

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：32607
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659101
 研究課題名（和文） ARF6による神経細胞移動とがん細胞浸潤の制御機構の共通性と特異性の解明
 研究課題名（英文） Common and distinct mechanisms for ARF6-mediated neuronal migration and cancer invasion
 研究代表者
 阪上 洋行（SAKAGAMI HIROYUKI）
 北里大学・医学部・教授
 研究者番号：90261528

研究成果の概要（和文）：

ADP リボシル化因子6 (ARF6)は、小胞輸送やアクチン細胞骨格制御を介して、がん細胞の浸潤・転移に深く関与する。本研究は、神経発生過程での神経細胞移動における ARF6 経路の機能関与の可能性と分子機構の解明を通して、細胞の運動制御機構の共通性と特異性の解明を目指した。研究成果として ARF6 の下流効果分子のひとつであるホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ γ が、新たな神経細胞移動の制御分子であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

ADP ribosylation factor is a small GTPase that regulate membrane traffic and actin remodeling through the activation of lipid modifying enzymes and recruitment of various interacting proteins such as FIP3/4 and JIP3/4. Recent evidence indicates the functional importance of ARF6 pathways in cell motility such as cancer invasion and metastasis. The aim of this study is to test the possibility whether the ARF6 pathway may be involved in neuronal migration during cortical layer formation. We found that type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase γ (PIP5KI γ), a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂)-synthesizing enzyme that functions as a downstream effector of Arf6, is required for neuronal migration possibly through recruitment of adhesion components to the plasma membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：神経細胞、がん細胞、アクチン骨格、小胞輸送、運動性、低分子量 GTP 結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

細胞の運動性は、細胞骨格系のみならず

リン脂質や細胞接着装置構成タンパク質などの細胞膜への極性輸送などによる細胞膜成分の動的な変化により厳密に制御されている。大脳皮質の発達過程において、脳室帯の神経上皮細胞は最終細胞分裂した後、細胞間接着を消失させて移動を開始する。脳室帯より脳室下帯に移動した神経細胞は、多極性から先導突起と尾突起を持った双極性細胞へと形態変化を遂げて、放射状グリアの線維に沿って軟膜側へ放射状に移動して最終目的地となる層へ移動する。この一連の神経細胞移動の過程には、「接着性の変化」「形態変化」「運動性の獲得」が含まれ、上皮間葉移行やがん細胞の浸潤・転移の過程と高い類似性を示す。大脳皮質の神経移動の障害は、滑脳症や帯状異所性灰白質などの脳奇形やてんかん、精神遅滞などの神経発達障害を引き起こすことより、その移動の分子機構の解明は非常に重要な研究テーマである。

ADP リボシル化因子 6 (ARF6) は、細胞膜とエンドゾーム間の小胞輸送や細胞膜直下のアクチン細胞骨格の再構築に関わる ras スーパーファミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク質のひとつである。1996 年に野生型 ARF6 を発現させた培養細胞がフッ化アルミニウム刺激により細胞突起を形成することより、Rho ファミリーとともに新たな細胞形態制御因子として発見され、2004 年には佐邊や D' Souza-Schorey らのグループにより ARF6 のがん細胞における浸潤・転移能を制御することが報告され、細胞移動の新たな制御因子として脚光を浴びている。ARF6 は GDP 型から GTP 型に変換されて活性化し、種々の下流効果分子との相互作用を介して細胞応答する。近年、ARF6 の下流効果分子として、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP₂) の合成酵素であるタイプ I ホスファチジルイノシトール-4-リン酸-5-キナーゼ (PIP5KI) の活性化やクラスリンアダプターの AP-2、Rab11-interacting protein 3/4 (FIP3/4)、JNK-interacting protein 3/4 (JIP3/4) などが明らかになっている。

