

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590323

研究課題名(和文) 乳癌の初期段階における浸潤・転移の分子機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms of early breast cancer invasion and metastasis

研究代表者

橋本 あり (Hashimoto, Ari)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60390803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：上皮由来の癌が浸潤形質を獲得する際、上皮-間葉形質転換(EMT)に類似した現象を伴う。本研究において、EMT様進行過程にGEP100-Arf6-AMAP1経路の活性化が重要であること、また、変異p53による代謝経路の活性化がArf6の活性化に関わっていることを見いだした。さらに、ヒト乳癌の臨床標本及びデータベース解析から、GEP100-Arf6-AMAP1経路の発現と放射線治療後の再発に相関があること、変異p53とシグナル因子群の発現は予後不良との相関が見られたことから、p53遺伝子変異を伴うArf6経路の活性化はEMT様進行過程、並びに乳癌の悪性度進行に深く関わっていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Cancer progression by which epithelial tumor cells acquire a more motile and invasive phenotype has been closely linked to the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. We found that the GEP100-Arf6-AMAP1 pathway is important for acquisition of mesenchymal invasive phenotypes of breast cancers and TP53 alterations link to this process. Metabolic pathway regulated by mutant p53 is required for Arf6 activation. The clinical specimens of human breast cancer showed that the expression of GEP100-Arf6-AMAP1 signal correlated with recurrence after radiotherapy. Database analysis also showed that co-occurrence of TP53 mutations and the high expression of this signal pathway statistically correlate with poor survival. These results suggest that generation of the Arf6-based mesenchymal invasive pathway by TP53 alterations regulate malignant progression and appears to be crucial for poor prognosis in breast cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：浸潤 転移 Arf6 GEP100 EMT p53

### 1. 研究開始当初の背景

癌の最大の脅威はその転移性にある。これまで癌の浸潤・転移形質獲得に関して、癌化の起源となる細胞(癌幹細胞)の genetic/epigenetic な変異の蓄積と共に、腫瘍組織内の微小環境における低酸素状態、血管新生、免疫細胞や繊維芽細胞などのストロマ細胞群の集積などの多様な変化によって癌の悪性度進展の最終段階において浸潤・転移形質が誘導されると考えられていた。しかしながら、最近、乳癌を例として、モデルマウスや病理学的解析などから癌発症の初期段階から、既に、浸潤・転移形質が獲得され、骨髄などへの微小転移が形成されることが明らかとなっている。

上皮-間充織形質転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)は、上皮細胞が一過性に繊維芽細胞様の形質を獲得し、浸潤性が誘導される過程であり、個体発生や器官形成に必須の過程である。病理学的解析から、乳癌をはじめ、浸潤・転移した癌細胞ではビメンチンなど繊維芽細胞に特異的な蛋白質の発現が頻繁に見られ、EMT、もしくは類似のプロセスが進行していることが想定される。さらに、最近の知見では、癌細胞における EMT によって浸潤形質と共に幹細胞様形質が誘導されることが報告されている。

私達は、乳癌を例とした解析の中で、GEP100-Arf6-AMAP1 経路が乳癌細胞の浸潤・転移形質の獲得に重要であることを明らかにしてきた。本研究において、初期段階の乳癌に誘導される浸潤・転移形質獲得、すなわち EMT 進行過程における GEP100-Arf6-AMAP1 経路の活性化の分子機序の検証、並びに病理学的解析を行い、生物学的・医学的意義の検討を行うに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、初期段階の乳癌における浸潤・転移形質獲得すなわち EMT 進行過程及び、微小転移形成における GEP100-Arf6-AMAP1 経路の活性化の分子機序を明らかにするために、TGFβ1 刺激依存的 EMT における Arf6 シグナル経路の活性化に関わる分子の同定を生化学的手法等を用いて行う。さらに、EMT 誘導に p53 変異との関与が報告されたことから、EMT 進行過程における Arf6 シグナル経路の活性化と p53 変異との関連について解析を行うと共に、網羅的遺伝子発現解析等を行い、分子機序に関して検討を行う。さらに、病理学的解析を行い、初期段階の浸潤・転移獲得モデルの妥当性を解析する。

### 3. 研究の方法

(1) TGFβ1 刺激依存的 EMT における Arf6 シグナル活性化機序に関し、GEP100 と相互作用する分子を GEP100 の PH ドメインをプローブとした結合実験、あるいは、抗 GEP100

抗体を用いた免疫沈降法により検討を行う。(2) TGFβ1 刺激依存的 EMT における Arf6 シグナル活性化と変異 p53 との関連を解析する。そのために、変異 p53 を発現している乳癌細胞を用い、変異 p53 の発現を抑制した細胞、並びに野生型 p53 を発現させた細胞を樹立し、Arf6 シグナル経路の活性化に与える影響を解析する。また、どのような遺伝子の発現が変動しているか網羅的遺伝子発現解析を行い、分子機序について検討を行う。

