

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15057

研究課題名(和文) 癌浸潤性獲得におけるArf6 mRNA G-quadruplex構造の役割と意義

研究課題名(英文) Mechanism by which Arf6 protein becomes overexpressed in cancer to promote malignancy

研究代表者

佐邊 壽孝 (Sabe, Hisataka)

北海道大学・医学研究科・教授

研究者番号：40187282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：私達は低分子量Gタンパク質Arf6を中心とする癌悪性度進展経路を発見した。本経路はcancer mesenchymal programを遂行するものであり、その因子群の高発現は、乳癌や腎癌などの悪性度や患者 poor overall survivalと強く統計的相関を示す。本研究においては、癌の特定の遺伝子変異がArf6蛋白質の異常高発現をもたらすことをその分子詳細と共に明らかにした。この成果は、特定の癌遺伝子変異によるeIF4Aを軸とするmRNA翻訳機構の活性亢進と癌の浸潤転移性や治療抵抗性とを関連付けた。

研究成果の概要(英文)：We have shown previously that the small-GTPase Arf6 and its downstream signaling factors are frequently overexpressed in different cancers and execute a cancer mesenchymal program, including invasion, metastasis and drug resistance. Here, we show a molecular basis by which Arf6 protein becomes overexpressed in some cancer cells. Our results indicated that an oncogenic mutation of a certain gene evokes an enhanced activity of eIF4A, which promotes translation of the Arf6 mRNA; and thus established a causative role of the enhanced mRNA translation in cancer malignancy development.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：Arf6 eIF4A mRNA translation cancer malignancy

### 1. 研究開始当初の背景

私達は一貫して、癌浸潤転移分子機構の研究を進めている。これまでに、低分子量 G タンパク質 Arf6 を中心とするシグナル経路を発見し、その分子の実態、医学病理学的意義を明らかにし、乳癌、肺腺癌、頭頸部癌に関して論文報告した。その結果、これまでに本経路は癌細胞 epithelial-mesenchymal transition (EMT)様変換を介在する癌特異的経路であることを示したが、最近、本経路は構成因子として元来は間充織組織に発現する特定の蛋白質を含有することを明らかにした。さらに、Arf6、及び、その下流因子 AMAP1 は、悪性度の進行したこれらの癌の多くにおいて蛋白質として異常高発現しており、この事が浸潤転移活性に必須であり、悪性予後因子ともなる。これらの蛋白質高発現は、それぞれの mRNA の発現量とは相関せず、転写後調節であると考えられる。

数年前から、Arf6 や AMAP1 の高発現を含め、癌における本経路の創出と活性化に関する研究へと進んだ。その結果、本経路活性化には Rab5c が介在する小包輸送が関与する事、また、乳癌における AMAP1 蛋白質異常発現は、TP53 遺伝子変異と、その事による特定 miRNA 群の発現低下、並びに、mTOR 活性亢進が主な原因である事を明らかにした。一方、Arf6 蛋白質の発現亢進にはこのような事柄は関与しなかった。

最近、Arf6 mRNA の 5'-untranslated region (5'-UTR) に典型的な G-quadruplex 構造が存在する事を見いだした。G-quadruplex 構造は、spacer となる塩基を挟んで4つの guanine が平面構造をとり、それらが多層構造になっているものであり、EZH2, Myc, や Runx1 などの mRNA にも認められる。G-quadruplex 構造を持つ mRNA の翻訳には、RNA helicase 活性を示す mRNA 翻訳複合体構成因子である eIF4A が必要である。既に、その活性阻害剤である Silvestrol によって高浸潤性乳癌細胞 MDA-MB-231 を処理した際、Arf6 蛋白質発現量、並びに、浸潤活性が著しく低下される事を観察していた。

### 2. 研究の目的

本研究は、Arf6 mRNA が eIF4A 依存性 G-quadruplex 構造を有することを端緒とし、悪性癌における Arf6 mRNA 翻訳亢進の生化学的実態の解明、並びに、本 mRNA がこのような特殊な構造を持つ事の癌悪性度進行における意義を明らかにする。

Arf6 mRNA 5'-UTR に典型的な eIF4A 依存的 G-quadruplex 構造が存在する事を見いだしており、実際、eIF4A 活性阻害剤 Silvestrol で乳癌細胞を処理した際、Arf6 蛋白質発現量が著しく低下し、浸潤活性も阻害

されることを観察している。本研究では、Arf6 mRNA が eIF4A 依存性 G-quadruplex 構造を有することを端緒とし、悪性癌における Arf6 mRNA 翻訳亢進の生化学的実態を解明する。

