

機関番号：10101
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20590293
 研究課題名 (和文) 癌浸潤並びに血管新生に共通に係わる分子装置の解析及び阻害剤開発に関する研究
 研究課題名 (英文) Analysis of common molecular mechanisms and pharmaceutical research in cancer invasion and angiogenesis
 研究代表者
 橋本 あり (HASHIMOTO ARI)
 北海道大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：60390803

研究成果の概要 (和文)：

乳癌を例とした解析の中で、GEP100-Arf6-AMAP1 シグナルが EGF 刺激による乳癌細胞の浸潤活性に重要であることを明らかにしてきた。申請者らの研究成果から、VEGF 刺激による血管新生においても GEP100-Arf6-AMAP1 シグナルが重要な役割を担う共通のシグナルであることを明らかにした。また、GEP100 が PH ドメインを介してリン酸化 VEGFR-2 と複合体を形成すること、VEGF 刺激による GEP100-Arf6-AMAP1 シグナルの活性化は VEGFR-2 の 951 番目のリン酸化チロシンを介していること、そして GEP100/ VEGFR-2 の結合を阻害する低分子化合物を見出した。さらに、病理学的解析から GEP100-Arf6-AMAP1 シグナルが創薬標的としての可能性があることが示された。

研究成果の概要 (英文)：

We have shown that GEP100 links EGFR signaling to Arf6 activation to induce invasive activities of some breast cancer cells. Our analyses demonstrate that the same GEP100-Arf6-AMAP1 pathway is essential for VEGF-induced angiogenesis activities, and that VEGFR2, via phospho-Tyr951, binds to the PH domain of GEP100 to activate the Arf6-AMAP1 pathway to induce angiogenesis. Moreover, we found the small compound that inhibits the interaction between GEP100 and VEGFR-2. The GEP100-Arf6-AMAP1 pathway, activated by receptor tyrosine kinases, appears to be common in angiogenesis and cancer invasion, and provide their new therapeutic targets from a pathological analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：血管新生、癌浸潤、Arf6、AMAP1、ArfGEF、乳癌、チロシンリン酸化

1. 研究開始当初の背景

低酸素領域の癌細胞によって誘導される血管新生は、癌の悪性度進行の律速段階の一

つに挙げられ、新生した血管は、癌細胞の転移のルートともなりうる。また、癌浸潤と血管内皮細胞が示す血管新生のメカニズムは

類似していることが知られている。従って、癌浸潤と血管新生とに共通に用いられる分子装置を標的とすれば、より効果的な癌浸潤・転移阻害剤の開発に繋がる可能性が考えられる。

申請者らは、低分子量 G タンパク質 Arf6 を中心とした浸潤に特化された分子装置の同定とそれらの蛋白質複合体形成のインターフェース構造に基づく癌細胞の浸潤・転移の特異的阻害剤の研究・開発を進めてきた。Arf6 が、乳癌細胞の浸潤活性において重要な役割を担うこと、そのエフェクターとして AMAP1 を見だし、乳癌細胞の浸潤に必須であること、AMAP1 の蛋白質発現量が乳癌の浸潤性と正の相関があることを明らかにした。さらに、乳癌の浸潤性と相関して AMAP1 を中心とした複合体が形成されることを見出した。この複合体は、AMAP1、cortactin、paxillin から成り、Src ホモロジドメイン 3 (SH3 ドメイン) とプロリンリッチ配列によって媒介される。Cortactin 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 線構造解析により解析した結果、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ている。そこで、AMAP1 と cortactin の結合を特異的に阻害する細胞透過性ペプチド、P4-TAT ペプチドを作製した。P4-TAT ペプチドは、浸潤性乳癌細胞の浸潤及びマウス個体を用いた肺への転移を効率的に阻害する。さらに、P4-TAT ペプチドは、血管内皮細胞の *in vitro* の tubular formation 及び、マウス個体を用いた *in vivo* angiogenesis を抑制する知見を得た。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果を踏まえ、癌浸潤に特化した分子 Arf6、AMAP1、GEP100 が血管新生においても重要な役割を担う共通のシグナルであること、また、どのような分子機序で血管新生に関与しているのかを明らかにし、より効果的な癌浸潤阻害剤の開発に繋がる知見を提示することを目的とする。

