

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570192

研究課題名（和文） 上皮組織の再構成における Arf6 活性微細制御機構の解析

研究課題名（英文） Analyses of the fine-tuning mechanism of Arf6 activity on reorganization of epithelial organ

研究代表者

矢野 元 (YANO HAJIME)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00284414

研究成果の概要（和文）：

Arf6 は上皮がん細胞浸潤機構における責任因子であることが先に提唱されている。今般、神経膠腫細胞浸潤において、その上流因子としてコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの一つである NG2 が機能している可能性が示された。加えて、ナトリウムイオン / プロトン交換輸送体 1 (NHE-1) が担うシグナルが並立して機能しており、両シグナルの阻害により相加的な神経膠腫浸潤抑制が可能であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

Arf6 was previously proposed to be critical for epithelial cancer invasion. In this study, possible participation of one of the chondroitin sulfate proteoglycan NG2 at the upstream of Arf6 in glioma invasion was presented. Moreover, a signal mediated by sodium ion / proton exchanger 1 (NHE-1) was found to play a pivotal role in glioma cell invasion, independently of the Arf6 signal. These results implicate simultaneous inhibition of the both signals as effective therapeutic protocol for anti-invasion therapy of glioma.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：分子細胞生理学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：Arf6, 神経膠腫浸潤、浸潤抑制剤、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン NG2

1. 研究開始当初の背景

Arf6 は細胞内膜系と形質膜の間の小胞輸送を制御する低分子量 G タンパク質の一つである。研究開始当初すでに、本因子およびその担うシグナルが上皮がん浸潤において中心的役割を果たしていることが判明していた。このことは本因子の上皮組織形成における機能に起因していると考えられた。研究代表者は Arf6 の微細活性制御機構の存在を

見出していたことから、この制御機構が上皮組織の形成・再構成において果たす意義を、正常上皮と上皮がんの比較において解明することを企図した。

2. 研究の目的

Arf6 の主たる活性制御機構は GEF や GAP を介するものと考えられる。一方で代表者は、ユビキチン化を介した Arf6

不応化のメカニズムを見出しており、このメカニズムが上皮がんにおいて失調している事を示した。このことは、上皮がん浸潤においては **Arf6** 活性の微細な制御が重要であることを示している。本研究においては、**Arf6** 活性微細制御機構がどのようにがん浸潤に寄与するかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題採択と前後して、研究代表者が異動したため、方法については当初のものからの修正を余儀なくされたが、研究課題の目的との整合性に留意して研究を遂行した。解析対象は神経膠腫とした。本疾患は脳腫瘍の中でも極めて難治性で、その浸潤性が脅威の中核をなす。

神経膠腫細胞を数種準備し、(1) 浸潤様式の検討、(2) **Arf6** 発現レベル、(3) **Arf6** ノックダウンによる浸潤活性の変化、(4) **Arf6** シグナルの上流因子の検索、(5) **Arf6** シグナルの寄与で説明不可能な浸潤活性の責任因子の検索、および当該分子を標的とした浸潤抑制の可否について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 多様な浸潤様式の発見

上皮がん細胞浸潤と比して、神経膠腫浸潤がどのような特徴を持つか、マトリゲルチャンパー法を用いて検討した。本法においては、がん浸潤誘引する誘引物質を自由に選択できる。上皮がんモデルとして調べた限りの乳がん細胞においては、誘引物質非存在下では有意な浸潤は観察されていない(データ非表示)。準備した複数の神経膠腫細胞の浸潤においても同様か否か、血清を誘引物質として検討したところ、図 1 に示すとおり、浸潤の特徴として少なくとも三群に分類された。

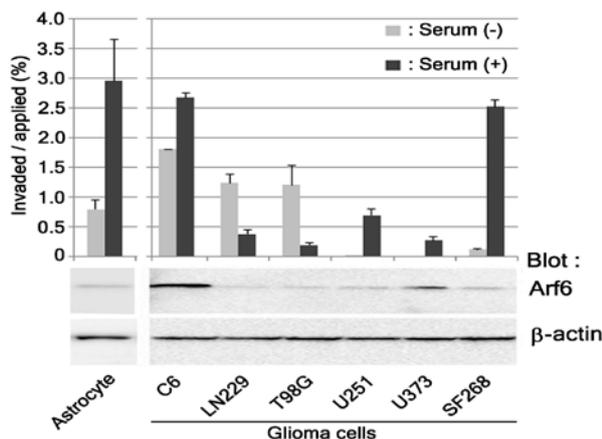


図 1 アストロサイト及び神経膠腫細胞浸潤における血清依存性および **Arf6** 発現

血清 (10%) 存在下 (黒いバー) および非存在下 (灰色のバー) における浸潤活性を、測定系に添加した細胞数のうち浸潤した細胞の割合として示している。**Arf6** 発現はイムのプロットングにより検討している。

すなわち、i) 血清に高依存性 (ヒト神経膠芽腫細胞 U251, U373, SF268)、ii) 血清に中程度依存性 (ラット初代培養正常アストロサイト、ラット神経膠腫細胞 C6)、および iii) 血清が抑制的 (ヒト神経膠芽腫細胞 LN229, T98G) である細胞群である。アストロサイトは神経膠腫が由来する細胞の一つと考えられているため、ラット初代培養正常アストロサイトを対照として用いた。特徴的であったのは iii) の群である。たとえば従来 T98G 細胞に関して、血清非存在下においても高い浸潤活性を示すことは報告があるが、血清が抑制的であるという報告は見ない。こうした特徴的な浸潤を起こす分子メカニズムが他の浸潤とどのように異なりどのように相同であるのかを知ることは、治療をデザインする上で重要であると考えられた。

(2) 神経膠腫浸潤と **Arf6** 発現

図 1 に示すとおり、神経膠腫細胞群における **Arf6** 発現と浸潤活性の相関を検討した。浸潤に対して **Arf6** が強く寄与する細胞の例が確認された (C6 細胞) 反面、弱い寄与しか見出されない細胞例が多く見出され、先に示された乳がんモデルとは異なり、浸潤に対する普遍的な責任因子とは言えないことが判明した。C6 細胞浸潤における **Arf6** の寄与を **Arf6** ノックダウン下における浸潤活性測定により検討した (図 2)。

Arf6 ノックダウンによりたしかに C6 細胞の浸潤性は抑制され、**Arf6** の寄与が明らかとなった。しかしながら、先に示された乳がんモデルにおける知見と異なり、抑制の程度が低く、神経膠腫細胞浸潤における **Arf6** の寄与は乳がん細胞浸潤に比べて低いことが示唆された。

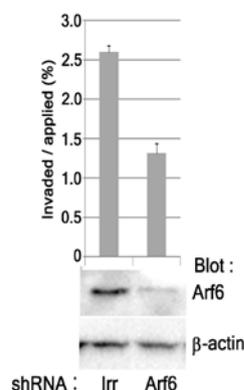


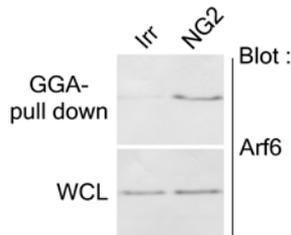
図 2 **Arf6** ノックダウン下における C6 細胞浸潤活性の測定

浸潤活性の測定は図 1 と同様の手法で行った。**Arf6** ノックダウンをイムプロットングにより確認している。Irr: 陰性対照 shRNA

(3) **Arf6** シグナル制御における上流因子の検索

C6 細胞においては、ある種のグリア細胞等に特異的に発現するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンである NG2 が強発現している。本分子が **Arf6** 上流因子として機能している新たな可能性が示された。これは並行して行っていた NG2 の機能解析から判明した。C6 細胞において恒常的 NG2 ノックダウンを行うと、増殖性や運動性が低下した。

とともに 94 % にもおよぶ浸潤性の抑制が観察された (データ非表示)。このとき NG2 ノックダウン C6 細胞においてどのような変化が起こったことがこの強い浸潤性の抑制をもたらしたかを検索したところ、① 浸潤の足場となると考えられる細胞膜上の仮足構造 (Pseudopodia) の減少、② 細胞間接着の増加に加え、以下に示す Arf6 活性の上昇を観察した。



NG2 が Arf6 シグナルの上流に位置し、Arf6 活性の抑制に寄与するものである可能性が高い。

図 3 NG2 ノックダウンに伴う Arf6 活性の上昇

GGA-プルダウン法を用いて細胞総抽出液中の GTP 結合型 (活性型) Arf6 を検出した。Irr: 陰性対照 shRNA 導入 C6 細胞; NG2: NG2 shRNA 導入 C6 細胞 NG2 ノックダウン C6 細胞において、陰性対照に比して多量の GTP 型 Arf6 を検出した。

この結果から、考える NG2 の機能としては、Arf6 GEF に対する抑制的意義、あるいは GAP に対する促進的意義が挙げられる。この点に関して、現在解析を継続中である。

(3) より普遍的な神経膠腫浸潤責任因子の検索

浸潤の特徴の異なる神経膠腫細胞群において、共通に機能している浸潤シグナルを検索し、ナトリウムイオン / プロトン交換輸送体 1 (NHE-1) シグナル系を見出した。以下の図 4 に示すとおり、NHE-1 は神経膠腫細胞において、mRNA、タンパク質いずれのレベルに置いても発現が亢進している。

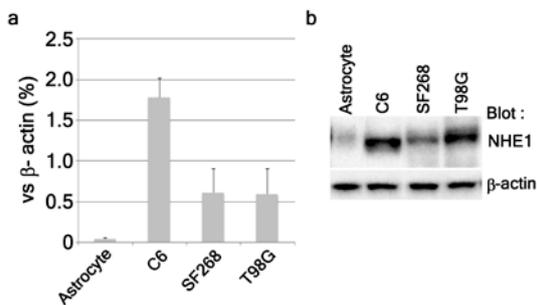
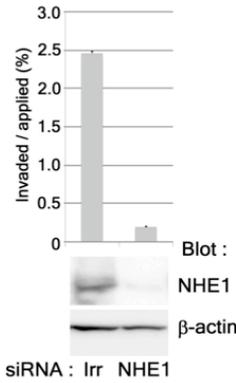


図 4 神経膠腫細胞における NHE-1 の発現亢進

a 定量的リアルタイム RT-PCR 法による NHE-1 mRNA 量の測定。表示はβアクチン量に対する比としている。b イムノブロットによる NHE-1 タンパク質量の比較。a, b いずれも初代培養アストロサイトを対照としている。

この発現亢進が浸潤性と相関するの否かを査定するために、NHE-1 ノックダウン下における浸潤性を測定した。SF268 細胞を用い、



siRNA によって NHE-1 をノックダウンした状態で浸潤性測定を行ったところ、約 90% におよぶ抑制効果を認めた (図 5) ことから、神経膠腫細胞において発現亢進している NHE-1 が浸潤性に強く寄与することが示された。

図 5 NHE1 ノックダウン下における浸潤性測定

SF268 細胞において、NHE-1 siRNA によって NHE-1 発現を抑制した状態で図 1 と同様の浸潤性測定をおこなった。Irr: 陰性対照 siRNA

重要なことに、本シグナル系は Arf6 シグナル系の寄与が少ないと見られる神経膠腫細胞 (SF268, T98G 細胞) の浸潤においても機能しており、より普遍的な神経膠腫細胞浸潤シグナルであると考えられた。

NHE-1 が神経膠腫浸潤に寄与することが明らかとなったことから、阻害剤による浸潤抑制の可否を検討した。図 6 に示すとおり、浸潤の特徴が異なる三種の神経膠腫細胞いずれにおいても NHE-1 阻害剤である 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (EIPA) が有意な浸潤抑制効果を示した。

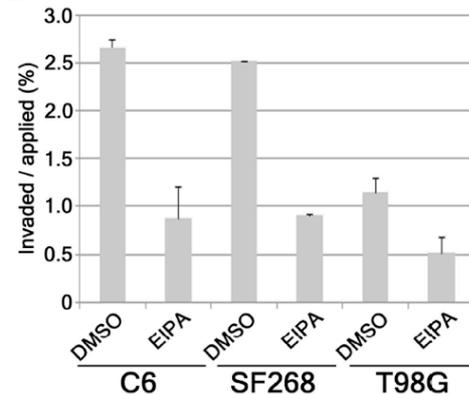


図 6 EIPA 存在下における浸潤性測定

図 1 と同様の浸潤性測定系に追いで、下部チャンパーに EIPA 25 μM を添加した状態で浸潤性測定を行った。なお、T98G に関してのみ、誘引物質としての 10% 血清添加を行っていない。Dimethyl sulfoxide (DMSO) を EIPA の溶媒として用いているので、対照として DMSO を下部チャンパーに添加した。

このことは、NHE-1 を標的とすることによる、より普遍的な神経膠腫浸潤抑制治療の可能性を示したものと考えられ、基礎生物学的のみならず臨床医学的にも重要な知見である。現在果たしてこの効果が、*in vivo* でも得られるか、動物実験による検討を進めている。

(4) NHE-1 阻害剤 EIPA の作用機作の検討

EIPA による浸潤性阻害がそのような作用機作で起こっているのか、検討を試みた。その結果、EIPA 処理は神経膠腫細胞に対して、① アクチン細胞骨格再構成の阻害、② NHE-1 細胞内局在の変化をもたらしていることが判明した (図 7, 8)。

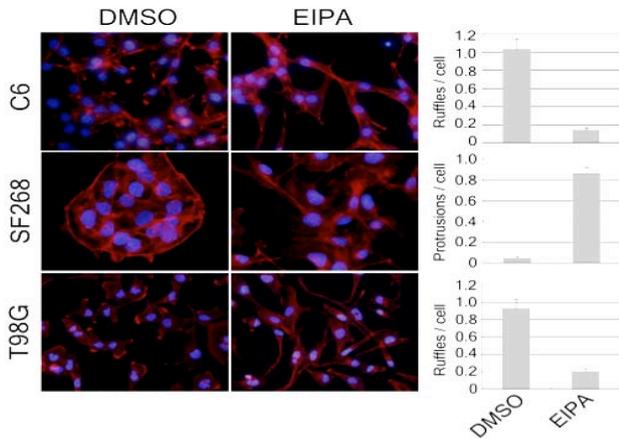


図 7 EIPA 処理が神経膠腫細胞に与える効果

各細胞を培養皿に播種後、25 μ M EIPA にて 24 時間処理した後の細胞形態を Phalloidin (赤) および Hoechst33342 (青) 染色した (細胞の写真)。DMSO 処理は陰性対照として行った。得られた細胞像より、細胞あたりのラッフル膜様構造の個数を (視野中のラッフル膜様構造の個数) / (視野中の Hoechst33342 で染め出される核の個数) としてプロットしたもの、および細胞あたりのアクチン細胞骨格陽性の細胞膜の突出構造の個数を (視野中の突出構造の個数) / (視野中の Hoechst33342 で染め出される核の個数) としてプロットしたものを右側にグラフとして示した。

図 7 において、細胞により構造が異なるものの (C6, T98G はラッフル膜様構造の減少、SF268 は細胞-細胞間接着の減少とアクチン細胞骨格陽性の細胞膜突出構造の形成) いずれの場合も EIPA によりアクチン細胞骨格の再構成に障害をきたしていることが観察される。このことが細胞の運動性、ひいては浸潤性の抑制の一因である可能性が高い。

一方、この時の NHE-1 の細胞内局在を検討した (図 8)。C6 細胞において NHE-1 は細胞膜上に広く分布するとともに、アクチンと共にラッフル様構造に集積することが観察される (図 8 矢頭)。EIPA 処理により、こうした構造が激減し、NHE-1 シグナルは細胞内膜構造上に観察されることとなり (図 8 下段)、それに伴いアクチンとの共局在も失われた。アクチン細胞骨格制御の失調とそれに伴うこの局在変化が、浸潤性抑制の一因である可能性は高い。EIPA による NHE-1 活性阻害がどのようなメカニズムで NHE-1 分子自身の細胞内局在を変化させるのかについては不明であり、現在蛍光標識 NHE-1 分子およびその一連の変異体を作成してその利用による検討を継続中である。

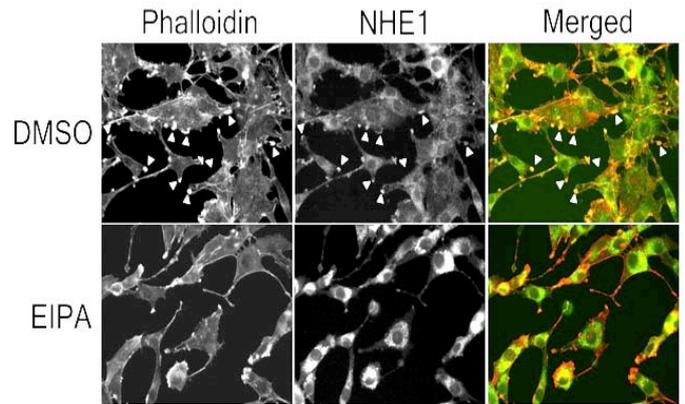


図 8 EIPA 処理による NHE-1 細胞内局在変化
C6 細胞を培養皿に播種後、25 μ M EIPA にて 24 時間処理した後の細胞形態を Phalloidin (赤) および抗 NHE-1 抗体 (緑) により染色した。アクチンと NHE-1 が共局在する箇所のいくつかに矢頭を付した。

(4) Arf6 シグナルと NHE-1 シグナルの並立性

重要なことに、NHE1 シグナルと Arf6 シグナル系両系を共に阻害することで神経膠腫細胞浸潤の抑制に相加効果が得られる (図 9)。このことは、両シグナルが並立に浸潤性に寄与していることを示している。これらの知見に基づくと、二種類の阻害剤を併用して両シグナルを共に抑制することで、効果的な神経膠腫細胞浸潤抑制治療ができる可能性が拓かれたと考えられる。

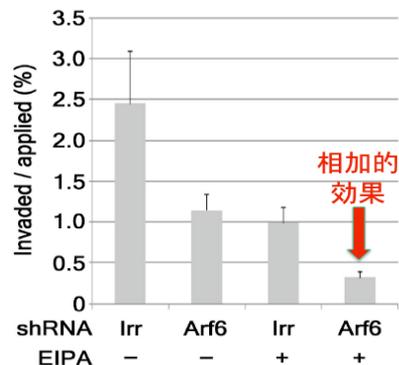


図 9 Arf6 ノックダウンと EIPA の C6 細胞浸潤阻害における相加性

図 1 における浸潤性測定を、陰性対照 shRNA 導入細胞および Arf6 ノックダウン細胞において、EIPA 25 μ M 存在下および非存在下にて行った。

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 4 件)

1. Nishihara, T. et al. Subcutaneous injection containing IL-3 and GM-CSF ameliorates stab wound-induced brain injury in rats. *Experimental*

- Neurology*, 査読有り, In press, 2011.
2. Inoue, A. et al. Cancer stem-like cells of glioblastoma characteristically express MMP-13 and display highly invasive activity. *International Journal of Oncology*, 査読有り, **37**, 1121-1131, 2010.
 3. Smirkin, A. et al. Iba1+/NG2+ macrophage-like cells expressing a variety of neuroprotective factors ameliorate ischemic damage of the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 査読有り, **30**, 603-615, 2010.
 4. Sabe et al. The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. *Traffic*, 査読有り **10**, 982-993, 2009

[学会発表] (計 6 件)

1. 矢野 元 他、神経膠腫細胞浸潤性における Na^+ / H^+ Exchanger (NHE1) の寄与について 日本生理学会中四国地方会 2010 年 11 月 21 日、出雲市
2. 矢野 元 他、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン NG2 の細胞浸潤における役割 グリア研究会 2010 年 10 月 23 日、福岡市
3. 矢野 元 他、Invasive potential of astrocytes and disinhibition of the properties in gliomas. 日本神経科学会 2010 年 9 月 19 日、神戸市
4. 河村 智宏 他、Roles of NG2 in glioma cell invasion 日本神経科学会 2010 年 9 月 19 日、神戸市
5. 矢野 元 他、Various modes of glioma cell invasions and a possible common molecular machinery among the invasions. 日本生理学会 2010 年 5 月 19 日、盛岡市
6. 矢野 元 他、Dependency and independency of glioma cell invasions on Arf6 which is an essential factor for breast cancer cell invasion. 国際生理学会 2009 年 7 月 28 日、京都市

○出願状況 (計 1 件)

名称：浸潤抑制剤

発明者：矢野 元

権利者：愛媛大学

種類：特許

番号：特願 2010-100248

出願年月日：平成 22 年 4 月 23 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 元 (YANO HAJIME)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00284414