

癌に関わる ErbB シグナル伝達系の数理解析

成尾佳美^{1,2}・長嶋剛史¹・中山亮子¹・田中博²・畠山真理子¹

1 理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター

2 東京医科歯科大学大学院 生命情報科学教育部

細胞内のシグナル伝達系は、細胞運命制御の中心的役割を果たしており、その脱制御は様々な種類の癌に関与している。シグナル伝達系に関与する分子の動的振る舞いは複雑で分子同士が密接に関与しているため、多段階的な細胞内の反応を一連のネットワークとして数理モデルを利用し記述することの意義は大きい。我々は、癌に関係の深い ErbB シグナル伝達系について癌細胞を用いた実験と数理解析の両方を行ってきた。現在進行中の、肺癌治療薬に対する肺癌細胞の感度解析の結果とともに紹介する。

1. 背景と目的

細胞内シグナル伝達系とは、細胞膜に発現している細胞膜受容体が細胞外からのシグナルを受け取り、遺伝子発現を引き起こすまでの過程を示す。この過程において、細胞内では分子の生化学的反応の連鎖が起こり分子の動態が制御されているが、この制御の異常は多くの癌に関連があることが知られている。

ErbB シグナル伝達系 (図 1) はヒトの癌において細胞内分子の制御が異常となっていることが知られている。ErbB 受容体ファミリーは ErbB1 (上皮成長因子受容体;EGFR)、ErbB2、ErbB3、ErbB4 で構成されている。中でも EGFR は実験的にも数理的にもよく研究されており、癌における細胞増殖、生存、転移、浸潤において重要な役割を果たしている。

EGFR は非小細胞肺癌の患者において過剰発現しており、キナーゼドメインのアミノ酸置換変異が EGFR キナーゼ阻害効果をもつ肺癌治療薬に対する反応性の違いを示すことが過去に報告されている[1]。このような変異は異なる遺伝子発現パターンをも導くが、詳細なメカニズムは明らかになっていない[2, 3]。EGFR 依存的に異なる細胞運命へと導くメカニズムを理解することで、EGFR キナーゼ阻害剤に反応性の高い患者を予測できる可能性もあり、さらには副作用を起こすことなくキナーゼ阻害剤治療を効果的に享受できることが期待される。最近の研究では、EGFR キナーゼ阻害剤に感受性の高い変異はキナーゼ阻害剤に対する結合アフィニティにはほとんど違いを示さないことも報告されている[4]。これは、キナーゼ阻害剤と EGFR との強い相互作用が原因でキナーゼ阻害剤に対して感受性が高くなっているわけではないことを示唆する。EGFR シグナル伝達系に関わる分子の複雑なダイナミクスを理解するためには、システムティックなアプローチが必要不可欠である。