2. 研究の目的

本研究では、がん細胞の浸潤・転移などの運動性と大脳皮質形成過程における神経細胞移動の類似性に着目し、ARF6 経路の神経細胞移動における機能関与の可能性を検討し、ARF6 による神経細胞とがん細胞の両現象の分子機構の共通性と特異性を明らかにすることを目的とする。本報告書では、研究を完遂された ARF6 の下流効果分子として知られているホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP₂) の合成酵素であるタイプ I ホスファチジルイノシトール-4-リン酸-5-キナーゼ γ アイソフォーム (PIP5KI γ) の神経移動への機能関与に関する研究成果について記載する。

3. 研究の方法

3-1. *in situ* ハイブリダイゼーション法：マウス脳切片に対して、PIP5KI γ の翻訳部領域を鋳型として作成したジゴキシゲン標識プローブを用いた非放射性 *in situ* ハイブリダイゼーション法を施行した。

3-2. 免疫組織化学：PIP5KI γ_{i1} の C 末端領域 513-635 アミノ酸部位を大腸菌で発現させ、家兎に免疫を行い採血した。PIP5KI γ 特異抗体は、抗血清より抗原を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。常法に従い免疫組織化学法を施行した。

3-3. RT-PCR：PIP5KI γ のスプアリスバリアントに共通の PCR プライマー（センス 5' -AAG GAG GAG GGT GCA GGA GTG GAG GTC-3' , アンチセンス 5' -TCC GTC AGT GGG GAG GGA GAG AAC AAG-3'）を用いて胎生 17.5 日齢、生直後、生後 7 週齢の大脳由来の cDNA ライブラリーを用いて PCR 法を施行した。

3-4. 子宮内電気穿孔法：発生過程の ICR 胎児マウスの脳室上皮層に、PIP5KI γ に対する RNA 干渉ベクターおよび不活性型 PIP5KI γ 変異遺伝子を GFP 遺伝子とともに子宮内電気穿孔法により遺伝子導入を行った。その後、経時的にマウス脳を固

定し、抗 GFP 抗体により遺伝子導入細胞を免疫組織学的に染色し、大脳皮質層での移動状況を計測した。

4. 研究成果

本研究では、ARF6 の下流効果分子としてホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸の合成酵素である PIP5KI γ に関する研究成果を記載する。PIP5KI γ の大脳皮質の層形成過程における遺伝子発現様式を RT-PCR 法により検討した結果、PIP5KI γ_{v2} と PIP5KI γ_{v3} に対応する 2 本のバンドが胎生 17.5 日齢の大脳皮質において増幅された。2 つのバリエーションは発達過程での異なる発現様式を示し、PIP5KI γ_{v2} は生後発達とともに著明に増加するのに対して、PIP5KI γ_{v3} は発達過程を通じて一定の発現量を維持した。次に、胎生 16.5 日齢の大脳皮質における PIP5KI γ の遺伝子発現様式を、非放射性 *in situ* ハイブリダイゼーション法により検討した結果、PIP5KI γ は脳室帯において既に微弱ながら遺伝子発現が検出され、脳室下帯、中間層、皮質板において順に発現量の増加を示した。さらに PIP5KI γ 特異抗体を用いて免疫組織学的に発現局在を検討した結果、PIP5KI γ の発現を示す免疫陽性反応は、胎児期の大脳皮質において、脳室上皮細胞、放射状グリア、移動中の神経細胞、分化した神経細胞のいずれの細胞においても検出された。さらに移動中の神経細胞における細胞内局在を種々の細胞内マーカーとの二重染色法で検討した結果、PIP5KI γ の免疫陽性反応は細胞質や細胞膜直下に点状に分布し、早期エンドゾームのマーカーである EEA1、リサイクリングエンドゾームのマーカーである syntaxin12、細胞接着斑の構成分子である focal adhesion kinase や talin との免疫反応と一部共存することより、PIP5KI γ は細胞内輸送小胞や接着斑などの種々の細胞内区画に局在することが明らかになった。

