

出國報告（出國類別：進修）

EGFR 家族成員在癌細胞內訊息傳遞之
交互作用，以及標靶治療藥物之抑癌和
抗藥性機轉研究
- EGFR 細胞核轉位的角色

服務機關：台北榮民總醫院胸腔部

姓名職稱：邱昭華，師三級

派赴國家：美國

出國期間：95.11.16 ~ 97.4.30

報告日期：

摘要

EGFR 可將訊息傳遞到細胞內調控許多生理功能。但除了此類傳統的 EGFR 傳導路徑，有研究發現 EGFR 本身就可以進入細胞核內參與基因的調控與修補。近來發現某些肺癌細胞 EGFR 基因的酪胺酸激酶區域有突變，和病人對 EGFR 抑制劑的療效有關。然而野生型和突變型 EGFR 核轉位能力是否不同則仍未知。我們的研究發現突變型 EGFR 在未刺激時就發生核轉位，在 EGF 刺激下卻不見核內 EGFR 的比例增加，其機制是因突變型 EGFR 的酪胺酸 1045 磷酸化有缺失。同樣的情形也在 cisplatin 刺激時出現，但其機制未明。突變型的細胞對 cisplatin 的敏感性比較差，此現象是否和其核轉位能力較差有關也有待研究。我們另外發現 cisplatin 導致的 EGFR 核轉位是經由 p38，事實上 p38 活化本身就可以造成 EGFR 核轉位，但此核內 EGFR 究竟扮演何種角色則待釐清。

目次

摘要	1
目次	2
本文	3
(1) 目的	3
(2) 過程	4
(A) 突變型 EGFR 在靜態時就可出現在細胞核內，但在 EGF 刺激下卻沒有明顯增加	4
(B) 突變型 EGFR 在 EGF 刺激下的酪胺酸 1045 磷酸化有缺失，所以影響了 EGFR 和 Cbl 的結合、EGFR 的內轉以及核轉位	5
(C) 突變型 EGFR 在順鉑的刺激下，也是比較不容易轉位到細胞核	5
(D) 突變型 EGFR 對順鉑的感受性較差	5
(E) EGFR 在順鉑刺激下細胞核轉位的機制是經由 p38	5
(F) p38 本身即可以造成 EGFR 的細胞核轉位	6
(G) EGFR 在癌細胞的糖代謝中扮演一個角色	6
(3) 心得及建議	6
(A) 研究總結	6
(B) 待解決的疑問以及未來的研究方向	7
(C) 建議	7
附錄	
(1) 圖表	9
(2) 參考文獻	13

本文

(1) 目的

肺癌在台灣及全世界均為癌症死亡率第一位的惡性腫瘤。目前已知菸害防治是最有效控制肺癌的方法，但在治療方面卻沒有明顯的進步。因為肺癌在診斷時大都是晚期，主要只能靠藥物治療。以往傳統的毒殺性化學治療藥物對肺癌的治療效果並不理想，而且毒性甚大，原因是藥物的非選擇性細胞毒殺作用，因此其療效已經到達瓶頸(1)。近年來分子醫學技術進步快速，針對癌細胞的標靶治療隱然已成為癌症治療的主流。上皮生長因子接受器家族 (Epidermal growth factor receptor family, EGFR family) 在許多腫瘤細胞的生長，都扮演重要的角色。其中 EGFR (亦稱為 HER-1)是上皮生長因子接受器家族的第一個成員，在大多數的肺癌細胞上都有過度表現的現象。二十一世紀初，第一個針對 EGFR 的細胞內酪胺酸激酶的抑制劑(EGFR tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)，開始進行臨床人體試驗，結果顯示它對已經化學治療失敗的晚期肺癌病患，仍有一定的療效。後來陸續發現，對此類藥物有效的病患，其肺癌組織的 EGFR 基因的酪胺酸激酶區域(tyrosine kinase domain, TKD)幾乎都有一群特殊且從未被發現的突變，而沒有有效的病患則沒有此突變(2,3)。更重要的是，此特殊的 EGFR 基因突變在日本人所提供的肺癌標本中，出現的機率遠高於西方國家。在我們的本土研究中也證實同樣的相關性及高發生率(4)。此重要發現，不但提供了使用此類標靶治療藥物的理論基礎，也開啓了肺癌致病機轉研究的一扇窗。雖然此類藥物的療效以及機轉的發現堪稱近幾十年來肺癌最重大的進展，然而還有許多問題仍待解決，例如：為何有不少病患沒有 EGFR 突變卻仍對此藥物有療效，是否暗示著 EGFR 突變不是決定藥物有無療效的唯一因素？病患為何會對此藥物產生抗藥性？EGFR 和其他細胞內的訊息傳遞因子之間的交互作用，在腫瘤以及藥物的有效性扮演著何種角色？是否有其他藥物可以輔助 EGFR 作用，進而強化此類藥物的療效？以及以上種種，都有待進一步的研究。

