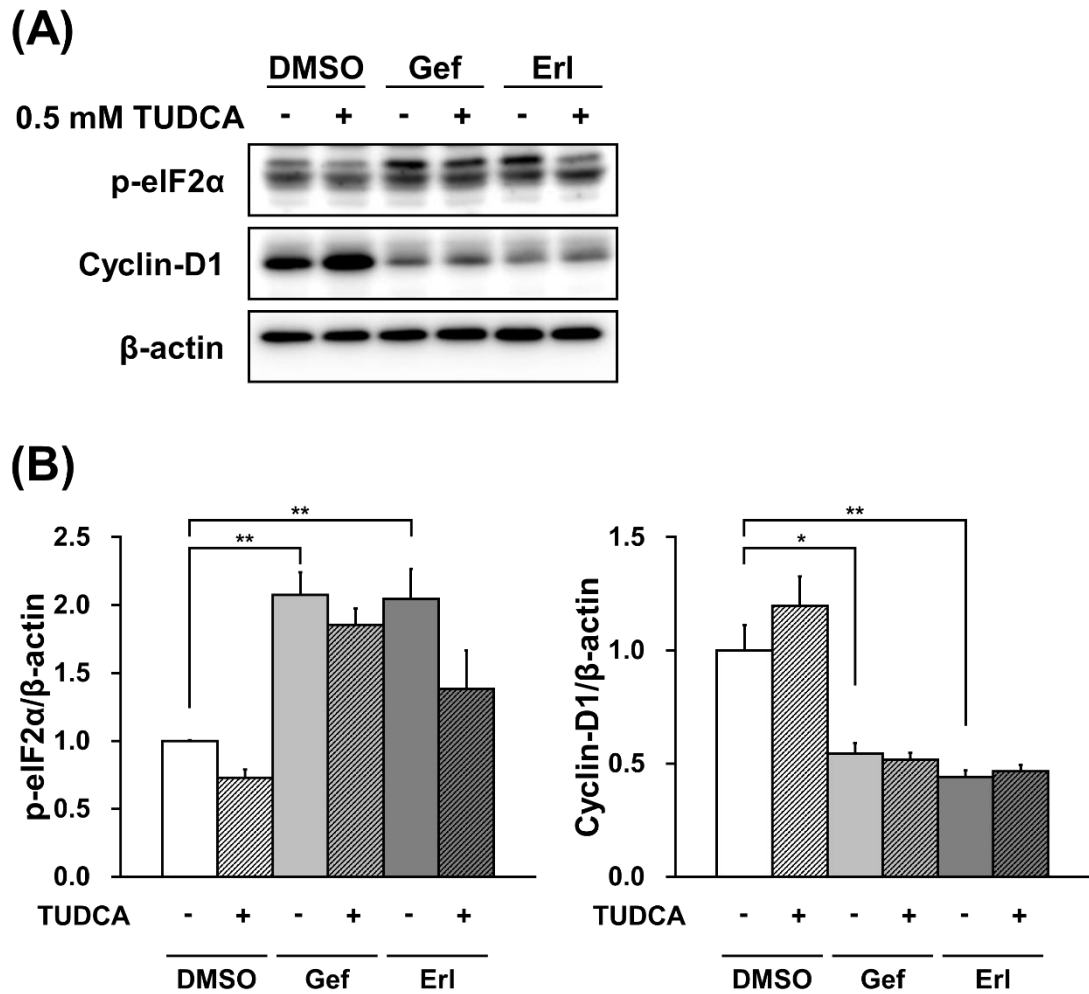


Figure I-14. Effects of TUDCA on eIF2 α phosphorylation and cyclin-D1 reduction in PC-9 cells treated with gefitinib and erlotinib.

PC-9 cells were treated with gefitinib or erlotinib (10 μ M) with/without TUDCA (0.5 mM) for 3 h. Whole-cell lysates were analyzed by immunoblotting using antibodies specific for phospho-eIF2 α , cyclin-D1 or β -actin. (A) Representative images of three independent experiments are shown. (B) Quantitative data are expressed as means \pm S.E.M. Asterisks indicate significant differences between two groups (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, one-way ANOVA with Tukey-Kramer's test).

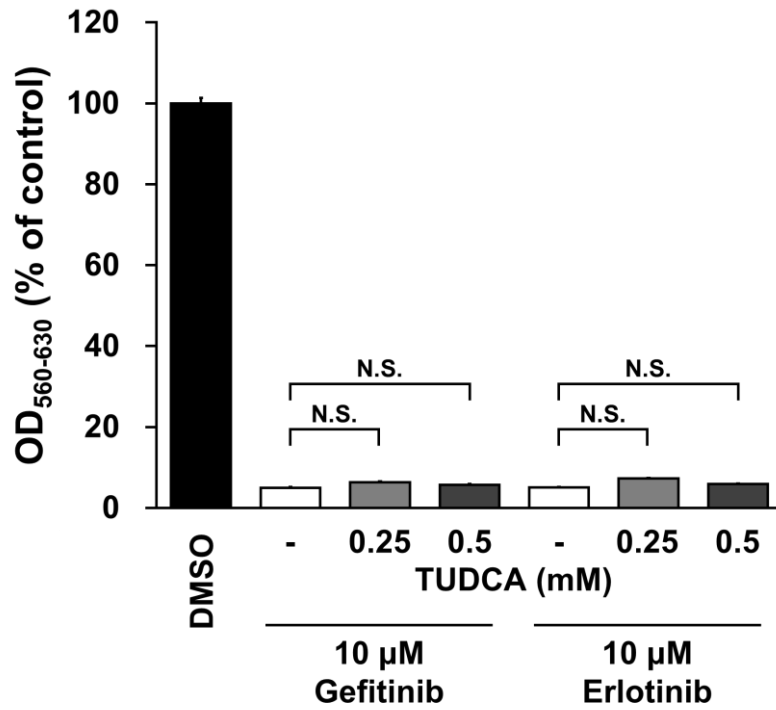


Figure I-15. Effects of TUDCA on cell viability of PC-9 treated with gefitinib and erlotinib. PC-9 cells were treated with gefitinib or erlotinib (10 μM). Cell counts were estimated by MTT assay. Data are expressed as means ± S.E.M. of three independent experiments. N.S. indicates insignificant differences between two groups (one-way ANOVA with Tukey-Kramer's test).

考察

肺癌患者の肺組織は、喫煙による慢性的な障害、肺癌そのものによる影響、放射線療法や化学療法といった肺癌治療による障害に晒されることになり、その度に組織の修復を余儀なくされる¹⁸。肺胞の修復の際は、I型肺胞上皮細胞の前駆細胞であるII型肺胞上皮細胞の増殖が極めて重要な役割を果たしている^{19,20}。そこで本章では、GefitinibとErlotinibがII型肺胞上皮細胞のモデルであるA549細胞に与える影響について、小胞体ストレスに関連したシグナルに着目して検討した。

A549細胞における*PARK2*および*CHOP*のmRNA発現量はGefitinibとErlotinibの濃度依存的に上昇した。*CHOP*遺伝子の転写はendoplasmic reticulum stress response element (ERSE)、unfolded protein response element (UPRE)およびAAREを介して活性化される^{52,53}。そして、ATF4はAAREを標的として*PARK2*の転写を調節していることから^{42,43}、GefitinibおよびErlotinibがA549細胞においてPERK/eIF2 α /ATF4経路を活性化していると考えられた。そこで次に、これらの分子の活性化について検討した。その結果、両薬物はeIF2 α のリン酸化とATF4の活性化を惹起していたことから、*PARK2*と*CHOP*のmRNA発現量の増加がeIF2 α /ATF4経路の活性化によるものであることが示唆された。

一方、eIF2 α のリン酸化が観察されたにも関わらず、GefitinibとErlotinibによる小胞体ストレスセンサーの一つであるPERK^{44,45}の活性化は認められなかった。さらに、これらの薬物は*HRD1*および*SEL1*のmRNA発現に影響を与えなかった。*HRD1*遺伝子と*SEL1*遺伝子の転写は、ATF6経路およびinositol requiring kinase 1/X-box binding protein 1 (IRE1/XBP1)経路によって影響を受けるUPREとERSEによって調節されているため^{54,55}、ATF6経路およびIRE1/XBP1経路は活性化していないと考えられた。以上より、PERK、IRE1およびATF6の3つの小胞体ストレスセンサーが活性化していないと推測されることから、GefitinibとErlotinibはA549細胞に対して小胞体ストレスを惹起しないと考えられた。すなわち、GefitinibとErlotinibによるeIF2 α のリン酸化は、小胞体ストレスによるPERKの活性化以外の機序による作用であると推察された。

GefitinibとErlotinibを処置したA549細胞では、*CHOP*のタンパク質レベルは一過性に僅かに誘導された。しかし、ATF4の誘導よりも*CHOP*の誘導が先んじていると

いう結果から、本研究で認められた CHOP タンパク質の増加は ATF4 の誘導の結果引き起こされたものではないと考えられた。以前の報告⁵⁶では、eIF2 α のリン酸化によって細胞内の GTP 結合型 eIF2 が枯渇すると、CHOP の上流に存在する open reading frame (uORF) による制御が解除され、CHOP mRNA が優先的に翻訳される可能性が示唆されている。すなわち、Gefitinib と Erlotinib による CHOP mRNA の誘導は ATF4 の増加によるものと考えられる。一方、両薬物による CHOP タンパク質の増加に関しては、eIF2 α のリン酸化によって GTP 結合型 eIF2 が枯渇した結果、ATF4 の誘導を介さずに CHOP の翻訳が誘導されたものと推測できる。

A549 細胞において Gefitinib と Erlotinib の処置によりアポトーシス調節因子である CHOP の発現が上昇したにも関わらず、両薬物は caspase-3 の活性化も細胞死も引き起こさなかった。Gefitinib や Erlotinib による CHOP の誘導は、tunicamycin によるそれと比較して遥かに小さいものであった。CHOP を十分に発現させた細胞ではアポトーシスが誘導されることが報告されている⁵⁷。また、本検討においても tunicamycin の処置により CHOP の誘導と caspase-3 の活性化が観察された。これらのことから、Gefitinib と Erlotinib によって caspase-3 が活性化しなかったのは、CHOP の誘導が不十分であったためと考えられる。しかし、正常な II 型肺胞上皮細胞においても Gefitinib や Erlotinib の処置により細胞死が起きないのかについては、本研究からは言及することはできない。A549 細胞は KRAS 遺伝子に変異を持つため、Gefitinib や Erlotinib などの EGFR 阻害薬に対して耐性を持つ細胞である⁵⁸。従って、この点について明らかにするには、EGFR 遺伝子と KRAS 遺伝子の両方が野生型である II 型肺胞上皮細胞を用いた検討が必要である。

TUDCA の共処置は A549 細胞におけるリン酸化 eIF2 α レベルを低下させたが、Gefitinib と Erlotinib による cyclin-D1 の低下および A549 細胞の増殖抑制を軽減した。これらの結果は両薬物による cyclin-D1 発現量の低下と増殖抑制が eIF2 α のリン酸化を介していることを示唆している。同時に、TUDCA が Gefitinib や Erlotinib による II 型肺胞上皮細胞の増殖抑制を軽減し、肺胞の修復を促進する可能性も提示している。以前にも、肺胞上皮細胞の増殖抑制が肺障害に関与することが報告されてきたことを踏まえると^{59,60}、Gefitinib と Erlotinib による間質性肺疾患の予防に TUDCA が有益である可能性が推察される。

Gefitinib および Erlotinib によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇が EGFR に対する作用

