

令和元年8月30日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08574

研究課題名(和文) 低分子量Gタンパク質Ralによる癌化、浸潤・転移の分子機構

研究課題名(英文) Molecular Mechanisms of Tumorigenesis, Invasion, and Metastasis by the Small GTPase Ral

研究代表者

白川 龍太郎 (Ryutaro, Shirakawa)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：50581039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低分子量GTP結合タンパク質Ralの異常によるがん化、がん悪性化の分子メカニズムを解析した。RalGAPの発現低下によるRalの恒常的な活性化が、口腔扁平上皮がん細胞や膵臓がん細胞の遊走、浸潤の促進に関わっていることを明らかにした。また、口腔がん組織においてRalGAP 2の発現が低下しており、プロモーター領域のDNA、ヒストン修飾が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rasファミリーの低分子量Gタンパク質Ralは、多くのがんで活性化されており、その阻害剤が開発される(Yan et al. Nature, 2014)など非常に注目されている。本研究ではRalの抑制性調節因子であるRalGAPの発現が、がんにおいて転写レベルで低下しており、それがRalの高度な活性化につながることを示した。Ralの機能制御機構の理解は新しいタイプの抗がん薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the molecular mechanisms of oncogenesis by activation of the small GTPase Ral. Constitutive activation of Ral by the reduction of RalGAP expression is involved in promoting the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma cells and pancreatic cancer cells. In addition, expression of RalGAP 2 is reduced in oral cancer tissue, possibly due to DNA and histone modifications in the promoter region of RalGAP 2 gene.

研究分野：生化学

キーワード：Ral RalGAP Ras 口腔扁平上皮がん 膵臓がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Ral は Ras ファミリーの低分子量 G タンパク質であり、哺乳類では RalA と RalB が存在する。他の G タンパク質と同様に、Ral は GTP が結合した活性型と GDP が結合した不活性型の 2 つの立体構造をとる。Ral の活性化は RalGEF (Ral guanine nucleotide exchange factor) により、不活性化は RalGAP (Ral GTPase-activating protein) により制御される。RalGDSをはじめ、多くの RalGEF は GEF ドメインに加え Ras 結合ドメインをもち Ras の直接結合により活性化される。したがって、Ral は Ras 下流において活性化され、Raf 経路、PI3 キナーゼ経路とともに主要な Ras エフェクター経路を構成する。Robert Weinberg らは Ral 経路の活性化が Ras により誘導されるヒト細胞のがん化に必須であることを示している (Rangarajan et al, Cancer Cell, 2004)。この Ras 誘導性のがん化には RalA が主要な役割をはたす (Lim et al, Cancer Cell, 2005)。Ral 経路はがん化のみならず、浸潤・転移にも関わっており前立腺がん細胞の実験骨転移に重要であることなどが知られている (Yin et al, MCB, 2007)。さらに、RalGDS のノックアウトマウスが Ras 依存性の化学皮膚発がんモデルに抵抗性を示すこと (Gonzalez-Garcia et al, Cancer Cell, 2005) など、in vivo においても Ral と癌化、浸潤・転移との関連を示す知見は蓄積している。また、研究代表者らは浸潤性膀胱がん組織で異常な Ral の活性化が見られること (Saito et al, Oncogene, 2013) を報告している。しかしながら、がん組織における Ral 活性化のメカニズムや、がん化、浸潤・転移を担う Ral 下流経路の分子メカニズムについては未知の部分が多い。

研究代表者はこれまで、Ral の抑制因子 RalGAP を初めて分子同定し、解析を進めてきた。RalGAP は、GAP ドメインを持ち約 2000 残基からなる 触媒サブユニットと、約 1500 残基からなる 共通サブユニットからなるヘテロ複合体である。サブユニットには約 55% の相同性をもつ 2 つの相同体 RalGAP 1 および RalGAP 2 が存在し、それぞれが サブユニットと複合体を形成する (1・複合体および 2・複合体)。RalGAP は結節性硬化症の原因遺伝子産物であり、Rheb の GAP としてはたらく tuberous sclerosis complex (TSC) に構造上の類似性を持つ。RalGAP の活性制御機構、またその生体における役割については多くが未知である。

### 2. 研究の目的

現在までの多くの知見が、Ral の恒常的な活性化と、がん化、がん悪性化との関連を示している。しかし、それらの多くは培養細胞レベルで示されたものであり、生体レベルあるいは実際のヒトがん検体を用いた解析は少ない。また、がん組織における Ral の恒常的な活性化の分子機構については多くが不明である。本研究では、口腔扁平がん組織や、膵臓がん組織を用いて Ral の活性化や、RalGAP の発現を解析し、がんにおける Ral 活性化の分子メカニズムを明らかにする。

また、研究代表者が分子同定した RalGAP の膵臓組織特異的コンディショナルノックアウトマウスを用い、K-Ras 誘導性膵臓がんの浸潤・転移における Ral の役割について生体を用いて解析する。

Ral のエフェクター分子としては RalBP1 や Sec5 (Exocyst 複合体) などが知られているが、がん化、がんの浸潤・転移に関わる直接の Ral 下流経路に関しては明らかになっていない。本研究では恒常的な活性化型 Ral を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより、がん化を担う Ral 下流分子の同定とその分子作用メカニズムを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 口腔扁平上皮がん細胞、膵臓がん細胞における Ral、RalGAP の解析

本研究では、まず口腔扁平上皮がん細胞株、膵臓がん細胞株を用い、ウェスタンブロット、定量 PCR により、これらの細胞における RalGAP の発現を解析する。また、Sec5 の Ral 結合ドメインを用いたプルダウンアッセイにより、細胞中の GTP 型 RalA、RalB の量を定量する。

RalGAP の喪失にともなう Ral の恒常的な活性化が細胞の遊走や浸潤性に与える影響を解析し、さらに、これらの細胞をヌードマウスに移植することで、in vivo での細胞増殖、浸潤・転移能を評価する。また、Ral の活性化にともなう遺伝子発現変化を明らかにするためにマイクロアレイや RNA seq による遺伝子発現解析を行う。

#### ヒトがん検体を用いた Ral、RalGAP の解析

口腔がん、膵臓がん組織切片を抗 RalGAP 抗体により免疫染色し、がん組織における RalGAP の発現を解析する。また、がん検体を用いたプルダウンアッセイによりがん組織中での Ral の活性化を解析する。さらに、がん細胞、がん組織での RalGAP 遺伝子プロモーター領域のメチル化、ヒストン修飾等を次世代シーケンスやクロマチン免疫沈降法により解析する。

#### RalGAP ノックアウトマウスを用いた解析

RalGAP 複合体の 共通サブユニットのノックアウトマウスは早期胎生致死であった。サブユニットの GAP 活性には サブユニットとの複合体化が必要であるためと考えられた。本研究で

は、早期致死性を回避するために、膵臓組織特異的 RalGAP コンディショナルノックアウトマウスを樹立し、膵臓がんの発生、浸潤・転移に Ral、RalGAP が与える影響を生体を用いて解析する。

#### 4. 研究成果

##### 口腔がん細胞における RalGAP の解析

口腔がん細胞株で RalGAP をノックダウンすると GTP 型 Ral の量が増加し、細胞遊走と浸潤が促進された。逆に RalGAP の過剰発現により細胞遊走、浸潤は抑制された。口腔がん患者検体を用いた免疫組織化学的解析により、口腔がん組織で RalGAP 2 の発現が低下していることを見出した。RalGAP 2 発現の低下は低い生存率に相関していた。口腔がん細胞株、がん検体を用いた解析によりプロモーター領域の DNA メチル化、ヒストン H4Ac、H3K27Me 修飾が RalGAP 2 の発現抑制に関連していることが示唆された(論文投稿中)。

##### 膵臓がん細胞における RalGAP の解析

膵臓がん細胞株 Panc-1、MIA PaCa-2 を用いて RalGAP 各遺伝子を CRISPR/Cas9 によりノックアウトした。RalGAP ノックアウト細胞では、GTP 型 RalA、RalB の量が増加し、高い遊走、浸潤能を示した。マイクロアレイによる解析で、RalGAP のノックアウトにより発現が変動する遺伝子を複数確認した。また、これらの細胞を、ヌードマウス皮下に移植することで in vivo での増殖能を解析した。さらにルシフェラーゼ導入細胞をヌードマウス膵臓に移植し、in vivo での浸潤・転移に Ral、RalGAP が与える影響を解析した。また、ヒト膵臓がん検体を用いた解析では、正常組織に比べ膵臓がん組織において活性化型 Ral の量が増加している傾向が見られた。これらの結果は現在、論文作成中である。

