

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02503

研究課題名(和文) 新規抗癌剤開発に向けた腫瘍血管新生・癌転移阻害ペプチドの創成

研究課題名(英文) Development of peptides inhibiting tumor angiogenesis and metastasis to develop novel anti-cancer drug

研究代表者

金保 安則 (Kanaho, Yasunori)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：00214437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Arf6をターゲットとした革新的抗癌剤開発のためのリードペプチドを創出することを目指し、次の結果を得た。Arf6に特異的なGTPase-activating proteinのARAP3はArf6の不活性化を介して浸潤仮足を制御すること、及びリンパ管内皮細胞のArf6は、腫瘍増殖を制御することを明らかにし、Arf6は腫瘍増殖と癌細胞浸潤・転移の両者を制御することが検証できた。そこで、約35アミノ酸残基からなるペプチドライブラリーを用いてArf6阻害ペプチドを探索した結果、Arf6を特異的に阻害する1つのペプチドを見出し、抗癌剤開発へと繋がる創薬リードペプチドの創出に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this project, it was confirmed that the small G protein Arf6 positively regulates both tumor growth and invasion of cancer cells, and screened peptides inhibiting Arf6 activation to develop a novel anti-cancer drug. It was found that Arf6-specific GTPase-activating protein ARAP3 regulates invadopodia formation through inactivation of Arf6 in cancer cells, and that Arf6 expressed in lymphatic endothelial cells regulates tumor growth. These results demonstrate that Arf6 regulates both tumor growth and invasion/metastasis of cancer cells, and indicate that Arf6 is a candidate for developing a novel anti-cancer drug. When peptides inhibiting Arf6 activation were screened using the peptide library with about 35 amino acid residues, one peptide specifically inhibited Arf6 activation. Thus, a drug lead peptide for a novel anti-cancer drug development was successfully found.

研究分野：細胞生物学

キーワード：癌 腫瘍増殖 腫瘍血管新生 浸潤・転移 シグナル伝達 抗癌剤 低分子量G蛋白質 Arf6

1. 研究開始当初の背景

低分子量G蛋白質スーパーファミリーは、機能面の類似性に基づいてRas、Rho、Rab、Ran、Arfファミリーの5つのファミリーに分類されており、ArfファミリーにはArf1~6の6種類のアイソフォームが存在する。Arf1~5は、小胞体とゴルジ体の間の膜輸送を制御している。一方、Arf6は、細胞膜やエンドソームに存在し、アクチン細胞骨格の再構築を制御することが知られていたが、Arf6の生理機能に関する知見は極めて少なかった。このような状況下、研究代表者は、Arf6が、多彩な機能を有する細胞膜構成微量リン脂質ホスファチジルイノシトール4,5-ニリン酸〔PI(4,5)P₂〕を産生するリン脂質キナーゼのホスファチジルイノシトール4-リン酸5-キナーゼ (PIP5K) を活性化して細胞運動に不可欠な細胞膜構造体のラッフル膜を形成するという、極めて新規なArf6を介するシグナル伝達機構とその生理機能を発見した。この発見に端を発して、細胞レベルでArf6の機能解析が世界的に展開され、その結果、「Arf6は細胞膜ダイナミクスに基づいたエンドサイトーシスやエキソサイトーシス、細胞膜蛋白質リサイクリング、細胞膜形態変化を制御する極めて重要な生命素子である」という定説が確立された。

このように、当初は細胞レベルでのArf6の機能は解明されつつあったが、個体レベルにおけるArf6の生理機能や病態への関わりについては全く不明であった。この問題の解決に向けて、研究代表者は世界に先駆けて各種臓器、細胞種に特異的なArf6コンディショナルKOマウスを作製してArf6の生理機能と病態への関わりについての解析を開始した。その過程で、血管内皮細胞特異的なArf6コンディショナルKO (Arf6 cKO) マウスを作製し、本マウスに癌細胞を移植して固形腫瘍を形成させると、腫瘍血管新生が阻害されて腫瘍増殖が抑制されることを発見した。この結果は、「Arf6を介するシグナル伝達系が新規抗癌剤開発のターゲットになり得る」ことを示唆している。

しかしながら、腫瘍血管新生を阻害することによって腫瘍増殖を抑制しても癌患者の予後は改善されないことが報告された。すなわち、腫瘍血管新生が阻害されると、癌細胞は抵抗性を獲得して転移能が亢進するため、腫瘍血管新生を阻害しても癌患者の予後は改善されない。この知見は、腫瘍血管新生と癌細胞転移の両方を同時に阻害しない限り、効果的な癌治療は期待できないことを意味している。研究代表者は、Arf6は癌細胞にも発現しており、癌細胞転移も制御していることを確認している (投稿準備中)。このことと、上記のArf6が腫瘍増殖を制御している知見を合わせると、Arf6を介するシグナル伝達系は革新的抗癌剤の開発のターゲットとなり得る。

2. 研究の目的

上述した学術的背景を踏まえると、腫瘍血管新生と癌細胞転移を制御する共通のArf6シグナル伝達分子機構を明らかにすれば、その共通分子機構をターゲットとして腫瘍増殖と癌細胞転移の両者を同時に抑制できる革新的抗癌剤を開発できると確信し、本研究計画に至った。本研究の狙いである1種類の抗癌剤で腫瘍増殖と癌細胞転移を抑制できれば1種類の抗癌剤の適用で癌治療を行うことが可能になり、それぞれの現象を抑制する2種類の抗癌剤を適用するよりも患者のストレスが激減して、副作用も相乗的に軽減できる可能性が高く、患者にとってのメリットは非常に大きい。以上を踏まえて、腫瘍増殖と癌細胞転移を制御するArf6を介するシグナル伝達機構の分子機構を解析することを目的とした。

創薬開発においては、これまで低分子化合物ライブラリーを用いた開発がほとんどであったが、多くの創薬リード低分子化合物は開発段階でドロップアウトしている。これは、低分子化合物はターゲットタンパク質との相互作用領域が小さいため、in vivoでは特異性が低く、副作用が出やすいことに起因する。そこで本研究では、ターゲットタンパク質との相互作用領域が比較的大きいので特異性が高く、副作用が少ないと期待されるペプチドに焦点を当てて、創薬研究を推進する。

3. 研究の方法

(1) 癌細胞浸潤に關与するArf6特異的なGTPase-activating protein (Arf6 GAP) の同定と癌細胞浸潤の分子メカニズムの解析

低浸潤性乳癌細胞株MCF7細胞と高浸潤性乳癌細胞株MDA-MB-231細胞を利用し、ノックダウン手法を駆使して細胞生物学的及び分子生物学的解析により癌細胞浸潤・転移に關与するArf6 GAPを同定する。さらには、同様の手法を用いて、Arf6 GAPが制御する癌細胞浸潤の分子メカニズムを解析した。

(2) 腫瘍リンパ管形成におけるArf6の機能解析

リンパ管内皮細胞特異的なArf6 cKOマウスを作製してB16メラノーマがん細胞をマウスに移植し、腫瘍リンパ管新生を組織染色により解析した。同時に、形成された腫瘍のサイズを測定し、Arf6の腫瘍増殖に対する役割を解析した。

(3) Arf6活性化を阻害する創薬リードペプチドの探索

Arf6活性化を阻害する創薬リードペプチドの創出は、以下のアッセイ方法を用いた。Arf6に特異的に結合するペプチドの探索は、 α -ヘリックス立体構造を固定化した約35アミノ酸残基からなるデノボペプチドのフェージ表層提示ライブラリーを用いて、エライザーアッセイ法にてクラスIとクラスIIのArfファミリーメンバーであるArf1とArf3には

結合せずに、クラスIIIのArf6に特異的に結合するペプチドの探索を行った。Arf6の活性化を阻害するペプチドの解析は、大腸菌に発現させたArf6とguanine nucleotide exchange factor (GEF)であるARNOのSec7領域ペプチド、及びGTP-BODIPYをインキュベートし、ARNO-Sec7の作用によりGTP-BODIPYがArf6に結合してArf6が活性化されると発光する蛍光を阻害するペプチドを探索した。

4. 研究成果

(1) 癌細胞浸潤に関するArf6 GAPの同定と癌細胞浸潤の分子メカニズム解析

これまでに報告されている9種のArf6 GAPの発現量を高浸潤性乳癌細胞株MDA-MB-231細胞と低浸潤性乳癌細胞株MCF7細胞で比較すると、ARAP3のみがMDA-MB-231細胞に高発現していた。この結果から、ARAP3が癌細胞の浸潤・転移に関与している可能性が高い。そこで、ARAP3をノックダウンしたMDA-MB-231細胞をマウス尾静脈から注入して肺への転移を解析したところ、ARAP3ノックダウンにより肺転移が抑制された(図1)。また、in vitroでの浸潤解

