

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目： 特定領域研究

研究期間： 2005 ～ 2009

課題番号： 17014083

研究課題名（和文） がん細胞の細胞基質間接着とその制御機構

研究課題名（英文） Mechanisms regulating cell adhesion activities in tumor progression

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： 40187282

研究成果の概要（和文）：

ヒトの悪性腫瘍の殆どは上皮組織に由来する。そのような悪性腫瘍の主な脅威はそれらの浸潤転移性である。殆どの癌の浸潤転移には、細胞間接着が破壊され細胞基質間接着を担うシグナル経路が活性化する。本研究においては、この点に関する分子機構の詳細を明らかにし、癌の診断や治療に貢献しようとするものである。

研究成果の概要（英文）：

Most malignant human tumors are epithelial cell origin. The basic fear of such tumors are based on their invasion and metastasis. Activation of integrins and inactivation of E-cadherin are hallmark characteristics for such invasive and metastatic properties. Here our purpose is to understanding the underlying molecular mechanisms for integrin activation and E-cadherin inactivation in the malignant development of tumor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	14,300,000	0	14,300,000
2006 年度	13,900,000	0	13,900,000
2007 年度	13,900,000	0	13,900,000
2008 年度	13,900,000	0	13,900,000
2009 年度	13,900,000	0	13,900,000
総計	69,900,000	0	69,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：癌、浸潤、転移、細胞接着、E-カドヘリン、インテグリン、Arf6、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

がんの最大の脅威はその浸潤性転移性にある。ヒトがんの80%以上は上皮組織に起因する。多くの上皮癌の場合、その浸潤転移の初期段階では、それまで存在した細胞間の接着が破壊され、一方、細胞の基質上での運動性や細胞の基質に対する浸潤能が著しく亢

進する。この過程は分子レベルで述べるとE-カドヘリンの不活化とある種のインテグリンの活性化であり、個体の発生や組織のリモデリング等で見られるEMTと類似しており重要な研究対象として捉えられている。しかし、多くの研究はEMTと関連する遺伝子発現制御への解析に重きをおいたものである。

一方、E-カドヘリンやインテグリンの活性制御は、これら表面受容体の細胞内輸送やリサイクリングが大きな役割を果たしており、当研究者のグループは、癌の浸潤性転移性獲得過程を理解するには、遺伝子支配に関する解析だけでは不十分であると考えていた。

2. 研究の目的

Arf6 の活性化／不活性化が細胞間接着の維持や破壊に大きく関与することが、Schoreyらにより示唆されていた。すなわち、Arf6 の活性化が細胞間接着の破壊をもたらす、その際、E-カドヘリンは細胞間接着から乖離する。一方、Arf6 の不活性化が E-カドヘリンを介する細胞間接着の安定化をもたらす。本研究者らは、一方、Arf6 の異常高発現と活性化が癌細胞に浸潤性を付与することに非常に重要な役割をなしていることを見いだしていた。従って、これら2点を繋ぎ、遺伝子発現制御に主眼をおいた他のグループでは明らかに出来ない観点から、癌の浸潤性転移性獲得過程を解明するのが本特定研究の主たる目的であった。Arf6 は細胞表面蛋白質のリサイクリングに関わる。E-カドヘリンを安定化し細胞間接着形成を維持する Arf6 シグナル経路が存在するとの作業仮説を立て、E-カドヘリンの動態制御に関わる Arf6 の活性化／不活性化因子はそれぞれ何か、それらはどのような機序により制御されるのか、を明らかにすることを具体的目標とした。同時に、浸潤に伴ってインテグリンを活性化するシグナル経路を明らかにすることも本研究の必然的な目的である。

3. 研究の方法

様々なヒト乳癌細胞株と正常乳腺細胞を用いて、まず上記仮説を検定した。その結果、この仮説の妥当性が十分に保証されたので、続いて、生化学的方法論や細胞生物学的的方法論を駆使し、E-カドヘリンの動態制御に関わる Arf6 の活性化／不活性化因子の同定を行った。同定されたそれぞれの蛋白質の構造にも基づき、それらを制御するシグナル経路の同定を行った。このような *in vitro* で得られた結果はすべてマウスを用いたモデル動物実験での検証とヒト病理標本観察とを行い、その妥当性を査定した。

