

平成21年 5月26日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570190

研究課題名（和文） 癌の浸潤形質獲得過程における Arf6 の活性化機序の解明

研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanisms of Arf6 activation during acquisition of tumor invasiveness

研究代表者

橋本 茂（HASHIMOTO SHIGERU）

財団法人大阪バイオサイエンス研究所・分子生物学部門・研究員

研究者番号：50311303

研究成果の概要：

乳癌をはじめ幾つかの癌において、レセプター型チロシンキナーゼである EGF レセプターの高発現と、癌の悪性度との間に相関があることが知られている。しかし、癌の浸潤形質獲得に特異的なシグナル伝達経路があるか否かについては、不明のままであった。申請者らの研究成果から、シグナル分子 GEP100 が EGF レセプターを介したシグナル伝達経路と、乳癌の浸潤形質獲得に必須な低分子量 G 蛋白質 Arf6 の活性化とを結び付ける新規のシグナル伝達経路の存在が明らかとなった。さらに、病理学的解析から、この GEP100-Arf6 経路が浸潤性乳癌の約 80% に存在することが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：乳癌、癌浸潤、Arf6、ArfGEF、EGF レセプター、チロシンリン酸化、PH ドメイン

1. 研究開始当初の背景

癌の最も大きな脅威はその転移性にある。ヒトにおける悪性新生物の約 80% 以上が上皮組織に由来する癌であるが、多くの上皮癌において、癌細胞が基底膜に対して高い浸潤能を獲得することがその転移性に大きく寄与すると考えられている。

申請者らは、細胞浸潤を制御する基本的分子機構を明らかにし、どのような制御の破綻が癌細胞の常軌を逸した浸潤性をもたらすのかを解明することを目標として研究を進

めてきた。その過程の中で、低分子量 G 蛋白質 Arf6 が浸潤性の高い乳癌細胞においてそれらの浸潤活性に根幹的役割を果たしていることを見出した。即ち、Arf6 が浸潤性乳癌細胞の浸潤仮足に局在し、その発現を siRNA 処理により抑制すると、マトリクスメタロプロテアーゼの分泌や活性化には影響を与えないものの、浸潤仮足形成や chemo-invasion 活性などの浸潤活性が阻害されることを見出した。さらに、Arf6 の GTP 非結合型変異体と GTP 水解活性欠損型変異体が共に浸潤活性

を阻害することを見出した。これらの結果は、Arf6 及び、その GTPase cycle の制御に関わる GAP (GTPase activating protein) あるいは GEF (guanine nucleotide exchange factor) が乳癌細胞の浸潤性獲得において必須の分子装置であることを示唆するものである。申請者らは、さらに、Arf6 を中心とした、細胞浸潤に必要な複合体が存在することを明らかにした。この複合体は GTP 型 Arf6 のエフェクターとして同定した AMAP1 と、AMAP1 結合蛋白質でありインテグリン裏打ち蛋白質であるパキシリンと、アクチン細胞骨格構造の再構成に関与するコータクチンとの 3 者からなる。その複合体形成は Src ホモロジドメイン 3 (SH3 ドメイン) によって媒介される。各々の SH3/プロリン結合をペプチドにより阻害すると、乳癌のみならず肺癌、神経膠芽腫 (glioblastoma) 由来細胞の浸潤活性を著しく抑制できることを見出した。さらに、コータクチンの SH3 ドメインと AMAP1 のプロリンリッチ配列との結合様式について X 線構造解析を用いた解析から、この結合インターフェース構造が他の一般的な SH3/プロリン結合とは大きく異なることを明らかにした。また、SH3 domain array を用いた解析から、AMAP1 のプロリンリッチ配列とコータクチン SH3 ドメインとの結合が、既知の SH3 ドメインとの結合に比較して特異性が高いことを見出した。そして、AMAP1/コータクチン結合を特異的に阻害する細胞透過性ペプチドを用いて、この結合インターフェースが乳癌の浸潤転移を阻害するための副作用の少ない分子標的と成り得ることを肺転移モデルマウス系において例示した。

