

論 文 概 要

論 文 題 目

癌細胞浸潤における Arf6 GTPase 活性化因子 ARAP3 の機能解析

指 導 教 員

人間総合科学研究科 生命システム医学専攻 金保安則 教授

(所 属) 筑波大学人間総合科学研究科 生命システム医学専攻

(氏 名) 山内庸平

背景・目的

癌細胞は基底膜の上皮側で増殖し始めるが、やがて浸潤能を獲得すると、基底膜を突き破って浸潤し、血管へと侵入する。癌細胞は血流に乗って他の臓器に運ばれると、血管外へと遊出する。その後到達した臓器で転移巣を形成する。

浸潤転移を行う癌細胞は浸潤仮足という細胞膜突起構造を形成する。浸潤仮足はアクチンと細胞外基質分解酵素に富む細胞膜突起構造であり、癌細胞は浸潤仮足を利用して周囲の細胞外基質を効率良く分解し、組織深部へと浸潤する。また浸潤仮足は癌細胞が血管内へ侵入、血管外へ遊出する際にも形成されることが近年明らかになってきており、浸潤仮足形成メカニズムの解明は、癌浸潤阻害薬の開発のために極めて重要である。

低分子量 G 蛋白質 **Arf6** は癌細胞浸潤に必要な分子の一つであることが知られている。**Arf6** は定常状態で GDP の結合した不活性型であるが、細胞が刺激を受容するとグアニンヌクレオチド交換因子が機能し、GTP が結合した活性型となる。活性型 **Arf6** はエフェクター分子を介して下流にシグナルを伝達し、様々な細胞機能を調節する。その後、活性型 **Arf6** は GTPase 活性化蛋白質 (GAP) によって不活性化される。興味深いことに、先行研究において癌細胞浸潤が誘導されるには、**Arf6** が活性化されることに加えて、不活性化される必要があることが示唆された。しかしながらこれまでの先行研究では、**Arf6** の活性化機構のみに焦点が当てられており、癌細胞浸潤の誘導に **Arf6** の不活性化が本当に必要であるのか、またその分子機構は未解析である。上述したように **Arf6** は GAP によって不活性化されるが、これまでに **Arf6** GAP は 9 つ同定されており、それらは細胞周囲の環境依存的に異なる細胞機能を制御すると考えられている。したがって、本研究ではこれら 9 つの **Arf6** GAP のうち、癌細胞浸潤を担う **Arf6** GAP を同定し、その機能解析を行うことで、**Arf6** 不活性化の意義、分子機構を明らかにすることを目的とした。

対象・方法

低浸潤性乳癌細胞株と高浸潤性乳癌細胞株を利用し、細胞生物学、分子生物学的手法を用いて癌細胞浸潤に必要な **Arf6** GAP の同定、機能解析を行った。

結果

1. ARAP3 は高浸潤能の癌細胞に高発現している唯一の Arf6 GAP である

癌細胞浸潤に必要な Arf6 GAP を同定するために高浸潤性乳癌細胞と低浸潤性乳癌細胞の間でこれまでに報告されている 9 つの Arf6 GAP の発現量を比較した。結果、唯一 ARAP3 のみが高浸潤性乳癌細胞に高発現していた。

2. ARAP3 は癌細胞浸潤を正に制御する

ARAP3 が転移に関与するかどうか検討するために、高浸潤性乳癌細胞株である MDA-MB-231 細胞の ARAP3 をノックダウンし、マウス肺転移アッセイを行った。その結果 ARAP3 のノックダウンは MDA-MB-231 細胞の肺転移を抑制した。次に、ARAP3 が転移の初期過程である浸潤に関与するかをトランスウェルチャンバーによる浸潤アッセイで検討した。その結果、ARAP3 が浸潤能を正に制御することが明らかとなった。

3. ARAP3 は EGF 刺激依存的な浸潤仮足形成を誘導する

ARAP3 が浸潤に重要な細胞膜構造体である浸潤仮足の形成に関与するかどうか免疫細胞染色によって検討した。その結果、ARAP3 ノックダウンにより上皮増殖因子 (EGF) 刺激依存的な浸潤仮足形成は顕著に抑制された。このことから ARAP3 は EGF 刺激依存的な浸潤仮足形成の誘導に関与することが明らかとなった。

4. ARAP3 は上皮増殖因子受容体 (EGFR) のリサイクリングを調節し、浸潤仮足形成を促進する

先行研究において、上皮増殖因子受容体 (EGFR) が細胞膜の浸潤仮足形成部位に細胞内輸送を介して集積することが浸潤仮足形成に重要であるという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 で刺激した結果、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 のノックダウンは浸潤仮足形成部位への EGFR のリサイクリングを抑制し、浸潤仮足形成を阻害すると考えられた。

5. ARAP3 はエンドソームのリン脂質組成を調節し、EGFR を含むエンドソーム膜へ EHD1 をリクルートする

ARAP3 ノックダウン細胞における EGFR のリサイクリング阻害メカニズムを解明

するため、エンドソームのくびりと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 ノックダウン細胞では EGFR 陽性エンドソームへの EHD1 のリクルートが阻害されていた。詳細な解析により、ARAP3 は Arf6 の不活性化により、EGFR 陽性エンドソームにおける Arf6 下流分子 PIP5K1A による膜リン脂質 PI(4,5)P₂ 産生を負に制御し、それによって 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。

考察

本研究によって、癌細胞浸潤に必要な Arf6 GAP として ARAP3 を同定し、さらに ARAP3 が浸潤仮足形成に関与することを明らかにした。詳細な解析により、ARAP3 による Arf6 の不活性化は、EGFR 陽性エンドソーム膜のリン脂質である PI(4,5)P₂ 産生を負に制御し、EHD1 をエンドソームにリクルートする働きをすることが明らかになった。EHD1 が EGFR 陽性エンドソームのくびりとりを行う結果、細胞膜の浸潤仮足形成部位への EGFR のリサイクリングが促進され、浸潤仮足形成が誘導されると考えられる。

結論

本研究において、癌細胞浸潤が誘導されるためには Arf6 の活性化のみならず、Arf6 GAP である ARAP3 による Arf6 不活性化も必要であることを示した。さらに ARAP3 の詳細な機能解析によって浸潤仮足形成最初期の分子メカニズムを新たに解明した。本研究によって得られた知見は、癌細胞浸潤転移メカニズムの理解、そして新たな癌浸潤阻害薬の開発に寄与するものであると考えられる。