EGFR 是在細胞膜上的生長因子接受器，傳統上的觀念是：EGFR 在接受配位體 (ligand)刺激而活化後，會藉由許多不同的訊息傳遞鏈將訊號傳到細胞質內的其他分子或是進入細胞核開啓或關閉各式各樣的基因，最後造成癌細胞的生長、增生，侵犯及轉移性、以及血管新生。除了此類傳統的 EGFR 傳導路徑，十多年前開始有另一派學說生成：科學家聲稱 EGFR 不僅能藉由其他因子將細胞外的訊息傳遞到細胞

核，EGFR 本身就可以直接進入細胞核內參與基因的調控。此一新興學說的倡議人爲美國安德遜癌症中心的中研院洪明奇院士。他所領導的團隊在這十多年來陸續發現 EGFR 以及 HER-2 均可以從細胞膜轉位到(translocation) 細胞核，他以及其他學者並證明 EGFR 進入細胞核後參與基因的調控以及 DNA 的修補(5)。

因爲 EGFR-TKD 基因突變和 EGFR 的核轉位(nuclear translocation)都和腫瘤的發生有密切的相關性，但突變型和野生型的 EGFR 在核轉位是否有不同仍是未知，因爲核內的 EGFR 參與 DNA 修補機制，所以很可能和抗藥性有關。因此在徵得洪院士的同意，並取得院方及胸腔部的支持後，決定到美國德州安德遜癌症中心洪院士的實驗室學習相關的生物技術，期望也許可改善肺癌對藥物的治療療效。

(2) 過程

(A) 和野生型 EGFR 相比，突變型 EGFR 在靜態時就可出現在細胞核內，但在 EGF 刺激下卻沒有明顯增加

首先，我們想知道突變型和野生型的 EGFR 在核轉位是否有不同。因爲突變型 EGFR 本身即是活化的(constitutively active)，所以我們的假說認爲：和野生型相比，我們預期會在核內看到比較高比例的突變型 EGFR。爲解決此問題，我們嘗試將突變型和野生型的 myc-tagged EGFR 分別用 transient transfection 的方式送入細胞，然後將細胞核和非細胞核的部分開，粹取出蛋白質後用 Western blotting 觀察細胞核和非細胞核的 EGFR 表現。然而此實驗卻失敗了，原因出在 transient transfection 會造成蛋白質的大量表現，所以無法看出明顯差異。因此，爲得到較理想的實驗結果，我們必須先花 3 個月的時間分別建立可以穩定表現突變型和野生型 EGFR 的細胞株 (stable clone)。在建立穩定細胞株後重複上述的實驗，我們得到了結果如圖一。具有野生型 EGFR 的細胞株在 serum starvation 時幾乎看不到核內有 EGFR，但在接受上皮生長因子(EGF)刺激 30 分鐘後，的確可見到核內 EGFR 的明顯上升；而具有突變型 EGFR 的細胞株在 serum starvation 就可以看到核內有 EGFR，但在接受 EGF 刺激後，並沒有見到核內 EGFR 的明顯上升。此實驗的結果顯示：和野生型相比，突變型 EGFR 因爲是 constitutively active，所以即使在沒有血清的狀態下也是活性的，因此 EGFR 可以發生核轉位。有趣的是突變型 EGFR 似乎對 EGF 的刺激比較不敏感，因此不論有沒有 EGF 刺激，其核內 EGFR 的比例都差不多。