Arf6 が血管内皮増殖因子 VEGF (vascular endothelial growth factor) によって誘導される血管新生に関わることが報告されている。このことは、Arf6 を中心とした癌細胞浸潤に必須の複合体形成が血管新生にも関与してい

ることを示唆する。また、VEGF によって誘導される血管透過性に血管内皮細胞接着分子 VE-cadherin が重要な役割を担っていることが報告されている。血管透過性は、癌の悪性度進展に大きく関与し、腫瘍の増殖に必要な不可欠な現象である。本研究では、VEGF 刺激によって Arf6 がどのような分子機序で活性化されるのか生化学的解析を行う。さらに、VE-cadherin の動態について解析を行い、血管新生のどのような過程に関与しているかを明らかにする。解析結果に基づいて、癌浸潤及び血管新生を阻害できる分子標的の同定を行う。

3. 研究の方法

(1) 血管新生における Arf6、AMAP1、GEP100 の機能解析

①血管新生における Arf6、AMAP1、GEP100 の関与に関して、*in vitro* における血管内皮細胞の管腔形成を指標に、siRNA 法を用いて蛋白質発現を抑制することで検討した。*In vivo* assay 系においては、血管内皮増殖因子 (VEGF) あるいは癌細胞をマトリゲルと共にマウスの皮下に埋め込み、マトリゲル内に新生した血管を血管内皮細胞特異的マーカーで評価を行った。VEGF や腫瘍によって誘導される血管新生に、GEP100 が関与していることを *in vivo* においても明らかにするために、siRNA をコラーゲンと共にマウスに投与し、siRNA が生体で効率良くデリバリーされる系を用いて検討を行った。

② VEGF/VEGFR-2 のシグナルにおける Arf6、AMAP1、GEP100 の作用機序に関して、VEGF 刺激による Arf6 活性、抗体を用いた生化学的解析及びペプチドを用いた結合実験により、VEGF 刺激による GEP100-Arf6-AMAP1 シグナルの活性化機序、VEGFR-2 との複合体形成及び結合部位の解析を行った。

(2) 臨床標本を用いた妥当性の検討

炎症などの異常な血管新生誘導を伴うサンプルを用いて、AMAP1 及び GEP100 の発現の病理学的解析を行い、創薬標的として意義があるか否かの妥当性の検討を行った。

(3) 血管新生に必要な蛋白質複合体の構造解析と創薬分子標的の提示

VEGF/VEGFR-2 シグナルにおける GEP100 の結合に関して、GEP100 の PH ドメインの構造解析を行うと共に、VEGFR-2 と GEP100 の

結合を阻害する化合物の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 血管新生における Arf6, AMAP1, GEP100 の機能解析

ヒト血管内皮細胞において、VEGF 刺激により Arf6 が活性化されること、Arf6 の活性化は GEP100 を介していることを明らかにした。さらに、VEGF 刺激によってチロシンリン酸化される VEGFR-2 の 951 番目のリン酸化チロシンを介して GEP100-Arf6-AMAP1 シグナルが活性化されることを見いだした。GEP100、Arf6、AMAP1 各々の発現抑制及び AMAP1 と cortactin の結合を特異的に阻害する P4-TAT ペプチドは、血管内皮細胞の *in vitro* の tubular formation 及び、マウス個体を用いた *in vivo* angiogenesis を阻害する知見を得た。GEP100 siRNA の投与実験においても *in vivo* angiogenesis が阻害された。以上のことから、GEP100-Arf6-AMAP1-cortactin シグナルは癌細胞の浸潤・転移だけでなく、血管新生にも関わる共通のシグナルであることが明らかとなった。

(2) 臨床標本を用いた妥当性の検討

血管新生が過剰に生じている皮膚の炎症サンプルにおいて、AMAP1 及び GEP100 は CD31 陽性の血管内皮細胞に発現していることを確認した。また、乳癌の再発症例の組織切片を用いた病理学的解析から、GEP100 は、乳癌の悪性度と相関のある HER2 陽性組織において発現が高い結果が得られた。これらの結果は、GEP100-Arf6-AMAP1 シグナルが創薬標的としての可能性があることを示唆している。

(3) 血管新生に必要な蛋白質複合体の構造解析と創薬分子標的の提示

GEP100 は PH ドメインを介して、リン酸化 EGFR 及びリン酸化 VEGFR2 と複合体を形成する。Oxford 大学との共同研究により、GEP100 の PH ドメインの構造解析を行った。また、Grb2 の結合を阻害する低分子化合物 TB03 は、GEP100 と EGFR 及び GEP100 と VEGFR2 の結合を阻害した。このことは、TB03 が癌浸潤と血管新生を阻害するリード化合物の可能性を示唆しており、構造解析の結果と合わせて阻害剤の開発に貢献出来る知見が得られた。

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 3 件)

- ① Sabe, H., Hashimoto, S., Morishige, M., Hashimoto, A., Ogawa, E., Nam, J.M, Miura, K., Yano, H., and Onodera, Y. (2009) The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. *Traffic* 10, 982-993. 査読有
- ② Sabe, H., Hashimoto, S., Morishige, M., Hashimoto, A., and Ogawa, E. (2008) The EGFR-GEP100-Arf6 pathway in breast cancer: Full invasiveness is not from the inside. *Cell Adhesion & Migration*. 103:7036-7041. 査読有
- ③ 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, Y., Wada, H., Kobayashi, H., and *Sabe, H. (2008) GEP100 links EGFR signaling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. *Nat Cell Biol*. 10:85-92. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 橋本 あり TGFβ1 activates GEP100-Arf6-AMAP1 pathway to induce EMT, and possible relationship of this activation to cancer stemness 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 8 日 ポスター発表 神戸
- ② 橋本 あり HGFR-mediated activation of GEP100-Arf6-AMAP1 pathway is an integral part for TGFβ-induced cancerous EMT and invasiveness 2010 年 9 月 23 日 口頭発表 大阪
- ③ 橋本 あり GEP100-Arf6-AMAP1 pathway is activated by VEGFR2 and promotes vascular remodeling and VE-cadherin endocytosis in endothelial cells 第 62 回日本細胞生物学会大会 2010 年 5 月 19 日 ポスター発表 大阪
- ④ 橋本 あり 腫瘍血管における透過性亢進に関与する分子輸送のメカニズム及び病態の解明 細胞内ロジスティクス斑会議 2009 年 11 月 11 日 口頭発表 沖縄
- ⑤ 橋本 あり GEP100-Arf6-AMAP1-cortactin シグナル経

路は癌浸潤と血管新生に共通である
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12日 シンポジウム
口頭発表 神戸

⑥ 橋本 あり Common usage of the
GEP100-Arf6-AMAP1 pathway in tumor
invasion, angiogenesis and vascular
permeability 第67回日本癌学会学術総会
2008年10月30日 ワークショップ
口頭発表 名古屋

⑦ 橋本 あり Common usage of the
GEP100-Arf6-AMAP1 pathway in tumor
invasion, angiogenesis and vascular
permeability 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』 2
008年10月22日ポスター発表 ジュ
ネーブ・スイス

⑧ 橋本 あり Common usage of the
GEP100-Arf6 signaling pathway in tumor
invasion, angiogenesis, and vascular
permeability Second JCA-AACR Special
Joint Conference 2008年7月15日ポ
スター発表 淡路

⑨ 橋本 あり Common usage of an
Arf6-GEP100 signaling pathway in
angiogenesis and tumor invasion 2008
年7月1日 ワークショップ 口頭発表
横浜

[図書] (計1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.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 あり (HASHIMOTO ARI)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：60390803

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：

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の共同研
究。

② GEP100 の立体構造解析及び低分子化合
物の解析について、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。