

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22117005

研究課題名(和文) Aktキナーゼによるアクチン結合蛋白Girdinのリン酸化修飾と疾患

研究課題名(英文) Roles of Girdin phosphorylation by Akt kinase in human diseases

## 研究代表者

高橋 雅英 (Takahashi, Masahide)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40183446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 102,800,000円

研究成果の概要(和文)：Girdinの機能、特にAktによるリン酸化が発生期でなく、生後あるいは成体期における血管新生および神経新生に重要であり、かつそれらの破綻が血管性網膜疾患、精神疾患、がんの進展に関わることを細胞レベル、個体レベルの研究により明らかにした。Aktリン酸化サイトに変異を導入したノックインマウスを用いて、GirdinのAktによるリン酸化が、がん組織周囲へ遊走するcancer-associated fibroblasts(CAFs)の機能を介したがんの進展、神経膠芽腫の増殖、浸潤能、さらに血管障害による血管内膜肥厚(血管平滑筋の内膜への遊走による)などに関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found that girdin and its phosphorylation play important roles in cell migration of cancer cells, endothelial cells and neuronal cells. Thus, girdin's function influences pathophysiology of human diseases such as cancer progression and vascular disease. Girdin is an actin-binding protein and is phosphorylated at serine 1416 by Akt. In this project, we generated knock-in mice in which serine1416 in girdin was replaced with alanine. Using knock-in mice, we demonstrated that Akt-girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression. In addition, Akt-girdin signaling in vascular smooth muscle cells was shown to be important for neointima formation after vascular injury. We also found that this signaling is crucial for growth and invasion of glioblastoma cells in vitro and in vivo. These findings suggest that Akt-girdin signaling becomes new therapeutic target for treatment of cancer and vascular disease.

研究分野：実験病理学

キーワード：Girdin Aktキナーゼ がんの進展 がん微小環境 網膜血管新生 血管内膜肥厚 神経新生

## 1. 研究開始当初の背景

細胞が分化やがん化の過程で、形態を変化させたり、栄養因子や微小環境に応答して運動するためには、アクチン線維などの細胞骨格の再編成、およびリン酸化によるタンパク質の機能調節が重要な役割を果たしている。私達はセリン/スレオニンキナーゼ Akt の新規基質として Girdin (girders of actin filaments) と名付けたアクチン結合タンパク質を同定し、培養細胞とノックアウトマウスを用いてその機能を解析してきた (Dev. Cell, 2005; Cancer Sci., 2010)。Girdin は Akt によるリン酸化で機能制御を受ける他、様々な分子と相互作用することで、血管新生、神経新生およびがんの進展など様々な現象における細胞運動を制御している。さらに興味深いことにノックアウトマウスの解析から、Girdin の機能は胎生期の発生には重要でなく、生後から成体期において観察される血管新生 (postnatal angiogenesis) および神経幹細胞からの神経新生 (postnatal/adult neurogenesis) に特異的に関与していることを明らかにした (Nat. Cell Biol., 2008; Neuron, 2009)。このことは、他の多くの細胞骨格関連タンパク質群が発生に重要であり、それらのノックアウトマウスが胎生致死であることと非常に対照的である。

上記の研究結果から、Girdin およびその関連タンパク質群がヒトの生後、とくに成体(人)期における疾患の病態に関連する可能性は高い。実際に最近の研究により Girdin は、(1) 生後の網膜における血管新生を制御しており、未熟児網膜症、糖尿病性網膜症との関連、(2) 生後脳における神経新生を制御しており、統合失調症をはじめとした精神疾患との関連、さらに(3)がん組織およびがん幹細胞に発現し、がんの進展、とくに局所浸潤や転移との関連が明らかとなった (Cancer Res., 2008; Nat. Cell Biol., 2008; Neuron, 2009)。

## 2. 研究の目的

以上の背景をもとに、「生後あるいは成体期の生命現象に特異的な分子群あるいは分子機能修飾機構が存在し、その破綻が血管性疾患、精神疾患、発がんの病態に関わっている」という仮説に至り、本研究計画を立案した。本研究の目的は、「Girdin の機能およびリン酸化制御機構の研究を通して、新生仔(児)期と成体期における細胞運動・移動の分子メカニズムと関連疾患の病態を解明すること」にある。具体的には(1) Girdin およびそのリン酸化による血管新生の制御と網膜疾患(未熟児網膜症、糖尿病性網膜症)および腫瘍進展の病態解明、(2) 新生仔(児)期および成体期の神経新生における Girdin の機能解析と病態への関わり、(3) がん幹細胞の分化・自己複製能、がんの進展における Girdin およびその修飾機構の役割、(4) Girdin の interactome の同定と細胞内における Girdin の分子機能の解明である。以上の研究を通して、生後の生命現象を制御するより普遍的な