によるものなのかについて siRNA を用いて検証したところ、EGFR の knockdown は Gefitinib や Erlotinib によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇に影響しないことが判明した。一方、EGFR の knockdown 条件下においても cyclin-D1 量の低下が部分的に認められたことから、Gefitinib および Erlotinib による cyclin-D1 量の低下には EGFR 依存的な作用と EGFR 非依存的な作用が共存することが示された。これまで、EGFR 阻害薬による cyclin-D1 量の低下は EGFR 阻害効果によるものであると考えられてきた⁶¹⁻⁶³。これは、EGF によるシグナル伝達が mitogen activated protein kinase (MAPK) や signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) を活性化することに加えて、EGFR の核内移行を促進することで cyclin-D1 の転写を直接誘導するためである⁶¹⁻⁶³。本検討では、EGFR 阻害薬である Gefitinib および Erlotinib による cyclin-D1 量の低下の一部が、EGFR を介さない経路によって引き起こされることを明らかにした。

両薬物は *EGFR* 遺伝子変異陽性の肺腺癌細胞である PC-9 細胞に対して著しい細胞死を惹起するとともに、eIF2 α のリン酸化レベルの上昇と cyclin-D1 量の低下を引き起こした。一方、A549 細胞とは異なり、PC-9 細胞では TUDCA の共処置による cyclin-D1 量の低下に対する軽減作用や細胞保護効果は観察されなかった。一般に、癌細胞のゲノム中には多数の遺伝子変異が存在するが、実際に発癌過程や増殖促進に関与する癌遺伝子として作用する変異は少数であると言われている⁶⁴。癌細胞はそのような少数の癌遺伝子のもたらす作用に高度に依存しており、これを「癌遺伝子中毒説 (oncogene addiction)」という⁶⁴。*EGFR* 遺伝子変異陽性の肺癌細胞はその典型的な例とされるが⁶⁵、このような細胞に対する EGFR 阻害薬の効果は EGFR に対する阻害作用に強く依存する。EGFR 阻害薬による肺癌細胞のアポトーシスは、Bcl-2 interacting mediator of cell death (BIM) の発現の上昇によってミトコンドリアのシトクロム c 漏出を介する機序により誘導される⁶⁶。従って、PC-9 細胞に対して TUDCA が保護効果を示さなかったのは、EGFR 非依存的な eIF2 α のリン酸化による影響の寄与が、変異型 EGFR に強く依存する PC-9 細胞においては少なかったためであると考えられる。また、PC-9 細胞において TUDCA の eIF2 α のリン酸化抑制効果が見られにくかったのは、Gefitinib と Erlotinib による EGFR 阻害作用の影響が大きく、PC-9 細胞に大きなストレスがかかった状態にあったためであると考えられる。以上の結果を踏まえると、TUDCA は Gefitinib と Erlotinib の非小細胞肺癌に対する治療効果には影響を与えず、Gefitinib と Erlotinib による間質性肺疾患を予防する効果が期待でき

ると考えられる。

以上、本章において、**Gefitinib** および **Erlotinib** が **EGFR** 非依存的に **eIF2 α** のリン酸化を亢進し、II型肺胞上皮細胞の増殖抑制に関与していることを見出した。

第二章 Gefitinib および Erlotinib による eIF2 α リン酸化機序の解析

第一章において、著者は Gefitinib と Erlotinib が eIF2 α のリン酸化レベルを上昇させることを見出した。しかしながら、この現象は小胞体ストレスや EGFR 阻害作用によるものではなく、どのような機序でリン酸化 eIF2 α の発現が上昇しているかは不明であった。eIF2 α のリン酸化レベルの上昇が II 型肺胞上皮細胞の増殖抑制に関与していると考えられたことから、その機序の解明は、創薬段階でのリスクの少ない候補薬の選別や臨床における副作用予防のために有益であると考えられる。そこで本章では、EGFR 阻害薬による eIF2 α のリン酸化機序の解析を試みた。

翻訳開始因子の一つである eIF2 は、methionine を結合した tRNA および高エネルギーリン酸結合を持つ GTP を運搬し、これらを翻訳開始複合体に組み込む役割を持つ。Methionine 結合 tRNA が開始コドンを認識することで翻訳が開始された後、GTP 結合型 eIF2 は GDP 結合型 eIF2 となる。eIF2 の α サブユニット (eIF2 α) は、51 番目の serine 残基がリン酸化することで、GDP 結合型 eIF2 を GTP 結合型 eIF2 へと変換する酵素である eIF2B に結合してその働きを阻害する²⁷。その結果、細胞内の GTP 結合型 eIF2 が枯渇すると翻訳開始複合体の形成が低下するため、mRNA からタンパク質への翻訳全体が抑制される。ATF4 や CHOP などのストレス応答分子の一部は、コーディング領域の上流に存在する uORF によって通常時は翻訳が抑制されている^{56,67}。しかし、eIF2 α がリン酸化されると、GTP 結合型 eIF2 の減少によって翻訳開始複合体の形成が遅延することで、本来のコーディング領域の開始コドンが認識され、優先的に翻訳されるようになる。このように、eIF2 α のリン酸化は、細胞全体がストレスに対応するための重要なシグナルの一つである。

哺乳類細胞における eIF2 α のリン酸化は、general control nonderepressible 2 (GCN2)、PERK、protein kinase RNA-activated (PKR)、heme regulated inhibitor kinase (HRI) という特異性の高い 4 種類のリン酸化酵素によって行われる。これらのリン酸化酵素は、細胞がタンパク質合成を低下させるべき状況に陥った際にそれぞれ活性化する。GCN2 は、細胞がアミノ酸飢餓に曝されると、細胞内の非荷電 tRNA の増加を検出して活性化する^{68,69}。PERK は、小胞体ストレスによって Bip が乖離した後、四量体化およびリン酸化することでリン酸化酵素活性を獲得する⁷⁰。PKR は、細胞が RNA ウィルスに感染すると、dsRNA を認識して自己リン酸化して活性化する⁷¹。造血系細

胞に発現が限局する HRI は、ヘムの欠乏によって活性化し、グロビンの産生を抑制することによりヘムとグロビンの量比を調節する⁷²。

上記の4つのリン酸化酵素は eIF2 α の51番目の serine 残基をリン酸化するが、このリン酸化のレベルはリン酸化酵素 (kinase) だけでなく脱リン酸化酵素 (phosphatase) によっても影響され、両者のバランスによって決定される。Serine/threonine protein phosphatase ファミリーは7種類のサブファミリーに分類されるが、eIF2 α の脱リン酸化に関与すると報告されているのは protein phosphatase 1 (PP1) である⁷³。ヒトにおいて serine/threonine protein kinase は約400種類が存在するのに対して、serine/threonine protein phosphatase は数十種類程度である⁷⁴。単純に考えた場合、1つのリン酸化酵素が1つの基質タンパク質を標的とし、1つの脱リン酸化酵素が複数の基質タンパク質を標的としていては、タンパク質の機能は個別には調節できないことになる。これらの脱リン酸化酵素側の数の不足は、1つの脱リン酸化酵素が特異性を持つ多様な機能調節因子とホロ酵素を形成することによって補われると考えられている⁷⁵。すなわち、脱リン酸化酵素が複数の異なる機能調節因子と組み合わせたり基質タンパク質を認識することで、少数の脱リン酸化酵素が遥かに多くの基質タンパク質の機能調節を個別に行うことが可能となる。PP1 の機能を調節する因子は protein phosphatase 1 regulatory subunits (PPP1R) 遺伝子ファミリーに属し、eIF2 α に対する基質認識性を付与する機能調節因子として growth arrest and DNA damage 34 (GADD34、PPP1R15A) と constitutive revertor of eIF2 α phosphorylation (CReP、PPP1R15B) の2つが同定されている^{76,77}。GADD34 は eIF2 α 結合ドメインおよび PP1 結合ドメインを持ち、どちらのドメインも eIF2 α の脱リン酸化にとって重要であると報告されているため^{78,79}、PP1 と eIF2 α を自身に結合させ、脱リン酸化反応の足場として機能すると考えられる。GADD34 は小胞体ストレスやアミノ酸飢餓等のストレス応答時に誘導される分子であり、翻訳抑制の解除に関与すると考えられている⁸⁰。一方、CReP は非ストレス時の eIF2 α のリン酸化レベルを調節していると言われているが、未解明な部分が多い^{76,81}。

以上を踏まえ、本章では、Gefitinib と Erlotinib によって亢進する eIF2 α のリン酸化の機序について、リン酸化過程と脱リン酸化過程の両方に着目して検討を進めた。

第一節 リン酸化過程の解析

リン酸化過程に着目し、Gefitinib と Erlotinib によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇に対する eIF2 α リン酸化酵素の発現抑制の影響を検討した。A549 細胞に GCN2、PERK および PKR のそれぞれに対する siRNA を導入し、その 48 時間後に Gefitinib あるいは Erlotinib を処置した。GCN2、PERK および PKR のいずれの場合にも十分な発現抑制を確認できたが、このような条件においてもリン酸化 eIF2 α レベルの上昇が観察され、その程度は control siRNA を導入した細胞で認められた上昇と同程度であった (Figure II-1)。次に、GCN2、PERK および PKR の eIF2 α リン酸化酵素全体に対する Gefitinib と Erlotinib の影響を検討するため、それぞれに対する siRNA を同時に A549 細胞に導入し、その上で Gefitinib と Erlotinib を処置した。3 種の siRNA を同時に導入した条件においても、GCN2、PERK および PKR の全てに対する発現抑制が認められた (Figure II-2)。そして、この条件においても Gefitinib と Erlotinib によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇は依然として観察された (Figure II-2)。

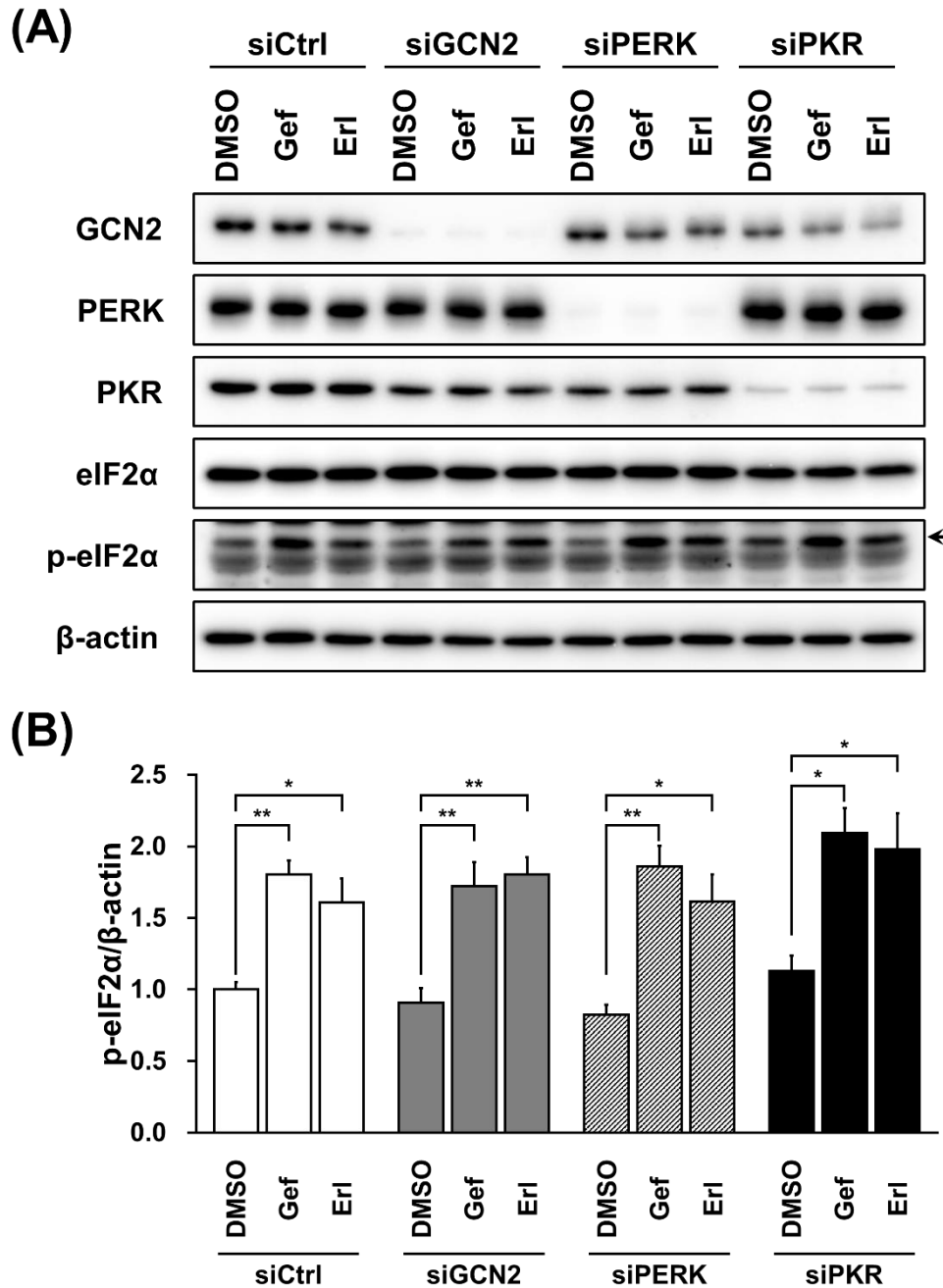


Figure II-1. Effects of eIF2α kinase knockdown on phospho-eIF2α level in A549 cells treated with gefitinib and erlotinib.