本研究では数理的側面と実験的側面の両側面から、EGFR シグナル伝達系のメカニズムの解明

に迫った。

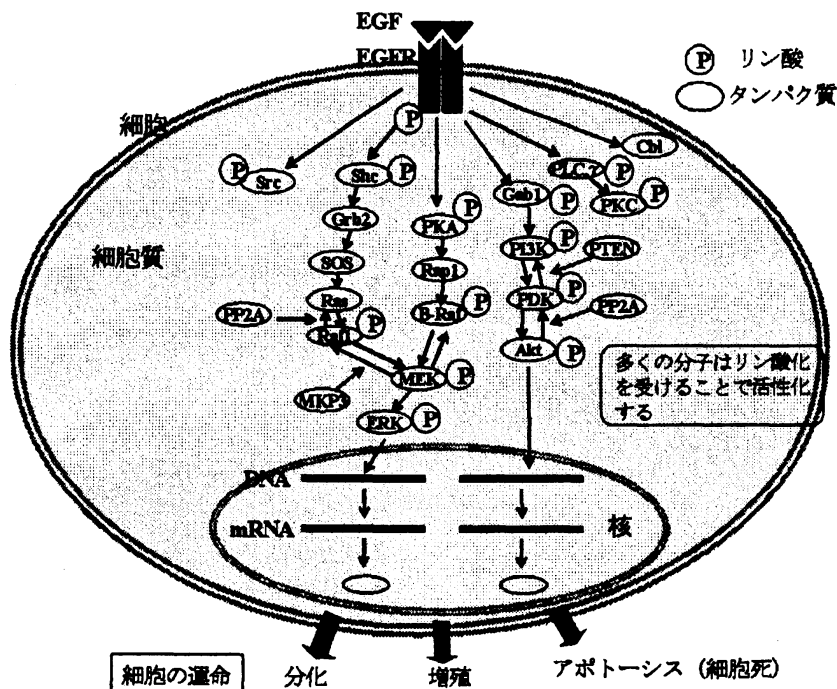


図 1 ErbB シグナル伝達系の概略

2. 実験方法

我々は非小細胞肺癌細胞株 H1299 を用いて EGF および EGFR キナーゼ阻害剤刺激後 30 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、10 時間後それぞれの遺伝子発現量をマイクロアレイにより計測し、その解析を行った。また、ウェスタンブロッティングを行いリン酸化タンパク質の定量を行った。これらの実験結果を、H1299 野生株 (H1299WT)、EGFR を過剰発現させた H1299 (H1299EGFR)、キナーゼドメインにアミノ酸置換変異を持つ EGFR を過剰発現させた H1299 (H1299L858R) の 3 種類の細胞間で比較した。

3. ウェスタンブロッティングの結果

EGF 刺激 (10nM, 1nM, 0.1nM) に誘導される EGFR、Shc、MEK、ERK、Akt の活性化ダイナミクスを H1299、H1299EGFR、H1299L858R の 3 種類の細胞間で比較を行った (図 2)。

また、図 3 では、EGF (10nM) と EGFR キナーゼ阻害剤 (0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.125, 0.15, 0.175, 0.2 μ M) を細胞に添加し、5 種類のタンパク質活性化状態を H1299EGFR と H1299L858R の細胞間で比較を行った。どちらの細胞でも EGFR キナーゼ抑制剤によってタンパク質活性化が抑制されていることがわかった。また、細胞間を比較すると EGFR キナーゼ抑制剤濃度依存的にタンパク質の活性化が抑制されるレベルが細胞間で異なり、L858R 変異がタンパク質活性化に影響を及ぼすことを明らかにした。