分子ネットワークおよび細胞内シグナル伝達機構を明らかにしたい。

## 3. 研究の方法

(1) Girdin の Akt リン酸化部位に変異を導入したマウスの作成と表現系解析

Girdin の Akt リン酸化部位である 1416 番目のセリンをアラニンに置換したマウス(以下 SA マウス)における血管新生を解析する。SA マウスを用いて生後の網膜における血管新生を検討する。Girdin およびそのリン酸化が病態に関わる影響を調べるため、未熟児網膜症のモデルとして知られる酸素誘発網膜症モデルの実験系を導入する。すなわち新生仔期マウスを 75% 程度の高濃度酸素状況下に 5 日間曝露し、さらに通常環境下で 5 日間飼育する。その後経時的に網膜を摘出し、異常血管新生の程度を野生型と SA マウスの両群で比較する。網膜血管における Girdin の発現とリン酸化の時空間的な解析を行う。

血管内膜障害モデルを用いて、Girdin のリン酸化が内膜肥厚に及ぼす影響について解析する。さらに、SA マウスに腫瘍を移植し、腫瘍微小環境における Girdin のリン酸化が腫瘍増殖に及ぼす影響を解析する。

(2) 脳室下帯の神経幹細胞移動における Girdin の機能解析・コンディショナルノックアウトマウスの作成

Girdin ノックアウトマウスは 4 週齢程で死亡するため、成体期における神経新生や精神疾患の基盤となる中間表現系の解析(行動解析など)が不可能である。本研究ではタモキシフェン投与により Girdin の発現を制御できるコンディショナルノックアウトマウスを作成し、その表現系を解析する。このために Girdin 遺伝子の開始コドンを含む exon1 領域の前後に loxP サイトを、また intron2 に Flp 発現によって除去できる neomycin 耐性遺伝子を導入するターゲティングベクターを作成し、本ベクターを導入した ES 細胞クローンを得る。この ES 細胞を用いて作成されたマウスを利用し、形態学的解析を行う。

(3) がん幹細胞における Girdin の発現と制御機構

現在までに神経膠芽腫のがん幹細胞(BTSC)で Girdin の発現が高いことが明らかとなっている。2004 年に Peter B. Dirks らによって報告された方法 (Nature, 432, 396-401, 2004) に従って CD133 陽性の BTSC を樹立し、BTSC を血清存在下で浸潤性膠芽腫に分化させた状態で、Girdin の発現変化および浸潤能獲得における Girdin の機能を検討する。培養ディッシュ上の細胞運動能をタイムラプス装置で検討する他、腫瘍細胞を脳スライス上あるいはステレオタキシスで脳内に移植し、その局所浸潤能を定量的に測定する。各種変異体の導入実験により BTSC の分化および自己複製における Girdin の Akt リン酸化の意義も検討する。

## 4. 研究成果

(1) Girdin の Akt リン酸化部位変異マウスの

## 作成と表現系解析

酸素誘発網膜症モデルにおける病的血管新生におけるリン酸化 Girdin の役割

新生仔期マウスを 75%程度の高濃度酸素状況下に 5 日間曝露し、さらに通常環境下で 5 日間飼育した。その後経時的に網膜を摘出し、異常血管新生の程度を野生型と Akt によるリン酸化部位セリン 1416 をアラニン置換したマウス (SA マウス) の両群で比較した。SA マウスでは異常血管新生の程度は有意に低下しており、Girdin の Akt によるリン酸化が病的血管新生において重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに VEGF を網膜に過剰発現するトランスジェニックマウスにおける病的血管新生についても、SA マウスと交配することにより、有意に低下することが判明した。

またラットの頸動脈内膜障害モデルを用いて、Girdin のリン酸化が内膜肥厚を引き起こす血管平滑筋の遊走に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