A549 cells were transfected with 50 pmol of siRNA against *GCN2*, *PERK* or *PKR*, or control siRNA for 48 h before treatment with gefitinib or erlotinib (10 μM) for further 3 h. Whole-cell lysates were analyzed by immunoblotting using antibodies specific for (B) phospho-eIF2α, (C) GCN2, (D) PERK, (E) PKR, (F) eIF2α or β-actin. (A) Representative images of three independent experiments are shown. Quantitative data are expressed as means ± S.E.M. Asterisks indicate significant differences between two groups (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, one-way ANOVA with Dunnett's test).

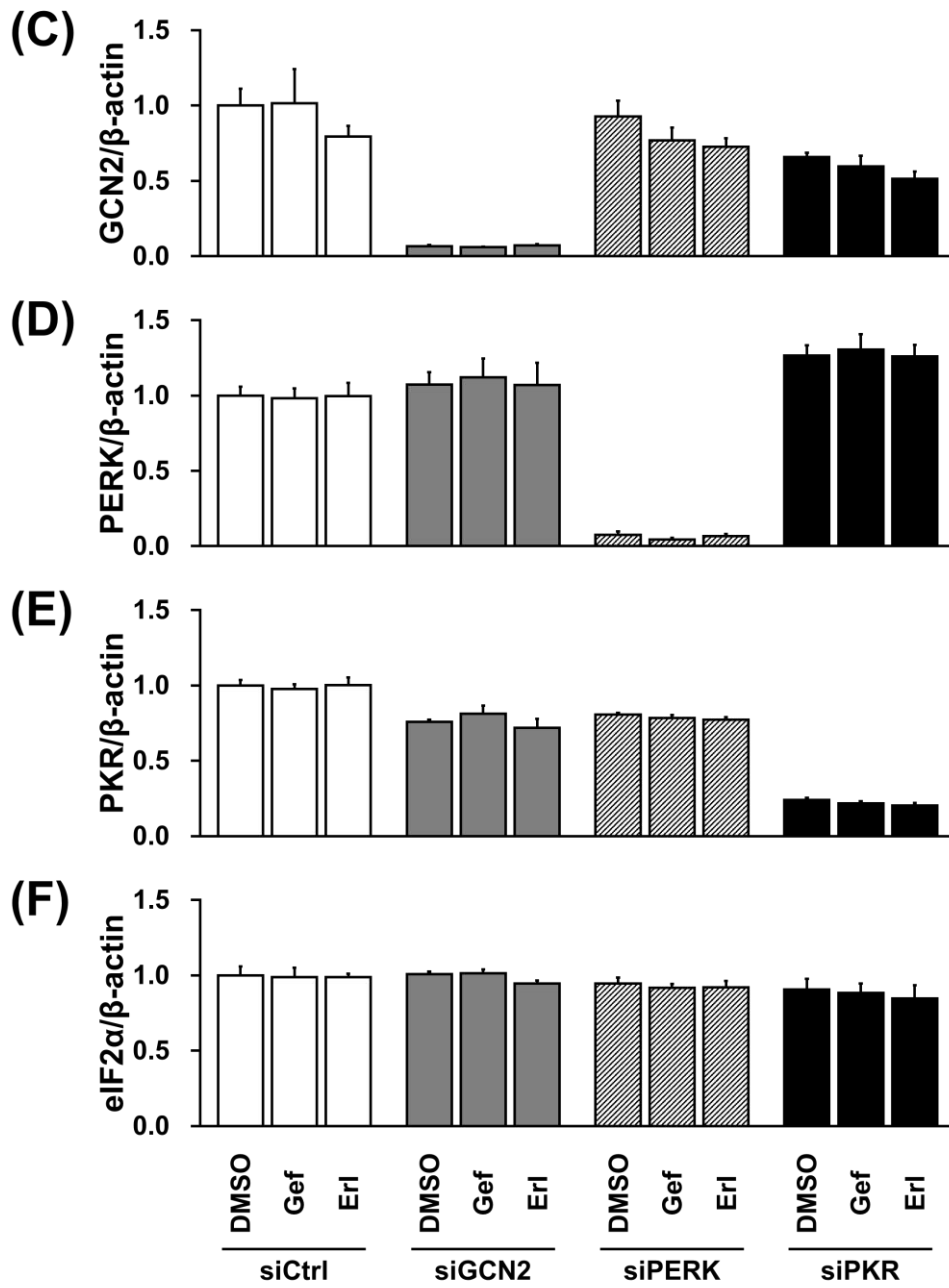


Figure II-1. Continued.

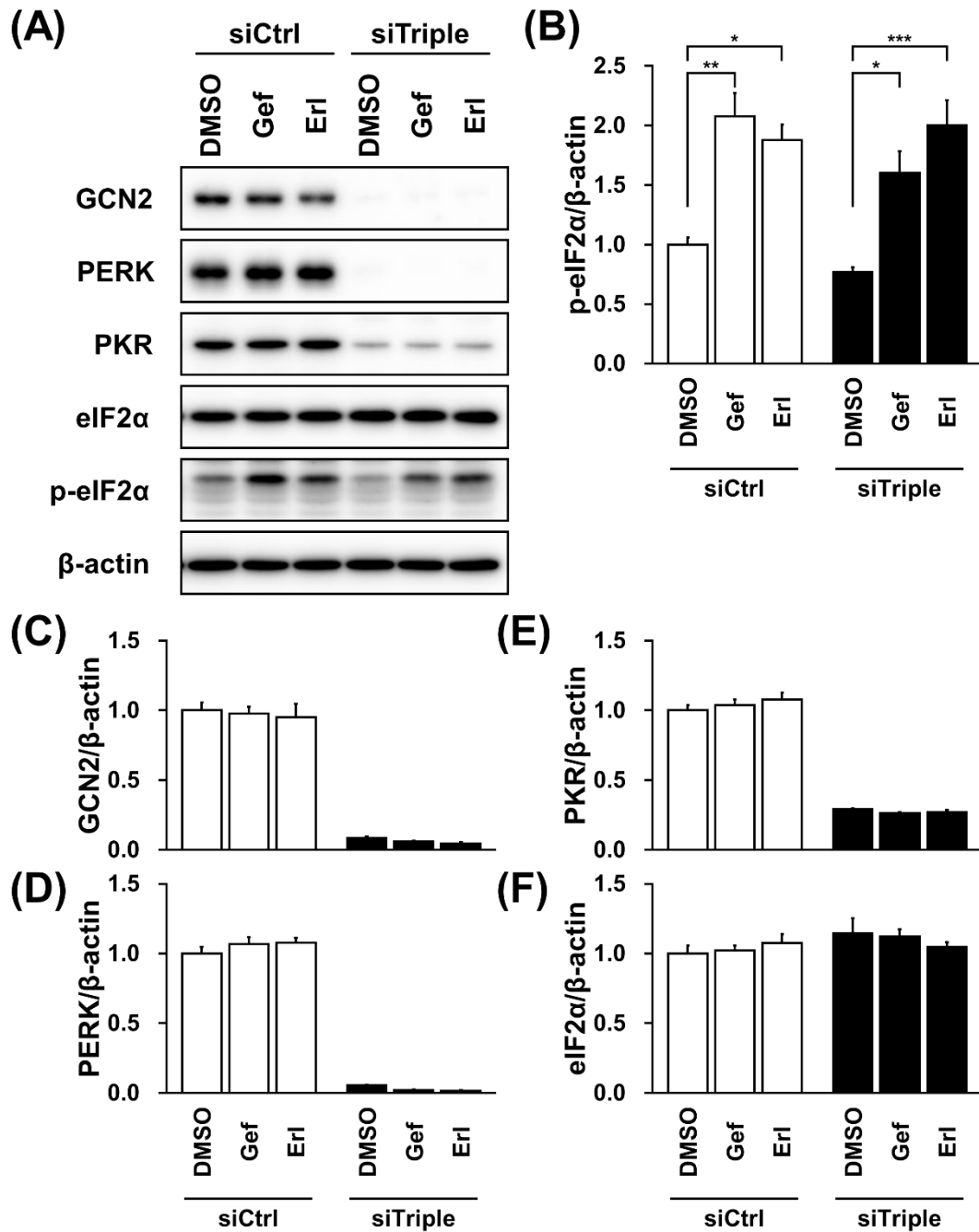


Figure II-2. Effects of simultaneous knockdown of three eIF2 α kinases on phospho-eIF2 α level in A549 cells treated with gefitinib and erlotinib.

A549 cells were transfected with all of siRNAs against *GCN2* (30 pmol), *PERK* (30 pmol) and *PKR* (40 pmol), or control siRNA for 48 h before treatment with gefitinib or erlotinib (10 μ M) for further 3 h. Whole-cell lysates were analyzed by immunoblotting using antibodies specific for (B) phospho-eIF2 α , (C) GCN2, (D) PERK, (E) PKR, (F) eIF2 α or β -actin. (A) Representative images of three independent experiments are shown. Quantitative data are expressed as means \pm S.E.M. Asterisks indicate significant differences between two groups (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, one-way ANOVA with Dunnett's test).