2. 研究の目的

本研究は、これまで見出してきた乳癌浸潤における Arf6 の役割についてより詳しく解析し、癌浸潤の基本機序を明らかにするために、Arf6 の活性化に関わる分子群、特に、ArfGEF を明らかにし、それらの作用機序の解明することを目的とする。乳癌をはじめ幾つかの癌において、レセプター型チロシンキナーゼである EGF レセプターや HGF レセプター/c-Met が高発現と、癌の悪性度との正の相関が知られている。また、Arf6 の活性化が EGF あるいは、HGF レセプターからのシグナル伝達により誘導されることが細胞生物学的に示唆されている。分子生物学的、発生工学的、そして、病理学的手法を駆使して、乳癌をはじめ幾つかの癌細胞での浸潤形質獲得過程において、EGF レセプターや HGF レセプター/c-Met などのレセプター型チロシンキナーゼから ArfGEF を介して Arf6 の活性化に至るシグナル伝達の分子機序を明らかにする。さらに、Arf6 の活性化に伴うシグナル伝達分子

群の相互作用の変化に関する解析を進め、癌の浸潤・転移阻害剤の分子標的の探索も行う。

3. 研究の方法

(1) ArfGEF の作用機序の解析

Arf6 は、EGF レセプター、c-Met などレセプター型チロシンキナーゼ群によって活性化される。同定した ArfGEF のチロシンリン酸化などの修飾が GEF 活性に与える影響を検討する。また、ArfGEF は、複数の蛋白質相互作用モジュールを有する。活性化に関わるレセプター群やそれらの制御に関わるアダプター分子などとの相互作用を検討した。ヒト乳癌をはじめとし、肺癌、神経膠芽腫などの様々な癌について同定した ArfGEF の発現と悪性度の進行との相関、また、レセプター型チロシンキナーゼ群との共発現について病理学的解析を行った。

(2) ArfGEF の細胞生物学的解析

同定した ArfGEF の蛋白質レベル、mRNA レベルでの発現について、正常乳腺上皮細胞あるいは浸潤性の低い乳癌細胞と浸潤性の高い細胞との間で比較検討した。遺伝子発現と浸潤性との間に相関が見られる場合、浸潤性の低い細胞内で強制発現させることにより浸潤形質がもたらされるか否か検討した。また、ArfGEF の浸潤仮足形成時あるいは、レセプター型チロシンキナーゼ群からのシグナル伝達による細胞内動態の変化について検討した。

(3) 乳癌細胞の肺転移モデルマウスを用いた解析

これまでに確立しているマウスの転移モデルを用いて、ArfGEF を knock-down あるいは、過剰発現させた場合の転移活性に与える影響を検討した。

(4) Conventional/conditional 遺伝子欠損マウスの解析

同定した ArfGEF、GEP100 の各種組織の発生・分化における発現パターンを調べ、遺伝子破壊マウスの作製を進めている。Conventional 遺伝子欠損マウスの作製については、胎生致死となる可能性があることが明らかとなった。胎生致死に至る過程を解析するとともに、特定の組織に特化した解析を行うために conditional 遺伝子欠損マウスの作製を進めている。最初の解析は、既に所属する研究機関が保有する neu 遺伝子のトランスジェニックマウスで見られる乳癌発生・悪性度の進行が ArfGEF の conventional あるいは、conditional 遺伝子欠損マウスとかけ合わせることにより、どのような影響を受けるか検討する。その他の癌のモデルマウス、及び、conditional 遺伝子欠損マウスに用いる cre マウスについても随時導入する。

(5) 浸潤/転移阻害の分子標的の探索

本研究期間前半に、GEP100 が活性化された EGFR に直接結合することによって Arf6 を活性化すること、また、その際の GEP100 と EGFR との会合が GEP100 の pleckstrin homology (PH) 領域と EGFR のチロシンリン酸化部位との直接的結合であることを明らかにした。これらの研究成果に基づいて、阻害剤探索のためのスクリーニング系を立ち上げ、阻害的に働くペプチドあるいは低分子化合物の探索を行う。特に、候補に挙がった ArfGEF を中心としたシグナル伝達分子間の相互作用に関しては、その結合インターフェースの立体構造を確定し、既知の相互作用と比較を行う。それらの構造解析により、目的とする阻害剤に関する構造的知見を提示し、基本デザインを試みることによって阻害剤の探索に役立つ。