(3) 悪性度の異なるヒト乳癌の病理標本並びにデータベース解析により、明らかになった初期段階の浸潤・転移獲得モデルの意義を検討する。

### 4. 研究成果

(1) Basal-like 乳癌細胞 MDA-MB-231 細胞において TGFβ1 刺激による運動性・浸潤性の誘導に伴って GEP100-Arf6-AMAP1 経路が c-Met/HGF レセプターの活性化を介して活性化されることを見いだした。その際、GEP100 が PH ドメインを介して活性化されたアダプター分子 Gab1 と結合し間接的に c-Met に相互作用する新たな分子機序を明らかにした。

(2) p53 遺伝子変異を有する高浸潤性 basal-like 乳癌細胞群 MDA-MB-231, Hs578T, MDA-MB-435s において、p53 の発現を抑制することにより、TGFβ1 刺激による Arf6 の活性化、並びに浸潤能が抑制されたことから、TGFβ1 刺激による浸潤能の獲得に、変異 p53 を介した Arf6 シグナルの活性化が重要であることが示された。また、変異 p53 の発現を抑制した細胞に野生型 p53 を発現させても、TGFβ1 刺激による Arf6 の活性化及び浸潤能は抑制されており、さらに AMAP1 並びに間葉系蛋白質 EPB41L5 の発現が阻害されていることが分かった。このことから、変異 p53 は Arf6 の活性化に重要であること、変異 p53 によって活性化される代謝経路が Arf6 の活性化に関わっていること、野生型 p53 は、AMAP1 や EPB41L5 の発現制御に関わっていることが明らかとなった。このように、p53 遺伝子変異を伴う Arf6 経路の活性化は EMT 様進行過程に深く関与していることが示された。

(3) 悪性度の異なるヒト乳癌の病理標本を用いて、GEP100-Arf6-AMAP1 シグナル分子の発現を解析した結果、GEP100/AMAP1 の高発現は再発サンプルの悪性度と相関があることが分かった。また、データベース解析から、AMAP1/EPB41L5 の高発現、p53 遺伝子変異と GEP100-Arf6-AMAP1 シグナル分子の発現は予後不良であることが示されたことから、これらのシグナルは乳癌の悪性度進行に深く関与していることが示された。

### 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 5 件)

1. Sato H., Hatanaka K.C., Hatanaka Y., Hatakeyama H., Hashimoto A., Matsuno Y., Fukuda S., and \*Sabe H. : High Level Expression of AMAP1 Protein Correlates with Poor Prognosis and Survival after Surgery of HNSCC Patients. *Cell Commun Signal* 12, 12-17, 2014 ( 査読有り )
2. Kinoshita R., Nam J.M., Ito Y.M., Hatanaka K.C., Hashimoto A., Handa H., Otsuka Y., Hashimoto S., Onodera Y., Hosoda M., Onodera S., Shimizu S., Tanaka S., Shirato H., \*Tanino M., and \*Sabe H. : Co-overexpression of GEP100 and AMAP1 proteins correlates with rapid local recurrence after breast conservative therapy. *PLoS One* 8, e76791, 2013( 査読有り )
3. Onodera Y., Nam J.M., Hashimoto A., Norman JC, Shirato H, Hashimoto S., and Sabe H. : Rab5c promotes AMAP1-PRKD2 complex formation to enhance  $\alpha$ 1 integrin recycling in EGF-induced cancer invasion. *J Cell Biol.* 197, 983-996, 2012 ( 査読有り )
4. Menju T., Hashimoto S., Hashimoto A., Otsuka Y., Handa H., Ogawa E., Toda Y., Wada H., Date H., and Sabe H. : Engagement of overexpressed Her2 with GEP100 induces autonomous invasive activities and provides a biomarker for metastases of lung adenocarcinoma. *PLoS One* 6, e25301, 2011 ( 査読有り )
5. Hashimoto A., Hashimoto S., Ando R., Noda K., Ogawa E., Kotani H., Hirose M., Menju T., Morishige M., Manabe T., Toda Y., Ishida S., and Sabe H. : GEP100-Arf6-AMAP1-cortactin pathway frequently used in cancer invasion is activated by VEGFR2 to promote angiogenesis. *PLoS One* 6, e23359, 2011 ( 査読有り )

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Hashimoto A., Hashimoto S., Onodera Y., Oikawa T., Oneyama C., Kinoshita R., Nam J.M., Tanino M., Sugino H., Yoshikawa A., Otsuka Y., Handa H., Yoshino M., Sato H., Fukuda S., Tanaka S., Shirato H., Ito Y., Okada M., and Sabe H. : Mechanisms by which p53 alterations generate GEP100-Arf6-AMAP1 pathway as a mesenchymal invasion machinery to be activated by external ligands. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013.12.4.
2. Hashimoto S., Hashimoto A., Oneyama

