

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293057

研究課題名(和文) 癌的機能獲得型p53変異を有する転移性癌細胞の放射線抵抗性機序の解明

研究課題名(英文) TP53 mutation drives cancer IR-resistance via the Arf6-based pathway

研究代表者

佐邊 壽孝 (Sabe, Hisataka)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40187282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌の放射線抵抗性は様々であるが、多くは癌細胞自身の性質に由来する。私達は低分子量Gタンパク質 Arf6を中心とする癌悪性度進展経路を発見したが、本経路は放射線抵抗性の主経路であることを見いだした。

本研究では、Arf6経路に起因する放射線抵抗性の分子的詳細と、その基盤となる癌遺伝子変異を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ionizing radiation (IR) is amongst a promising method of the cancer therapeutics. We have shown previous that the small-GTPase Arf6 and its downstream signaling factors are frequently overexpressed in different cancers and execute a cancer mesenchymal program, including invasion and metastasis. We have furthermore identified that this pathway is a core to promote IR-resistance of cancer cells. Here, we show a precise mechanism by which the Arf6-based pathway contributes to the cancer IR-resistance, and identified a critical gene mutation therein involved.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：放射線抵抗性 Arf6 TP53

### 1. 研究開始当初の背景

放射線治療(ここでは主に「電離放射線」治療を指す)は照射技術の向上も伴い今後益々期待される。生体において電離放射線は様々な活性酸素種やヒドロキシラジカルを生じ、生体成分に様々な酸化修飾を起こす。癌の放射線抵抗性は様々であるが、抵抗性の多くは標的部位の低酸素分圧である。一方、癌細胞には同一酸素分圧下での培養において放射線抵抗性/非抵抗性のものが存在し、癌細胞のゲノムストレス下における生存性維持機序の多様性を示している。

私共はこれまでの研究成果として、癌の浸潤転移に根幹的なシグナル経路の一つを明らかにした。この経路は低分子量 G 蛋白質 Arf6 を中心とし、活性化因子 GEP100 と下流因子 AMAP1 からなり、E-cadherin のエンドサイトーシスと  $\beta 1$  integrin のリサイクリングを担う。浸潤性乳癌では本経路蛋白質群が正常乳癌の 10-20 倍発現しており、このことが浸潤・転移活性に必要である。

最近、この Arf6 経路は放射線抵抗性をもたらすことを見いだした。しかし、その分子機構は不明である。

### 2. 研究の目的

放射線治療は癌治療の一つの柱であり、今後益々期待される。放射線照射後の細胞反応は詳細な理解が進んでいるが、多くは正常細胞でのものである。一方、癌細胞は多様なゲノム変異を有し、多くに生存性維持/細胞死誘導機構の障害が認められる。従って、癌細胞の放射線照射後の振る舞いに関しては、癌的ゲノム変異も考慮した癌特性ごとの解析が必要である。また、上記のように、癌によって放射線抵抗性に強弱があるが、その分子実態はまだ不明である。

我々は、癌の浸潤転移特異的な Arf6 経路を明らかにしたが、最近、特定の p53 変異が本 Arf6 経路を創出し活性化すること、本経路は乳癌放射線抵抗性の根幹でもあることを明らかにした。病理標本解析からも証拠立てられた。本研究は、p53 変異を持ち浸潤転移性の亢進した悪性乳癌細胞の放射線抵抗性の根本的機序を明らかにする。

### 3. 研究の方法

悪性乳癌細胞の多くに Arf6 経路が存在し、浸潤転移性をもたらすが、本経路阻害は乳癌細胞の電離放射線抵抗性を著しく低下させることを明らかにしている。Arf6 経路阻害はミトコンドリアの細胞内局在を大きく変化させ、その DNA 損傷も亢進した。本研究ではこのような観察に基づき、Arf6 経路阻害/非阻害における電離放射線照射後の核 DNA とミトコンドリア DNA の損傷量測定、ミトコンドリア機能の検討等を行ない、Arf6 経路阻害下においては何が電離放射線障害の主た