4. 研究成果

本研究期間前半において、乳癌細胞の浸潤において Arf6 を活性化する GEF の同定を行った。浸潤性の高い乳癌細胞である MDA-MB-231 細胞をモデルとし解析を行った結果、この細胞株で発現している ArfGEF の中で GEP100 の発現を抑制した時のみ、有意な浸潤活性の抑制が認められた。GEP100 は、リガンドにより活性化された EGFR に直接結合することによって Arf6 を活性化すること、また、GEP100 と EGFR との結合様式も明らかにした。MCF7 など非浸潤的乳癌細胞では、GEP100、Arf6 共に殆ど発現していない。MCF7 細胞に GEP100 の強制発現を試みたところ、Arf6 との共発現においてのみ、EGF 刺激依存的な浸潤性の誘導を見出した。病理学的解析から、GEP100 の発現がヒト浸潤性乳管癌の約 80%に観察されることを見出した。さらに、それらの悪性度の高いケースで、特に EGFR との共発現が見られた。

これらの研究成果は、Nature Cell Biology 誌 (2008, 10, 822-832) に掲載され、同じ号の News & Views、Science Signaling 誌 (2008, 1, ec9) の Editor's choice、Nature Reviews Cancer 誌 (2008, 8, 80-81) の Research Highlight にも取り上げられた。さらに、2007 年 12 月 17 日付の朝日新聞、日本経済新聞、読売新聞、産経新聞にも記載された。

本研究期間後半において、マウスモデルの構築と構造解析を進めた。GEP100 の Conventional 遺伝子欠損マウスは、胎生致死となる可能性があることが明らかとなった。現在、どの段階まで発生が進んでいたかの検討を進めつつある。乳癌の浸潤形質獲得との関連を明らかにするため、乳腺特異的 GEP100 遺伝子欠損マウスの作製を進めている。特に、既に所属する研究機関が保有する乳癌モデルマウス (MMTV-NeuT マウス) との掛け合わ

せにより、乳癌の発症・悪性度の進行が GEP100 遺伝子欠損により、どのような影響を受けるか明らかにする。関連事項として、培養細胞のレベルでは、これまでに、erbB2 蛋白質の発現が高い乳癌細胞株及び、肺癌細胞株において、GEP100 が erbB2 と相互作用し、Arf6 を活性化し、浸潤形質誘導に関与することを示唆する結果を得ている。

さらに、GEP100 と EGFR との結合インターフェースの立体構造についてオックスフォード大学の Feller 博士のグループと共同研究を開始した。それにより、結合阻害に関する構造的知見を提示し、阻害剤の基本デザインを試み、焦点を絞った阻害剤の探索を行う予定である。

固形癌の場合、ある特定の癌(例えば、小細胞肺癌、膵臓癌)を除けば、多くの場合、腫瘍サイズ・増殖性と浸潤・転移性との間に相関がある。ErbB ファミリーの EGF レセプター (EGFR) や ErbB2、c-Met を介した増殖シグナル伝達経路の関与がさまざまな癌腫で示唆されている。実際の臨床の場で、EGF レセプター (EGFR) や ErbB2 を分子標的とした阻害抗体やキナーゼ活性を阻害する低分子化合物により、癌の悪性度の進行を抑制することが報告されているが、それらの分子標的が様々な生命機能に関わる根幹的なものを標的としているため副作用が問題となっている。我々の研究成果から、GEP100 が erbB ファミリーを介したシグナル伝達経路と、乳癌の浸潤形質誘導に必要な Arf6 の活性化とを結び付ける特異的な、新規シグナル伝達経路の存在すること、さらに、その分子機序から新しい視点からの分子標的となることの可能性が示唆された。今後、GEP100-Arf6 経路がどのようなシグナル伝達経路と連関して浸潤形質を誘導するのかについてその固有性と普遍性を明らかにすると共に、GEP100 とレセプター型チロシンキナーゼとの結合インターフェースを詳細に解析することにより、より特異性の高い、新しい視点からの癌浸潤・転移治療の分子標的の提示、治療方法の開発に結びつくことが期待される。

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 6 件)