PIP5KI γ の大脳皮質層構築過程での神経細胞移動への機能関与を明らかにするために、子宮内穿孔法を用いて、胎生 14,5 日齢

のマウス脳室帯に神経上皮細胞に PIP5KI γ に対する RNA 干渉ベクター (shPIP5KI γ) と EGFP 遺伝子を導入し、生直後のマウスの大脳皮質の層構築を検討した。その結果、コントロールベクターの導入された神経細胞の大部分は、脳室層より放射状移動を行い、大脳皮質の表層の II-IV 層を形成しているのに対して、shPIP5KI γ を導入された神経細胞は、コントロールに比較して中間帯や大脳皮質深層の V-VI 層に停滞しており、PIP5KI γ の発現抑制により、神経細胞移動が著明な遅延することが明らかになった (図 1)。PIP5KI γ の発現抑制による神経細胞移動の障害は、RNA 干渉に抵抗性の遺伝子変異を施した野生型 PIP5KI γ 遺伝子の導入により部分的に正常化することが確認されることより、PIP5KI γ の発現抑制特異的な所見であることが示唆された。

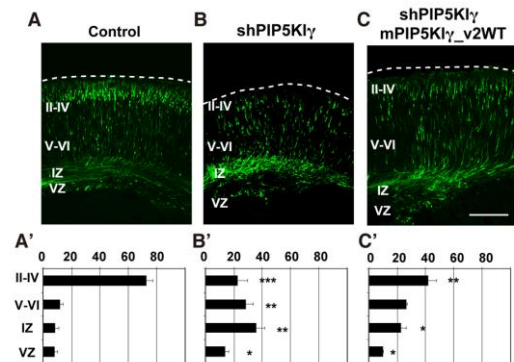


図 1 PIP5KI γ 発現抑制による大脳皮質神経細胞移動の障害
胎生 14.5 日齢の脳室帯神経上皮細胞に GFP 遺伝子とともにコントロールベクター (A)、PIP5KI γ に対する RNA 干渉ベクター (shPIP5KI γ) (B) および、shPIP5KI γ と RNA 干渉抵抗性変異導入野生型 PIP5KI γ 遺伝子 (mPIP5KI γ_{v2WT}) (C) を子宮内穿孔法により導入し、生直後における大脳皮質での GFP 遺伝子導入細胞を分布を示した。B' ではコントロールに対して、C' では PIP5KI γ 発現抑制した場合とを t-test により検定した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0001$ IZ, 中間帯; VZ, 脳室帯。スケールは 200 μm を示す。

さらに、shPIP5KI γ 導入された移動中の神経細胞において、細胞接着斑の構成分子である focal adhesion kinase や talin がコントロールに比較して、細胞質に瀰漫性に分布し、細胞膜への局在が障害されていることが免疫組織学的に明らかになった。以上の結果より、ARF6 の下流効果分子のひとつである PIP5KI γ が大脳皮質の神経細胞移動に必須であること、さらに移動中の神経細胞において接着斑の構成分子である focal adhesion kinase や talin の細胞膜への局在を制御していることを明らかにした。

近年、PIP5KI γ はがん細胞の浸潤・転移に制御分子であることが報告されており (Sun et al., 2010)、がん細胞と神経細胞の運動性の共通制御分子として機能してい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 16 件) すべて査読有