る標的となり、どのようにして癌細胞に細胞死をもたらすのかを明らかにする。

### 4. 研究成果

乳癌細胞 MDA-MB-231 は gain-of-function 型 p53 を発現し(片方の TP53 遺伝子は発現しない)、Arf6 経路蛋白質群が高レベルに発現し活性化している。本細胞は高い放射線抵抗性を示すが、siRNA 法により Arf6 経路因子である、GEP100, Arf6, AMAP1 のいずれの発現を阻害した時も非阻害時に比べ、電離放射線 2Gy, 4Gy, 8Gy において細胞死が約 5-10 倍亢進した。MDA-MB-435s や Hs578T も gain-of-function 型 p53 を発現し Arf6 経路が活性化しているが、同様の事が見られた。

放射線障害の主な標的は DNA や膜脂質である。放射線照射における核 DNA の損傷や修復は、Arf6 経路因子の発現抑制とは関係しなかった。一方、放射線照射におけるミトコンドリアの酸化障害が、Arf6 経路の有無と関係することを明らかにした。Arf6 経路はインテグリン活性に深く関わることは以前に示した。インテグリンは細胞基質接着班を形成するが、多くの微小管は接着班を終点とする。今回、Arf6 経路はインテグリンシグナルを活性化することにより微小管上のミトコンドリア anterograde 輸送を亢進すること、そのことによって、ミトコンドリアから発生する活性酸素によるミトコンドリア同士の障害を軽減することを明らかにした。

変異 p53 の放射線抵抗性への関与に関しても研究を進めた。変異 p53 がメバロン酸経路活性を亢進することは海外グループから報告されたが、我々は、メバロン酸経路活性が Arf6 活性化に必須であること、その際、メバロン酸経路に存在する geranylgeranyl transferase-II が Rab11b をプレニル化すること、プレニル化された Rab11b が Arf6 を細胞質から形質膜へと輸送し、その結果、Arf6 が細胞表面で増殖因子受容体によって活性化されることを明らかにした。

以上のことは、変異 p53 による放射線抵抗性亢進の分子実態を明らかにしたものであり、本研究は当初目的を十分に達成した。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

1. Handa H, Hashimoto A, Hashimoto S, Sabe H. Arf6 and its ZEB1-EPB41L5 mesenchymal axis are required for both mesenchymal- and amoeboid-type invasion of cancer cells. Small GTPases 2016. [in press] (査読有)  
doi: 10.1080/21541248.2016.1249043
2. Otsuka Y, Sato H, Oikawa T, Onodera Y, Nam JM, Hashimoto A, Fukunaga K, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Matsuno Y, Fukuda S, Sabe H. High expression of the