第二節 脱リン酸化過程の解析

脱リン酸化過程について検討するため、Gefitinib と Erlotinib によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇作用に対して、非特異的脱リン酸化酵素阻害薬である okadaic acid の影響を調べた。A549 細胞に control siRNA、または GCN2、PERK および PKR の 3 種の eIF2 α リン酸化酵素に対する siRNA を同時に導入し、その 48 時間後から 1 μ M の okadaic acid で 1 時間前処置し、Gefitinib あるいは Erlotinib と okadaic acid を 3 時間共処置した。Control siRNA 導入細胞と eIF2 α リン酸化酵素の発現抑制細胞のいずれにおいても、okadaic acid 処置条件下では Gefitinib と Erlotinib によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇は認められなかった (Figure II-3)。このことから、脱リン酸化酵素阻害薬である okadaic acid が Gefitinib と Erlotinib によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇を阻害することが判明した。

次に、eIF2 α の脱リン酸化を担う PP1 に対する直接的な阻害効果について検証した。Human recombinant PP1 による蛍光リン酸ペプチド基質の脱リン酸化反応に対して、Gefitinib と Erlotinib はいずれも阻害作用を示さなかった (Figure II-4)。一方、okadaic acid はこの反応を顕著に阻害した。

脱リン酸化酵素である PP1 に eIF2 α に対する基質認識性を付与する分子としては GADD34 と CReP が知られている^{76,77}。これらの分子は PP1 と複合体を形成し、リン酸化 eIF2 α の脱リン酸化を行う。Gefitinib と Erlotinib の GADD34 に対する影響を検証するため、PP1/GADD34 複合体に対する阻害薬である salubrinal を用いて検討を行った。A549 細胞に control siRNA、または GCN2、PERK および PKR の 3 種の eIF2 α リン酸化酵素に対する siRNA を同時に導入し、その 48 時間後から 50 μ M の salubrinal で 3 時間前処置し、Gefitinib あるいは Erlotinib と salubrinal を 3 時間共処置した。その結果、有意差はなかったが、salubrinal は DMSO 群のリン酸化 eIF2 α レベルを上昇させる傾向を示した (Figure II-5)。eIF2 α リン酸化酵素の発現抑制の有無に関わらず、salubrinal 処置条件下では Gefitinib と Erlotinib によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇が認められた (Figure II-5)。Salubrinal 処置条件下では、control siRNA に比べて eIF2 α リン酸化酵素を抑制した場合の方が概してリン酸化 eIF2 α レベルが高かった。

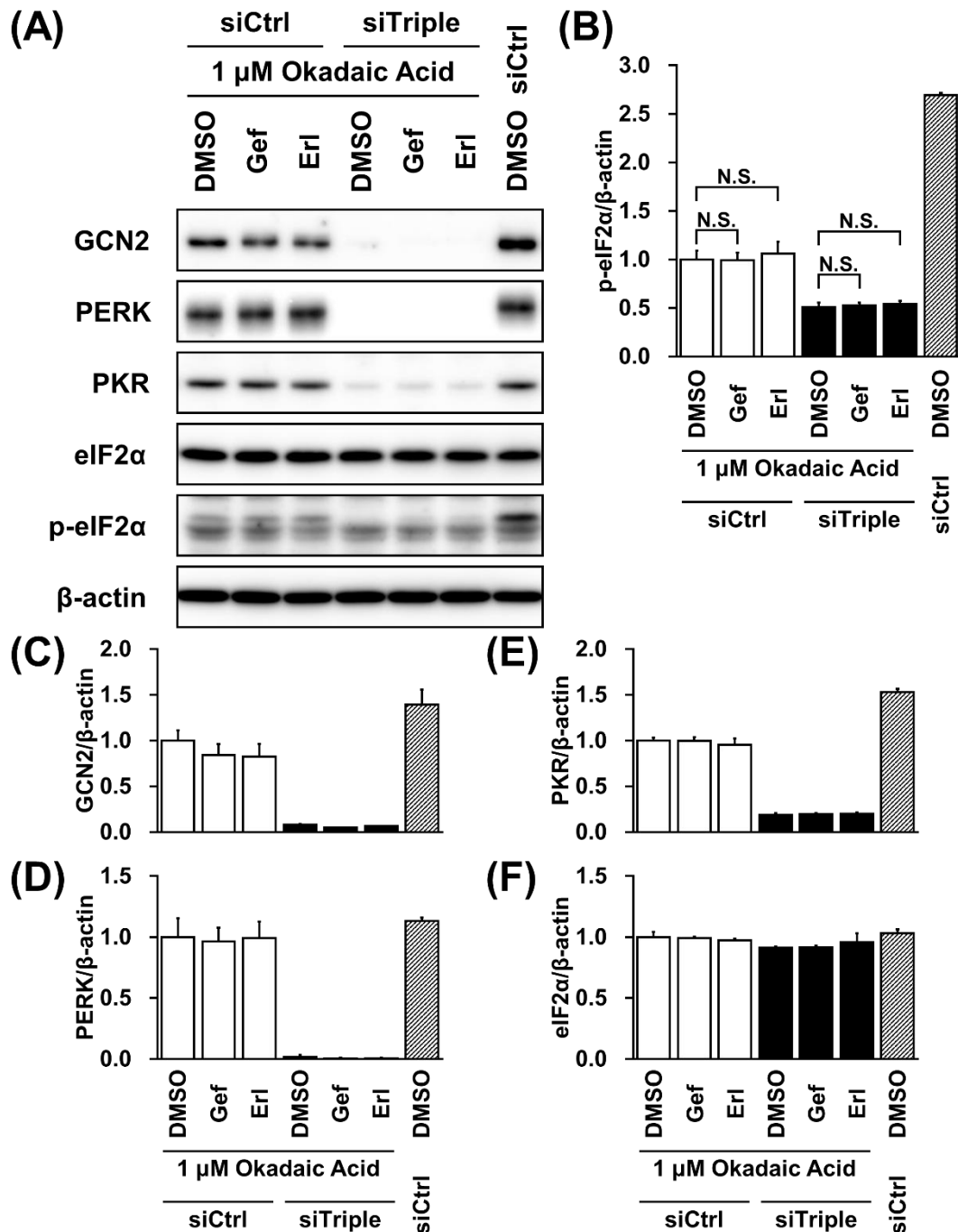


Figure II-3. Effects of okadaic acid on phospho-eIF2α level in A549 cells treated with gefitinib and erlotinib.

A549 cells were transfected with all of siRNAs against *GCN2* (30 pmol), *PERK* (30 pmol) and *PKR* (40 pmol), or control siRNA for 48 h. Cells were pre-treated with okadaic acid (1 μM) for 1 h before co-treatment with gefitinib or erlotinib (10 μM) and okadaic acid (1 μM) for further 3 h. Whole-cell lysates were analyzed by immunoblotting using antibodies specific for (B) phospho-eIF2α, (C) GCN2, (D) PERK, (E) PKR, (F) eIF2α or β-actin. (A) Representative images of three independent experiments are shown. Quantitative data are expressed as means ± S.E.M. N.S. indicates insignificant differences between two groups (one-way ANOVA with Tukey-Kramer's test).

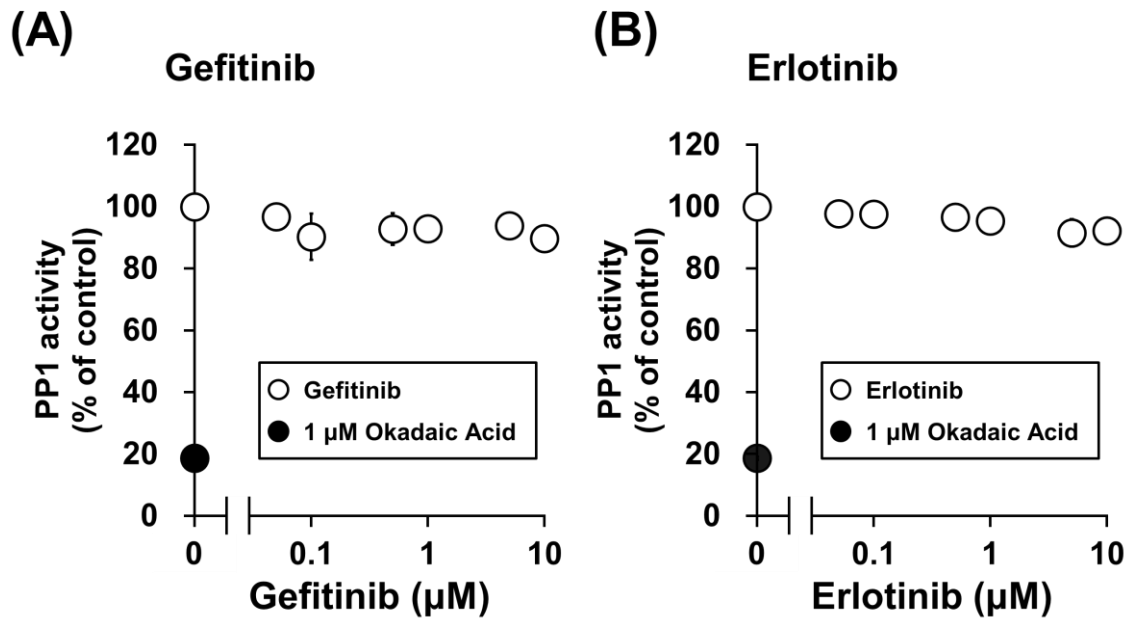


Figure II-4. Influence of (A) gefitinib and (B) erlotinib on PP1 activity.

Human recombinant PP1 (0.025 μg) and R110 substrate was incubated in the presence of gefitinib or erlotinib (0.05-10 μM) at 25°C for 10 min. The reaction products were detected with excitation/emission at 485/530 nm. Okadaic acid (1 μM) was used as a positive control of inhibition. Data are expressed as means \pm S.E.M.

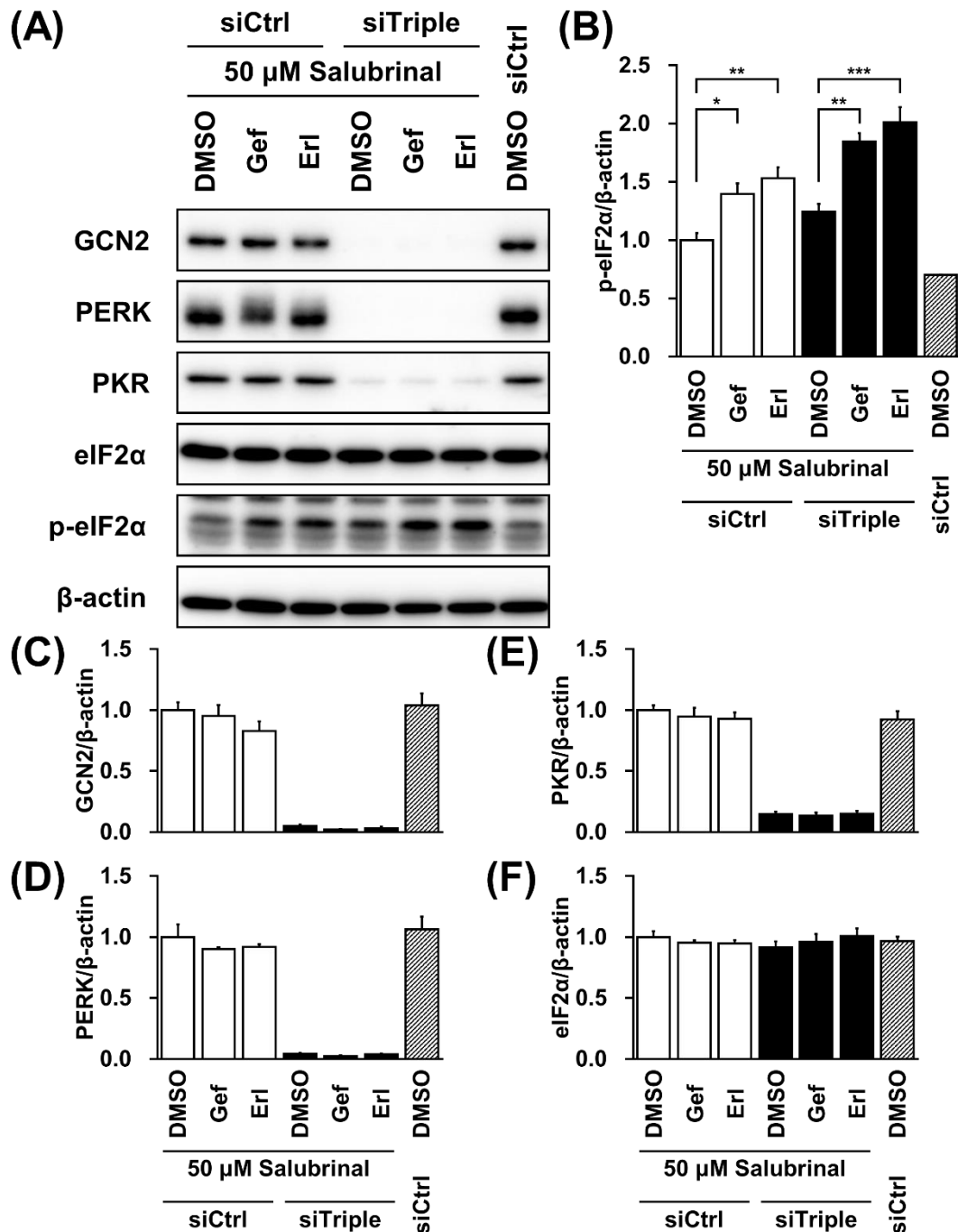


Figure II-5. Effects of salubrinal on phospho-eIF2α level in A549 cells treated with gefitinib and erlotinib.

