

氏 名 　　らとな　でいに　はりゆに  
Ratna Dini Haryuni

学位の種類 　　博士（薬科学）

学位記番号 　　富医薬博甲第 349 号

学位授与年月日 　　令和 2 年 9 月 28 日

学位授与の要件 　　富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 　　富山大学大学院医学薬学教育部　博士後期課程  
薬科学専攻

学位論文題目 　　Roles of non-canonical phosphorylation in negative feedback  
regulation and intracellular trafficking of oncogenic EGFRvIII  
in glioblastoma cells  
（神経膠芽腫細胞における発がん性 EGFRvIII のネガティブフィードバック  
調節と細胞内輸送機構における非定型的リン酸化の役割）

論文審査委員

（主査） 教授 早川 芳弘

（副査） 教授 宗 孝紀




（副査） 教授 櫻井 宏明（指導教員）

# **Roles of non-canonical phosphorylation in negative feedback regulation and intracellular trafficking of oncogenic EGFRvIII in glioblastoma cells**

## **ABSTRACT**

The ErbB family of receptor tyrosine kinases (RTKs) plays essential roles in many cellular processes, including proliferation, differentiation, migration and survival. Binding of ligand results in activation of tyrosine kinase via receptor dimerization and tyrosine autophosphorylation, which subsequently induces activation of downstream mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT pathways. Multiple regulations are involved in these downstream pathways either negative or positive feedback regulation. Evidences have been accumulated in feedback regulation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) by non-canonical phosphorylation, in which their serine/threonine residues are involved. For example, ERK-mediated phosphorylation of EGFR Thr-669 and ErbB2 Thr-677 in the juxtamembrane domain causes feedback inhibition of the receptors. p38 also regulates internalization/recycling of EGFR via phosphorylation at Ser-1015. However, the precise mechanism of feedback regulation in ErbB4 and an oncogene mutant EGFR variant III (EGFRvIII) still remains unclear. In this study, we identify the role of non-canonical phosphorylation at Ser/Thr residues of ErbB4 and EGFRvIII as well as mechanism of receptor internalization of EGFRvIII.

学位論文審査の要旨

報告番号	富医薬博甲第 号	氏 名	Ratna Dini Haryuni
審査委員	職 名	氏 名	
	(主査) 教授	早川 芳弘	
	(副査) 教授	宗 孝紀	
(副査) 教授	櫻井 宏明		
(論文題目) Roles of non-canonical phosphorylation in negative feedback regulation and intracellular trafficking of oncogenic EGFRvIII in glioblastoma cells 神経膠芽腫細胞における発がん性EGFRvIIIのネガティブフィードバック制御と細胞内輸送機構における非定型的リン酸化の役割		(判定)  合格	
<p>(論文審査の要旨) (2頁以内)</p> <p>ErbBチロシンキナーゼ型受容体ファミリーは、ヒトの発がん遺伝子として機能していることが知られている。リガンドによるチロシンキナーゼの活性化は、下流のRas/MAPK経路やPI3K/Akt経路を活性化する。最近、ErbB受容体のセリン/スレオニン残基の非定型的なリン酸化による活性調節機構の解析が注目されている。これまでに、ErbB受容体のフィードバック制御機構として、EGFRやErbB2の細胞内膜近傍領域に保存されたスレオニン残基のERKによるリン酸化が関与していることや、C末端領域にあるセリン残基のp38によるリン酸化がEGFRのエンドサイトーシスやリサイクリングに関与していることが報告されている。</p> <p>EGFRvIIIは、細胞外ドメインの一部をコードするエキソン2-7を欠失した変異体であり、神経膠芽腫の代表的な発がん遺伝子として知られている。リガンドとの結合能を消失しているにもかかわらず、恒常的なチロシンキナーゼ活性を有しているため、その発現は患者予後とよく相関することがわかっている。そこで本研究では、EGFRvIIIの非定型的リン酸化による活性調節機構を解析した。合わせて、ErbB4のネガティブフィードバック機構についても解析を行った。</p> <p>1. EGFRvIIIのネガティブフィードバック機構 <sup>[1]</sup></p> <p>野生型EGFRのフィードバック阻害は、ERKによる膜近傍領域のThr-669のリン酸化によって起こる。EGFRvIIIは細胞外ドメインが欠失しているものの、細胞内ドメインのアミノ酸配列は野生型と同じであり、Thr-669に相当する残基はThr-402である。ヒト神経膠芽腫細胞にEGFRvIIIを過剰発現した細胞を用いて検討を行ったところ、ERK活性化を強く誘導するホルボールエステル (TPA) 刺激によりERKを介したThr-402のリン酸化が強く誘導された。その結果、EGFRチロシンキナーゼ活性が抑制されることから、EGFRvIIIも野生型EGFRと同様にフィードバック制御を受けることがわかった。次いで、EGFRリガンドであるEGFで細胞を刺激したところ、TPAと同様にフィードバック阻害が認められた。EGFRvIIIはリガンドと結合できないことから、わずかながら発現している内在性のEGFRを介して活性化されたERKを介してフィードバック制御が起こっていると考えられ</p>			

た。神経膠芽腫細胞では、野生型EGFRとEGFRvIIIとの機能的な相互作用が知られており、これには膜近傍領域のリン酸化によるフィードバック制御が関与している可能性が考えられた。

## 2. テモゾロミドによるEGFRvIIIのエンドサイトーシス誘導

アルキル化剤のテモゾロミドは、血液-脳関門を通過することができることから、神経膠芽腫の治療で使われる唯一の化学療法剤である。神経膠芽腫細胞をテモゾロミドで処理すると、48時間後からp38を活性化することがわかった。そこで、テモゾロミドによるEGFRvIIIのエンドサイトーシス機構の解析を行った。その結果、EGFRのエンドサイトーシスを誘導するSer-748（野生型EGFRのSer-1015に相当）のリン酸化が起り、EGFRvIIIのエンドサイトーシスが認められた。これらの反応は、p38阻害剤で完全に抑制された。さらに、テモゾロミドはEGFRvIIIを発現している神経膠芽腫細胞の遊走を誘導し、それをp38阻害剤が抑制した。したがって、テモゾロミドによる細胞ストレス刺激がEGFRvIIIの細胞内局在を制御し、細胞運動能も制御していることが示唆された。

## 3. ErbB4のネガティブフィードバック機構<sup>[2]</sup>

4つのErbB受容体の中で、これまでにEGFRとErbB2のフィードバック阻害機構が明らかになっている。キナーゼ活性を持たないErbB3はフィードバック阻害に関わるスレオニン残基が保存されていないが、ErbB4には当該残基が存在している。そこで、ErbB4においても他のErbB受容体と同様のフィードバック阻害が起こるのか解析した。293細胞にErbB4を発現させ検討を行った結果、膜近傍領域にあるThr-674のERKによるリン酸化が、ErbB4チロシンキナーゼ活性を阻害することがわかった。興味深いことに、ErbB4では膜近傍領域のThr-674だけでなく、C末端領域のSer-1026のリン酸化もフィードバック制御に関与していることがわかった。さらに、ErbB4はメラノーマにおいて変異していることが知られていることから、1033番目のプロリンがセリンに置換した変異体を用いて検討した結果、ネガティブフィードバック制御の消失がこの変異体の恒常的活性化に関与していることがわかった。

## 結論

本研究により、神経膠芽腫のがん遺伝子として機能しているEGFRvIIIの活性調節機構として、膜近傍領域のスレオニン残基のリン酸化によるネガティブフィードバック機構、およびC末端領域のセリン残基のリン酸化によるエンドサイトーシス機構の存在が示された。特に、神経膠芽腫の治療に用いられるテモゾロミドが、EGFRvIIIの活性調節を行っていることを見出したことは興味深い。また、ErbB4のフィードバック機構においても、新たな制御機構の存在を示した。

以上の研究成果は、ErbB受容体の新しい活性調節機構として重要であり、今後のがん分子標的治療に貢献するものと期待される。

これらの研究成果は、下記に示す国際的な学術誌に公表がしていること、また面接等による学位論文審査の結果、提出した論文内容が博士（薬科学）の学位を授けるに値すると判断した。

(学位論文のもとになる論文 著者名, 論文題目, 掲載誌名, 巻, 最初の頁と最後の頁, 年を記載)

1. Haryuni R.D., Tanaka T., Zhou Y., Yokoyama S., and Sakurai H.: ERK-mediated negative feedback regulation of oncogenic EGFRvIII in glioblastoma cells. *Oncology Letters*, 20: 2477-2482, 2020.
2. Haryuni R.D., Watabe S., Yamaguchi A., Fukushi Y., Tanaka T., Kawasaki Y., Zhou Y., Yokoyama S., and Sakurai H.: Negative feedback regulation of ErbB4 tyrosine kinase activity by ERK-mediated non-canonical phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 514: 456-461, 2019.