

64. ヒトがんにおける低分子量 G 蛋白質 Arl4c の異常と機能

菊池 章

Key words : Arl4c, 管腔形態形成, がん,
Wnt シグナル, EGF シグナル

大阪大学 大学院医学系研究科
生化学分子生物学講座
分子病態生化学教室

緒 言

がんの主要な発生母地となる上皮細胞は、正常状態ではタイトジャンクションや基底膜を介して隣接する細胞や間質と強固に結合し、安定なシート状の組織を形成している。このため、生体内で上皮細胞は増殖や運動をしにくい静的な状態にある。しかし、がん細胞はこのような環境下でも、上皮間葉転換を誘導し、増殖して運動できる形質を獲得して動的な状態にある。一方、正常上皮細胞も発生過程において管腔構造を形成する際には、静的な状態から運動能と増殖能を獲得して間質内に侵入していく、すなわち、がん細胞と同様な、動的な状態にならなければならない。生体内に近い環境である三次元基質培養法を用いて上皮細胞集団の増殖や運動制御に関する解析を行うことにより、新規がん関連遺伝子の同定を含む新たながんの知見が見出されることが期待される。

私共は正常腸管上皮細胞株 (IEC6) を用いた三次元基質培養下で Wnt/ β -カテニンシグナルと EGF-Ras-MAPK シグナルの同時活性化 (Wnt3a/EGF) により強く発現誘導され、上皮の管腔構造形成を促進する分子として低分子量 G 蛋白質 Arf-like protein 4c (Arl4c) を同定した (図 1)¹⁾。これまでに、Arl4c は Arf ファミリーに属する低分子量 G 蛋白質として同定され²⁾、データベース上、ヒトの神経組織や血球系細胞に発現していることや、細胞内コレステロール輸送に関与する³⁾ことが報告されている。しかし、Arl4c の発現制御機構と機能、さらに、がんとの関連についてはほとんど不明である。本研究では Arl4c の発現制御機構や作用機構、および、Arl4c のがんにおける発現様式および機能について明らかにすることを目的とした。

方法および結果

私共は最近、ラット正常腸管由来上皮細胞株 (IEC6) を用いた三次元基質培養系において、IEC6 細胞は極性化して小さな上皮細胞塊 (シスト) を形成するが、Wnt シグナルと EGF シグナルが同時協調的に活性化すると、標的遺伝子として Arf-like protein 4c (Arl4c) が発現して、上皮細胞集団が活発に増殖しながら形態変化することを見出した (図 1)¹⁾。

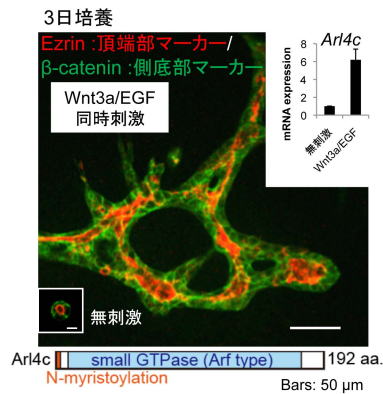


図1. 三次元培養下における Wnt3a/EGF シグナルによる上皮細胞の分岐管腔形態形成と Arl4c 発現.

マトリゲルを用いた三次元基質培養下において正常腸管上皮細胞株 (IEC6) を Wnt3a と EGF 同時刺激すると、低分子量 G 蛋白質 Arl4c 発現が促進し、上皮細胞が集団として活発に増殖しながら管腔構造を形成する。

クロマチン IP 法を用いて、Wnt3a/ β -カテニンシグナルの転写因子 Tcf4 と EGF シグナルの転写因子 Ets の Arl4c の発現制御への関与について検討した。その結果、IEC6 において、Wnt3a/ β -カテニンシグナルと EGF シグナルを活性化すると、 β -カテニン、Tcf4 そして Ets が複合体を形成し、Ets 結合部位にリクルートされ、ヒストン H4 のアセチル化を促進することにより、Arl4c の発現を誘導することが明らかとなった⁴⁾。

IEC6 において、プルダウン法を用いて、Wnt3a/EGF 刺激により細胞骨格制御因子 Rac1 が活性化した結果、RhoA の活性化が抑制されることが明らかとなった。阻害剤 (NSC23766) を用いた Rac1 の機能阻害、または、Rac1 のドミナントネガティブ変異体を発現させると Wnt3a/EGF 依存的な管腔構造形成が抑制された。これらの結果から、IEC6 における Wnt3a/EGF 依存的な管腔構造形成において Rac1 の活性化が必要であった。これまでに、Arl4c と高い相同性のある低分子量 G 蛋白質 Arl4d について、Arf nucleotide-binding site opener (ARNO) を介して低分子量 G 蛋白質 ADP-ribosylation factor 6 (Arf6) を活性化する経路が報告されている⁴⁾。そこで、阻害剤 (SecinH3) を用いて Arf6 の活性を阻害すると、IEC6 における Wnt3a/EGF 依存的な Rac1 の活性化および管腔構造形成が抑制された。また、ARNO または Arf6 のノックダウン、および Arf6 ドミナントネガティブ変異体を発現させると Wnt3a/EGF 依存的な管腔構造形成と Rac1 の活性化が抑制された。一方、Arl4c のノックダウンにより IEC6 における Wnt3a/EGF 依存的な Rac1 の活性化および管腔構造形成が抑制された。これらの結果から、Wnt3a/EGF 刺激による Arl4c 依存的な管腔構造形成において、ARNO を介した Arf6 および Rac1 の活性化が必要であった⁴⁾。