(B) 突變型 EGFR 在 EGF 刺激下的酪胺酸 1045 磷酸化有缺失，所以影響了 EGFR 和 Cbl 的結合、EGFR 的內轉以及核轉位

為釐清上述野生型和突變型 EGFR 在 EGF 刺激下核轉位能力不同的機制，我們首先觀察在野生型和突變型 EGFR 上編號 1045 酪胺酸(Y1045)的磷酸化。如圖二所示：以 293 細胞為載體的 stable clones，在 EGF 刺激 5 分鐘後，就可以明顯看到野生型 EGFR 的 Y1045 磷酸化，此磷酸化可持續到 2 小時。然而突變型 EGFR 的 Y1045 磷酸化卻有明顯缺失。此現象在細胞株 H226(野生型)以及 HCC827(突變型)有有同樣的發現。因為磷酸化的 Y1045 是 Cbl 和 EGFR 的主要結合位點，而 Cbl 是 EGFR 內轉過程中非常重要的因子，同時內轉是 EGFR 轉未到核內的第一個步驟，所以我們決定利用 co-immunoprecipitation 實驗，觀察野生型和突變型 EGFR 在被 EGF 活化後是否和 Cbl 的結合能力有所不同，結果的確如預期(圖二)，證實突變型 EGFR 在 EGF 刺激下的 Y1045 磷酸化缺失的確是其進入細胞核能力較差的原因之一。

(C) 突變型 EGFR 在順鉑的刺激下，也是比較不容易轉位到細胞核

過去曾有一個研究指出順鉑(cisplatin)也可以造成 EGFR 核轉位(6)。因此我們決定用我們所建立的模型重複此實驗。如圖三所示，野生型 EGFR 在 cisplatin 刺激後 4 小時，細胞核內的 EGFR 明顯增加。有趣的是，如同在用 EGF 刺激的實驗中，突變型 EGFR 在 cisplatin 刺激前後的核內 EGFR 比例並沒有明顯變化。利用共聚焦顯微鏡(confocal microscopy)也有同樣的發現(圖四)。

(D) 突變型 EGFR 對順鉑的感受性較差

因為和野生型相比，突變型 EGFR 在順鉑的刺激下比較不容易轉位到細胞核，而過去的研究顯示細胞核的 EGFR 和 DNA 修補有關，其次，理論上 DNA 修補能力較差的細胞對 cisplatin 的敏感性較強，所以我們假說和野生型相比，突變型 EGFR 對順鉑的敏感性較強。經由 MTT 生長試驗，出乎意料地，我們發現突變型 EGFR 對順鉑的感受性不但沒有比較好反而比較差。(圖五)

(E) EGFR 在順鉑刺激下細胞核轉位的機制是經由 p38

過去的研究雖觀察到順鉑(cisplatin)可以造成 EGFR 核轉位(6)，但其機制仍未明。因為曾有報告指出 p38 在細胞接受 cisplatin 處理時會活化，同時也 and EGFR 內轉有關，所以我們假說 p38 和 EGFR 的核轉位有關。如圖六所示，細胞在經過

SB202190(一種 p38 抑制劑)前處理下，cisplatin 造成 EGFR 的核轉位會被抑制。

(F) p38 本身即可以造成 EGFR 的細胞核轉位

因為細胞在很多壓力刺激下，都可以活化 p38，所以我們好奇 cisplatin 造成的 EGFR 核轉位是一個特殊現象，還是活化 p38 就可以造成 EGFR 的細胞核轉位。因為 MKK-6 是直接活化 p38 的上游分子，所以我們同時轉殖 EGFR 和 constitutively active MKK-6 突變株到細胞內，在觀察細胞核內 EGFR 的變化。如圖七所示，constitutively active MKK-6 可以增加細胞核內 EGFR，而且此增加可以被 p38 抑制劑所抑制。

(G) EGFR 在癌細胞的糖代謝中扮演一個角色

除了 EGFR 細胞核轉位的研究，我同時也參與洪院士實驗室中另一個關於 EGFR 在癌細胞的糖代謝中所扮演角色的計畫。此研究發現，癌細胞在低濃度葡萄糖的培養基中比較容易被 EGFR siRNA 所殺死，此種細胞死亡並不是一般熟知的細胞凋零 (apoptosis)，而是自噬 (autophagy)。而且此一現象並不會發生在 EGFR TKI 的處理中，暗示此現象和 EGFR 的 tyrosine kinase 活性無關。進一步的研究發現，此現象和一葡萄糖轉運蛋白 SGLT-1 有關，事實上 EGFR 扮演了穩定 SGLT-1 使之不易被壞進而增加了細胞對低濃度葡萄糖培養基的耐受性(7)。

