

27. Arf6 シグナル伝達を標的とした革新的抗癌剤の開発

金保 安則

筑波大学 医学医療系 生理化学教室

Key words : 腫瘍血管新生, 癌転移, 抗癌剤, 低分子量 G 蛋白質, Arf6

緒言

腫瘍を取り巻くストローマ細胞や癌細胞自身から放出される様々な血管新生因子の作用により既存の血管から毛細血管が新生され、それが腫瘍内に侵入する「腫瘍血管新生」が促進されるため、腫瘍は血液から栄養素や酸素を獲得して増大する。それ故に、腫瘍血管新生阻害剤が抗癌剤として開発された。しかしながら、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、腫瘍血管新生阻害剤は癌治療においてそれほど有効ではないことが報告されている。この知見は、腫瘍血管新生と癌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。

低分子量 G 蛋白質の Arf6 は、細胞膜やエンドソームに局在して細胞膜ダイナミクスを制御するユニークな生命素子である。我々が Arf6 の新規な機能を発表して以来、細胞レベルでの Arf6 の機能解析が急速に展開されているが、個体レベルにおける Arf6 の生理機能や病態への関与は不明であった。この問題の解決に向けて、我々は世界に先駆けて *Arf6* 遺伝子コンディショナルノックアウト (*Arf6* cKO) マウスを作製してその解析を進めた結果、血管内皮細胞特異的な *Arf6* cKO マウスに固形腫瘍を形成させると、腫瘍血管新生が阻害されて癌の進行が抑制されることを見出した¹⁾。また、癌細胞に発現する Arf6 は癌転移に重要な役割を果たすことを検証している。

以上の研究背景を踏まえて、本研究では、腫瘍血管新生と癌転移を同時に抑制できる革新的抗癌剤の開発を目指して、腫瘍血管新生と癌転移を制御する Arf6 シグナル伝達機構を明らかにし、その共通分子機構をターゲットとして Arf6 シグナルを阻害できる創薬リードペプチドを創出することを目的とした。

方法

Arf6 の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ァージ表面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、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、大腸菌で発現させた Arf1、Arf5 または 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解析した。

結果および考察

1. Arf6 による癌細胞浸潤制御の分子メカニズム解析²⁾

これまでに報告されている 9 種の Arf6 特異的な GTPase-activating protein (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 細胞と比較すると、ARAP3 のみが MDA-MB-231 細胞に高発現していた。MDA-MB-231 細胞の ARAP3 をノックダウンすると、MDA-MB-231 細胞の肺転移が抑制され (図 1)、

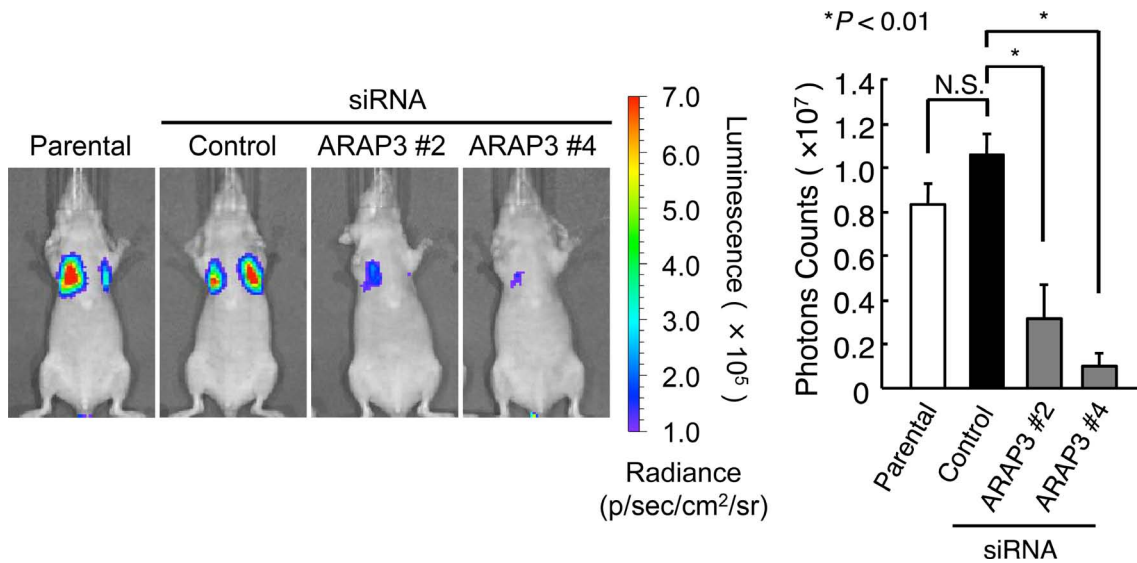


図 1. 乳癌細胞の ARAP3 は癌転移を制御する

ルシフェラーゼを安定発現させた MDA-MB-231 細胞の ARAP3 をノックダウンして BALB/c ノードマウスの尾静脈に注射し、14 日後にマウスの生物発光画像を撮影し (左図)、肺への転移を定量した。右図は平均値 ± s.e.m. を示す。統計学的解析は Tukey multiple comparison test を用いて行った。*: P < 0.05, N.S.: not significant.

in vitro での浸潤も抑制された。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明らかとなった。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た (図 2)。