### 3. 研究の方法

既に、eIF4A 活性阻害剤 Silvestrol で MDA-MB-231 細胞を処理した際、Arf6 蛋白質発現量が低下する事を観察しており、まず、eIF4A siRNA での効果、他の乳癌細胞株における一般性、eIF4A 以外の RNA helicase の関与、mTOR や eIF4E 等の関与も検討する。続いて、Arf6 mRNA の細胞局所翻訳の可能性など、G-quadruplex 構造を有する事の細胞生物学的意義を明らかにし、他の Arf isoform や RhoA 等の mRNA は G-quadruplex 構造を有しない事も踏まえ、癌細胞悪性度進展における意義を明らかにする。eIF4A 高発現が Arf6 mRNA 翻訳活性亢進の主因子が否かに関し病理標本解析も行い、主たる因子であれば、乳癌悪性度進行過程における eIF4A 遺伝子発現亢進に関し、DNase hypersensitive site やヒストン修飾を始め、ゲノム・エピゲノム状態の実態解明へと進める。

具体的には以下の様な計画で進めた。

**(1) 乳癌細胞 Arf6 蛋白質高発現における eIF4A1/2、並びに、他の RNA helicase の関与:** 高浸潤性乳癌細胞である MDA-MB-231、Hs578T, MDA-MB-435s においても Arf6 蛋白質発現は異常に高発現している。上述の MDA-MB-231 細胞での実験結果を踏まえ、Hs578T 細胞や MDA-MB-435s 細胞でも Silvestrol 処理によって、Arf6 蛋白質量が低下するかを調べる。続いて、eIF4A は 1 と 2 の isoform が存在するが、これらの細胞に発現するものに対して siRNA 処理を行い、同様に検討する。翻訳複合体の構成成分ではないものの G-quadruplex 構造の解きほぐしに関与する RNA helicase として DHX9 と DHX36 が知られている。Arf6 mRNA 翻訳にこれらも関与するかに関しても siRNA 法を用いて調べる。

### **(2) Arf6 mRNA 翻訳への mTOR や eIF4E の関与:**

Arf6 mRNA に見られるように、5'-UTR が G/C-rich で自由エネルギー変化量が大きい mRNA は、多くの場合、何らかの翻訳制御を受ける。翻訳制御の代表例である mTOR の活性制御には多くの因子群が関与し、また活性化経路も複数存在するが、一般に、細胞の代謝が活発であり ATP 合成等のエネルギー充填率が高く、細胞運動や増殖が許容される状況下において活性化される。特に、PI3K-Akt 経路が mTOR 活性化主経路と考えられているが、実際、多くの癌において PIK3CA に高頻度な変異が見られ、mTOR 活性が高い、また、抗がん剤としての mTOR 阻害剤の有用性

は広く認識されている。ここでは、Arf6 mRNA 翻訳に mTOR 活性が関与するか否かを検定する。先の Silvestrol 処理実験において、mTOR 阻害剤である Rapamycin の添加効果を検討する。Rapamycin 単独処理効果や、eIF4E を siRNA で抑制した際の効果も調べる。平行して、G-quadruplex 構造領域を欠損させた Arf6 5'-UTR を構築 ( $\Delta G$  と称する) し、その下流に Arf6 cDNA、並びに、luciferase cDNA を連結した pEF-BOS plasmid を構築する (その際、promoter は転写活性が比較的強い elongation factor1 由来となる)。この  $\Delta G$  plasmid にコードされる mRNA の翻訳に mTOR や eIF4E が関与するか否かを上と同様に調べる。

### (3) Arf6 mRNA が G-quadruplex 構造を有することの癌悪性度進展における意義

グアニンの平面四量体構造はグアニン水溶液においても見られる安定な構造である。それが多層になった G-quadruplex 構造には幾つかのタイプがあるが、その中の幾つかのものに対する結合蛋白質が同定されており、G-quadruplex 構造を持つ RNA の細胞内輸送等に関与すると考えられている。Arf6 蛋白質は、癌細胞の invadopodia (浸潤仮足) に局在するが、invadopodia ではある種の mRNA の翻訳が行われていることも以前から指摘されている。ここでは、G-quadruplex 構造が Arf6 の invadopodia 局在に関与するのかを明らかにする。MDA-MB-231 細胞において、Arf6 mRNA 3'-UTR を標的とした miRNA によって内在性 Arf6 の発現を抑制し、HA-tag を付加した Arf6 を  $\Delta G$  plasmid から発現させた際、本 Arf6 蛋白質が invadopodia に局在するか (Arf6 が invadopodia 形成に必須であることから、そもそも invadopodia を形成するのかが否か) を調べる。続いて、collagen 膜上に invadopodia を形成させた MDA-MB-231 細胞を固定し、in situ RNA hybridization 法により Arf6 mRNA の invadopodia への集積の有無も調べる。局在が確認されれば、eIF4A 抗体を用い、in situ hybridization と共染色を行い、eIF4A 蛋白質と Arf6 mRNA が共に invadopodia に存在するかを調べる。Matrigel invasion assay を用いた細胞浸潤活性も測定し、G-quadruplex 構造による Arf6 mRNA と蛋白質の細胞局所局在性付与が、癌の浸潤活性に重要であるか否かを明らかにする。