4. 研究成果

(1) 乳癌の浸潤転移において Arf6 を活性化する経路を同定した。
乳癌の浸潤転移において Arf6 を活性化するのは GEP100 であり、その際 GEP100 はリガンドで活性化された EGFR により活性化されることを明らかにした。GEP100 と EGFR との結合は従来には知られていない様式であった。GEP100 による Arf6 の活性化は E-カドヘリンを不活性化し細胞間接着を破壊する

ことも示した。この Arf6 経路の作動には Arf6 とその下流因子である AMAP1 の異常な高発現が必要であることをそれまでに明らかにしていた。一方、EGF は乳癌の悪性度進展に大きく寄与することはよく知られている。また、EGF は乳癌自身が産生するのではなく、多くの場合、微小環境に存在するマクロファージが産生する。この研究も含め我々の一連の成果は、EGF は乳癌の悪性度進展において正常細胞には実質的に存在しない経路を用いていること、並びに、乳癌の浸潤転移は癌細胞自身の変化のみによって獲得されるのではなく微小環境因子が必要であることをその分子的詳細と共に明らかにしたものであり、この成果は大きな反響を呼び、*nature review in cancer* や *nature cell biology* の highlight 記事、並びに *science signal* の第一巻の巻頭記事に editorial choice として取り上げられた。国内では主要全国紙のほとんどや多数の地方紙に取り上げられた。

(2) E-カドヘリンを安定化し細胞間接着形成を維持する Arf6 シグナル経路を同定した。
細胞間接着形成時において Arf6 を不活性化し E-カドヘリンを安定化するのは、Git1 と呼ばれる ArfGAP であることを明らかにした。その際、Git1 は Nck を介して細胞表面受容体である EphA と複合体を形成していた。EphA は ephrin をリガンドとするが、ephrin も細胞形質膜蛋白質である。この研究は、細胞同士が接触した際にどのようにして E-カドヘリンを安定化し細胞間接着を形成し維持するのかに関して一つの明確な経路を明らかにした。EphA の機能異常が癌と関連することが報告されている。この研究はその分子機構の一端を明らかにしたものと考えられる。

(3) 乳癌浸潤においてインテグリンを活性化する分子機構を明らかにした。
乳癌浸潤において $\beta 1$ インテグリンのリサイクル活性が上昇し、このことが浸潤活性に深く関与することをまず明らかにした。続いて、このリサイクル活性は EGF 刺激により誘起されること、その際、EGF 刺激は Arf6 を活性化と AMAP1 を介し、 $\beta 1$ インテグリンのリサイクルを行うことをその分子的詳細共に明らかにした。

(4) 今後の展望

浸潤において Arf6 を活性化し E-カドヘリンを不活性化するのは GEP100 であるが、では、Arf6 の活性がどのようにして E-カドヘリンの不活性化をもたらすのかに関して現在解析を進めている。これら一連の結果はこの Arf6 経路の活性化が癌の EMT 進行に深く関与するものであることを示唆している。乳癌において最も顕著な EMT 誘導因子は TGF β

である。調べた結果、この Arf6 経路は TGFβ 刺激によっても作動することも分かった。現在、TGFβ シグナル経路と EGFR などのチロシンリン酸化酵素型受容体との相互関連を調べている。最近、乳癌を含め幾つかの癌はその初期段階からでも転移することが明らかにされている。しかし、その分子機序は全く不明である。これまでの成果を足場にし、そのような難問題へのアプローチも少しずつ見えてきている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