- (1) Hara Y, Fukaya M, Tamaki H, Sakagami H. Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase γ is required for neuronal migration in the mouse developing cerebral cortex. *Eur. J. Neurosci.* (2013) in press.
- (2) Ueda T, Hanai A, Takei T, Kubo K, Ohgi M, Sakagami H, Takahashi S, Shin HW, Nakayama K. EFA6 activates Arf6 and participates in its targeting to the Flemming body during cytokinesis. *FEBS Lett.* S0014- 5793(13)00298-6 (2013) in press.
- (3) Sakagami H, Katsumata O, Hara Y, Tamaki H, Watanabe M, Harvey RJ, Fukaya M. Distinct synaptic localization patterns of brefeldin A-resistant guanine nucleotide exchange factors BRAG2 and BRAG3 in the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 521: 860-876 (2013)
- (4) Song N, Nakagawa S, Izumi T, Toda H, Kato A, Boku S, Inoue T, Sakagami H, Li X, Koyama T. Involvement of CaMKIV in neurogenic effect with chronic fluoxetine treatment. *Int J Neuropsychopharmacol.* 16(4):803-812 (2013)
- (5) Tamaki H, Sanda M, Katsumata O, Hara Y, Fukaya M, Sakagami H. Pilt is a coiled-coil domain-containing protein that localizes at the trans-Golgi complex and regulates its structure. *FEBS Lett.*, 586:3064-3070 (2012)
- (6) Pan YW, Zou J, Wang W, Sakagami H, Garelick MG, Abel G, Kuo CT, Storm DR, Xia Z. Inducible and Conditional Deletion of Extracellular Signal-regulated Kinase 5 Disrupts Adult Hippocampal Neurogenesis. *J Biol Chem.* 287(28):23306-23317 (2012)
- (7) Nakata Y, Yasuda T, Fukaya M, Yamamori S, Itakura M, Nihira T, Hayakawa H, Kawanami A, Kataoka M, Nagai M, Sakagami H, Takahashi M, Mizuno Y, Mochizuki H. Accumulation of α -synuclein triggered by presynaptic dysfunction. *J. Neurosci.* 32: 17186-17196 (2012)
- (8) Minamino T, Ito Y, Ohkubo H, Hosono K, Suzuki T, Sato T, Ae T, Shibuya A, Sakagami H, Narumiya S, Koizumi W, Majima M. Thromboxane A(2) receptor signaling promotes liver tissue repair after toxic injury through the enhancement of macrophage recruitment. *Toxicol Appl Pharmacol.* 259: 104-114 (2012)
- (9) Katoh H, Yamashita K, Waraya M, Margalit O, Ooki A, Tamaki H, Sakagami H, Kokubo K, Sidransky D, Watanabe M. Epigenetic silencing of HOPX promotes cancer progression in colorectal cancer. *Neoplasia* 14:559-571 (2012)
- (10) Fukaya M, Kamata A, Hara Y, Tamaki H, Katsumata O, Ito N, Takeda S, Hata Y, Suzuki T, Watanabe M, Harvey RJ, Sakagami H. SynArfGEF is a guanine nucleotide exchange factor for Arf6 and localizes preferentially at post-synaptic specialization of inhibitory synapses. *J. Neurochem.* 116:1122-1137, 2011.
- (11) Kato T, Ito Y, Hosono K, Suzuki T, Tamaki H, Minamino T, Kato S, Sakagami H, Shibuya M, Majima M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling promotes liver repair through restoration of liver microvasculature after acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 120:218-229, 2011.
- (12) Hosono K, Suzuki T, Tamaki H, Sakagami H, Hayashi I, Narumiya S, Alitalo K,