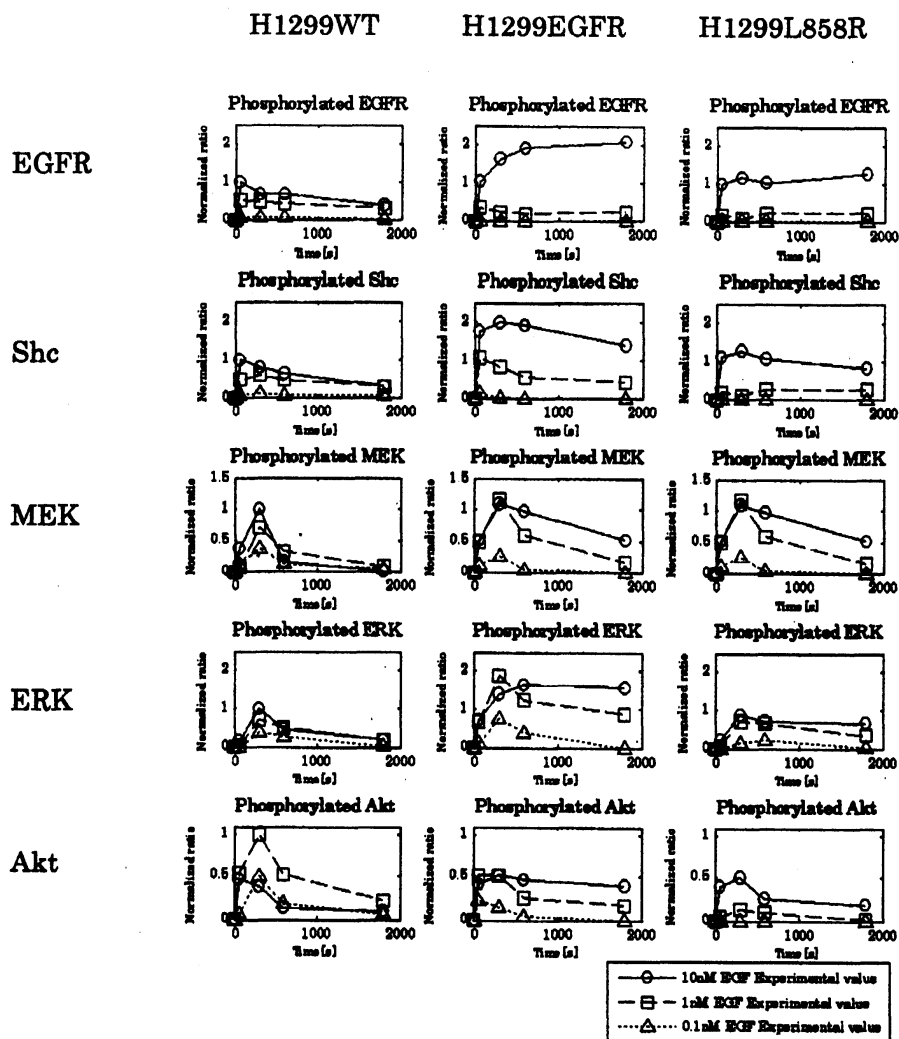


図2 EGFに誘導されるタンパク質のダイナミクスの細胞間における違い

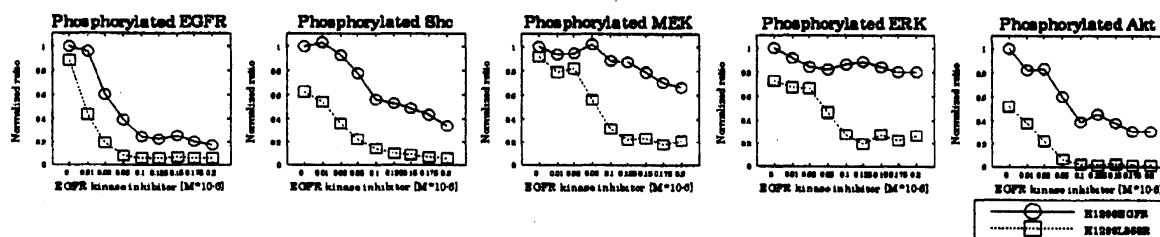
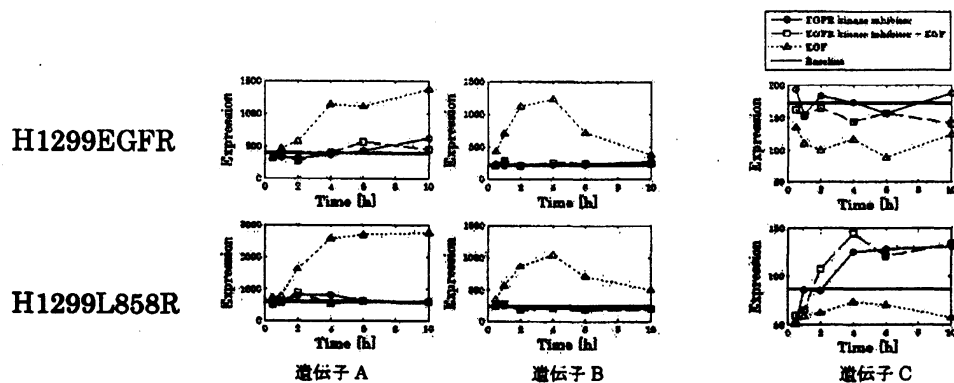


図3 キナーゼ抑制剤に誘導されるタンパク質の活性化の細胞間における違い

4. マイクロアレイ解析の結果

時系列マイクロアレイデータの統計解析の結果、EGFR キナーゼ阻害剤を加えることによって著しく抑制又は活性化される遺伝子を見つけることができた。また、細胞特異的に発現パターンが異なる遺伝子を見つけることができた。一例を図4及び図5に挙げる。