##### RalGAP コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析

膵臓特異的に RalGAP 活性を喪失させるために RalGAP flox マウスと膵臓特異的 cre リコンビナーゼ発現マウス (Pdx1 cre、Ptf1a cre) を交配した。さらに、cre リコンビナーゼ依存性に K-Ras を発現するマウスと交配することで K-Ras 誘導性の膵臓発がん、がん悪性化における Ral、RalGAP の役割を解析中である。

##### Ral エフェクターの解析

がん化に関わる Ral の下流シグナリング経路を明らかにするために、ラット脳細胞質より RalA 結合複合体を精製し、質量分析法により分子同定した。これらの結合因子はエンドサイトーシスに参与する可能性が予想され、がん化、がん悪性化との関わりを解析中である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

C2 Domains of Munc13-4 Are Crucial for Ca<sup>2+</sup>-Dependent Degranulation and Cytotoxicity in NK Cells. Bin NR, Ma K, Tien CW, Wang S, Zhu D, Park S, Turlova E, Sugita K, [Shirakawa R](#), van der Sluijs P, Horiuchi H, Sun HS, Monnier PP, Gaisano HY, Sugita S. *J Immunol*. 2018 Jul 15;201(2):700-713. doi: 10.4049/jimmunol.1800426. Epub 2018 Jun 8. PMID:29884704

Human CTL-based functional analysis shows the reliability of a munc13-4 protein expression assay for FHL3 diagnosis. Shibata H, Yasumi T, Shimodera S, Hiejima E, Izawa K, Kawai T, [Shirakawa R](#), Wada T, Nishikomori R, Horiuchi H, Ohara O, Ishii E, Heike T. *Blood*. 2018 May 3;131(18):2016-2025. doi: 10.1182/blood-2017-10-812503. Epub 2018 Mar 16. PMID:2954917

Metformin directly binds the alarmin HMGB1 and inhibits its proinflammatory activity. Horiuchi T, Sakata N, Narumi Y, Kimura T, Hayashi T, Nagano K, Liu K, Nishibori M, Tsukita S, Yamada T, Katagiri H, [Shirakawa R](#), Horiuchi H. *J Biol Chem*. 2017 May 19;292(20):8436-8446. doi: 10.1074/jbc.M116.769380. Epub 2017 Apr 3. PMID:28373282

A CD57+ CTL Degranulation Assay Effectively Identifies Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Type 3 Patients. Hori M, Yasumi T, Shimodera S, Shibata H, Hiejima E, Oda H, Izawa K, Kawai T, Ishimura M, Nakano N, [Shirakawa R](#), Nishikomori R, Takada H, Morita S, Horiuchi H, Ohara O, Ishii E, Heike T. *J Clin Immunol*. 2017 Jan;37(1):92-99. doi: 10.1007/s10875-016-0357-3. Epub 2016 Nov 28. PMID:27896523

〔学会発表〕(計 3 件)

蛍光蛋白質融合 Golgin を用いたゴルジ内膜輸送機構の解析 後藤孝太 白川龍太郎、堀内久徳 第 90 回日本生化学会大会 (2018)  
Metformin directly binds the alarmin HMGB1 and inhibits its proinflammatory activity. Natsumi Sakata, Takahiro Horiuchi, Yoshihiro Narumi, Tomohiro Kimura, Takashi Hayashi, Keisuke Nagano, Keyue Liu, Masahiro Nishibori, Sohei Tsukita, Tetsuya Yamada, Hideki Katagiri, Ryutaro Shirakawa, and Hisanori Horiuchi. 第 90 回日本生化学会大会 (2017)  
Metformin directly binds the alarmin HMGB1 and inhibits its proinflammatory activity. Natsumi Sakata, Takahiro Horiuchi, Yoshihiro Narumi, Tomohiro Kimura, Takashi Hayashi, Keisuke Nagano, Keyue Liu, Masahiro Nishibori, Sohei Tsukita, Tetsuya Yamada, Hideki Katagiri, Ryutaro Shirakawa, and Hisanori Horiuchi. 12th International Symposium of the Institute Network (2017)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
東北大学加齢医学研究所基礎加齢研究分野  
<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/mcb/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

白川 龍太郎 (SHIRAKAWA, RYUTARO)  
東北大学・加齢医学研究所・助教  
研究者番号：50581039

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。