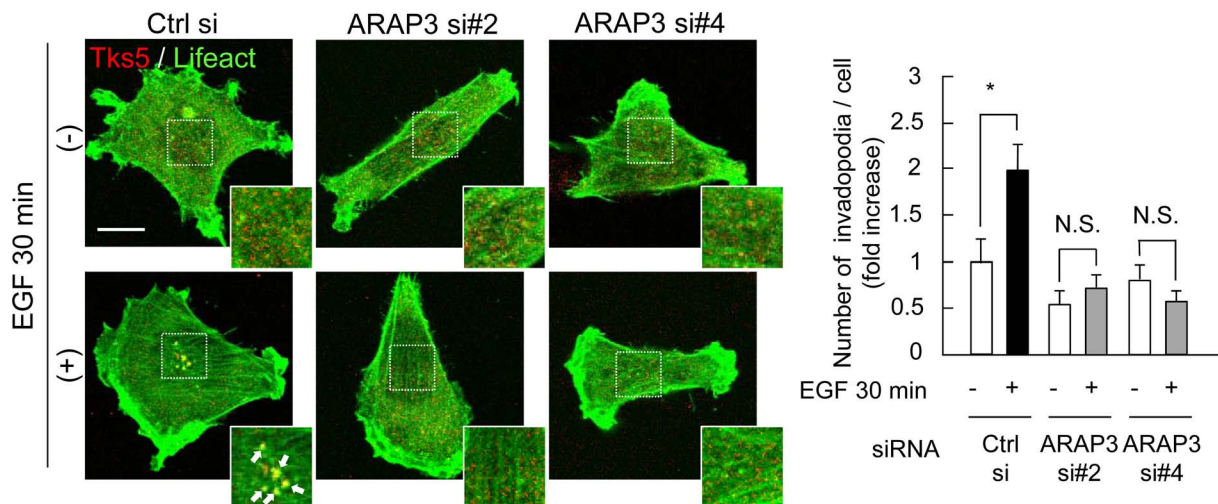


図 2. ARAP3 は浸潤仮足前駆体形成に関与する

GFP-Lifeact を発現させた MDA-MB-231 細胞の ARAP3 をノックダウンしたのちに、10 ng/ml EGF で刺激し、30 分後に抗 GFP と抗 Tks5 抗体で染色した。左図は Tks5 陽性浸潤仮足の画像。挿入図は四角で囲んだ領域の拡大画像。矢印は Tks5 陽性シグナルを示す。スケールバーは 10 μm を示す。右図は、1 回の試行につき 20 個の細胞について、Tks5 陽性浸潤仮足の数の定量し、3 回の独立な試行の平均値 ± s.e.m. を示す。統計解析は Tukey multiple comparison test を用いて行った。*: P < 0.05, N.S.: not significant.

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 PIP5K1A による膜リン脂質 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、本研究において、Arf6 が腫瘍血管新生と癌細胞の浸潤・転移の両方に重要な役割を果たしていることを検証した。

2. 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「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)。

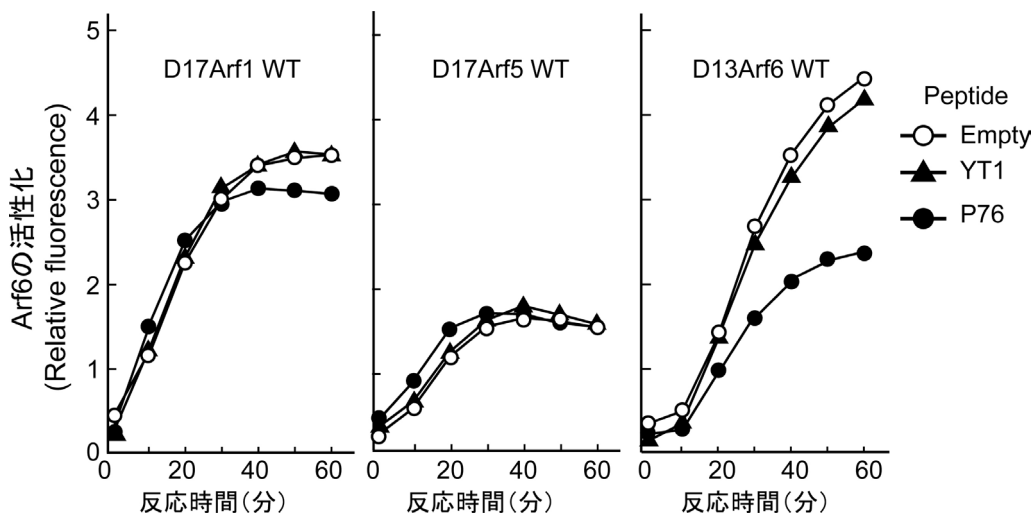


図 3. ペプチド P76 は ARF6 の活性化を特異的に抑制する

以上、本研究において、腫瘍血管新生と癌細胞の浸潤・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。

3. Arf6 のその他の機能に関する解析

上述した Arf6 の個体レベルでの生理機能以外の生理機能も解析している。その結果、表皮の角化細胞に発現している Arf6 は、皮膚の創傷治癒に関わっていることを明らかにした³⁾。すなわち、成体マウスの表皮角化細胞における Arf6 の発現量は非常に低いですが、皮膚の創傷時に肝増殖因子 (HGF) 依存的に Arf6 は角化細胞に発現して創傷治癒を促進することを見出した。

共同研究者

本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Hongu T, Funakoshi Y, Fukuhara S, Suzuki T, Sakimoto S, Takakura N, Ema M, Takahashi S, Itoh S, Kato M, Hasegawa H, Mochizuki N, Kanaho Y. Arf6 regulates tumor angiogenesis and growth through HGF-induced endothelial β integrin recycling. *Nat. Commun.* doi: 10.1038/ncomms8925 (2015).
- 2) Yamauchi Y, Funakoshi Y, Hongu T, Miura Y, Yamaguchi H, Katagiri N, Ohbayashi N, Kanaho Y. Deactivation of PIP5K1A by ARAP3 through Arf6 inactivation is essential for invadopodium precursor formation of breast cancer cells. *Dev. Cell* (submitted).
- 3) 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.* *in press*.