(3) 心得及建議

(A) 研究總結

近十幾年來的研究顯示，EGFR 不僅能藉由傳統的傳導路徑將細胞外的訊息傳入細胞質以及細胞核內，引發一連串的細胞反應，包括癌變，此一細胞膜上的接受體也可以直接轉位到細胞核內引發一連串效應。此次本人到美國德州安德遜癌症中心洪明奇院士的實驗室中學習相關的生物技術，主要即是探討最近幾年所新發現的 EGFR TKD 突變型和原本野生型的 EGFR 核轉位能力是否有所不同。我們發現：突變型在未刺激的情況下的確有較高比例的核內 EGFR 表現，但在無論是器配位體 (EGF) 的刺激或是化療藥物 cisplatin 的處理下，和野生型相比，其 EGFR 核轉位能力大大不如。此外我們進一步有一重大發現：cisplatin 造成的 EGFR 核轉位是透過活化 p38，而事實上，p38 活化本身就可以在不激活 EGFR 的情況下造成 EGFR 的核轉位，此一機制是全新的發現。而且我們初步的研究結果顯示，此機制和 EGFR 本身的

kinase activity 無關，意即此為一個新發現的 EGFR kinase-independent function。此外，雖然我們的研究結果還不足以支持此結論，但我們強烈懷疑 EGFR 的核轉位是細胞在面對 stress 時的一種反應，但其進入細胞核的目的及功能為何則尚不明瞭，但很可能和傳統 EGF 刺激所造成的 EGFR 核轉位的功能不同，因為經由 p38 所造成的 EGFR 核轉位並不活化 EGFR，所以此時核內的 EGFR 是不具 kinase activity 的。

(B) 待解決的疑問以及未來的研究方向

雖經過一年半的研究，還有許多疑問尚待釐清，這是我將來研究的方向之一

(i) 我們已知 EGF 刺激下，突變型 EGFR 的 Y1045 磷酸化有缺失，造成下游一系列的變化以致突變型 EGFR 比較不易進核，但為何突變型 EGFR 的 Y1045 不易磷酸化，其機轉仍未知。

(ii) 在 cisplatin 刺激下，突變型 EGFR 一樣比較不易進核，但因為 cisplatin 刺激並不會活化 EGFR，所以無法用 Y1045 磷酸化以及和 Cbl 結合的不同來解釋為何突變型比較不易進核。雖然我們證實 cisplatin 刺激所造成的 EGFR 核轉位和 p38 有關，但我們的初步研究結果卻未發現野生型和突變型 EGFR 和 p38 的活化或是結合有所不同，因此其真正機轉仍然不明。

(iii) cisplatin 刺激所造成 EGFR 核轉位的病理或臨床意義究竟為何？突變型比較不易進核，但卻對 cisplatin 比較不敏感，如果此現象為真，則暗示著此情況下的核內 EGFR 不但不是和細胞存活有關，反而是 cisplatin 毒殺細胞的機轉之一；又或者是 cisplatin 刺激下細胞膜上或是細胞質中的 EGFR 扮演著和 cisplatin resistance 相關的角色。究竟何者為真？尚有待進一步的實驗設計來證實。

(iv) p38 本身的活化即可造成 EGFR 核轉位，暗示著此現象是細胞在遭受環境壓力時的共同反應。但究竟為何細胞在遭受環境壓力時要讓未活化的 EGFR 進入細胞核？又此時 EGFR 在核內的功能為何？而有趣的是，無論 EGFR 在核內的功能為何，很可能都和 EGFR kinase activity 無關。凡此總總都是細胞生物學上重要的問題。

(v) 最後，雖然基礎的研究指出 EGFR 保護 SGLT-1 是癌細胞為何能在低葡萄糖環境中存活的原因，然而臨床的觀察卻不見 SGLT-1 在正常細胞和癌細胞的分布有關，暗示著 EGFR 在癌細胞的糖代謝上很可能另外扮演其他角色。