(a) キナーゼ阻害剤によって発現量が低くなる遺伝子 (b) キナーゼ阻害剤によって発現量が高くなる遺伝子

図4 キナーゼ阻害剤によって発現量が著しく変化する遺伝子

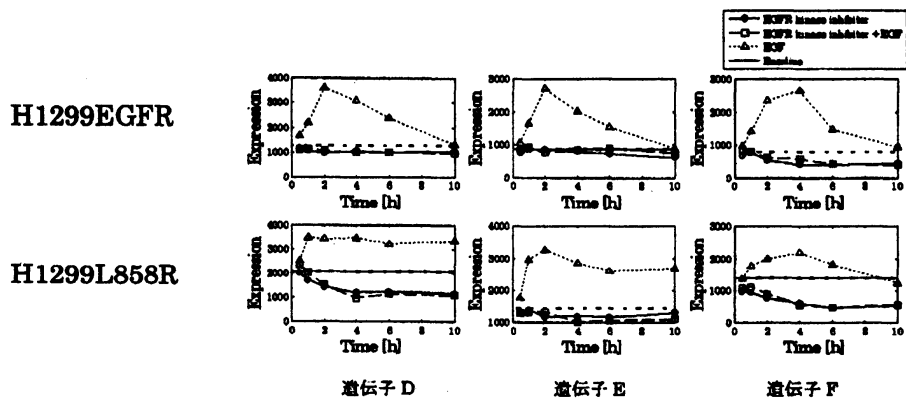


図5 細胞特異的に発現パターンの異なる遺伝子

5. H1299WT の数理モデル

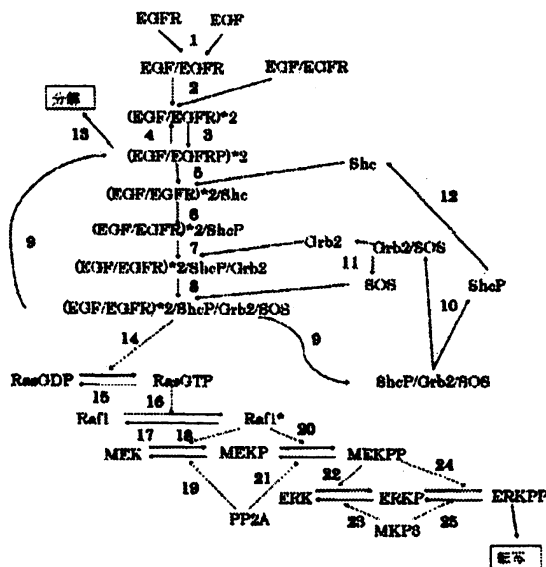


図6 EGFR シグナル伝達系のスキーム

反応スキームは図6のようになっており、過去に報告されている ErbB シグナル伝達系の数理モデルの論文を参考にした[5, 6]。反応速度方程式は表1に示した。

表1 反応速度方程式

$v_1 = k_{-1}[EGFR][EGF] - k_{-1}[EGF/EGFR]$ $v_2 = k_{-2}[EGF/EGFR][EGF/EGFR] - k_{-2}[(EGF/EGFR) * 2]$ $v_3 = k_{-3}[(EGF/EGFR) * 2] - k_{-3}[(EGF/EGFRP) * 2]$ $v_4 = \frac{V_1[(EGF/EGFRP) * 2]}{K_1 + [(EGF/EGFRP) * 2]}$ $v_5 = k_{-4}[(EGF/EGFRP) * 2][Shc] - k_{-4}[(EGF/EGFRP) * 2/Shc]$ $v_6 = k_{-5}[(EGF/EGFRP) * 2/Shc] - k_{-5}[(EGF/EGFRP) * 2/ShcP]$ $v_7 = k_{-6}[(EGF/EGFRP) * 2/ShcP][Grb2]$ $v_8 = k_{-7}[(EGF/EGFRP) * 2/ShcP/Grb2]$ $v_9 = k_{-8}[(EGF/EGFRP) * 2/ShcP/Grb2/SOS]$ $v_{10} = k_{-9}[(EGF/EGFRP) * 2][ShcP/Grb2/SOS]$	$v_{10} = k_{-10}[ShcP/Grb2/SOS] - k_{-10}[Grb2/SOS][ShcP]$ $v_{11} = -k_{-11}[Grb2][SOS] + k_{-11}[Grb2/SOS]$ $v_{12} = \frac{V_{12}[ShcP]}{K_{12} + [ShcP]}$ $v_{13} = k_{-12}[(EGF/EGFRP) * 2]$ $v_{14} = \frac{V_{14}[RasGDP][(EGF/EGFRP) * 2/ShcP/Grb2/SOS]}{K_{14} + [RasGDP]}$ $v_{15} = \frac{V_{15}[RasGTP]}{K_{15} + [RasGTP]}$ $v_{16} = \frac{V_{16}[Raf1][RasGTP]}{K_{16} + [Raf1]}$ $v_{17} = \frac{V_{17}[Raf1]}{K_{17} + [Raf1]}$ $v_{18} = \frac{V_{18}[Raf1][MEK]}{K_{18} + [MEK]}$ $v_{19} = \frac{V_{19}[MEK][PP2A]}{(K_{19}(1 + \frac{[MEKPP]}{K_{21}})) + [MEK]}$	$v_{20} = \frac{V_{20}[MEK][Raf1]}{K_{20}(1 + \frac{[MEK]}{K_{18}}) + [MEK]}$ $v_{21} = \frac{V_{21}[MEKPP][PP2A]}{K_{21}(1 + \frac{[MEKPP]}{K_{19}}) + [MEKPP]}$ $v_{22} = \frac{V_{22}[ERK][MEKPP]}{K_{22}(1 + \frac{[ERK]}{K_{24}}) + [ERK]}$ $v_{23} = \frac{V_{23}[ERK][MKP3]}{K_{23}(1 + \frac{[ERKPP]}{K_{25}}) + [ERK]}$ $v_{24} = \frac{V_{24}[ERK][MEKPP]}{K_{24}(1 + \frac{[ERK]}{K_{25}}) + [ERK]}$ $v_{25} = \frac{V_{25}[ERKPP][MKP3]}{K_{25}(1 + \frac{[ERKPP]}{K_{23}}) + [ERKPP]}$
---	---	---