リン酸化 Girdin の腫瘍微小環境における役割

腫瘍微小環境におけるリン酸化 Girdin の意義を検討するため、がん細胞を野生型マウスと SA マウスの皮下に移植して、腫瘍増殖を比較した。SA マウスにおいて、腫瘍の増大が有意に抑制されており、腫瘍組織に存在するがん関連線維芽細胞の数も有意に少なかった。腫瘍血管量は両群で有意差が見られなかったことより、血管内皮細胞ではなく、がん関連線維芽細胞内における Akt シグナルが腫瘍の進展に寄与していることが示唆された。SA マウスから得られた線維芽細胞やがん関連線維芽細胞とがん細胞をマウスへ移植すると、野生型マウスからの線維芽細胞やがん関連線維芽細胞を用いた群と比較して、腫瘍の増大が抑えられ、がん関連線維芽細胞内における Akt-Girdin シグナルが腫瘍の進展に寄与していることを支持する結果となった。

(2) 脳室下帯の神経幹細胞移動における Girdin の機能解析・コンディショナルノックアウトマウスの作成

神経幹細胞の移動における Girdin と Par-3 の機能関連性の解析

Girdin のノックアウトマウスでは脳室下帯で発生する神経前駆細胞が嗅球へ向かう移動の障害が観察され、嗅球の形成異常が生じることが明らかになっている。その移動経路である rostral migratory stream (RMS) における神経前駆細胞の形態を観察すると、必ずしも嗅球への方向性を示さず細胞極性に異常が生じている可能性が示唆された。そこで細胞の極性決定に重要な役割を果たすことが知られている Par-3 と Girdin との機能関連性について検討した。

まず HEK293 細胞を用いて内在性 Par-3 と Girdin の結合を免疫沈降法で検討した結果、細胞内での両者の結合を確認した。両者の結

合には、Par-3 の C 末端領域および Girdin の C 末端領域が必要な領域であることが判明した。両者の結合能は Akt による Girdin のリン酸化により影響をうけなかった。つぎに、両者の細胞内局在を Vero 線維芽細胞を用いた蛍光抗体法にて調べたところ、EGF で刺激を行うと両蛋白は運動する細胞の先端端に形成されるラメリポディアの部分に局在した。Girdin の細胞極性における役割を明らかにするため、Girdin の発現をノックダウンした際の遊走細胞におけるゴルジ体の位置異常について wound healing 法により検討した。通常ゴルジ体は運動する細胞の核の運動方向側に局在するが、Girdin あるいは Par-3 をノックダウンすると 50%以上の細胞にゴルジ体の位置異常が認められ、Girdin が細胞極性にも関与していることが示唆された。さらに細胞極性と関連することが知られている 3 次元培養による MCF10A 乳腺上皮細胞の管腔形成能における Girdin の役割を検討した。Girdin の発現をノックダウンすると Par-3 をノックダウンした時と同様に、MCF10A 細胞の管腔形成能が著しく低下し、シート状に細胞が増殖するようになった。以上に結果より、Girdin は Par-3 と相互作用することにより細胞極性に決定に重要な役割を果たしていることが示唆された。

神経特異的 Girdin コンディショナルマウスの作成

Girdin<sup>+/+</sup>-マウスの LacZ 染色による全身における Girdin の発現を検索した。その結果、中枢神経系、自律神経系、腸管神経系を含む広範な神経細胞、一部の血管、腱や心臓弁などに Girdin の発現が強く見られた。そこで神経系における Girdin の発現の意義をさらに明らかにするため、Girdin flox: nestin Cre マウスを用いた神経系特異的コンディショナルノックアウトマウス (Girdin cKO) を作製した。Girdin cKO マウスでは歯状回顆粒層神経細胞の分散や rostral migratory stream (RMS) の拡大を伴う嗅球の低形成が見られ、生後 1 か月以内に全例が死亡するという Girdin KO マウスとほぼ同じ表現型を示した。この結果は Girdin の nestin 系列細胞での発現が生体内での生理機能にとって重要であることを証明した。

(3) がん幹細胞における Girdin の発現と制御機構

神経膠芽腫 (グリオーマ) において PI3K-Akt シグナル伝達系が活性化されていることが報告されている。摘出されたグリオーマから sphere 形成能を指標に樹立された細胞株を用いて、腫瘍細胞の増殖、浸潤能と幹細胞マーカー遺伝子の発現における Girdin の役割を解析した。Girdin の発現を short hairpin RNA によりノックダウンした細胞株を樹立し、マウス脳スライス上で浸潤能を検討したところ、Girdin をノックダウンしたグリオーマ細胞では浸潤能が著明に低下した。またマウス脳内に移植したノックダウン細胞は生体

内における腫瘍形成能が減弱し、長期生存が可能であった。さらに Girdin ノックダウングリオーマ細胞では幹細胞マーカーである CD133, nestin, Oct-4, Sox2 などの遺伝子発現が減弱し、腫瘍幹細胞性の維持に Girdin が関わっていることを示唆した。

#### 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 17 件)

Yamamura, Y., Asai, N., Enomoto, A., Kato, T., Mii, S., Kondo, Y., Ushida, K., Niimi, K., Tsunoda, N., Nagino, M., Ichihara, S., Furukawa, K., Maeda, K., Murohara, T. and Takahashi, M.

Akt-Girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression. **Cancer Res.** 75: 813-823 (2015). 査読有

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1317

Nakai, T., Nagai, T., Tanaka, M., Itoh, N., Asai, N., Enomoto, A., Asai, M., Yamada, S., Saifullah, A.B., Sokabe, M., Takahashi, M. and Yamada, K.

Girdin phosphorylation is crucial for synaptic plasticity and memory: Potential role in the interaction of BDNF/TrkB/Akt signaling with NMDA receptor. **J. Neurosci.** 34: 14995-15008 (2014). 査読有

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2228-14.2014

Weng, L., Enomoto, A., Miyoshi, H., Takahashi, K., Asai, N., Morone, N., Jiang, P., An, J., Kato, T., Kuroda, K., Watanabe, T., Asai, M., Ishida-Takagishi, M., Murakumo, Y., Nakashima, H., Kaibuchi, K. and Takahashi, M.

Regulation of cargo-selective endocytosis by dynamin 2 GTPase-activating protein girdin. **EMBO J.** 33: 2098-2112 (2014). 査読有

DOI: 10.15252/embj.201488289

Ota, H., Hikita, T., Sawada, M., Nishioka, T., Matsumoto, M., Komura, M., Ohno, A., Kamiya, Y., Miyamoto, T., Asai, N., Enomoto, A., Takahashi, M., Kaibuchi, K., Sobue, K. and Sawamoto, K.

Speed control for neuronal migration in the postnatal brain by Gmip-mediated local inactivation of RhoA. **Nat. Commun.** July 30;5:4532 (2014). 査読有

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.126

Miyachi, H., Mii, S., Enomoto, A., Murakumo, Y., Kato, T., Asai, N., Komori, K. and Takahashi, M.

Role of Girdin in intimal hyperplasia in vein grafts and efficacy of atelocollagen-mediated application of siRNA for vein failure. **J. Vasc. Surg.** 60:479-489.e5 (2014). 査読有

DOI: 10.1016/j.jvs.2013.06.080

Ito, T., Komeima, K., Yasuma, T., Enomoto, A., Asai, N., Iwase, S., Takahashi, M. and Terasaki, H.

Girdin and its phosphorylation dynamically regulate neonatal vascular development and pathological neovascularization in the retina. **Am. J. Pathol.** 182: 586-596 (2013). 査読有

DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.10.012

An, J., Enomoto, A., Weng, L., Kato, T., Iwakoshi, A., Ushida, K., Maeda, K., Ishida-Takagishi, M., Ishii, G., Ming, S., Sun, T. and Takahashi, M.

Significance of cancer-associated fibroblasts in the regulation of gene expression in the leading cells of invasive lung cancer. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** 139: 379-388 (2013). 査読有

DOI: 10.1007/s00432-012-1328-6

Mao, J.-Z., Jiang, P., Cui, S.-P., Ren, Y.-L., Zhao, J., Yin, X.-H., Enomoto, A., Liu, H.-J., Hou, L., Takahashi, M. and Zhang, B.

Girdin locates in centrosome and midbody and plays an important role in cell division. **Cancer Sci.** 103: 1780-1787 (2012). 査読有

DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02378.x

Asai M., Asai, N., Murata, A., Yokota, H., Ohmori, K., Mii, S., Enomoto, A., Murakumo, Y. and Takahashi, M.

Similar Phenotypes of Girdin germ-line and conditional knockout mice indicate a crucial role for Girdin in the nestin lineage. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 426: 533-538 (2012). 査読有

DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.08.122

Ishida-Takagishi, M., Enomoto, A., Asai, N., Ushida, K., Watanabe, T., Hashimoto, T., Kato, T., Weng, L., Matsumoto, S., Asai, M., Murakumo, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A. and Takahashi, M.

The Dishevelled-associating protein Daple controls the non-canonical Wnt/Rac pathway and cell motility. **Nature Commun.** May 29 3: 859 (2012). 査読有

DOI: 10.1038/ncomms1861

Ohara, K., Enomoto, A., Kato, T., Hashimoto, T., Isotani-Sakakibara, M., Asai, N., Ishida-Takagishi, M., Weng, L., Nakayama, M., Watanabe, T., Kato, K., Kaibuchi, K., Murakumo, Y., Hirooka, Y., Goto, H. and Takahashi, M.