(1) H. Sabe, S. Hashimoto, M. Morishige, A. Hashimoto, E. Ogawa, A. Hashimoto, J.-M. Nam, K. Miura, H. Yano and Y. Onodera. The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. *Traffic* (in press)

(2) H. Sabe, S. Hashimoto, M. Morishige,

- A. Hashimoto, E. Ogawa. (2008) The EGFR-GEP100-Arf6 pathway in breast cancer: Full invasiveness is not from the inside. *Cell Adhesion & Migration* 2:1-3.
- (3) M. Hirano, S. Hashimoto, S. Yonemura, H. Sabe, S. Aizawa. (2008) EPB41L5 functions to post-transcriptionally regulate cadherin and integrin during epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* 182:1217-1230.
- (4) H. Yano, I. Kobayashi, Y. Onodera, F. Luton, M. Franco, Y. Mazaki, S. Hashimoto, K. Iwai, Z. Ronai and H. Sabe. (2008) Fbx8 makes Arf6 refractory to function via ubiquitination. *Mol. Biol. Cell* 19:822-832.
- (5) M. Morishige*, S. Hashimoto*, E. Ogawa, Y. Toda, H. Kotani, M. Hirose, S. Wei, A. Hashimoto, A. Yamada, H. Yano, Y. Mazaki, H. Kodama, Y. Nio, T. Manabe, H. Wada, H. Kobayashi and H. Sabe. (2008) GEP100 links EGFR signaling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. *Nature Cell Biol.* 10:85-92 (* These authors contributed equally to this work).
- (6) J.-M. Nam, Y. Onodera, Y. Mazaki, H. Miyoshi, S. Hashimoto and H. Sabe. (2007) CIN85, a Cbl-interacting protein, is a component of AMAP1-mediated breast cancer invasion machinery. *EMBO J.* 26: 647-656.

[学会発表] (計 5件)

- (1) 橋本茂 EMT と低酸素下での浸潤活性獲得に共通なエピジェネティック変化 BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) 2008年12月10日ポスター発表 神戸
- (2) 橋本茂 Comprehensive analysis for the acquisition of invasiveness of mammary epithelial cells under hypoxia and EMT 第67回日本癌学会学術総会 2008年10月28日口頭発表 名古屋
- (3) 橋本茂 The EGFR-GEP100-Arf6 pathway in breast cancer invasion and metastasis 第20回 欧州癌研究治療機関・米国国立ガン研究所・米国ガン学会合同シンポジウム『分子標的とがん治療』 2008年10月22日ポスター発表 ジュネーブ・スイス
- (4) 橋本茂 Growth factor receptor signaling and tumor invasion and metastasis BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会) 2007年12月12日口頭発表 (招待講演) 横浜
- (5) 橋本茂 GEP100 links epidermal growth factor signaling to Arf6 activation to

induce breast cancer invasion 第66回 日本癌学会学術総会 2007年10月3日口頭発表 横浜

[図書] (計 2件)

- (1) 橋本茂、森重真毅、小川栄治、橋本あり、小野寺康仁、佐邊壽孝 (2008) がんの浸潤形質獲得過程における低分子量Gタンパク質 Arf6 シグナル伝達 実験医学増刊号 (羊土社) vol. 26(15), pp2349-2355.
- (2) 橋本茂 (2008) 癌の浸潤形質獲得過程における細胞接着・移動の変化-低分子量Gタンパク質 Arf6 の活性化との関連 実験医学増刊号 (羊土社) vol. 26(14), pp2196-2203.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

所属する研究室のURL
<http://www.sabelab.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 茂 (HASHIMOTO SHIGERU)

財団法人大阪バイオサイエンス研究所・分子生物学部門・研究員

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

研究協力者について

① 病理学的解析について、京都大学医学部病理真鍋俊明教授のグループと大分大学医学部神経外科古林秀則教授グループとの共同研究。

② 遺伝子破壊マウスの作製について、理研再生・発生研究所の相沢慎一教授のグループとの共同研究。

③ GEP100とEGFRとの結合インターフェースの立体構造について、オックスフォード大学・Weatherall Institute of Molecular Medicine・Cell Signalling のStephan M. Feller博士のグループとの共同研究