$\frac{d[EGF]}{dt} = -v_1$ $\frac{d[EGF/EGFR]}{dt} = v_1 - 2v_2$ $\frac{d[ERK]}{dt} = -v_{22} + v_{23}$ $\frac{d[ERKPP]}{dt} = v_{22} - v_{23} - v_{24} + v_{25}$ $\frac{d[Grb2/SOS]}{dt} = v_{10} - v_{11}$ $\frac{d[Grb2]}{dt} = -v_7 + v_{11}$	$\frac{d[EGFR]}{dt} = -v_1$ $\frac{d[(EGF/EGFR) * 2]}{dt} = v_2 - v_3 + v_4$ $\frac{d[(EGF/EGFRP) * 2]}{dt} = v_3 - v_4 - v_5 + v_6 - v_7$ $\frac{d[(EGF/EGFRP) * 2/Shc]}{dt} = v_5 - v_6$ $\frac{d[(EGF/EGFRP) * 2/ShcP]}{dt} = v_6 - v_7$ $\frac{d[(EGF/EGFRP) * 2/ShcP/Grb2]}{dt} = v_7 - v_8$ $\frac{d[(EGF/EGFRP) * 2/ShcP/Grb2/SOS]}{dt} = v_8 - v_9$	$\frac{d[Degradation]}{dt} = v_{18}$ $\frac{d[MEK]}{dt} = -v_{18} + v_{19}$ $\frac{d[MEKPP]}{dt} = v_{18} - v_{19} - v_{20} + v_{21}$ $\frac{d[MEKPP]}{dt} = v_{20} - v_{21}$ $\frac{d[MKP3]}{dt} = 0$ $\frac{d[PP2A]}{dt} = 0$ $\frac{d[Raf1]}{dt} = -v_{18} + v_{17}$	$\frac{d[Raf1]}{dt} = v_{18} - v_{17}$ $\frac{d[Shc]}{dt} = -v_{14} + v_{15}$ $\frac{d[RasGDP]}{dt} = v_{14} - v_{15}$ $\frac{d[RasGTP]}{dt} = v_{17} - v_{18} - v_{19}$ $\frac{d[SOS]}{dt} = -v_8 + v_{11}$ $\frac{d[Shc]}{dt} = -v_5 + v_{12}$ $\frac{d[ShcP]}{dt} = v_{10} - v_{12}$ $\frac{d[ShcP/Grb2/SOS]}{dt} = v_9 - v_{10}$
---	---	---	--

6. H1299WT のシミュレーション結果

表1に示した反応速度方程式とウェスタンブロッティングの実験データより未知パラメータを推定した。推定されたパラメータを用いてシミュレーションを行った結果が図7である。