(C) 建議

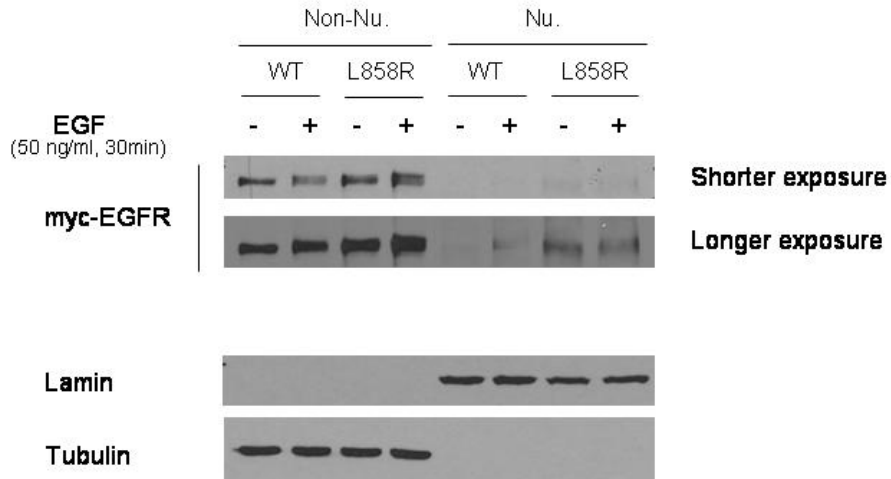
事實上，我原計畫在完成一年的進修後即返國，但因當時才開始逐漸有重要的

研究發現，考量到回國後一時之間無論時間、人力、經費、實驗室均無著落，等到建立後恐怕已經過半年，和過去一年的研究在銜接上恐又要耗費時日，因此接受洪院士的建議，決定在徵得院方及胸腔部的支持下，辦理留職停薪，自費延長半年。事實上，因國內過去已有許多人曾到洪院士的實驗室中進修，他非常瞭解一年的時間其實在剛開始進入狀況後就差不多要離開了，而離開後，大多數的人礙於繁忙的臨床工作，大多無力繼續未完成的研究工作，非常可以。因此當初在和他接洽進修事宜時，他就曾提出至少要兩年的要求。無奈院方僅能提供一年經費，因此在向洪院士說明解釋，並經過蔡俊明主任從中的大力協助，洪院士才勉與同意我前往做為期一年的進修。結果證實，洪院士的經驗完全正確，一年的研究的確是不夠的。我雖自費延長半年，其實還是有所不足。所以建議院方可否提供另一個機制，對某些進修研究內容無法以一年完成者，給予超過一年的補助，而非每年都編列一樣的一年期進修項目，如此恐怕比較沒有彈性。尤其現今國科會均鼓勵多年期研究計畫，應該是也有共同的體驗：多年期研究計畫的成果恐怕要優於同年術但分成許多短期研究計畫的總合。

附錄

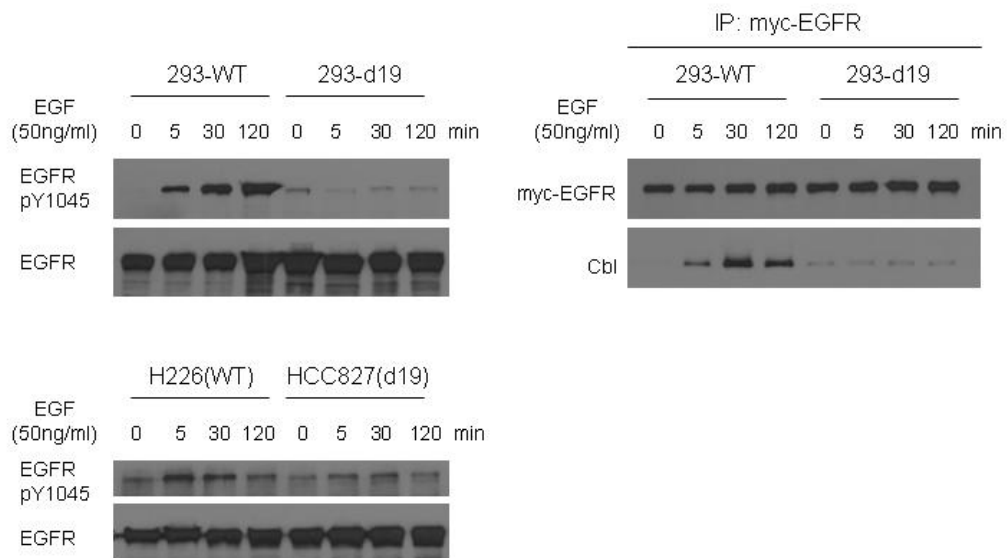
圖一

**Subcellular localization of EGFR, WT vs. TKD mutants, by EGF treatment
(Stable transfection, NR6 cell)**



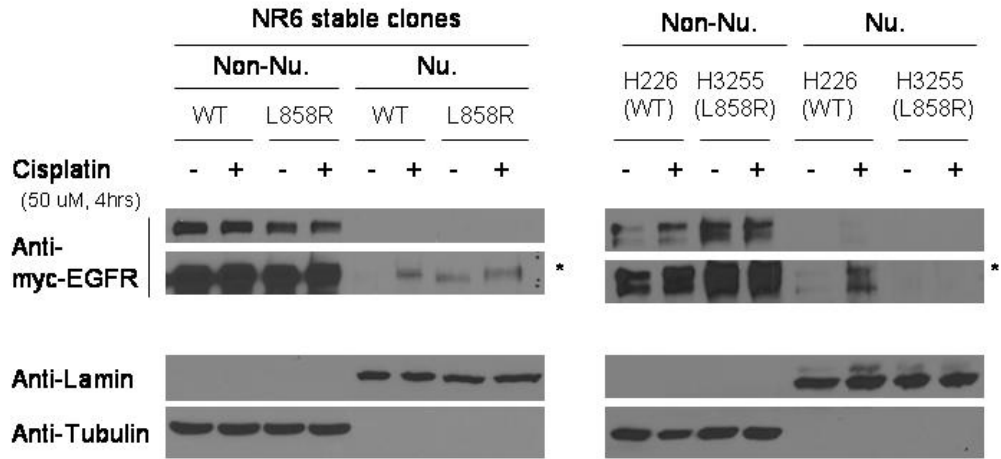
圖二

**EGFR TKD mutants have defective Y1045 phosphorylation,
c-Cbl interaction, and internalization by EGF treatment**



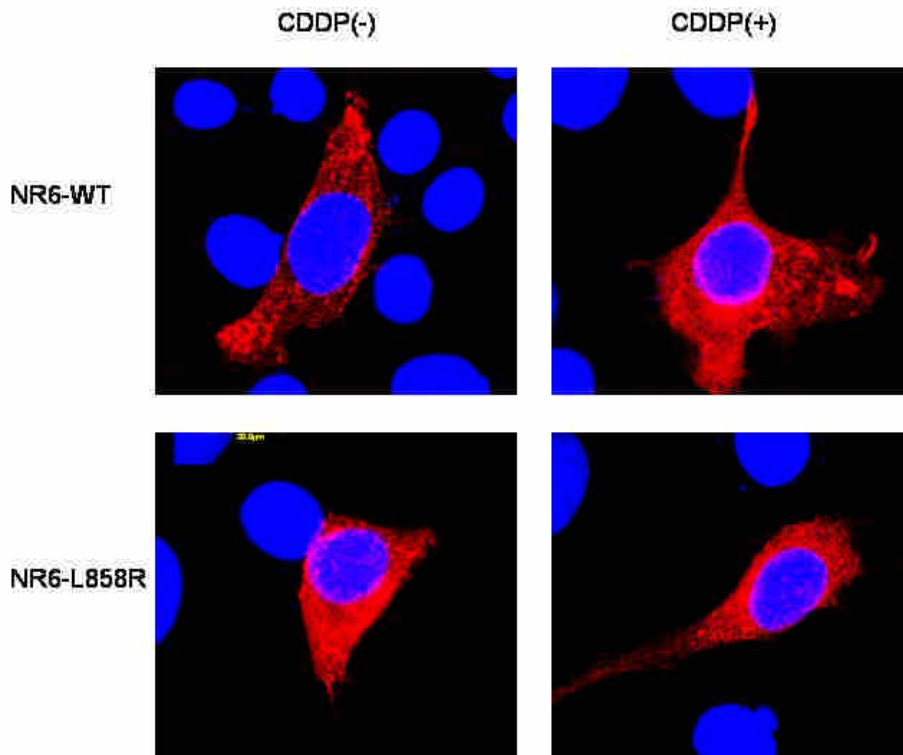
圖三

Subcellular localization of EGFR, WT vs. TKD mutants, by Cisplatin



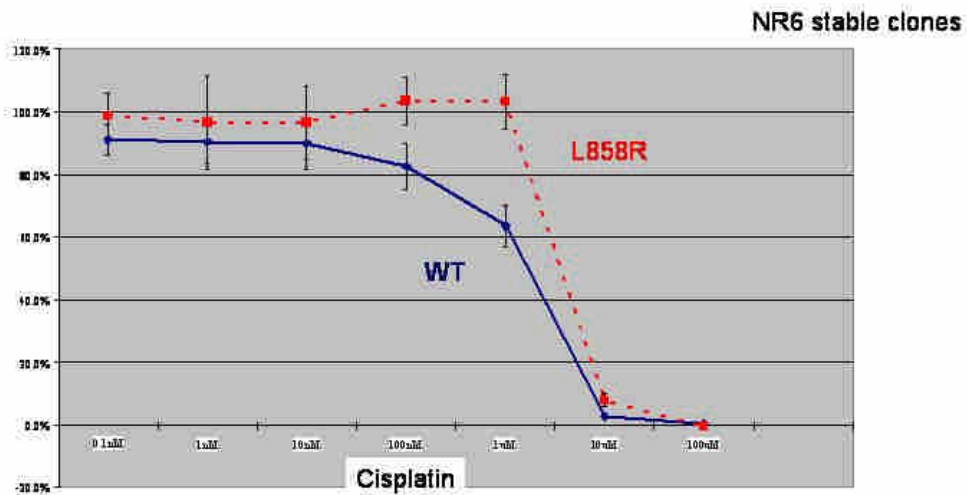
*Longer exposure

圖四



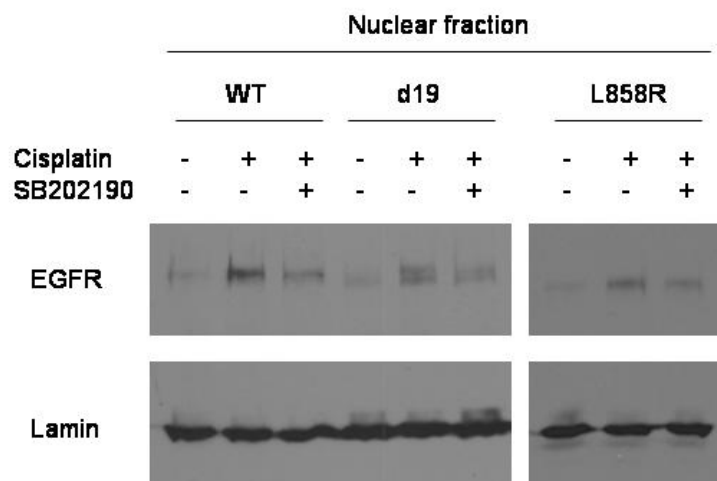
圖五

EGFR TKD mutant (L858R) is more resistant to cisplatin than WT



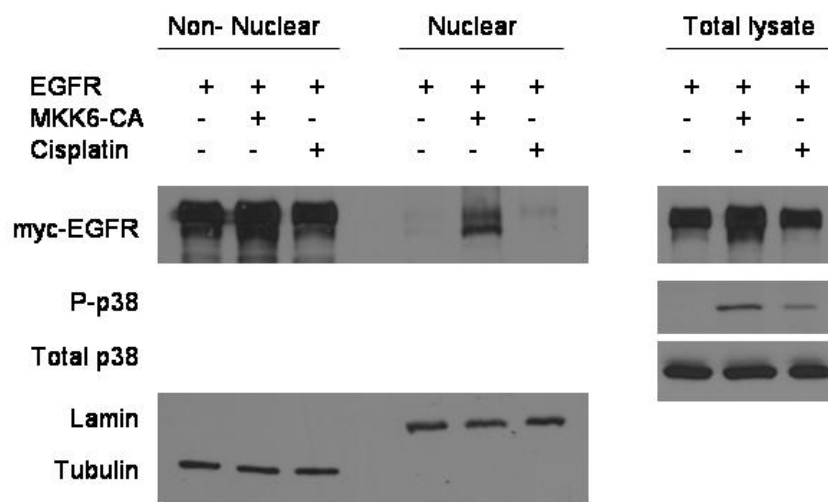
圖六

p38 inhibitor can partially block EGFR nuclear translocation by cisplatin



圖七

Constitutively active MKK6 can induce EGFR nuclear translocation



HeLa cell, EGFR:MKK6-CA= 1:4 transfection

參考文獻

1. Carney DN. Lung cancer--time to move on from chemotherapy. *N Engl J Med.* 2002;346:126-8.
2. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-39.
3. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-500.
4. Chou TY, Chiu CH, Li LH, et al. Mutation in the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor is a predictive and prognostic factor for gefitinib treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11:3750-7.
5. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer.* 2006 30;94:184-8.
6. Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, et al. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of dna-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 2005;280,31182-9.
7. Weihua Z, Tsan R, Huang WC, et al. Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity. *Cancer Cell.* 2008;13:385-93.