- ① Zyxin mediates actin fiber reorganization in epithelial-mesenchymal transition and contributes to endocardial morphogenesis. Mori M., Nakagami H., Koibuchi N., Miura K., Takami Y., Koriyama H., Hayashi H., Sabe H., Mochizuki N., Morishita R. and Kaneda Y. *Mol Biol Cell*. 20: 3115-3124 (2009). 査読有
- ② EphA2 engages Glt1 to suppress Arf6 activity modulating epithelial cell-cell contacts. Miura K., Nam J.M., Kojima C., Mochizuki N. and Sabe H. *Mol Biol Cell*. 20: 1949-1959 (2009). 査読有
- ③ The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. Sabe H., Hashimoto S., Morishige M., Ogawa E., Hashimoto A., Nam J.M., Miura K., Yano H. and Onodera Y. *Traffic*. 10: 982-993 (2009). 査読有
- ④ IRES-mediated translational control of AMAP1 expression during differentiation of monocyte U937 cells. Miyata M., Raven JF., Baltzis D., Koromilas AE. and Sabe H. *Cell Cycle*. 7: 3273-3281 (2008). 査読有
- ⑤ EPB41L5 functions to post-transcriptionally regulate cadherin and integrin during epithelial-mesenchymal transition. Hirano M., Hashimoto S., Yonemura S., Sabe H. and Aizawa S. *J Cell Biol*. 182: 1217-1230 (2008). 査読有
- ⑥ Clathrin dependent endocytosis of E-cadherin is regulated by the Arf6GAP isoform SMAP1. Kon S., Tanabe K., Watanabe T., Sabe H. and Satake M. *Exp Cell Res*. 314: 1415-1428 (2008). 査読有
- ⑦ Dynamic rearrangement of surface proteins is essential for cytokinesis. Bauer T., Motosugi N., Miura K., Sabe H. and Hiiragi T. *Genesis*. 46: 152-162 (2008). 査読有
- ⑧ Fbx8 makes Arf6 refractory to function via ubiquitination. Yano H., Kobayashi I., Onodera Y., Luton F., Franco M., Mazaki Y., Hashimoto S., Iwai K., Ronai Z. and Sabe H. *Mol Biol Cell*. 19: 822-832 (2008). 査読有
- ⑨ GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. Morishige M., Hashimoto S., Ogawa E., Toda Y., Kotani H., Hirose M., Wei S., Hashimoto A., Yamada A., Yano H., Mazaki Y., Kodama H., Nio Y., Manabe T., Wada H., Kobayashi H. and Sabe H. *Nat Cell Biol*. 10: 85-92 (2008). 査読有
- ⑩ The EGFR-GEP100-Arf6 pathway in breast cancer: Full invasiveness is not from the inside. Sabe H., Hashimoto S., Morishige M., Hashimoto A. and Ogawa E. *Cell Adh Migr*. 2: 71-73 (2008). 査読有
- ⑪ CIN85, a Cbl-interacting protein, is a component of AMAP1-mediated breast cancer invasion machinery. Nam J.M., Onodera Y., Mazaki Y., Miyoshi H., Hashimoto S. and Sabe H. *EMBO J*. 26: 647-656 (2007). 査読有
- ⑫ Neutrophil direction sensing and superoxide production linked by the GTPase-activating protein GIT2. Mazaki Y., Hashimoto S., Tsujimura T., Morishige M., Hashimoto A., Aritake K., Yamada A., Nam J.M., Kiyonari H., Nakao K. and Sabe H. *Nat Immunol*. 7: 724-731 (2006). 査読有
- ⑬ Targeting AMAP1 and cortactin binding bearing an atypical src homology 3/proline interface for prevention of breast cancer invasion and metastasis. Hashimoto S., Hirose M., Hashimoto A., Morishige M., Yamada A., Hosaka H., Akagi K., Ogawa E., Oneyama C., Agatsuma T., Okada M., Kobayashi H., Wada H., Nakano H., Ikegami T., Nakagawa A. and Sabe H. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103: 7036-7041 (2006). 査読有
- ⑭ ArfGAP family proteins in cell adhesion, migration and tumor invasion. Sabe H., Onodera Y., Mazaki Y. and Hashimoto S. *Curr Opin Cell Biol*. 18: 558-564 (2006). 査読有
- ⑮ Assays and properties of the ArfGAPs, AMAP1 and AMAP2, in Arf6 function. Hashimoto S., Hashimoto A., Yamada A., Onodera Y. and Sabe H. *Methods Enzymol*. 404: 216-231 (2005). 査読有
- ⑯ Interaction of paxillin with poly(A)-binding protein 1 and its role in focal adhesion turnover and cell migration. Woods A.J., Kantidakis T., Sabe H., Critchley D.R. and Norman J.C. *Mol Cell Biol*. 25: 3763-3773

(2005). 、査読有

- ⑩ Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. Onodera Y., Hashimoto S., Hashimoto A., Morishige M., Mazaki Y., Yamada A., Ogawa E., Adachi M., Sakurai T., Manabe T., Wada H., Matsuura N. and Sabe H. EMBO J. 24: 963-973 (2005). 、査読有

〔学会発表〕 (計 17 件)

- ① Sabe H. Integrin activation and E-cadherin inactivation by the Arf6 pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. 第 6 回 OOTR 年次学会, 京都, February 25, 2010
- ② Sabe H. メンブレントラフィックと癌浸潤形質獲得機序, 第 82 回 日本生化学会, 神戸, October 21, 2009
- ③ Sabe H. Integrin activation and E-cadherin inactivation by the Arf6 pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. 2009 FEBS workshop, Seefeld, September 6, 2009
- ④ Menju T, Arf6-AMAP1 pathway in invasion of lung cancer and malignant mesothelioma cell lines. 20th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Geneva Palexpo, Geneva, Switzerland, October 22, 2008
- ⑤ Hashimoto A, Common usage of the GEP100-Arf6-AMAP1 pathway in tumor invasion, angiogenesis and vascular permeability. 20th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Geneva Palexpo, Geneva, Switzerland, October 22, 2008
- ⑥ Hashimoto S, The EGFR-GEP100-Arf6 Pathway in breast cancer invasion and metastasis. 20th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Geneva Palexpo, Geneva, Switzerland, October 22, 2008
- ⑦ Yano H, Fbx8 makes Arf6 refractory to function via ubiquitination. FASEB Summer Research Conferences, II Ciocco, Tuscany, Italy, June 26, 2007
- ⑧ Hashimoto A, Essential role of Arf6/AMAP1 signaling pathway in tumor angiogenesis. FASEB Summer Research Conferences and Jacques Monod “Arf Family GTPases” II Ciocco, Italy, June 24, 2007
- ⑨ Hashimoto S, GEP100 links epidermal growth factor receptor signaling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion.

FASEB Summer Research Conferences and Jacques Monod “Arf Family GTPases” II Ciocco, Italy, June 22-27,2007

- ⑩ Sabe H. Arf6 constitutes a signaling pathway involved in the invasive phenotypes of primary tumors of the human breast., FASEB Summer Research Conferences, II Ciocco, Tuscany, Italy, June 22-27,2007
- ⑪ Onodera Y, The roles of AMAP1 for integrin trafficking in breast cancer invasion. Keystone Symposia, Molecular Target for Cancer / Mouse Models of Cancer Discovery, march 18-23, 2007
- ⑫ Nam JM, CIN85, a Cbl-interacting protein, is a component of AMAP1-mediated breast cancer invasion machinery. Keystone Symposia, Whistler, Canada, March 18-23, 2007
- ⑬ Hashimoto S, Comprehensive analysis for the acquisition of invasiveness in mammary epithelial cells. The 46th annual meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego, CA, December 12, 2006
- ⑭ Masaki Y, Neutrophil directional sensing and superoxide production Linked by GIT2, The 46th annual meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego, CA, December 11, 2006
- ⑮ Sabe H. How invasive Phenotypes Arise in Primary Tumors of Human Breast, Burnham institute for Medical Research, CA,USA, December 11, 2006
- ⑯ Sabe H. Cancer Cell Invasion:How the invative phenotypes arises in Breast Tumors, Beatson Institute Worksho, Glasgow, UK, March 19-21, 2006
- ⑰ Sabe H. Reglation of cancer cell mobility, Montebello Conference 2005, Olso, Norway, June 18-21, 2005

〔図書〕 (計 1 件)

貝淵弘三、稲垣昌樹、佐邊壽孝、共立出版、蛋白質・核酸・酵素：細胞骨格と接着、2006、第 51 巻第 6 号編集

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 3 件)

名称：血管新生ならびに癌細胞の mesenchymal 型および amoeboid 型浸潤を阻害するための薬剤

発明者：佐邊壽孝、橋本あり、橋本茂

権利者：同上

種類：国際特許

番号：JP2007-056670

取得年月日：2007.3.28

国内外の別：国外

名称：非典型的なプロリンリッチ配列結合阻害剤

発明者：佐邊壽孝、橋本茂、中野洋文、我妻勉

権利者：同上

種類：国際特許

番号：JP2006-319319

取得年月日：2006.9.28

国内外の別：国外

名称：血管新生ならびに癌細胞のmesenchymal型およびamoeboid型浸潤を阻害するための薬剤

発明者：佐邊壽孝、橋本あり、橋本茂

権利者：同上

種類：国内特許

番号：2006-87990

取得年月日：2006.9.28

国内外の別：国内

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：40187282

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし ()

研究者番号：