Arl4c のがんにおける発現および機能については全く不明であるので、免疫組織学的な発現解析およびその機能解析を行った。Arl4c のがんにおける発現を免疫組織学的に検討したところ、ヒト大腸がん症例において 47% (117 症例中 55 例陽性)、ヒト肺がん症例において 79% (65 症例中 51 例陽性) の高頻度で腫瘍組織に高発現していた (図 2)。

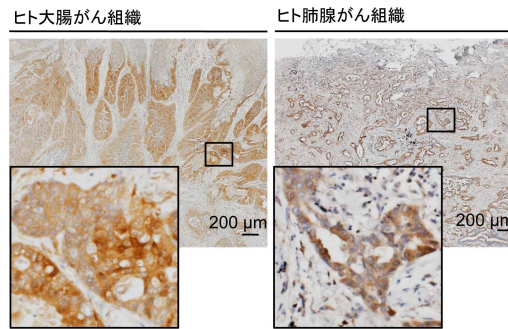


図2. ヒト悪性腫瘍における Arl4c の過剰発現.

ヒト大腸がん組織およびヒト肺腺がん組織において、腫瘍部において Arl4c が特異的に発現していた。

しかし、大腸と肺の非腫瘍細胞組織においては、Arl4c は検出されなかった。また、肺腺がんの前がん病変と考えられている異型腺腫様過形成 (AAH) においても高頻度に過剰発現していたことから、腫瘍早期診断マーカーとしての有用性も示唆された。がんにおける Arl4c の機能を解析するため、ヒト大腸がんおよび肺がん細胞株における Arl4c の発現を検討した。その結果、複数の細胞株において Wnt/ β -カテニンシグナルと EGF-Ras-MAPK シグナルに依存して Arl4c が高発現していることを見出した。大腸がん細胞株 HCT116 において、Arl4c をノックダウンすると、*in vitro* におけるがん細胞の運動能や浸潤能が抑制された (図3)。

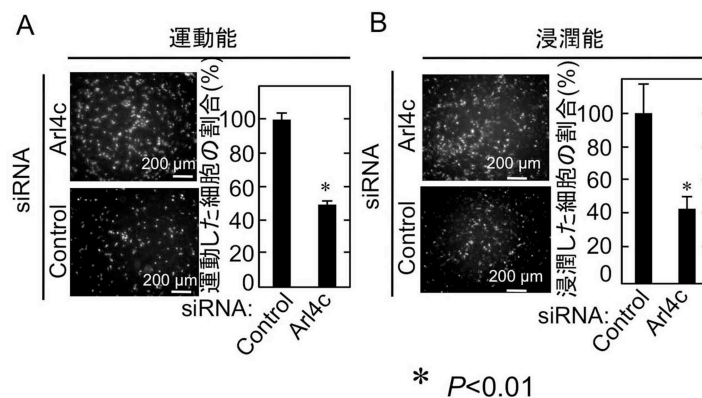


図3. Arl4c の発現抑制による HCT116 細胞の運動能・浸潤能抑制.

Arl4c をノックダウンすると Arl4c 高発現ヒト大腸がん細胞株 HCT116 細胞において、その運動能および浸潤能が抑制された。統計処理はスチューデントの t 検定を用いて評価した。

また、shRNA を用いて HCT116 細胞の Arl4c を恒常的に発現抑制したところ、ヌードマウスを用いたマウス皮下腫瘍形成モデルにおいて、HCT116 細胞の腫瘍形成能が減少した (図4)。

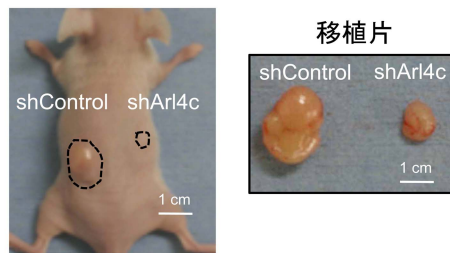


図4. Arl4c の shRNA による HCT116 細胞の皮下腫瘍形成能の抑制。

shRNA を用いて Arl4c を恒常的に発現抑制すると、ヌードマウス皮下に HCT116 細胞を移植したマウス皮下腫瘍形成モデルにおいて、腫瘍体積が減少した。

これらの研究結果から、Arl4c ががん細胞の増殖能、運動能、浸潤能の促進に関与していることが明らかになった。そこで、Arl4c ががん治療の分子標的となりうるかを検討した。HCT116 細胞をヌードマウス皮下に移植し形成された腫瘍に対して、Arl4c の siRNA をアテロコラーゲンと混和後、腫瘍組織に直接投与 (*in vivo* siRNA) した。その結果、Arl4c の遺伝子発現の抑制と共に抗腫瘍効果（腫瘍体積と重量の減少）が認められた（図5）²⁾。

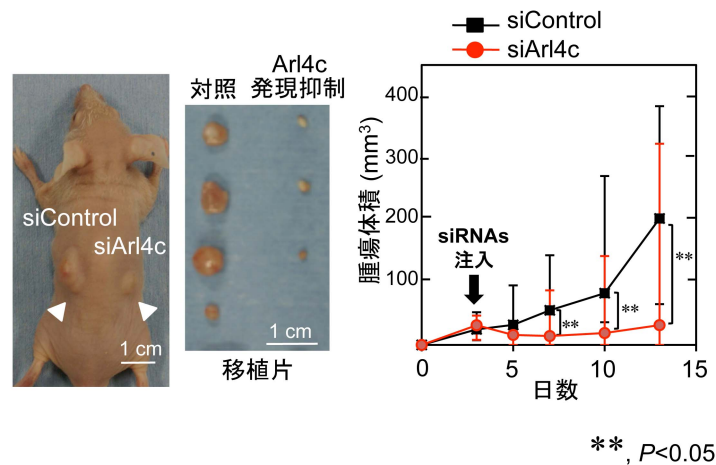


図5. 皮下腫瘍モデルマウスに対する Arl4c の *in vivo* siRNA による抗腫瘍効果。

HCT116 細胞をヌードマウス皮下に移植し形成された腫瘍に対して、Arl4c の siRNA をアテロコラーゲンと混和後、腫瘍組織に直接投与 (*in vivo* siRNA) したところ、腫瘍体積の減少が認められた。統計処理はマン・ホイットニーの U 検定を用いて評価した。

考 察

Wnt シグナルと EGF シグナルの異常活性化は各種ヒトがんの発がんおよび悪性化に密接に関与することが知られている。Arl4c は、私共が新たに確立した三次元基質培養法を用いて、Wnt/ β -カテニンシグナルと EGF-Ras-MAPK シグナルの同時活性化により強く発現誘導され、上皮細胞の形態形成を促進する分子として同定した。また、本研究において私共は、がん細胞における Arl4c の重要性を明らかにしている。これらの研究成果は、Arl4c がヒトがんにおいて分子標的となりうる可能性を示すものである。現在、正常細胞に比べて急速かつ制御不能ながん細胞の増殖を抑制す

るために、各種抗がん剤が多用されている。しかし、既存の抗がん剤は必ずしもがんに対する十分な治療効果を有していないものもあり、また、一般に抗がん剤は正常細胞にも作用するため副作用を伴う。したがって、新たな作用機序の抗がん剤、すなわち、がん細胞特異的に増殖抑制作用を示すが、正常細胞には毒性の少ない抗がん剤の開発が期待されている。ヒト病理検体を用いた解析から、Arl4c はヒト大腸がん症例およびヒト肺がん症例において高頻度でがん組織に高発現していたが、ヒト大腸正常腸管上皮組織および肺胞正常上皮組織では発現を認めなかった。したがって、Arl4c を分子標的とした治療は正常細胞に対する副作用が少なく、がん細胞特異的な治療効果を期待できる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、大阪大学医学系研究科分子病態生化学の松本真司および藤井慎介、大阪大学医学系研究科病態病理学の森井英一および野島 聡である。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Matsumoto, S., Fujii, S., Sato, A., Ibuka, S., Kagawa, Y., Ishii, M. & Kikuchi, A. : A combination of Wnt and growth factor signaling induces Arl4c expression to form epithelial tubular structures. *EMBO J.*, **33** : 702-718, 2014.
- 2) Jacobs, S., Schilf, C., Fliegert, F., Koling, S., Weber, Y., Schurmann, A. & Joost, H. G. : ADP-ribosylation factor (ARF)-like 4, 6, and 7 represent a subgroup of the ARF family characterization by rapid nucleotide exchange and a nuclear localization signal. *FEBS Lett.*, **456** : 384-388, 1999.
- 3) Engel, T., Lueken, A., Bode, G., Hobohm, U., Lorkowski, S., Schlueter, B., Rust, S., Pech, M., Assmann, G. & Seedorf, U. : ADP-ribosylation factor (ARF)-like 7 (ARL7) is induced by cholesterol loading and participates in apolipoprotein AI-dependent cholesterol export. *FEBS Lett.*, **566** : 241-246, 2004.
- 4) Hofmann, I., Thompson, A., Sanderson, C. M. & Munro, S. : The Arl4 Family of Small G Proteins Can Recruit the Cytohesin Arf6 Exchange Factors to the Plasma Membrane. *Curr. Biol.*, **8** : 711-716, 2007.
- 5) Fujii, S., Matsumoto, S., Nojima, S., Morii, E. & Kikuchi, A. : Arl4c expression in colorectal and lung cancers promotes tumorigenesis and may represent a novel therapeutic target. : *Oncogene*, **34** : 4834-4844, 2015.