- mesenchymal protein EPB41L5 correlates with poor prognosis of head and neck squamous cell carcinoma. *Cell Comm. Signal.* 14: 28, 2016. (査読有) doi: 10.1186/s12964-016-0151-0
3. Tanaka N, Kosaka T, Miyazaki Y, Mikami S, Niwa N, Otsuka Y, Minamishima YA, Mizuno R, Kikuchi E, Miyajima A, Sabe H, Okada Y, Suematsu M, Oya M. Acquired platinum resistance involves epithelial-to-mesenchymal transition through ubiquitin ligase FBXO32 dysregulation. *JCI Insight* 1: e83654.2016. (査読有) doi: 10.1172/jci.insight.83654
  4. Hashimoto A, Hashimoto S, Sugino H, Yoshikawa A, Onodera Y, Handa H, Oikawa T, Sabe H. ZEB1 induces EPB41L5 in the cancer mesenchymal program that drives ARF6-based invasion, metastasis, and drug resistance. *Oncogenesis*. 5: e259, 2016. (査読有) doi: 10.1038/oncis.2016.60
  5. Komiya Y, Onodera Y, Kuroiwa M, Nomimura S, Kubo Y, Nam JM, Kajiwarra K, Nada S, Oneyama C, Sabe H, Okada M. The Rho guanine nucleotide exchange factor ARHGEF5 promotes tumor malignancy via epithelial-mesenchymal transition. *Oncogenesis*. 5: e258, 2016. (査読有) doi: 10.1038/oncis.2016.59
  6. Sabe H, Hashimoto A, Hashimoto S, Oikawa T. Tumor responsiveness to statins requires overexpression of the ARF6 pathway. *Mol Cell Oncol*. 3: e1185564, 2016. (査読有) doi: 10.1080/23723556.2016.1185564
  7. Hashimoto A, Oikawa T, Hashimoto S, Sugino H, Yoshikawa A, Otsuka Y, Handa H, Onodera Y, Nam JM, Oneyama C, Okada M, Fukuda M, Sabe H. P53- and mevalonate pathway-driven malignancies require Arf6 for metastasis and drug resistance. *J. Cell Biol.* 213: 81-95, 2016. (査読有) doi: 10.1083/jcb.201510002
  8. Hashimoto S, Mikami S, Sugino H, Yoshikawa A, Hashimoto A, Onodera Y, Furukawa S, Handa H, Oikawa T, Okada Y, Oya M, Sabe H. Lysophosphatidic acid activates Arf6 to promote the mesenchymal malignancy of renal cancer. *Nat. Commun.* 7: 10656, 2016. (査読有) doi: 10.1038/ncomms10656
  9. Tien DN, Kishihata M, Yoshikawa A, Hashimoto A, Sabe H, Nishi E, Kamei K, Arai H, Kita T, Kimura T, Yokode M, Ashida N. AMAP1 as a negative-feedback regulator of nuclear factor- $\kappa$ B under inflammatory conditions. *Sci Rep.* 4: 5094, 2014. (査読有) doi:10.1038/srep05094
  10. Sato H, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Hatakeyama H, Hashimoto A, Matsuno Y, Fukuda S, Sabe H. High level expression of AMAP1 protein correlates with poor prognosis and survival after surgery of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cell Comm. Sig.* 12: 17, 2014. (査読有) doi: 10.1186/1478-811X-12-17
- 〔学会発表〕(計 24 件)
1. 及川司, 超解像イメージングから見える新しい細胞生物学, 第 11 回北海道大学医学研究科連携研究センターシンポジウム・超解像細胞生物学, 2016 年 11 月 1 日, 北海道大学(北海道・札幌市)
  2. 小野寺康仁, がん細胞における小胞輸送経路を介したミトコンドリア分布制御と活性酸素および放射線への耐性, 日本放射線影響学会 第 59 回大会, 2016 年 10 月 27 日, JMS アステールプラザ 広島県・広島市)
  3. 及川司, p53 antagonizes EZH2 function to maintain epithelial integrity, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 8 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
  4. 橋本あり, Tumor responsiveness to mevalonate pathway inhibitors require overexpression of the Arf6 pathway, 第 89 回日本生化学会, 2016 年 9 月 25 日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)
  5. 佐邊壽孝, 癌的代謝亢進によるミトコンドリア空間配置: 転移性癌の治療抵抗性について, 第 11 回 Basic Research Urology Seminar(BURS), 2016 年 8 月 27 日, ANA クラウンプラザホテル千歳(北海道・千歳市)
  6. 小野寺康仁, がん形質の獲得と代謝の局所制御, 第 4 回がんと代謝研究会 in 鹿児島, 2016 年 7 月 7 日, かごしま県民交流センター(鹿児島県・鹿児島市)
  7. 小野寺康仁, Malignant phenotype mediated by metabolism, transport and compartmentalization, 第 68 回日本細胞生物学会大会, 2016 年 6 月 16 日, 京都テルサ(京都府・京都市)
  8. 佐邊壽孝, Arf6 is a core driver of mesenchymal invasion and metastasis, and therapeutic resistance of different types of cancers under RTK and GPCR signaling, 第 68 回日本細胞生物学会大会, 2016 年 6 月 15 日, 京都テルサ(京都府・京都市)
  9. 及川司, p53 antagonizes EZH2 function to maintain epithelial integrity, 第 8 回シグナルネットワーク研究会, 2016 年 5 月 27 日, 大阪大学微生物病研究所(大阪府・吹田市)
  10. 佐邊壽孝, Arf6-AMAP1 pathway drives mesenchymal metastasis and drug resistance of cancers under RTK and GPCR signaling, OOTR 第 12 回年次学会, 2016 年 3 月 3 日~6 日, ウェスティン都ホテル京都(京都府・京都市)