A549 cells were transfected with all of siRNAs against *GCN2* (30 pmol), *PERK* (30 pmol) and *PKR* (40 pmol), or control siRNA for 48 h. Cells were pre-treated with salubrinal (50 μM) for 3 h before co-treatment with gefitinib or erlotinib (10 μM) and salubrinal (50 μM) for further 3 h. Whole-cell lysates were analyzed by immunoblotting using antibodies specific for (B) phospho-eIF2α, (C) GCN2, (D) PERK, (E) PKR, (F) eIF2α or β-actin. (A) Representative images of three independent experiments are shown. Quantitative data are expressed as means ± S.E.M. Asterisks indicate significant differences between two groups (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$, one-way ANOVA with Tukey-Kramer's test).

第三節 様々な分子標的薬の eIF2 α リン酸化レベルに対する影響

本研究において Gefitinib や Erlotinib がリン酸化 eIF2 α レベルを上昇させることを見出したが、その他の分子標的薬の eIF2 α のリン酸化に対する影響を検討した報告はほとんどない。そこで様々な分子標的薬がリン酸化 eIF2 α レベルを変動させるのかどうかについて検討した。A549 細胞に各分子標的薬を 10 μ M で 3 時間処置したところ、Afatinib、Dasatinib、Regorafenib および Sunitinib で処理した細胞においてリン酸化 eIF2 α レベルの上昇が認められた (Figure II-6)。また、Crizotinib、Nilotinib、Ruxolitinib、Sorafenib および Temsirolimus の場合にはリン酸化 eIF2 α レベルの低下が観察された (Figure II-6)。

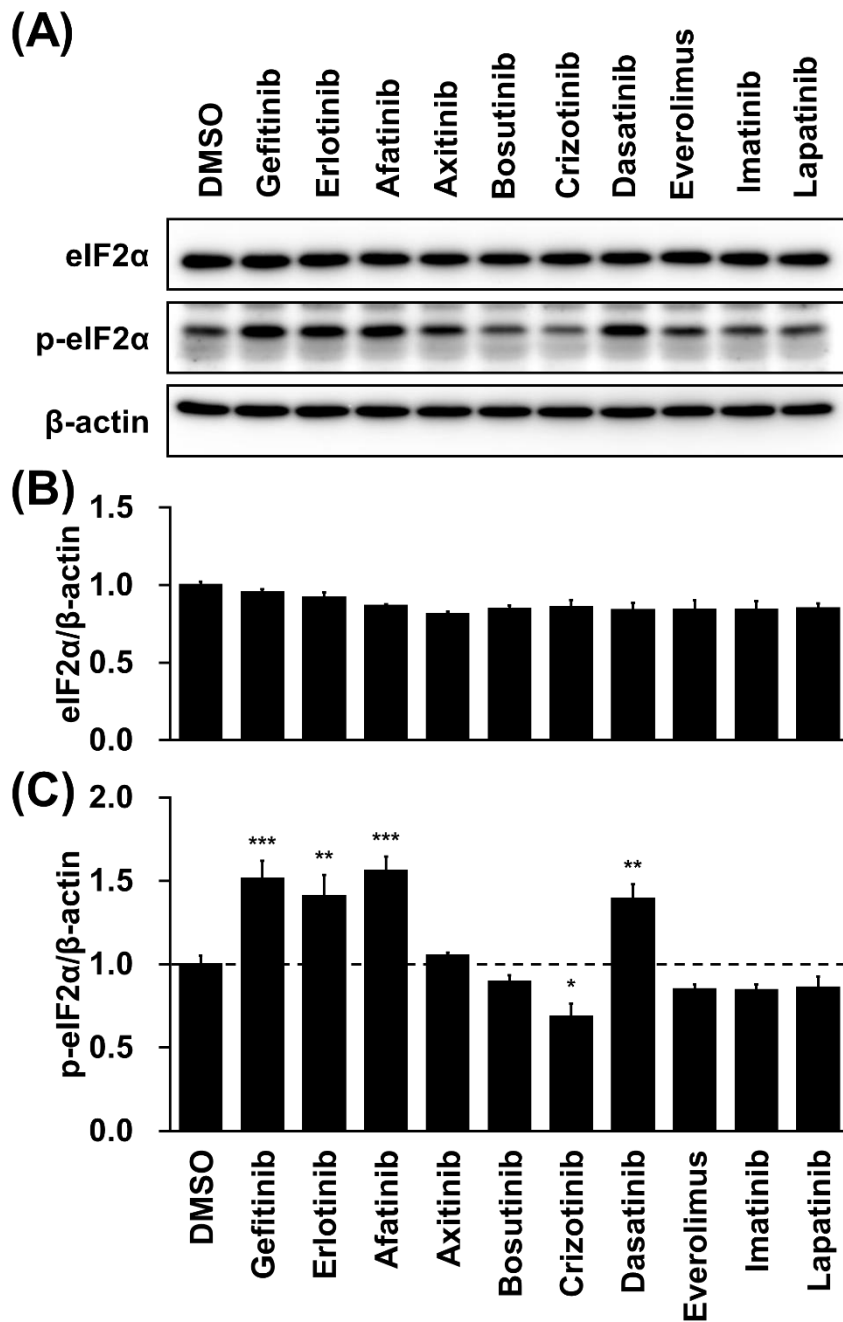


Figure II-6. Phospho-eIF2 α levels in A549 cells treated with various drugs.

A549 cells were treated with various drugs (10 μ M) for 3 h. Whole-cell lysates were analyzed by immunoblotting using antibodies specific for (B and E) eIF2 α , (C and F) phospho-eIF2 α or β -actin. (A and D) Representative images of three independent experiments are shown. Quantitative data are expressed as means \pm S.E.M. Asterisks indicate significant differences from DMSO group (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, one-way ANOVA with Dunnett's test).

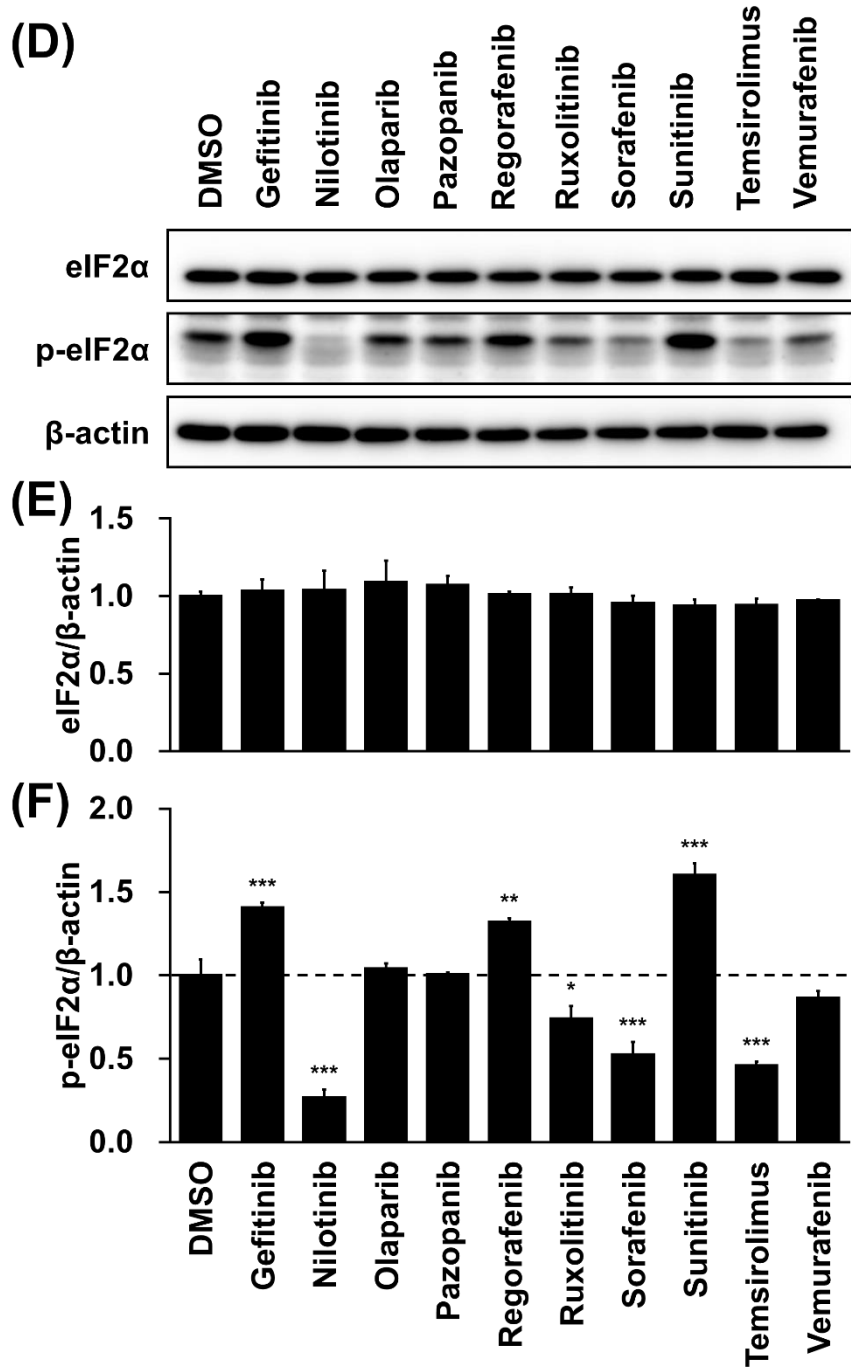


Figure II-6. Continued.

考察

本章では、第一章で見出した Gefitinib と Erlotinib によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇の機序について解析を進めた。まず両薬物によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇がストレスシグナルの活性化によるものかどうかを検証した。GCN2、PERK および PKR のそれぞれに対する siRNA、あるいは3つ全ての siRNA によって eIF2 α リン酸化酵素の発現を抑制した条件下においても、Gefitinib と Erlotinib によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇が認められた。これらの結果から、両薬物による eIF2 α のリン酸化レベルの上昇にこれらのリン酸化酵素は関与しないと考えられた。また、脱リン酸化過程について検討したところ、非特異的な脱リン酸化酵素阻害薬の okadaic acid の処置によって Gefitinib と Erlotinib によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇が抑制された。この結果は、両薬物によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇が脱リン酸化過程に起因する可能性を示唆する。ホスファターゼアッセイにより PP1 に対する Gefitinib と Erlotinib の直接的な阻害効果を検討したが、両薬物のいずれも PP1 活性を阻害しなかった。また、PP1/GADD34 複合体阻害薬 salubrinal の処置は DMSO 群でのリン酸化 eIF2 α レベルを上昇させたが、依然として両薬物によるさらなる上昇が認められた。以上より、Gefitinib と Erlotinib によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇は、PP1 の直接的な阻害ではない別の脱リン酸化過程の抑制に起因すると考えられた。

Gefitinib と Erlotinib の処置によって A549 細胞の3つのストレス応答分子のいずれもが活性化せず、ストレス応答性の PP1 機能調節因子である GADD34 も標的ではないと考えられたことから、A549 細胞には両薬物の処置によるストレスが生じていない可能性がある。今回検討できなかった CReP は非ストレス条件下での eIF2 α のリン酸化レベルを決定していると考えられているため、Gefitinib と Erlotinib によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇に CReP が関与している可能性がある。また、okadaic acid が阻害する脱リン酸化酵素は PP1 以外にも報告されていることから^{82,83}、PP1 以外の okadaic acid の標的分子についても検討する必要がある。

様々な分子標的薬を用いて検討した結果、Gefitinib と Erlotinib 以外の薬物のなかにもリン酸化 eIF2 α レベルを変動させるものがあることが判明した。例えば、第二世代 EGFR 阻害薬の Afatinib にも同様の作用が認められた。しかし、Everolimus や Temsirolimus のような間質性肺疾患を高頻度に発症する mTOR 阻害薬では eIF2 α の