低分子量 G 蛋白質であり細胞質の特定部位に局在し機能する蛋白質は Arf6 以外にも多くある。RhoA はその一つであるが、RhoA mRNA には G-quadruplex 構造は存在しない。従って、上での解析により、Arf6 の invadopodia 局在に G-quadruplex 構造が必要であるとの結果が出たにせよ、他の可能性は否定できない。その為、より多角的解析として、5'-UTR と 3'-UTR を外した pEF-BOS Arf6 cDNA を構築し、内在性 Arf6 発現を阻害した MDA-MB-231 細胞に導入し、内在性 Arf6 と

同程度発現させた際、MDA-MB-231 細胞の浸潤活性はどうなるのかも調べる。

### (4) eIF4A 発現亢進と癌の悪性度進行

1 年目の解析で、Arf6 mRNA の翻訳に eIF4A が必要であるという結果が得られた場合、eIF4A 量はその翻訳活性を規定する主因子であるか否かを調べる。その為、MDA-MB-231 等を用いて、添加する eIF4A siRNA 量の titration や、cDNA transfection による eIF4A 強制発現により、Arf6 蛋白質量と eIF4A 量とは正に相関するのかを調べる。各種乳癌細胞株における両者の相関も調べる。同時に、Arf6 抗体と eIF4A 抗体を用いた臨床乳癌標本の免疫組織化学染色も行う。既述のように、eIF4A 依存的 G-quadruplex 構造は多くの発癌関連遺伝子に存在する。上と同様に、乳癌において、これらの遺伝子産物量と eIF4A 高発現量とに相関があるか調べる。正の相関が認められれば、癌悪性度進展において eIF4A 高発現をもたらす、関連領域の DNase hypersensitive site 等のゲノム状態、並びに、ヒストン修飾などに関し、その分子の実態を明らかにする。ここから得られる成果は、ゲノムやヒストンの状態を変化させる因子群の同定などに繋がり、癌悪性度進展に対する初発段階の理解へと向かうものである。

### 4. 研究成果

上記の計画と方法に則り研究を進めた。その結果、癌細胞における特定の遺伝子変異 (遺伝子名は論文発表前の為、記載できない) が eIF4A の活性促進を起こす事を見いだした。その際、PDCD4 が eIF4A に結合し、eIF4A を転写装置から sequester するが、全ゲノムに及ぶ遺伝子発現解析を行い、PDCD4 の発現を制御する転写因子群を同定した (転写因子名は論文発表前の為、記載できない)。続いて、今回同定した遺伝子変異によって、これら PDCD4 遺伝子に対する転写因子群の発現が失われ、その結果、PDCD4 の発現が低下し、eIF4A 活性が異常に亢進すること、このことが Arf6 mRNA 翻訳を亢進させることを明らかにした。結果は現在、論文投稿準備中である。一方、mTORC1 活性は Arf6 mRNA 翻訳制御とは強い関係はなかった。Arf6 mRNA G-quadruplex 構造結合蛋白質に関しても解析したが、期間内に確たる結果は得られていない。