Involvement of Girdin in the determination of cell polarity during cell migration. **PLoS One** 7: e36681 (2012). 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0036681

Natsume, A., Kato, T., Kinjo, S., Enomoto, A., Toda, H., Shimato, S., Ohka,

F., Motomura, K., Kondo, Y., Miyata, T., Takahashi, M. and Wakabayashi, T.

Girdin maintains the stemness of glioblastoma stem cells. **Oncogene** 31: 2715-2724 (2012). 査読有  
DOI: 10.1038/onc.2011.466

Wang, Y., Kaneko, N., Asai, N., Enomoto, A., Isotani-Sakakibara, M., Kato, T., Asai, M., Murakumo, Y., Ota, H., Hikita, T., Namba, T., Kuroda, K., Kaibuchi, K., Ming, G., Song, H., Sawamoto, K. and Takahashi, M. Girdin is an intrinsic regulator of neuroblast chain migration in the rostral migratory stream of the postnatal brain. **J. Neurosci.** 31: 8109-8122 (2011). 査読有

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1130-11.2011

Miyake, H., Maeda, K., Asai, N., Shibata, R., Ichimiya, H., Isotani-Sakakibara, M., Yamamura, Y., Kato, K., Enomoto, A., Takahashi, M. and Murohara, T.

The actin-binding protein Girdin and its Akt-mediated phosphorylation regulate neointima formation after vascular injury. **Circ. Res.** 108: 1170-1179 (2011). 査読有  
DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.236174

Matsushita, E., Asai, N., Enomoto, A., Kawamoto, Y., Kato, T., Mii, S., Maeda, K., Shibata, R., Hattori, S., Hagikura, M., Takahashi, k., Sokabe, M., Murakumo, Y., Murohara, T. and Takahashi, M.

Protective role of Gipie, a Girdin family protein, in endoplasmic reticulum stress responses in endothelial cells. **Mol. Biol. Cell.** 22: 736-747 (2011). 査読有

DOI: 10.1091/mbc.E10-08-0724

Yamaguchi, M., Suyari, O., Nagai, R. and Takahashi, M.

dGirdin a new player of Akt /PKB signaling in Drosophila Melanogaster. **Front Biosci.** 15: 1164-1171 (2010). 査読有

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20515748>

Weng, L., Enomoto, A., Ishida-Takagishi, M., Asai, N. and Takahashi, M.

Girding for migratory cues: Role of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis. **Cancer Sci.** 101: 836-842 (2010). 査読有

DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01487.x

〔学会発表〕(計 7 件)

Takahashi, M.

Akt/girdin signaling in cancer progression

2nd International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. (The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo)

January 23-24, (2015).

Takahashi, M., Enomoto, A. and Asai, N.

Roles of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis.

International Symposium on Nanomedicine (Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya)

January 13-14, (2014).

Takahashi, M.

Roles of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis.

Joint meeting of the Medical School of Nagoya University and the University of Adelaide (Faculty of Health Sciences, The University of Adelaide, Adelaide, Australia)

May 27, (2013).

Takahashi, M.

Roles of the Akt substrate Girdin in cell motility.

1st International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. (The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo)

February 1-2, (2013).

Takahashi, M.

Roles of the Akt substrate Girdin in tumor progression, angiogenesis and neurogenesis.

Minisymposium Neurosciences

Joint meeting of the Medical School of Nagoya University and the Medical University of Vienna. (Center for Brain Research, Medical University of Vienna, Vienna, Austria)

January 28, (2013).

Takahashi, M.

Roles of the Akt substrate Girdin in cancer progression, angiogenesis and Neurogenesis.

Global Center of Excellence (COE) Program, The 4th International Symposium: Global COE symposium on Neuro-Tumor Biology and Medicine. (Westin Nagoya Castle, Nagoya) November 15-16, (2012).

Takahashi, M.

Roles of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis.

Global Center of Excellence (COE) Program, The 3rd International Symposium: New trends in basic and clinical cancer research for innovative Therapy. (Midland Hall, Nagoya).

December 8-9, (2011).

〔その他〕

ホームページ

<http://shushoku-signal.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 雅英 (TAKAHASHI MASAHIDE)  
名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：40183446

### (2) 研究分担者

榎本 篤 (ENOMOTO ATSUSHI)  
名古屋大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：20432255

### (3) 連携研究

浅井 直也 (ASAI NAOYA)  
名古屋大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：80273233