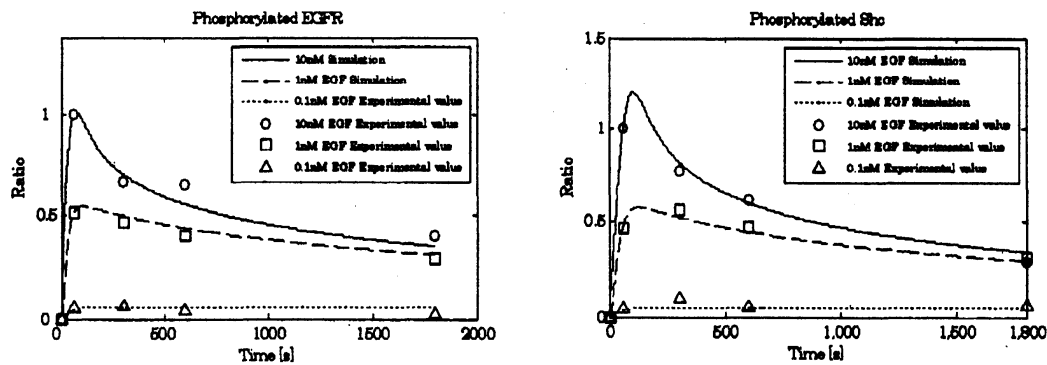


図7 シミュレーションと実験データの比較

7. 考察と今後の展望

- 定量的な解析により、EGFR の過剰発現や EGFR の L858R 変異が EGFR シグナル伝達系のダイナミクスに影響を与えることを明らかにした。
- 時系列マイクロアレイ解析の結果、EGFR キナーゼ阻害剤によって発現が著しく活性化される遺伝子及び抑制される遺伝子を同定することができた。また、細胞特異的に遺伝子の発現パターンが異なる遺伝子も同定することができた。
- 我々の解析結果は EGFR の濃度や EGFR の分解速度が遺伝子発現の定量的な違いを引き起こすことを示唆している[7]。
- 今回構築した数理モデルは H1299WT のみのデータを用いてパラメータ推定及びシミュレーションを行っている。今後は H1299EGFR や H1299L858R といった他の細胞を用い、細胞間の比較を行いたい。

参考文献

- [1] Chen, Y. R., Fu, Y. N., Lin, C. H., Yang, S. T., Hu, S. F., Chen, Y. T. & Tsai, S. F., Distinctive activation patterns in constitutively active and gefitinib-sensitive EGFR mutants, *Oncogene*, 25(8): 1205-1215, 2006.
- [2] Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J. & Haber, D.A., Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer, *Nat. Rev. Cancer*, 7(3): 169-81, 2007.
- [3] Yarden, Y., & Sliwkowski, M.X., Untangling the ErbB signalling network, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2(12): 127-137, 2001.
- [4] Fabian, M. A., Biggs, W. H. 3rd, Treiber, D. K., Atteridge, C. E., Azimioara, M. D., Benedetti, M. G., Carter, T. A., Ciceri, P., Edeen, P. T., Floyd, M., Ford, J. M., Galvin, M., Gerlach, J. L., Grotzfeld, R. M., Herrgard, S., Insko, D. E., Insko, M. A., Lai, A. G., L  lias, J. M., Mehta, S. A., Milanov, Z. V., Velasco, A. M., Wodicka, L. M., Patel, H. K., Zarrinkar, P. P., & Lockhart, D. J., Small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors, *Nat. Biotechnol.*, 23(3): 329-36, 2005.
- [5] Hatakeyama, M., Kimura, S., Naka, T., Kawasaki, T., Yumoto, N., Ichikawa, M., Kim, J. H., Saito, K., Saeki, M., Shirouzu, M., Yokoyama, S. & Konagaya, A., A computational model on the modulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Akt pathways in heregulin-induced ErbB signaling, *Biochem. J.* 373(Pt 2): 451-63, 2003.
- [6] Kholodenko, B. N., Demin, O. V., Moehren, G. & Hoek, J. B., Quantification of Short Term Signaling by the Epidermal Growth Factor Receptor, *J. Biol. Chem.* 274(42): 30169-30181, 1999.
- [7] Nagashima, T., Shimodaira, H., Ide, K., Nakakuki, T., Tani, Y., Takahashi, K., Yumoto, N. & Hatakeyama, M. Quantitative transcriptional control of ErbB receptor signaling undergoes graded to biphasic response for cell differentiation, *J. Biol. Chem.* 282(6): 4045-4056, 2007.