リン酸化レベルの上昇は起きず、リン酸化 eIF2 α の上昇が認められた Sunitinib は間質性肺疾患をほとんど惹起しない。従って、間質性肺疾患の発症とリン酸化 eIF2 α の変動との相関は本研究では認められなかった。間質性肺疾患の発症には、投与開始時に肺が障害されているか否かが重要である。Sunitinib は根治切除不能又は転移性の腎細胞癌に使用される抗癌剤であり、そのような患者では非小細胞肺癌の患者における肺の状態とは異なる可能性がある。Everolimus や Temsirolimus のような mTOR 阻害薬による間質性肺疾患に関しては、発症は高頻度であるが症状は比較的軽度で済むことから、EGFR 阻害薬による間質性肺疾患とは病態や機序が異なる可能性がある。

生体分子のリン酸化と脱リン酸化のバランスは、細胞内および細胞間シグナルの調節において極めて重要である。PP1 の機能異常が癌の病態に関わるという報告はこれまでもあるが⁸⁴⁻⁸⁶、PP1 の基質タンパク質や関与するシグナル経路は多岐にわたるため、PP1 自体を標的とすることは薬理作用の選択性の観点から有望ではない。本研究によって、Gefitinib や Erlotinib が PP1 を直接的に阻害せずに eIF2 α の脱リン酸化過程を抑制している可能性が示唆されたことから、PP1 の多数の標的分子のうち、特定の分子の脱リン酸化を選択的に阻害できる可能性がある。PP1 機能調節因子に対して選択的に作用することによる脱リン酸化反応の阻害については、種々の病態に対する創薬標的の候補として検討していく余地があると思われる。

以上、本章では、標的分子の同定には至らなかったが Gefitinib と Erlotinib による eIF2 α のリン酸化レベルの上昇が既知のリン酸化酵素の活性化によるものではなく、脱リン酸化過程の抑制に起因している可能性を見出した。

結論

以上二章にわたり、著者は EGFR 阻害薬による間質性肺疾患の発症機序の解明を目的とした検討を行い、以下の結論を得た。

第一章 Gefitinib および Erlotinib による eIF2 α のリン酸化と肺胞上皮細胞の増殖抑制

EGFR 阻害薬は肺組織の修復を阻害することにより間質性肺疾患発症のリスクを増大すると考えられている。障害を受けた肺胞を修復する過程において II 型肺胞上皮細胞の増殖は重要であることから、第一章では、II 型肺胞上皮モデル細胞である A549 細胞に Gefitinib や Erlotinib が小胞体ストレスに関連した細胞シグナルに与える影響と間質性肺疾患との関連について検討した。両薬物は *PARK2* および *CHOP* の mRNA 発現を誘導し、*HRD1*、*SEL1*、*BIP* の mRNA 発現には影響しなかった。さらに、PERK/eIF2 α /ATF4 経路の活性化を検討したところ、Gefitinib と Erlotinib の処置によりリン酸化 eIF2 α レベルが上昇し、その後 ATF4 の誘導が見られたが、小胞体ストレスセンサー分子である PERK の活性化は認められなかった。以上のことから Gefitinib および Erlotinib は A549 細胞に対して小胞体ストレスを惹起しないが、eIF2 α /ATF4 経路を活性化することが判明した。また、これら EGFR 阻害薬は II 型肺胞上皮細胞モデルである A549 細胞に cyclin-D1 の発現低下と増殖抑制を引き起こした。eIF2 α のリン酸化を抑制する TUDCA は Gefitinib と Erlotinib による cyclin-D1 の発現低下および増殖抑制を軽減したことから、eIF2 α のリン酸化が A549 細胞の増殖抑制に関与していることが示された。一方、EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌である PC-9 細胞では、これら EGFR 阻害薬により細胞死が惹起され、リン酸化 eIF2 α レベルの上昇も観察された。しかしながら、TUDCA は両薬物による PC-9 細胞の細胞死に対して保護的に作用せず、TUDCA が EGFR 阻害薬の抗癌作用には影響しないことが示唆された。以上より、Gefitinib および Erlotinib によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇が II 型肺胞上皮細胞の増殖抑制に関与していることを見出した。

第二章 Gefitinib および Erlotinib による eIF2 α リン酸化機序の解析

第一章より、Gefitinib および Erlotinib によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇が II 型肺胞上皮細胞の増殖抑制に関与することが示唆された。そこで第二章では、これら EGFR 阻害薬による eIF2 α リン酸化の亢進がどのような機序で起きているか解析した。eIF2 α リン酸化酵素である PERK、GCN2 および PKR を siRNA により発現抑制した際の影響を検討した結果、それぞれに対する siRNA あるいは 3 つ全ての siRNA を導入した条件下においても、Gefitinib と Erlotinib によるリン酸化 eIF2 α レベルの上昇は認められた。次に eIF2 α の脱リン酸化過程について検討するため、非選択的脱リン酸化阻害薬 okadaic acid を処置した条件下で両薬物を処置したところ、eIF2 α のリン酸化は認められなかった。しかし、PP1/GADD34 複合体阻害薬である salubrinal を用いて同様の検討を行ったところ、Gefitinib と Erlotinib による eIF2 α のリン酸化作用は抑制されなかった。さらに、eIF2 α の脱リン酸化を担う PP1 に対する直接の阻害作用を検討したところ、Gefitinib と Erlotinib は PP1 の脱リン酸化活性を阻害しなかった。以上の結果より、PP1 に対する直接阻害以外の形式で、Gefitinib および Erlotinib が eIF2 α の脱リン酸化反応を低下させている可能性が示唆された。

以上、著者は Gefitinib および Erlotinib による eIF2 α の脱リン酸化反応の低下がリン酸化 eIF2 α レベルの上昇を引き起こし、cyclin-D1 の減少を介して II 型肺胞上皮モデルである A549 細胞の増殖抑制に関与していることを見出した。また、eIF2 α のリン酸化を抑制する TUDCA が、両薬物による A549 細胞の増殖抑制を軽減するのに対し、PC-9 細胞における細胞死に対しては保護的に作用しないことを示した。本研究の成果は、EGFR 阻害薬による II 型肺胞上皮細胞の増殖抑制の機序に eIF2 α が関与していることを示唆するものであり、間質性肺疾患の発症機序の解明と予防法の開発に有用な基礎的知見を提供するものである。

謝辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学医学部附属病院 松原和夫教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、種々の有益な御助言と御指導を戴きました京都大学大学院薬学研究科 矢野育子准教授、京都大学医学部附属病院 中川貴之准教授、米澤淳講師、今井哲司助教、大村友博助教、中川俊作助教、立命館大学薬学部 桂敏也教授、九州大学病院 増田智先教授、旭川医科大学病院 福土将秀准教授に深謝致します。

同じ研究グループのメンバーとして苦楽を共にし、互いに切磋琢磨することのできた笹岡美和学士、小島奈津美学士、松田裕貴学士、橋本凱朝くんをはじめ、医療薬剤学分野ならびに臨床薬学教育分野の諸氏に心より感謝致します。

最後に、大学院生活を精神的・経済的に支え、研究に専念できる環境を与えて下さった両親に深く感謝致します。

実験の部

第一章 実験の部

【1】 試薬

Gefitinib は LC Laboratories より、Erlotinib hydrochloride は Santa Cruz Biotechnology より購入した。Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) は Sigma-Aldrich より購入した。Hoechst33342 と 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide (MTT) は Dojindo Laboratories より購入した。Tunicamycin は Wako Pure Chemicals より購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、Roswell Park Memorial Institute 1640 培地 (RPMI1640)、リン酸緩衝液は、Sigma-Aldrich より購入した。その他の試薬は、市販特級品を用いた。

【2】 抗体

C/EBP homologous protein (CHOP) (#2895)、cleaved caspase-3 (#9661)、cyclin-D1 (#2926)、epidermal growth factor receptor (EGFR) (#2232)、eukaryotic initiation factor 2 α subunit (eIF2 α) (#9722)、phospho-eIF2 α (Ser51) (#9721)、protein kinase R-like ER kinase (PERK) (#3192) に対する抗体は Cell Signaling Technology より購入した。抗 KDEL 配列抗体 (ADI-SPA-827-F) は Enzo Life Sciences より、抗 activating transcription factor 4 (ATF4) 抗体 (sc-200) は Santa Cruz Biotechnology より購入した。抗 β -actin 抗体 (AC-15) は Sigma-Aldrich より購入した。

【3】 細胞培養と薬物処置

A549 細胞 (ECACC、86012804) は旭川医科大学病院 法医学講座 清水恵子教授より、PC-9 細胞は京都大学医学部附属病院 呼吸器外科 毛受暁史助教より分与して頂いた。A549 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS) 含有 DMEM で、PC-9 細胞は 10% FBS 含有 RPMI1640 で、それぞれ 10 cm Dish に接着させて 5% CO₂、37°C 環境下にて維持培養した。

実験の際には、24-well plate (MTT 試験)、12-well plate (色素染色) または 6-well plate (real-time PCR および western blotting) に、A549 細胞を 4.2×10^4 cells/cm²、PC-

9 細胞を 1.6×10^4 cells/cm² で播種した。薬物を含む FBS 不含培地を dimethylsulfoxide (DMSO) 濃度が 0.1% 以下となるように調製し、播種の 24 時間後あるいは siRNA 導入の 48 時間後に細胞に処置した。

【4】 RNA 発現の定量

RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) を用いて、A549 細胞から total RNA を抽出した。得られた total RNA (20 µg) を鋳型として High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) により逆転写反応を行い、cDNA を作製した。StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) および TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) を用いて、cDNA に対して定量的 real-time PCR を行った。以下の遺伝子に対する特異的なプローブは Applied Biosystems から購入した。18S rRNA は mRNA 発現量の内標準として使用した。

Binding immunoglobulin protein (BIP), Hs00607129_gH

CHOP, Hs00358796_g1

HMG-CoA reductase degradation 1 (HRD1), Hs00381211_m1

Parkinson juvenile disease protein 2 (PARK2), Hs01038325_m1

Suppressor or enhancer of lin-12 1 (SEL1), Hs01071406_m1

18S rRNA, Hs99999901_s1

【5】 タンパク質発現の定量

細胞を 20 mM HEPES、120 mM NaCl、5 mM EDTA、1% Triton X-100、10% Glycerol、10 mM NaF、2 mM Na₃VO₄、1% protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque) を含む lysis buffer により可溶化し、Bradford 法により γ -globulin で作成した検量線からタンパク濃度を求め、4 µg/µL に希釈した。等量のタンパク質を SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜に転写した。5% skim milk 含有 TBS-T によって 1 時間ブロッキングを行った後、一次抗体と 4°C で一晩反応させた。その後、適切な二次抗体と 1 時間反応させた後、Luminata Crescendo (Millipore) あるいは ECL select (GE Healthcare) を用いて発光を検出した。得られた画像は Image J ソフトウェア (NIH) を用いてバンド強度の測定を行い、それぞれのタンパク質の強度は対応する β -actin の強度で補正した。

【6】細胞増殖の評価

薬物処置から当該時間経過後の細胞に 0.5 mg/mL MTT を含む DMEM を処置し、37°C で 30 分インキュベートした。培地を除去後、生成されたホルマザン色素を 1 mL の DMSO で溶解し、そのうち 200 μ L を用いて 560 nm の吸光度を測定した。リファレンス波長 630 nm の吸光度を 560 nm の吸光度から差し引いた。

【7】細胞死の評価

薬物曝露後、トリプシンにより細胞を剥がし 1×PBS で洗浄した。Trypan blue 染色と細胞計数は付属の Trypan Blue Stain 0.4% および Countess (Invitrogen) を用いて行った。アポトーシスおよびネクローシスした細胞の検出は、Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit (PromoKine) を用いて行った。添付の手順書に従い Hoechst 33342、FITC-Annexin V および Ethidium Homodimer III を含む 50 μ L の 1×Binding Buffer と 50 μ L の細胞懸濁液を混ぜ合わせ、室温で 15 分インキュベートした後に 1×Binding Buffer で洗浄した。蛍光イメージは BZ-9000 (Keyence) を用いて撮像し、染色された細胞を計測した。アポトーシス細胞およびネクローシス細胞の割合はそれぞれ FITC-Annexin V と Ethidium Homodimer III の値を Hoechst 33342 の値で除すことにより算出した。

【8】EGFR に対する RNA 干渉

A549 細胞の播種の 24 時間後に、50 pmol の Human EGFR に対する Stealth RNAi siRNA (Life Technologies) を Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Life Technologies) を用いて細胞内に導入した。陰性対照として Stealth RNAi siRNA Negative Control Low GC (Life Technologies) を用いた。使用した EGFR を特異的に抑制する siRNA の標的配列は、以下に示す通りである。

EGFR-siRNA (HSS103116) : 5'-CCTATGCCTTAGCAGTCTTATCTAA-3'

【9】統計解析

解析により得られた定量的なデータは Mean \pm S.E.M. で表現した。統計解析は GraphPad Prism 5 を用いて行った。多重比較検定は、一元配置分散分析の後 Dunnett

の検定あるいは Tukey-Kramer の検定を行い、P 値が 0.05 以下である場合を有意と判定した。

第二章 実験の部

【1】 試薬

Afatinib、Crizotinib、Dasatinib、Everolimus、Imatinib、Lapatinib Di-p-toluenesulfonate salt、Nilotinib、Olaparib、Pazopanib、Regorafenib、Ruxolitinib、Sorafenib p-toluenesulfonate salt、Sunitinib malate salt、Vemurafenib は LC Laboratories より購入した。Axitinib、Bosutinib、Salubrinal、Temsirolimus は Sigma-Aldrich より購入した。Okadaic acid は Calbiochem より購入した。その他の試薬は、第一章と同様のもの、もしくは市販特級品を用いた。

【2】 抗体

General control nonderepressible 2 (GCN2) (#3302)、protein kinase RNA-activated (PKR) (#3072) に対する抗体は Cell Signaling Technology より購入した。PERK、eIF2 α 、phospho-eIF2 α (Ser51)、 β -actin に対する抗体は第一章と同様のものを使用した。

【3】 細胞培養と薬物処置

A549 細胞の培養と薬物の処置は第一章と同様の方法で行った。

【4】 eIF2 α リン酸化酵素に対する RNA 干渉

A549 細胞の播種の 24 時間後に、各遺伝子に対する Stealth RNAi siRNA (Life Technologies) を Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Life Technologies) を用いて細胞内に導入した。陰性対照として Stealth RNAi siRNA Negative Control Medium GC (Life Technologies) を用いた。使用した siRNA の標的配列は、以下に示す通りである。

GCN2-siRNA (HSS140746) : 5'-GCATAAGGTCCTGAGTGCATCTAAT-3'

PERK-siRNA (HSS190343) : 5'-CACCAGTAGCAAATCTTCTTCTGAA-3'

PKR-siRNA (HSS183404) : 5'-CAGGTTTCTTCATGGAGGAACTTAA-3'

【5】 タンパク質発現の定量

タンパク質発現の定量は第一章と同様にして行った。

【6】 脱リン酸化反応の評価

脱リン酸化反応は、Human Recombinant Protein Phosphatase 1 (Millipore) および ProFluor Ser/Thr PPase Assay (Promega) を用いて評価した。予め 5 μ L の薬物を入れた Black-walled 96-well plate の各 well に 20 μ L の Phosphatase Solution を入れた後、25 μ L のリン酸化状態の R110 Substrate を加え、脱リン酸化反応の開始とした。22-25°C の範囲で 10 分インキュベートした後、25 μ L の Protease Solution を加えて 90 分間、25°C で R110 Substrate の分解反応を行った。その後、25 μ L の Stabilizer Solution を加えて、励起波長 485 nm、蛍光波長 530 nm における蛍光強度を測定した。

【7】 統計解析

統計解析は第一章と同様にして行った。

論文目録

本研究の内容は、以下の論文に発表した。

Gefitinib and Erlotinib Lead to Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 2 Alpha Independent of Epidermal Growth Factor Receptor in A549 Cells.

PLoS One. **10**: e0136176, 2015.

Mechanism of eIF2 α Phosphorylation Induced by Gefitinib and Erlotinib in A549 Cells.

Manuscript in preparation

引用文献

1. Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, Allen C, Hansen G, Woodbrook R, Wolfe C, Hamadeh RR, Moore A, Werdecker A, Gessner BD, Te Ao B, McMahon B, Karimkhani C, Yu C, Cooke GS, Schwebel DC, Carpenter DO, Pereira DM, Nash D, Kazi DS, De Leo D, Plass D, Ukwaja KN, Thurston GD, Yun Jin K, Simard EP, Mills E, Park E-K, Catalá-López F, DeVeber G, Gotay C, Khan G, Hosgood HD, Santos IS, Leasher JL, Singh J, Leigh J, Jonas J, Sanabria J, Beardsley J, Jacobsen KH, Takahashi K, Franklin RC, Ronfani L, Montico M, Naldi L, Tonelli M, Geleijnse J, Petzold M, Shrimel MG, Younis M, Yonemoto N, Breitborde N, Yip P, Pourmalek F, Lotufo PA, Esteghamati A, Hankey GJ, Ali R, Lunevicius R, Malekzadeh R, Dellavalle R, Weintraub R, Lucas R, Hay R, Rojas-Rueda D, Westerman R, Sepanlou SG, Nolte S, Patten S, Weichenthal S, Abera SF, Fereshtehnejad S-M, Shiue I, Driscoll T, Vasankari T, Alsharif U, Rahimi-Movaghar V, Vlassov V V, Marcenes WS, Mekonnen W, Melaku YA, Yano Y, Artaman A, Campos I, MacLachlan J, Mueller U, Kim D, Trillini M, Eshrati B, Williams HC, Shibuya K, Dandona R, Murthy K, Cowie B, Amare AT, Antonio CA, Castañeda-Orjuela C, van Gool CH, Violante F, Oh I-H, Deribe K, Soreide K, Knibbs L, Kereselidze M, Green M, Cardenas R, Roy N, Tillman T, Li Y, Krueger H, Monasta L, Dey S, Sheikhabaehi S, Hafezi-Nejad N, Kumar GA, Sreeramareddy CT, Dandona L, Wang H, Vollset SE, Mokdad A, Salomon JA, Lozano R, Vos T, Forouzanfar M, Lopez A, Murray C, Naghavi M. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* **1**:505–527, 2015.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* **100**:57–70, 2000.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* **144**:646–674, 2011.
4. Jorge SEDC, Kobayashi SS, Costa DB. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in lung cancer: preclinical and clinical data. *Brazilian J Med Biol Res.* **47**:929–939, 2014.
5. Shea M, Costa DB, Rangachari D. Management of advanced non-small cell lung cancers with known mutations or rearrangements: latest evidence and treatment

approaches. *Ther Adv Respir Dis.* :in press.

6. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard J-Y, Nishiwaki Y, Vansteenkiste J, Kudoh S, Rischin D, Eek R, Horai T, Noda K, Takata I, Smit E, Averbuch S, Macleod A, Feyereislova A, Dong R-P, Baselga J. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol.* **21**:2237–2246, 2003.
7. Miller VA, Kris MG, Shah N, Patel J, Azzoli C, Gomez J, Krug LM, Pao W, Rizvi N, Pizzo B, Tyson L, Venkatraman E, Ben-Porat L, Memoli N, Zakowski M, Rusch V, Heelan RT. Bronchioloalveolar pathologic subtype and smoking history predict sensitivity to gefitinib in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* **22**:1103–1109, 2004.
8. Paez JG, Jänne P a, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science (80-).* **304**:1497–1500, 2004.
9. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* **350**:2129–2139, 2004.
10. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Okinaga S, Hirano H, Yoshimori K, Harada T, Ogura T, Ando M, Miyazawa H, Tanaka T, Saijo Y, Hagiwara K, Morita S, Nukiwa T. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med.* **362**:2380–2388, 2010.
11. Rosell R, Molina MA, Costa C, Simonetti S, Gimenez-Capitan A, Bertran-Alamillo J, Mayo C, Moran T, Mendez P, Cardenal F, Isla D, Provencio M, Cobo M, Insa A, Garcia-Campelo R, Reguart N, Majem M, Viteri S, Carcereny E, Porta R, Massuti B, Queralt C, de Aguirre I, Sanchez JM, Sanchez-Ronco M, Mate JL, Ariza A, Benlloch

- S, Sanchez JJ, Bivona TG, Sawyers CL, Taron M. Pretreatment EGFR T790M mutation and BRCA1 mRNA expression in erlotinib-treated advanced non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations. *Clin Cancer Res.* **17**:1160–1168, 2011.
12. Inoue A, Saijo Y, Maemondo M, Gomi K, Tokue Y, Kimura Y, Ebina M, Kikuchi T, Moriya T, Nukiwa T. Severe acute interstitial pneumonia and gefitinib. *Lancet.* **361**:137–139, 2003.
 13. Cersosimo RJ. Gefitinib: an adverse effects profile. *Expert Opin Drug Saf.* **5**:469–479, 2006.
 14. Miyake K, Tani K, Kakiuchi S, Suzuka C, Toyoda Y, Kishi J, Tezuka T, Yuasa S, Hanibuchi M, Aono Y, Nishioka Y, Sone S. Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (gefitinib) augments pneumonitis, but attenuates lung fibrosis in response to radiation injury in rats. *J Med Investig.* **59**:174–185, 2012.
 15. Ishiguro N, Oyabu M, Sato T, Maeda T, Minami H, Tamai I. Decreased biosynthesis of lung surfactant constituent phosphatidylcholine due to inhibition of choline transporter by gefitinib in lung alveolar cells. *Pharm Res.* **25**:417–427, 2008.
 16. Namba T, Tanaka K, Hoshino T, Azuma A, Mizushima T. Suppression of expression of heat shock protein 70 by gefitinib and its contribution to pulmonary fibrosis. *PLoS One.* **6**:e27296, 2011.
 17. Kudoh S, Kato H, Nishiwaki Y, Fukuoka M, Nakata K, Ichinose Y, Tsuboi M, Yokota S, Nakagawa K, Suga M, Jiang H, Itoh Y, Armour A, Watkins C, Higenbottam T, Nyberg F. Interstitial lung disease in Japanese patients with lung cancer: a cohort and nested case-control study. *Am J Respir Crit Care Med.* **177**:1348–1357, 2008.
 18. Higenbottam T, Kuwano K, Nemery B, Fujita Y. Understanding the mechanisms of drug-associated interstitial lung disease. *Br J Cancer.* **91**:S31–S37, 2004.
 19. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* **342**:1334–1349, 2000.
 20. Uhal BD. Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am J Physiol.* **272**:L1031–L1045, 1997.
 21. Petty WJ, Dragnev KH, Memoli VA, Ma Y, Desai NB, Biddle A, Davis TH, Nugent WC, Memoli N, Hamilton M, Iwata KK, Rigas JR, Dmitrovsky E. Epidermal growth

- factor receptor tyrosine kinase inhibition represses cyclin D1 in aerodigestive tract cancers. *Clin Cancer Res.* **10**:7547–7554, 2004.
22. Orzáez M, Guevara T, Sancho M, Pérez-Payá E. Intrinsic caspase-8 activation mediates sensitization of erlotinib-resistant tumor cells to erlotinib/cell-cycle inhibitors combination treatment. *Cell Death Dis.* **3**:e415, 2012.
 23. Kalish LH, Kwong RA, Cole IE, Gallagher RM, Sutherland RL, Musgrove EA. Deregulated cyclin D1 expression is associated with decreased efficacy of the selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res.* **10**:7764–7774, 2004.
 24. Raven JF, Baltzis D, Wang S, Mounir Z, Papadakis AI, Gao HQ, Koromilas AE. PKR and PKR-like endoplasmic reticulum kinase induce the proteasome-dependent degradation of cyclin D1 via a mechanism requiring eukaryotic initiation factor 2 α phosphorylation. *J Biol Chem.* **283**:3097–3108, 2008.
 25. Hamanaka R, Bennett B, Cullinan S, Diehl J. PERK and GCN2 contribute to eIF2 α phosphorylation and cell cycle arrest after activation of the unfolded protein response pathway. *Mol Biol Cell.* **16**:5493–5501, 2005.
 26. Rowlands AG, Panniers R, Henshaw EC. The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2. *J Biol Chem.* **263**:5526–5533, 1988.
 27. Gebauer F, Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**:827–835, 2004.
 28. Thomas AQ, Lane K, Phillips J, Prince M, Markin C, Speer M, Schwartz DA, Gaddipati R, Marney A, Johnson J, Roberts R, Haines J, Stahlman M, Loyd JE. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med.* **165**:1322–1328, 2002.
 29. Lawson WE, Cheng D-S, Degryse AL, Tanjore H, Polosukhin V V, Xu XC, Newcomb DC, Jones BR, Roldan J, Lane KB, Morrissey EE, Beers MF, Yull FE, Blackwell TS. Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**:10562–10567, 2011.