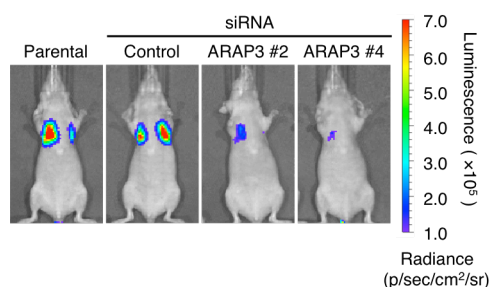


図1 Arf6 GAP ARAP3のノックダウンによる肺転移の抑制

析においても、ARAP3ノックダウンによりMDA-MB-231細胞の浸潤が抑制されることを確認した。これらの結果から、ARAP3は癌細胞浸潤能を正に制御することが結論づけられる。さらに、ARAP3ノックダウンによりMDA-MB-231細胞における上皮増殖因子(EGF)刺激依存的な浸潤仮足形成が顕著に抑制されることを明らかにした。

先行研究において、上皮増殖因子受容体(EGFR)が細胞内輸送を介して浸潤仮足形成部位に集積することが浸潤仮足形成に重要であることが報告されている。ARAP3をノックダウンしたMDA-MB-231細胞をEGFで刺激すると、エンドソームにEGFRの異常な蓄積が見られ、EGFRの細胞膜へのリサイクリングは阻害された。このことから、ARAP3はエンドソームから浸潤仮足形成部位へのEGFRのリサイクリングを正に制御し、浸潤仮足形成を促進することが示唆された。

ARAP3によるEGFRのリサイクリング分子メカニズムを解明するため、エンドソームの縊り取りを促進してエンドソームの細胞膜へのリサイクリングを誘導するEHD1に着目した。ARAP3をノックダウンした

MDA-MB-231細胞においては、EGFR陽性エンドソームへのEHD1のリクルートが阻害された。さらに詳細な解析により、ARAP3はEGFR陽性エンドソームにおいてArf6を不活性化してArf6下流分子PIP5KのアイソザイムであるPIP5K1AによるPI(4,5)P₂産生を負に制御することによりEHD1をエンドソーム膜にリクルートすることが明らかとなった。

以上のように、Arf6が癌細胞の浸潤・転移に重要な役割を果たしていることを検証した。以前、研究代表者は、Arf6は腫瘍血管新生に極めて重要な因子であり、腫瘍増殖を正に制御することを報告している。このことと、本研究の結果から、Arf6は腫瘍増殖と癌細胞転移の両者を制御しており、革新的な抗癌剤開発のターゲットとなりうることを示唆している。

(2) 腫瘍リンパ管形成におけるArf6の機能解析

B16メラノーマ癌細胞をマウスに移植して固形腫瘍を形成させると、LEC-Arf6 cKOマウスにおいては、腫瘍リンパ管新生が阻害されて腫瘍増殖が遅延することが明らかになった(図2)。この知見から、リンパ管内

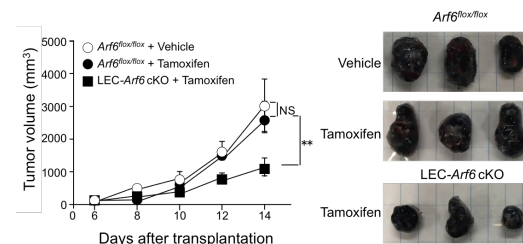


図2 リンパ管内皮細胞のArf6ノックダウンによる腫瘍増殖の抑制

皮細胞のArf6も腫瘍増殖を正に制御していると結論づけられる。また、腫瘍リンパ管新生は癌細胞の転移に必要な現象であることから、リンパ管内皮細胞に発現しているArf6の活性化を阻害すれば、がん細胞の転移も抑制できる可能性が考えられ、Arf6をターゲットとした抗癌剤は非常に効果的であることが期待される。

(3) Arf6の活性化を阻害する創薬リードペプチドの創出

上述の「方法の項」に記載した手法に従って、Arf6に特異的に結合するペプチドの探索を行った。その結果、Arf6に特異的に結合する29種類のペプチドを同定した。

次いで、これらのペプチドのうち、どのペプチドがArf6の活性化を阻害するかを「研究の方法」の項に記載した手法に従って検討した。その結果、上述のArf6に特異的に結合する29種類のペプチドのうち、1種類のペプチドがArf6の活性化を約50%抑制し、その他のArfアイソザイムの活性のペプチドによる阻害は非常に軽微であった(図3)。このよう

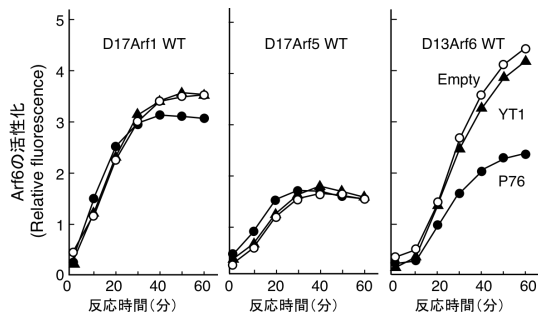


図3 ペプチドP76はArf6の活性化を特異的に抑制する

に、本研究において、腫瘍増殖と癌細胞の浸潤・転移の両方に重要な役割を果たしているArf6の活性化を特異的に阻害する創薬リードペプチドの創出に成功した。

このペプチドが結合するArf6のドメインを決定するため、非標識の本ペプチドと $^{15}\text{N}^2\text{H}^{13}\text{C}$ 標識したArf6を用いてNMR法にて解析した。その結果、Arf6疎水残基に由来する一部のアミノ酸の化学シフトにおいて、ペプチドの濃度依存的にシグナルの消失・移動が観察された。この結果から、本ペプチドは疎水結合を介してArf6と結合していると推察される。現在、Arf6の本ペプチドとの結合ドメインを決定するためにアミノ酸残基の帰属を解析している。また、ペプチドの末端に9個のアルギニン残基を付加した細胞膜透過性ペプチドを作製中である。

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 9件)

1. Miura Y, Kanaho Y. ACAP3, the GTPase-activating protein specific to the small GTPase Arf6, regulates neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Biochem Biophys Res Commun.* 493, 1089-1094 (2017)、査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.076
2. Lin YC, Ohbayashi N, Hongu T, Katagiri N, Funakoshi Y, Lee H, Kanaho Y. Arf6 in lymphatic endothelial cells regulates lymphangiogenesis by controlling directional cell migration. *Sci Rep.* 7, 11431 (2017)、査読有 doi: 10.1038/s41598-017-11240-x
3. Tsai MT, Katagiri N, Ohbayashi N, Iwasaki K, Ohkohchi N, Ding ST, Kanaho Y, Funakoshi Y. Regulation of HGF-induced hepatocyte proliferation by the small GTPase Arf6 through the PIP2-producing enzyme PIP5K1A. *Sci Rep.* 7, 9438 (2017)、査読有

doi: 10.1038/s41598-017-09633-z

4. Miura Y, Ngo Thai Bich V, Furuya M, Hasegawa H, Takahashi S, Katagiri N, Hongu T, Funakoshi Y, Ohbayashi N, Kanaho Y. The small G protein Arf6 expressed in keratinocytes by HGF stimulation is a regulator for skin wound healing. *Sci Rep.* 7, 46649 (2017)、査読有 doi: 10.1038/srep46649
 5. Yamauchi Y, Miura Y, Kanaho Y. Machineries regulating the activity of the small GTPase Arf6 in cancer cells are potential targets for developing innovative anti-cancer drugs. *Adv Biol Regul.* 63, 115-121 (2017)、査読有 doi: 10.1016/j.jbior.2016.10.004
 6. Miura Y, Hongu T, Yamauchi Y, Funakoshi Y, Katagiri N, Ohbayashi N, Kanaho Y. ACAP3 regulates neurite outgrowth through its GAP activity specific to Arf6 in mouse hippocampal neurons. *Biochem J.* 473, 2591-602 (2016)、査読有 doi: 10.1042/BCJ20160183
 7. Hongu T, Yamauchi Y, Funakoshi Y, Katagiri N, Ohbayashi N, Kanaho Y. Pathological functions of the small GTPase Arf6 in cancer progression: tumor angiogenesis and metastasis. *Small GTPases.* 7, 47-53 (2016)、査読有 doi: 10.1080/21541248.2016
 8. Mukai H, Muramatsu A, Mashud R, Kubouchi K, Tsujimoto S, Hongu T, Kanaho Y, Tsubaki M, Nishida S, Shioi G, Danno S, Mehruba M, Satoh R, Sugiura R. PKN3 is the major regulator of angiogenesis and tumor metastasis in mice. *Sci Rep.* 6, 18979 (2016)、査読有 doi: 10.1038/srep18979
 9. Huang Y, Joshi S, Xiang B, Kanaho Y, Li Z, Bouchard BA, Moncman CL, Whiteheart SW. ADP-ribosylation factor 6 (Arf6) controls platelet spreading and clot retraction by affecting integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ trafficking. *Blood.* 127, 1459-67 (2016)、査読有 doi: 10.1182/blood-2015-05-648550
- [学会発表] (計 8件)
1. Kanaho Y. Pathological function of Arf6 in cancer progression. 57th International Symposium on "Biological Regulation and Enzyme Activity in Normal and Neoplastic Tissues". 2016. 10.3-4. University of Bologna, Italy
 2. 山内庸平 他：癌細胞浸潤におけるArf6 GTPase活性化因子ARAP3の機能解析。

- 第89回日本生化学会大会 2016. 9.25-27.
仙台
3. Lin Y-C, et al. The function of the small GTPases Arf6 in lymphangiogenesis. Tsukuba Global Science Week 2016, 2016.9. 17-19. Tsukuba, Japan
 4. Miura Y, et al. ACAP3 regulates neurite outgrowth through its GAP activity specific to Arf6 in mouse hippocampal neurons, Tsukuba Global Science Week, 2016. 9.17-19. Tsukuba, Japan
 5. Yamauchi Y, et al. Inactivation of the small GTPase Arf6 by the Arf6 GAP ARAP3 is critical for breast cancer cell invasion and metastasis. FASEB 2016 Science Research Conferences. 2016. 7.31-8.5. Colorado, U.S.A.
 6. Yamauchi Y, et al. The Arf6 GTPase activating protein ARAP3 regulates breast cancer cell invasion. The 9th KOREA-JAPAN Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, 2016. 7.21-22. Seoul, Korea
 7. Miura Y, et al. Functional analysis of the small GTPase ADP-ribosylation factor 6 (Arf6) in skin wound healing, 15th Life Science Research meeting, 2016. 6.24-25. Tokyo, Japan
 8. 山内庸平 他：癌細胞浸潤におけるArf6 GTPase活性化因子ARAP3の機能解析. 第68回日本細胞生物学会大会 2016. 6.15-17. 京都

[図書] (計 0件)
該当なし

[その他]

ホームページ：

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/biochem/kanaholab/Member.html>

総説

1. 本宮綱記、金保安則：低分子量Gタンパク質Arf6の個体における多彩な生理機能. 生化学 88, 78-85 (2016)
2. 秋山雅博、金保安則：低分子量G蛋白質Arf6の髓鞘形成における役割. 医学のあゆみ 256, 255-256 (2016)
3. Ohbayashi N, Fukuda M, Kanaho Y: Rab32 subfamily small GTPases: pleiotropic Rabs in endosomal trafficking. *J Biochem.* 162, 65-71 (2017)
doi: 10.1093/jb/mvx027

6. 研究組織

(1)研究代表者

金保 安則 (KANAHO, Yasunori)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：00214437

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

藤井 郁男 (FUJII, Ikuo)

大阪府立大学・理学系研究科・教授

研究者番号：70189984

北 将樹 (KITA, Masaki)

筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号：30335012

(4)研究協力者

船越 裕司 (FUNAKOSHI, Yuji)

山内 庸平 (YAMAUCHI, Yohei)

三浦 悠樹 (MIURA, Yuki)

宮地 泰人 (MIYACHI, Taito)

Lin, Yueh-Chen

Ngo Thai Bich, Van

Tsai, Meng-Tsz

藤原 大祐 (FUJIWARA, Daisuke)

Akindele, Tito

米田 耕三 (YONEDA, kozou)

山岸 航大 (YAMAGISHI, kota)