

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860206

研究課題名(和文)病的な血管新生を選択的に制御する低分子量G蛋白質Arf6シグナル伝達系の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of small GTPase Arf6 in pathological angiogenesis

研究代表者

本宮 綱記 (Hongu, Tsunaki)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：30628920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析から、低分子量G蛋白質Arf6が血管内皮細胞において腫瘍血管形成を制御することを明らかにした。また、Arf6は血管内皮細胞において、肝細胞増殖因子(HGF)依存的なbeta1インテグリンのリサイクリングを制御することを示した。さらに、HGFシグナルにおいて、Arf6を活性化する因子としてArf6 GEFであるGrp1を同定し、Grp1-Arf6シグナルを薬剤により阻害することで腫瘍血管新生を抑制できることを示した。以上のことから、本研究によってArf6シグナル伝達系を新規血管新生阻害剤の標的として利用し得る可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that Arf6 regulates tumor neoangiogenesis induced by hepatocyte growth factor (HGF), but not other angiogenic factors, by utilizing endothelial cell-specific Arf6 conditional knockout mice. In Arf6 deficient endothelial cells, HGF-stimulated beta1 integrin recycling was abolished, resulting in inhibition of spreading, migration and focal adhesion formation. This function of Arf6 was regulated by its guanine nucleotide exchange factor Grp1. Finally, the pharmacological inhibition of Grp1-Arf6 axis efficiently suppressed tumor vascularization. Taken together, our findings shed the light on the mechanism of angiogenesis regulated by HGF, and provide evidence for an important role of Arf6 in tumor vascularization.

研究分野：腫瘍血管新生

キーワード：腫瘍血管新生 Arf6

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 1971年に Folkman によって提唱された「腫瘍血管新生の抑制による腫瘍への兵糧攻め」の概念が確立されたことにより、血管新生メカニズムの解明は近年精力的に展開されてきている。特に、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は、腫瘍血管新生において極めて重要な分子であり、これまでにスニチニブやベバシツマブなどの VEGF シグナル阻害剤が多数開発され、抗癌剤として臨床応用が成されている。しかし、VEGF は病的な血管新生だけでなく、生理的な血管新生においても重要であるため、近年の臨床的な知見から、これらの薬剤が生理的な血管新生を阻害することによって種々の副作用が生じることが報告されてきている。したがって、より安全な治療を行うためには、生理的な血管新生に対する影響が少なく、病的な血管新生に対する高い選択性を有する血管新生阻害剤を開発することが必要である。

(2) 低分子量 G 蛋白質 ADP-ribosylation factor 6 (Arf6) は、細胞膜やエンドソームに局在し、アクチン細胞骨格の再構成や、様々な受容体・接着分子のエンドサイトーシス、リサイクリングなどの細胞内小胞輸送を制御する分子である。これまでに当研究グループは、Arf6 を血管内皮細胞特異的にノックアウトしたマウス (EC-Arf6 cKO マウス) を作製して *in vivo* における Arf6 の機能解析を進めた結果、このマウスは胎仔発生期の血管新生には影響が観察されないにも関わらず、成体における腫瘍血管新生は著しく抑制されることを見出した。すなわち、Arf6 は生理的な血管新生には関与しておらず、病的な血管新生において選択性をもって機能する分子であると推察される。したがって、血管新生におけるこのような Arf6 の機能的特徴を解析し、Arf6 を介するシグナル伝達経路が明らかになれば、生理的および病的な血管新生における血管新生メカニズムの違いを理解でき、病的な血管新生を選択的に阻害する安全な血管新生阻害剤の開発に繋がるとの着想に至った。

## 2. 研究の目的

血管新生における、上述のような Arf6 の機能的特徴から、Arf6 を介するシグナル伝達経路は、病的な血管新生を阻害するための選択性をもった薬剤標的となり得る。そこで本研究では、病的な血管新生における Arf6 の役割および Arf6 を介するシグナル伝達機構の解明し、病的な血管新生を選択的に阻害する新たな血管新生抑制剤の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 生理的および病的な血管新生において Arf6 の機能的選択性が発生するメカニズムの解析

生理的および病的な血管新生においては、異なる血管新生誘導因子が機能することが知られている。そこで、種々の血管新生誘導因子のうち、血管新生において Arf6 が重要な役割を果たす血管新生因子を、*in vitro* チューブ形成アッセイおよび大動脈リングアッセイにより同定した。

### (2) 血管内皮細胞における Arf6 の機能解析

血管新生が誘導される際に、Arf6 がどのような細胞機能を担っているのかを、Arf6 KO 血管内皮細胞を用いた細胞遊走アッセイ、細胞接着アッセイ、細胞染色等の細胞生物学の実験および分子生物学の実験により明らかにした。

### (3) 血管新生における Arf6 シグナル伝達系の分子機能メカニズムの解析

血管新生において、Arf6 を活性化する分子メカニズムを細胞生物学の実験および分子生物学の実験により明らかにした。Arf6 の活性化に寄与するとされる計 7 種類のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) のうち、特に Grp1 に着目し、間接蛍光抗体法による細胞内局在解析および shRNA を用いたノックダウン法による分子機能解析を行った。

### (4) Arf6 シグナル伝達系の阻害による腫瘍血管新生の抑制

Arf6 シグナル伝達系を阻害する薬剤をマウスに投与し、腫瘍血管新生および腫瘍の増大が抑制されるか否かを検討した。

## 4. 研究成果

(1) 胎仔の血管新生においては、VEGF や塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) によって誘導される血管新生が非常に重要である。しかし、腫瘍は VEGF や bFGF に加えて肝細胞増殖因子 (HGF) などの様々な血管誘導因子を放出し、腫瘍血管新生を誘導することが知られている。我々は Arf6 KO 血管内皮細胞を用いて、これらの血管誘導因子に対する血管新生能を解析したところ、チューブ形成実験や大動脈リングアッセイなどの *in vitro* 血管新生実験において、Arf6 の欠損は特に HGF 依存的な血管新生を顕著に抑制することが明らかとなった。すなわち、血管内皮細胞の Arf6 は、HGF によって誘導される血管新生において機能しており、そのため EC-Arf6 cKO マウスでは、胎仔血管新生に大きな影響が観察されないものの、腫瘍血管新生は顕著に抑制されたと推察される。

(2)  $\beta 1$  インテグリンは、細胞と細胞外マトリックスの接着を仲介する重要な接着分子であり、腫瘍血管新生において血管内皮細胞の遊走に極めて重要な役割を果たしている。これまでに Arf6 は  $\beta 1$  インテグリンの細胞内小胞輸送に関与することが報告されている。

そこで、 $\beta 1$  インテグリンの細胞膜へのリサイクリングを測定したところ、*Arf6* KO 血管内皮細胞では HGF 依存的な  $\beta 1$  インテグリンの細胞膜へのリサイクリングがほぼ完全に抑制されていた。一方 *Arf6* KO 血管内皮細胞では、 $\beta 1$  インテグリンのエンドサイトーシスは抑制されていなかった。 $\beta 1$  インテグリンのリサイクリングが抑制された結果、*Arf6* KO 血管内皮細胞では、HGF によって誘導される接着斑の形成が阻害されており、血管内皮細胞の遊走も抑えられていた。VEGF 刺激によっても  $\beta 1$  インテグリンはエンドソームから細胞膜へリサイクリングされるが、興味深いことに、*Arf6* KO 血管内皮細胞では VEGF 依存的な  $\beta 1$  インテグリンのリサイクリングは阻害されなかった。このことは、VEGF シグナルと HGF シグナルでは  $\beta 1$  インテグリンのリサイクリングシステムが異なっていることを示唆しており、*Arf6* は HGF シグナルが誘導するリサイクリングシステムにおいて重要であると考えられる。