我々の成果は、特定の癌遺伝子の変異が eIF4A の活性を促進すること、このことは、mRNA 翻訳装置と癌の浸潤転移性や治療抵抗性とを関連付けた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Handa H, Hashimoto A, Hashimoto S, Sabe H. Arf6 and its ZEB1-EPB41L5 mesenchymal axis are required for both mesenchymal- and amoeboid-type invasion of cancer cells. *Small GTPases* 2016. [in press] (査読有) doi: 10.1080/21541248.2016.1249043
2. Otsuka Y, Sato H, Oikawa T, Onodera Y, Nam JM, Hashimoto A, Fukunaga K, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Matsuno Y, Fukuda S, Sabe H. High expression of the mesenchymal protein EPB41L5 correlates with poor prognosis of head and neck squamous cell carcinoma. *Cell Comm. Signal.* 14: 28, 2016. (査読有) doi: 10.1186/s12964-016-0151-0
3. Tanaka N, Kosaka T, Miyazaki Y, Mikami S, Niwa N, Otsuka Y, Minamishima YA, Mizuno R, Kikuchi E, Miyajima A, Sabe H, Okada Y, Suematsu M, Oya M. Acquired platinum resistance involves epithelial-to-mesenchymal transition through ubiquitin ligase FBXO32 dysregulation. *JCI Insight* 1: e83654.2016. (査読有) doi: 10.1172/jci.insight.83654
4. Hashimoto A, Hashimoto S, Sugino H, Yoshikawa A, Onodera Y, Handa H, Oikawa T, Sabe H. ZEB1 induces EPB41L5 in the cancer mesenchymal program that drives ARF6-based invasion, metastasis, and drug resistance. *Oncogenesis*. 5: e259, 2016. (査読有) doi: 10.1038/oncis.2016.60
5. Komiya Y, Onodera Y, Kuroiwa M, Nomimura S, Kubo Y, Nam JM, Kajiwaru K, Nada S, Oneyama C, Sabe H, Okada M. The Rho guanine nucleotide exchange factor ARHGEF5 promotes tumor malignancy via epithelial-mesenchymal transition. *Oncogenesis*. 5: e258, 2016. (査読有) doi: 10.1038/oncis.2016.59
6. Sabe H, Hashimoto A, Hashimoto S, Oikawa T. Tumor responsiveness to statins requires overexpression of the ARF6 pathway. *Mol Cell Oncol*. 3: e1185564, 2016. (査読有) doi: 10.1080/23723556.2016.1185564
7. Hashimoto A, Oikawa T, Hashimoto S, Sugino H, Yoshikawa A, Otsuka Y, Handa H, Onodera Y, Nam JM, Oneyama C, Okada M, Fukuda M, Sabe H. P53- and mevalonate pathway-driven malignancies require Arf6 for metastasis and drug resistance. *J. Cell Biol.* 213: 81-95, 2016. (査読有) doi: 10.1083/jcb.201510002
8. Hashimoto S, Mikami S, Sugino H, Yoshikawa A, Hashimoto A, Onodera Y, Furukawa S, Handa H, Oikawa T, Okada Y, Oya M, Sabe H. Lysophosphatidic acid activates Arf6 to promote the mesenchymal malignancy of renal cancer. *Nat. Commun.* 7: 10656, 2016. (査読有) doi: 10.1038/ncomms10656

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 及川司, 超解像イメージングから見える新しい細胞生物学, 第 11 回北海道大学医学研究科連携研究センターシンポジウム・超解像細胞生物学, 2016 年 11 月 1 日, 北海道大学(北海道・札幌市)
2. 橋本あり, Tumor responsiveness to mevalonate pathway inhibitors require overexpression of the Arf6 pathway, 第 89 回日本生化学会, 2016 年 9 月 25 日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)
3. 佐邊壽孝, 癌的代謝亢進によるミトコンドリア空間配置: 転移性癌の治療抵抗性について, 第 11 回 Basic Research Urology Seminar(BURS), 2016 年 8 月 27 日, ANA クラウンプラザホテル千歳(北海道・千歳市)
4. 佐邊壽孝, Arf6 is a core driver of mesenchymal invasion and metastasis, and therapeutic resistance of different types of cancers under RTK and GPCR signaling, 第 68 回日本細胞生物学会大会, 2016 年 6 月 15 日, 京都テルサ(京都府・京都市)
5. 及川司, p53 antagonizes EZH2 function to maintain epithelial integrity, 第 8 回シグナルネットワーク研究会, 2016 年 5 月 27 日, 大阪大学微生物病研究所(大阪府・吹田市)
6. 佐邊壽孝, Arf6-AMAP1 pathway drives mesenchymal metastasis and drug resistance of cancers under RTK and GPCR signaling, OOTR 第 12 回年次学会, 2016 年 3 月 3 日~6 日, ウェスティン都ホテル京都(京都府・京都市)
7. 及川司, p53 warrants epithelial gene expressions through epigenetic regulation, BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会 合同大会), 2015 年 12 月 1 日~4 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
8. 毛受暁史, Grb2 promotes cancer invasive activities via EGF-induced GEP100-Arf6 pathway, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8 日~10 日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
9. 小野寺康仁, Arf6-AMAP1 pathway confers radioresistance via regulation of ROS in breast cancer, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8 日~10 日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
10. 橋本あり, ZEB1-EPB4.1L5 axis drives mesenchymal-type invasion and metastasis of primary breast cancers, 第 67 回日本細胞生物学会大会, 2015 年 6 月 30 日~7 月

2 日, タワーホール船堀 ( 東京都・江戸川区 )

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 膵癌の再発リスクの予測に用いるための診断薬及びキット、並びに予測方法

発明者: 佐邊壽孝、平野聡、古川聖太郎

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2015-246132

出願年月日: 2015 年 12 月 17 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://g21001.med.hokudai.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐邊 壽孝 (SABE, Hisataka)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 4 0 1 8 7 2 8 2