30. Jorgensen E, Stinson A, Shan L, Yang J, Gietl D, Albino AP. Cigarette smoke induces endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in normal and malignant human lung cells. *BMC Cancer*. **8**:229, 2008.
31. Omura T, Asari M, Yamamoto J, Oka K, Hoshina C, Maseda C, Awaya T, Tasaki Y, Shiono H, Yonezawa A, Masuda S, Matsubara K, Shimizu K. Sodium tauroursodeoxycholate prevents paraquat-induced cell death by suppressing endoplasmic reticulum stress responses in human lung epithelial A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **432**:689–694, 2013.
32. Lin Y-C, Wu M-H, Wei T-T, Lin Y-C, Huang W-C, Huang L-Y, Lin Y-T, Chen C-C. Metformin sensitizes anticancer effect of dasatinib in head and neck squamous cell carcinoma cells through AMPK-dependent ER stress. *Oncotarget*. **5**:298–308, 2014.
33. Kerkelä R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, Walters B, Shevtsov S, Pesant S, Clubb FJ, Rosenzweig A, Salomon RN, Van Etten RA, Alroy J, Durand J-B, Force T. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med*. **12**:908–916, 2006.
34. Rahmani M, Davis EM, Crabtree TR, Habibi JR, Nguyen TK, Dent P, Grant S. The kinase inhibitor sorafenib induces cell death through a process involving induction of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*. **27**:5499–5513, 2007.
35. Imai Y, Soda M, Takahashi R. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem*. **275**:35661–35664, 2000.
36. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. **12**:982–995, 1998.
37. Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ. Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest*. **118**:3378–3389, 2008.
38. Munro S, Pelham HR. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell*. **46**:291–300, 1986.

39. Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J. The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*. **332**:462–464, 1988.
40. Kaneko M, Ishiguro M, Niinuma Y, Uesugi M, Nomura Y. Human HRD1 protects against ER stress-induced apoptosis through ER-associated degradation. *FEBS Lett*. **532**:147–152, 2002.
41. Kaneko M, Nomura Y. ER signaling in unfolded protein response. *Life Sci*. **74**:199–205, 2003.
42. Bouman L, Schlierf A, Lutz AK, Shan J, Deinlein A, Kast J, Galehdar Z, Palmisano V, Patenge N, Berg D, Gasser T, Augustin R, Trümbach D, Irrcher I, Park DS, Wurst W, Kilberg MS, Tatzelt J, Winklhofer KF. Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell Death Differ*. **18**:769–782, 2011.
43. Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Reimold AM, Ferrara M, Fafournoux P. Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Mol Cell Biol*. **20**:7192–7204, 2000.
44. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. **397**:271–274, 1999.
45. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*. **5**:897–904, 2000.
46. Cybulsky AV, Takano T, Papillon J, Bijian K. Role of the endoplasmic reticulum unfolded protein response in glomerular epithelial cell injury. *J Biol Chem*. **280**:24396–24403, 2005.
47. Yamaguchi H, Wang H-G. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem*. **279**:45495–45502, 2004.
48. Henkel AS, Dewey AM, Anderson KA, Olivares S, Green RM. Reducing endoplasmic reticulum stress does not improve steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-

- deficient diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **303**:G54–G59, 2012.
49. Macedo B, Batista AR, Ferreira N, Almeida MR, Saraiva MJ. Anti-apoptotic treatment reduces transthyretin deposition in a transgenic mouse model of Familial Amyloidotic Polyneuropathy. *Biochim Biophys Acta.* **1782**:517–522, 2008.
 50. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, Roth JA, Herz J, Minna JD, Gazdar AF. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* **97**:339–46, 2005.
 51. Arao T, Fukumoto H, Takeda M, Tamura T, Saijo N, Nishio K. Small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor as a target for ZD6474. *Cancer Res.* **64**:9101–9104, 2004.
 52. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* **20**:6755–6767, 2000.
 53. Lee A-H, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* **23**:7448–7459, 2003.
 54. Kaneko M, Yasui S, Niinuma Y, Arai K, Omura T, Okuma Y, Nomura Y. A different pathway in the endoplasmic reticulum stress-induced expression of human HRD1 and SEL1 genes. *FEBS Lett.* **581**:5355–5360, 2007.
 55. Yamamoto K, Suzuki N, Wada T, Okada T, Yoshida H, Kaufman RJ, Mori K. Human HRD1 promoter carries a functional unfolded protein response element to which XBP1 but not ATF6 directly binds. *J Biochem.* **144**:477–486, 2008.
 56. Palam LR, Baird TD, Wek RC. Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation. *J Biol Chem.* **286**:10939–10949, 2011.
 57. Gotoh T, Oyadomari S, Mori K, Mori M. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP. *J Biol Chem.* **277**:12343–12350, 2002.

58. Yoon Y-K, Kim H-P, Han S-W, Oh DY, Im S-A, Bang Y-J, Kim T-Y. KRAS mutant lung cancer cells are differentially responsive to MEK inhibitor due to AKT or STAT3 activation: implication for combinatorial approach. *Mol Carcinog.* **49**:353–362, 2010.
59. McGrath-Morrow S, Lauer T, Yee M, Neptune E, Podowski M, Thimmulappa RK, O'Reilly M, Biswal S. Nrf2 increases survival and attenuates alveolar growth inhibition in neonatal mice exposed to hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **296**:L565–L573, 2009.
60. Marsh LM, Cakarova L, Kwapiszewska G, von Wulffen W, Herold S, Seeger W, Lohmeyer J. Surface expression of CD74 by type II alveolar epithelial cells: a potential mechanism for macrophage migration inhibitory factor-induced epithelial repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **296**:L442–L452, 2009.
61. Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol.* **3**:802–808, 2001.
62. Park OK, Schaefer TS, Nathans D. In vitro activation of Stat3 by epidermal growth factor receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:13704–13708, 1996.
63. Moriuchi A, Hirono S, Ido A, Ochiai T, Nakama T, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H. Additive and inhibitory effects of simultaneous treatment with growth factors on DNA synthesis through MAPK pathway and G1 cyclins in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **280**:368–373, 2001.
64. Pagliarini R, Shao W, Sellers WR. Oncogene addiction: pathways of therapeutic response, resistance, and road maps toward a cure. *EMBO Rep.* **16**:280–296, 2015.
65. Rooney C, Sethi T. Advances in Molecular Biology of Lung Disease: Aiming for Precision Therapy in Non-small Cell Lung Cancer. *Chest.* **148**:1063–1072, 2015.
66. Faber AC, Corcoran RB, Ebi H, Sequist L V, Waltman BA, Chung E, Incio J, Digumarthy SR, Pollack SF, Song Y, Muzikansky A, Lifshits E, Roberge S, Coffman EJ, Benes CH, Gómez HL, Baselga J, Arteaga CL, Rivera MN, Dias-Santagata D, Jain RK, Engelman JA. BIM expression in treatment-naïve cancers predicts responsiveness to kinase inhibitors. *Cancer Discov.* **1**:352–365, 2011.
67. Vattem KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA

- translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**:11269–11274, 2004.
68. Zhang P, McGrath BC, Reinert J, Olsen DS, Lei L, Gill S, Wek SA, Vattem KM, Wek RC, Kimball SR, Jefferson LS, Cavener DR. The GCN2 eIF2alpha kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. *Mol Cell Biol*. **22**:6681–6688, 2002.
69. Dong J, Qiu H, Garcia-Barrio M, Anderson J, Hinnebusch AG. Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol Cell*. **6**:269–279, 2000.
70. Kebache S, Cardin E, Nguyễn DT, Chevet E, Larose L. Nck-1 antagonizes the endoplasmic reticulum stress-induced inhibition of translation. *J Biol Chem*. **279**:9662–9671, 2004.
71. Barber GN. The dsRNA-dependent protein kinase, PKR and cell death. *Cell Death Differ*. **12**:563–570, 2005.
72. Chen J-J. Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias. *Blood*. **109**:2693–2699, 2007.
73. Korrodi-Gregório L, Esteves SLC, Fardilha M. Protein phosphatase 1 catalytic isoforms: specificity toward interacting proteins. *Transl Res*. **164**:366–391, 2014.
74. Ceulemans H, Bollen M. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev*. **84**:1–39, 2004.
75. Fardilha M, Esteves SLC, Korrodi-Gregório L, da Cruz e Silva OAB, da Cruz e Silva FF. The physiological relevance of protein phosphatase 1 and its interacting proteins to health and disease. *Curr Med Chem*. **17**:3996–4017, 2010.
76. Jousse C, Oyadomari S, Novoa I, Lu P, Zhang Y, Harding HP, Ron D. Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol*. **163**:767–775, 2003.
77. Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol*. **23**:1292–1303, 2003.
78. Rojas M, Vasconcelos G, Dever TE. An eIF2 α -binding motif in protein phosphatase 1 subunit GADD34 and its viral orthologs is required to promote dephosphorylation of

- eIF2 α . *Proc Natl Acad Sci.* **112**:E3466–E3475, 2015.
79. Otsuka R, Harada N, Aoki S, Shirai K, Nishitsuji K, Nozaki A, Hatakeyama A, Shono M, Mizusawa N, Yoshimoto K, Nakaya Y, Kitahata H, Sakaue H. C-terminal region of GADD34 regulates eIF2 α dephosphorylation and cell proliferation in CHO-K1 cells. *Cell Stress Chaperones.* **21**:29–40, 2015.
 80. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *J Cell Biol.* **153**:1011–1022, 2001.
 81. Kloft N, Neukirch C, von Hoven G, Bobkiewicz W, Weis S, Boller K, Husmann M. A subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 α -phosphatase (CreP/PPP1R15B) regulates membrane traffic. *J Biol Chem.* **287**:35299–35317, 2012.
 82. Bialojan C, Takai A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J.* **256**:283–290, 1988.
 83. Takai A, Bialojan C, Troschka M, Rüegg JC. Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin. *FEBS Lett.* **217**:81–84, 1987.
 84. Molina-Pinelo S, Ferrer I, Blanco-Aparicio C, Peregrino S, Pastor MD, Alvarez-Vega J, Suarez R, Verge M, Marin JJ, Hernandez-Losa J, Ramon y Cajal S, Paz-Ares L, Carnero A. Down-regulation of spinophilin in lung tumours contributes to tumourigenesis. *J Pathol.* **225**:73–82, 2011.
 85. Kim W, Youn H, Kang C, Youn B. Inflammation-induced radioresistance is mediated by ROS-dependent inactivation of protein phosphatase 1 in non-small cell lung cancer cells. *Apoptosis.* **20**:1242–1252, 2015.
 86. Hsu L-C, Huang X, Seasholtz S, Potter DM, Gollin SM. Gene amplification and overexpression of protein phosphatase 1 α in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oncogene.* **25**:5517–5526, 2006.