11. 及川司, p53 warrants epithelial gene expressions through epigenetic regulation, BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会), 2015年12月1日~4日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
12. 毛受暁史, Grb2 promotes cancer invasive activities via EGF-induced GEP100-Arf6 pathway, 第74回日本癌学会学術総会, 2015年10月8日~10日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
13. 小野寺康仁, Arf6-AMAP1 pathway confers radioresistance via regulation of ROS in breast cancer, 第74回日本癌学会学術総会, 2015年10月8日~10日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
14. 橋本あり, ZEB1-EPB4.1L5 axis drives mesenchymal-type invasion and metastasis of primary breast cancers, 第67回日本細胞生物学会大会, 2015年6月30日~7月2日, タワーホール船堀(東京都・江戸川区)
15. 佐邊壽孝, Different genome statuses in breast cancer and renal cancer generate the Arf6-based mesenchymal machinery critical for metastasis and poor survival, The 4th Global Cancer Genomics Consortium Symposium, 2014年11月14日~15日, 芝蘭会館(京都府・京都市)
16. 小野寺康仁, Robust redox homeostasis mediated by Arf6-AMAP1 pathway confers resistance to ionizing radiation in breast cancer, 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25日~27日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
17. 橋本あり, TP53 alterations generate Arf6-based mesenchymal invasion pathway that is activated by RTKs and TGFβ1 in breast cancer, 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25日~27日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
18. 橋本茂, EZH2 generates Arf6-based mesenchymal invasion machinery that is central to poor prognosis of renal cancer, 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25日~27日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
19. Jin-Min Nam, Analysis of molecular mechanism involved in invasiveness of radiation treated breast cancer cells, 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25日~27日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
20. 及川司, p53 recalls epithelial memory in mammary cancer cells with mesenchymal phenotypes, 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25日~27日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
21. 橋本茂, EZH2 overexpression generates Arf6-based mesenchymal invasion

machinery that is activated by LPA and central to poor prognosis of renal cancer, Mechanisms & Models of Cancer, 2014年8月12日~16日, Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor・アメリカ)

22. 佐邊壽孝, ゲノム・代謝変異と癌悪性度進展, 社団法人がんと炎症・代謝研究会理事会, 2014年5月25日, 京都大学(京都府・京都市)
23. 橋本茂, エピゲノム修飾による腎癌細胞の間葉浸潤形質の獲得, 第6回シグナルネットワーク研究会, 2014年5月9日~10日, 慶應義塾大学(東京)
24. 小野寺康仁, 乳癌のROS制御におけるArf6-AMAP1経路の役割, 第6回シグナルネットワーク研究会, 2014年5月9日~10日, 慶應義塾大学(東京)

〔図書〕(計 1 件)

1. Hashimoto S, Hashimoto A, Sugino H, Yoshikawa A, Handa H, Yoshino M, Otsuka Y, Sabe H. (Ed. F. Wittenghofer, Springer Pub.) ArfGAPs: not only for the termination. In "Ras-superfamily small G-proteins" Vol. 2 pp253-274, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 膝癌の再発リスクの予測に用いるための診断薬及びキット、並びに予測方法  
 発明者: 佐邊壽孝、平野聡、古川聖太郎  
 権利者: 同上  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2015-246132  
 出願年月日: 2015年12月17日  
 国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等  
<http://g21001.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐邊 壽孝 (SABE, Hisataka)  
 北海道大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号: 40187282