- Majima M, Roles of prostaglandin E2-EP3/EP4 receptor signaling in the enhancement of lymphangiogenesis during fibroblast growth factor-2-induced granulation formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31:1049-1058, 2011.
- (13) Yamamori S, Itakura M, Sugaya D, Katsumata O, Sakagami H, Takahashi M. Differential expression of SNAP-25 family proteins in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 519:916-932, 2011.
- (14) Nishimaru H, Sakagami H, Kakizaki M, Yanagawa Y. Locomotor-related activity of GABAergic interneurons localized in the ventrolateral region in the isolated spinal cord of neonatal mice. *J Neurophysiol.* 106 :1782- 1792 (2011)
- (15) Isono M, Suzuki T, Hosono K, Hayashi I, Sakagami H, Uematsu S, Akira S, DeClerck YA, Okamoto H, Majima M. Microsomal prostaglandin E synthase-1 enhances bone cancer growth and bone cancer-related pain behaviors in mice. *Life Sci.* 88:693-700, 2011.
- (16) Takaso M, Nakazawa T, Imura T, Fukushima K, Ueno M, Saito W, Shintani R, Sakagami H, Takahashi K, Yamazaki M, Ohtori S, Kotani T, Less invasive and less technically demanding decompressive procedure for lumbar spinal stenosis - appropriate for general orthopaedic surgeons? *International Orthopaedics* 35: 67-73, 2011.
- [学会発表] (計 15 件)
- ① 原芳伸、深谷昌弘、玉木英明、阪上洋行 Expression and functional roles of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5K) γ in the developing cerebral cortex. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2013 年 3 月 28 日～30 日 香川
- ② 深谷昌弘、阪上洋行 Splice variant-dependent subcellular localization of the Arf6 activator BRAG2 in the adult mouse brain 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2013 年 3 月 28 日～30 日 香川
- ③ 矢崎佑紀、原芳伸、深谷昌弘、阪上洋行 Arf6 の下流効果分子 Rab11-FIP3/Arfophilin-1 の神経細胞の樹状突起における役割 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2013 年 3 月 28 日～30 日 香川
- ④ 深谷昌弘、原芳伸、阪上洋行 ARF6 活性化制御因子 BRAG2/IQSEC1 のスプライスバリエント依存的なシナプス局在 第 35 回日本神経科学学会 2012 年 9 月 18 日～21 日 名古屋
- ⑤ 福島大輔、深谷昌弘、阪上洋行 成熟マウス脳における EFA6A とおよびその結合分子 SNX1 の細胞内局在解析 第 35 回日本神経科学学会 2012 年 9 月 18 日～21 日 名古屋
- ⑥ 原芳伸、阪上洋行 Expression and functional roles of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5K) γ in the developing cerebral cortex. 第 8 回欧州神経科学学会 (FENS) 2012 年 7 月 14 日～18 日 スペイン
- ⑦ 阪上洋行、原芳伸、深谷昌弘 DISTINCT LOCALIZATION OF THE BRAG/IQSEC FAMILY OF GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTORS FOR ARF6 IN THE MOUSE RETINA 第 8 回欧州神経科学学会 (FENS) 2012 年 7 月 14 日～18 日 スペイン
- ⑧ 福島大輔、深谷昌弘、阪上洋行 成熟マウス脳における Arf6 活性化制御因子 EFA6A の細胞内局在解析 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2012 年 3 月 28 日 山梨
- ⑨ 深谷昌弘、原芳伸、阪上洋行 成体マウス脳における ARF6 活性化因子 BRAG2/IQSEC1 の細胞内局在解析 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2012 年 3 月 28 日 山梨
- ⑩ 玉木英明、阪上洋行 マウス小脳プルキンエ細胞の生後発生過程におけるゴルジ装置の動態 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2012 年 3 月 27 日 山梨

- ⑪ 原芳伸、阪上洋行 大脳皮質層形成におけるホスファチジルイノシトール4-リン酸5キナーゼの機能解析 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会 2012年3月26日 山梨
- ⑫ 原芳伸、西村伸彦、深谷昌弘、玉木英明、阪上洋行 大脳皮質形成におけるホスファチジルイノシトール4-リン酸5キナーゼの機能解析 第99回日本解剖学関東支部学術集会 2011年10月15日 千葉
- ⑬ 福島大輔、深谷昌弘、阪上洋行 中枢神経系における ARF6 活性化制御因子 EFA6A の細胞内局在解析 第99回日本解剖学関東支部学術集会 2011年10月15日 千葉
- ⑭ 深谷昌弘、原芳伸、阪上洋行 成熟期マウス脳における BRAG2/GEP100 の細胞内局在解析 第34回日本神経科学会 2011年9月17日 横浜
- ⑮ 原芳伸、西村伸彦、阪上洋行 大脳皮質層形成における PIP5Kgamma の発現機能解析 第34回日本神経科学会 2011年9月15日 横浜

[その他]

ホームページ等

北里大学医学部解剖学教室ホームページ

<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/~sakagami/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪上 洋行 (SAKAGAMI HIROYUKI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90261528

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし