

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791015

研究課題名 (和文) 神経膠芽腫の浸潤能獲得における増殖因子を介した Arf6 活性機構の解析

研究課題名 (英文) Requirement for Arf6 activities in Growth Factor induced Glioblastoma invasion

研究代表者

森重 真毅 (MORISHIGE MASAKI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60381050

研究成果の概要 (和文)：脳腫瘍において、臨床的に悪性度を規定しているものは、その浸潤能にある。そこで、浸潤過程のできるだけ根幹を成す分子の候補として、分子量 G 蛋白質である Arf6 の解析を分子生物学的手法により検証した。Arf6 及び制御分子の蛋白質の発現は、神経膠芽腫細胞株の In vitro での浸潤活性と相関することを確認した。Arf6 及び Arf6 制御因子に対する siRNA によって神経膠芽腫細胞株での浸潤能は抑制され、AMAP1 の相互作用のインターフェースに作用する peptide 及び低分子化合物によっても神経膠芽腫細胞株の浸潤能は抑制された。臨床検体での免疫染色における検討を行ったところ、Arf6 及び Arf6 制御因子のなかで、免疫染色が可能であった AMAP1 は神経膠芽腫にも発現されていることが確認された。さらに腫瘍細胞が正常脳へ浸潤していく局面で高発現されている傾向が観察された。また、再構成系を用いた免疫沈降法などで Arf6 活性の上流因子として EGFR の関連が示唆されており、約 40-50% に増幅や過剰発現が観察されている神経膠芽腫において非常に興味ある知見といえる。従って、上記研究結果より Arf6 を介した分子メカニズムは神経膠芽腫の浸潤局面においても特異的に機能している可能性が高いと考えられ、神経膠芽腫に対する治療としての新たな分子標的となりうることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Glioblastoma multiforme (GBM) is the most invasive form in gliomas and extremely refractory to therapy. Invasive phenotypes are considered to be a principal factor of poor prognosis. An investigation of the molecules regulating invasion will thus contribute to the GBM treatment. We have previously shown that Arf6 plays an important role in the invasive activities of human breast cancer, and also AMAP1, an effector of GTP-Arf6, is involved in the invasive mechanism by binding Cortactin and Paxillin in breast cancer. We here found that AMAP1 is highly expressed in primary human gliomas, and blockage this complex formation, by using of cell-permeable proline peptide derived from the AMAP1 inhibits GBM invasion in vitro. Our results indicate that Arf6 and its regulator are the major components of cancer invasive activities, and propose novel pharmaceutical targets for prevention GBM invasion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科

キーワード：脳腫瘍 浸潤 分子標的

1. 研究開始当初の背景

全脳腫瘍中、約1/4を占めるのが神経膠腫 (Glioma)であり、この中で最も悪性度が高いのが神経膠芽腫 (Glioblastoma)である。様々な外科的治療、化学療法、放射線療法等が試みられているがなお著名な治療成績の向上に至っていない原因の一つとして、その浸潤能が挙げられる。癌細胞浸潤には様々な分子が関与し、複雑な機構を必要とするが、できるだけ根幹を成し、浸潤に特異的に関与する分子メカニズムを解析する事は、今後脳腫瘍の治療を発展させていく上で効果的かつ必須と考えられる。浸潤を標的とした抗癌剤の開発は盛んになりつつあるが、現行の化学療法において、脳腫瘍に用いられているほとんどの薬剤は細胞周期を標的とし増殖能を抑制するものであり、浸潤を標的とした薬剤は研究段階である。

申請者が共同研究を行っている(財)大阪バイオサイエンス研究所・分子生物学部門は、低分子量Gタンパク質Arf6 (ADP-ribosylation factor 6)の活性が、乳癌細胞の運動・浸潤活性に重要な役割を担うことを報告している。申請者らは、Arf6に対してGAP活性を持つ ArfGAPタンパク質であるAMAP1がCortactin、

Paxillin分子と三者複合体を形成して癌浸潤の先端部位である浸潤仮足 (invadopodia)に局在しており、AMAP1の発現が乳癌の浸潤能と相関するという結果を報告した。さらに、このAMAP1・Cortactin・Paxillin分子の結合を阻害する事で乳癌細胞の浸潤・転移が抑制される知見も得られている。

申請者は、これまでに神経膠芽腫由来の細胞株において、Arf6及びArf6を制御する分子の蛋白質発現の検討を行ったところ、神経膠芽腫由来の細胞株でも、報告のある乳癌細胞株と同様に、Arf6蛋白質の発現が浸潤性と相関して上昇していることを見いだしており、Arf6が神経膠芽腫の浸潤においても特異的に機能している可能性が高いと考えられる。そこでArf6及びArf6の活性制御に関わる分子が神経膠芽腫の浸潤能獲得における基本分子メカニズムであるかの詳細な解析を行い、癌浸潤を標的とした新たな分子標的となり得るかの基礎的知見を得るため、本申請に至った。

2. 研究の目的

Arf6は、その他の低分子量Gタンパク質と同様に、GEF (guanine-nucleotide exchange

factor)によってGTP結合型に、GAP(GTPase activating protein)によりGDP型に変換される。申請者らは、乳癌細胞において、Arf6に対してGAP活性を持つAMAP1が癌浸潤の先端部位である浸潤仮足に局在し、AMAP1の発現が乳癌の浸潤能と相関するという結果を報告した。そこで、これらのArf6及びAMAP1が神経膠芽腫においても同様に癌細胞浸潤の局面において特異的に機能しているかを分子生物学的手法により検証する。

さらに、AMAP1はCortactin、Paxillin分子と三者複合体を形成し、浸潤性獲得に関与しているが、これら分子の結合を阻害する事で乳癌細胞の浸潤が抑制される知見も得られている。これら分子の阻害が神経膠芽腫において臨床応用できる可能性があるか否かの基礎的知見をin vitro及びin vivoの解析により提示する。

一般的に増殖因子等の細胞外からの刺激に対し、receptorなどの膜貫通蛋白質を介して細胞内にシグナル伝達されるが、上記のGEFやGAPは一定の条件下で膜貫通蛋白と結合し低分子量G蛋白質の活性化に与ることが多いとされている。Arf6活性に関与が示唆されている因子の中で特にEGFRは神経膠芽腫においても高率に過剰発現が認められており、Arf6と増殖因子の関連性の検討も同時に行う。EGFRの過剰発現は主にsecondary glioblastomaに認められており、既知の遺伝子異常との関連を検討することで、テーラーメイド医療につながる可能性を持つ。

### 3. 研究の方法

Arf6及びArf6制御因子に対するsiRNAを神経膠芽腫細胞株に導入し発現を抑制させた場合の、in vitroでの浸潤能(Matrigel透過性)・接着能・運動能の詳細な評価、及びArf6制御分子であるAMAP1の相互作用のインターフェースに作用するpeptide及び低分子

化合物の効果として浸潤能を評価した。さらに、臨床検体での免疫染色における検討を行った

### 4. 研究成果

Arf6及び制御分子の蛋白質の発現は、神経膠芽腫細胞株のIn vitroでの浸潤活性と相関することを確認した。Arf6及びArf6制御因子に対するsiRNAによって神経膠での浸潤能(Matrigel透過性)は抑制され、接着能・運動能には影響を与えなかった。AMAP1の相互作用のインターフェースに作用するpeptide及び低分子化合物によっても神経膠芽腫細胞株の浸潤能は抑制された。

免疫染色における検討ではArf6及びArf6制御因子のなかで、免疫染色が可能であったAMAP1は神経膠芽腫にも発現されていることが確認された。さらに腫瘍細胞が正常脳へ浸潤していく局面で高発現されている傾向が観察された。

従って、Arf6を介した分子メカニズムはGlioblastomaの浸潤においても特異的に機能している可能性が高く、新たな分子標的となりうることが示唆された。

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 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 JM, Miura K, Yano H, Onodera Y.

Traffic. 2009 Aug;10(8):982-93. 2009

- ② The EGFR-GEP100-Arf6 pathway in breast cancer: Full invasiveness is not from the inside.

Sabe H, Hashimoto S, Morishige M, Hashimoto A, Ogawa E

Cell Adhesion & Migration. 2008; 2(2): 1-3.

- ③ 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

橋本茂、森重真毅、小川栄治、橋本あり、小野寺康仁、佐邊壽孝

実験医学 増刊 シグナル伝達研究 2008; 26(15) 49-55

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[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:

6. 研究組織

(1)研究代表者

森重 真毅 (MORISHIGE MASAKI)

大分大学・医学部脳神経外科・助教

研究者番号: 60381050