(3) *Arf6* が  $\beta 1$  インテグリンのリサイクリングを駆動するためには、刺激に伴って *Arf6* が活性化されることが必要である。そこで活性化型 *Arf6* に特異的に結合するペプチドである LZII を用いたプルダウン実験によって *Arf6* の活性を検討したところ、HGF 刺激によって血管内皮細胞の *Arf6* は顕著に活性化された。このことは、HGF シグナルの下流で *Arf6* GEF が機能していることを意味している。現在 *Arf6* の GEF は EFA6 ファミリー、BRAG ファミリー、cytohesin ファミリーの 3 つのファミリーに分類されており、計 7 種類の *Arf6* GEF が同定されている。そのうち、cytohesin ファミリーに属する *Arf6* GEF である Grp1 の局在を解析したところ、細胞内において内在性 Grp1 は  $\beta 1$  インテグリンを含む細胞内小胞に局在しており、Grp1 のノックダウンにより、HGF 依存的な  $\beta 1$  インテグリンのリサイクリングは顕著に抑制された。また、cytohesin 阻害剤である SecinH3 で細胞を処理した際には、HGF 依存的な *Arf6* の活性化は有意に抑制され、 $\beta 1$  インテグリンのリサイクリングも阻害された。これらのことから、Grp1-*Arf6* シグナル伝達は HGF 依存的な  $\beta 1$  インテグリンのリサイクリングを制御することが明らかとなった。

(4) そこで最後に、cytohesin 阻害剤 SecinH3 が血管新生を阻害するかどうかを、大動脈リングアッセイにより検討したところ、SecinH3 添加群では HGF 依存的な血管新生が有意に抑制された。また、B16 メラノーマ細胞およびルイス肺癌細胞を移植したマウスにおいて、SecinH3 の投与が腫瘍の増大および腫瘍血管新生に与える影響を解析した結果、SecinH3 を投与したマウスでは、コントロール群と比較して腫瘍の増大が有意に抑制され、腫瘍血管新生が阻害されていた。

以上のことから、血管内皮細胞において Grp1-*Arf6* シグナルは HGF 依存的な  $\beta 1$  インテグリンのリサイクリングを制御する重要なシグナル伝達系として位置づけることができ、このシグナルを抑制することによって腫瘍血管新生を抑制することが可能であると考えられる。この結果は、*Arf6* シグナル伝達系が血管新生阻害剤の新たな創薬標的として位置づけられることを示している。

## 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 4 件)

Teng S, Stegner D, Chen Q, Hongu T, Hasegawa H, Chen L, Kanaho Y, Nieswandt B, Frohman MA, Huang P. Phospholipase D1 facilitates second-phase myoblast fusion and skeletal muscle regeneration. *Mol Biol Cell*, Vol 26, 506-517, 2015. 査読：有  
DOI:10.1091/mbc.E14-03-0802.

本宮綱記、金保安則. 新たな抗がん剤創薬標的としての低分子量 G 蛋白質 *Arf6*. *ファルマシア* (日本薬学会) 51 巻、310-314、2015. 査読：無

Akiyama M\*, Hasegawa H\*, Hongu T\*, Frohman MA, Harada A, Sakagami H, Kanaho Y. Trans-regulation of oligodendrocyte myelination by neurons through small GTPase *Arf6*-regulated secretion of fibroblast growth factor-2. *Nat Commun*. Vol 5, 4744, 2014. 査読：有  
\*These authors equally contributed to this work.  
DOI:10.1038/ncomms5744.

本宮綱記、金保安則. ホスホリパーゼ D の多彩な生理機能と癌における役割. *医学のあゆみ*, 248 巻、1091-1096、2014. 査読：無

[学会発表](計 1 件)

本宮綱記、佐藤隆信、船越祐司、金保安則. 好中球における活性酸素産生および酵素放出の分子メカニズム解析：ホスホリパーゼ D は必要か？ *日本脂質生化学会*、2014 年 6 月 6 日、近畿大学、大阪.

[図書](計 2 件)

本宮綱記、金保安則. LIFE-SCIENCE INFORMATION CENTER、疾患モデルの作製と利用 脂質代謝異常と関連疾患 (下巻) 2015、p283-292

Tsunaki Hongu and Yasunori Kanaho. Springer,

Phospholipases in Health and Disease, 2014,  
p343-358

6 . 研究組織

(1)研究代表者

本宮 綱記 (HONGU, TSUNAKI)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：30628920