- C., Yoshikawa A., Sugino H., Handa H., Yoshino M., Otsuka Y., Onodera Y., Okada M., and Sabe H. : Mutant-p53 generates the GEP100-Arf6-AMAP1 pathway to promote breast cancer invasiveness. 第 86 回日本生化学大会, 横浜, 2013.9.12.
3. Hashimoto A., Hashimoto S., Oneyama C., Onodera Y., Sugino H., Yoshikawa A., Otsuka Y., Handa H., Okada M., and Sabe H. : Mutant-p53 generates GEP100-Arf6-AMAP1-EPB41L5 pathway externally activated to promote mesenchymal invasion. The First International Meeting, Epithelial Tubulology, 札幌, 2013.6.23.
4. Hashimoto A., Hashimoto S., Yoshikawa A., Sugino H., Handa H., Kinoshita R., Hatanaka K.C., Mikami S., Tanino M., Mito S., Sato H., Otsuka Y., Yoshino H., Kado Y., Nam J.M., Onodera Y., Tanaka S., Shirato H., and Sabe H. : Mutant-p53 generates GEP100-Arf6-AMAP1 pathway to be activated by TGF $\beta$ 1 and receptor tyrosine kinases to promote cancer invasion., 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012.12.12.
5. Hashimoto A., Hashimoto S., Yoshikawa A., Sugino H., Handa H., Mito S., Sato H., Otsuka Y., Yoshino H., Nam J.M., Onodera Y., and Sabe H. : Mutant-p53 generates GEP100-Arf6-AMAP1 pathway to promote breast cancer cell invasiveness in response to TGF $\beta$ 1. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.20.
6. Hashimoto A., Hashimoto S., Yoshikawa A., Sugino H., Handa H., Mito S., Sato H., Otsuka Y., Yoshino H., Nam J.M., Onodera Y., and Sabe H. : MUTANT-p53 GENERATES GEP100-Arf6-AMAP1 PATHWAY TO PROMOTE BREAST CANCER CELL INVASIVENESS IN RESPONSE TO TGF $\beta$ 1. The 31st Sapporo International Cancer Symposium, 札幌, 2012.6.23.
7. 橋本あり、佐邊壽孝 : 変異 p53 は Arf6 活性化経路を介した浸潤獲得形質に必須である. 第 4 回シグナルネットワーク研究会, 大阪, 2012.5.18.
8. Hashimoto A., Hashimoto S., Otsuka Y., Yoshikawa A., Sugino H., Handa H., Sato H., Nam J.M., Shirato H., Fukuda S., Onodera Y., and Sabe H. : Mutant p53 is essential for TGF $\beta$ 1-induced breast cancer cell invasion via activation of GEP100-Arf6-AMAP1 pathway. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.12.15.
9. Hashimoto A., Hashimoto S., Otsuka Y.,

Yoshikawa A., Sugino H., Handa H., Nam J.M., Sato H., Fukuda S., Onodera Y., and Sabe H. : Mutant p53 is essential for TGFβ1-induced breast cancer cell invasiveness via activation of GEP100-Arf6-AMAP1 pathway. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011.10.3.

10. Hashimoto A., Hashimoto S., Otsuka Y., Handa H., Sato H., Sugino H., Yoshikawa A., Umemoto T., Onodera Y., Fukuda S., and Sabe H. : HGFR/c-Met-mediated activation of GEP100-Arf6-AMAP1 pathway is an integral part for TGFβ-induced cancerous EMT and invasiveness. 第 63 回日本細胞生物学会大会, 札幌, 2011.6.28-29.

〔図書〕(計 2 件)

1. 橋本あり、杉野弘和、橋本茂、佐邊壽孝 : EMT-基礎的観点から、29 項-35 項 (戸井雅和編: 乳癌レビュー2012、メディカルレビュー社、大阪・東京)、2012
2. 橋本あり、橋本茂、佐邊壽孝 : 局所浸潤モデル - がんの浸潤転移に関わる分子装置の解析法、68 項-78 項 (中村卓郎編: 疾患モデルの作製と利用、エル・アイ・シー(株)、東京)、2012

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 乳癌乳房温存療法後の局所再発リスクの予測に用いるための診断薬並びに予測方法

発明者: 佐邊壽孝、橋本 茂、橋本あり、小野寺康仁、白土博樹、木下留美子

権利者: 北海道大学

種類: 特許

番号: 特許 2013-041644

出願年月日: 2013 年 3 月 4 日

国内外の別: 国内

名称: 放射線治療増強薬及び放射線抵抗性癌の治療方法

発明者: 佐邊壽孝、小野寺康仁、Nam Jin Min、橋本 茂、橋本あり

権利者: 北海道大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-148970

出願年月日: 2013 年 7 月 17 日

国内外の別: 国内

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:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~g21001/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 あり (HASHIMOTO ARI)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 60390803

(2) 研究分担者

なし

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし

研究者番号: