

平成21年4月30日現在

| | |
|-----------------------|---|
| 研究種目：若手研究(A) | |
| 研究期間：2006～2008 | |
| 課題番号：18689904 | |
| 研究課題名（和文） | 新規Akt基質Girdinとそのファミリー分子の腫瘍浸潤および発生における役割 |
| 研究課題名（英文） | Roles of the novel Akt substrate Girdin and its family of proteins in development and tumor progression |
| 研究代表者 | |
| 榎本 篤(Atsushi Enomoto) | |
| 名古屋大学・高等研究院・特任講師 | |
| 研究者番号：20432255 | |

研究成果の概要：

Akt リン酸化酵素は細胞の増殖・分化にとって重要な分子であり、その異常活性化は細胞の癌化を誘導する。Akt が悪性腫瘍の浸潤や転移を促進するメカニズムの解明は治療法開発にも直結する重要課題である。近年私達が同定した Akt の新規基質「Girdin」は細胞骨格の制御分子である。本研究では悪性腫瘍の進展における Akt/Girdin シグナル伝達系の意義を解明した。また Girdin およびそのファミリー分子 Daple の遺伝子改変動物を作成し、生体内における各分子の意義について検討した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2006年度 | 6,500,000 | 0 | 6,500,000 |
| 2007年度 | 8,600,000 | 2,580,000 | 11,180,000 |
| 2008年度 | 7,000,000 | 2,100,000 | 9,100,000 |
| | | | |
| 総計 | 22,100,000 | 4,680,000 | 26,780,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：がん、Akt、細胞骨格、浸潤、Wnt、血管新生

1. 研究開始当初の背景

セリン・スレオニンキナーゼである Akt は、発生過程および様々な増殖因子や分化誘導因子の細胞内シグナル伝達系において重要な機能を有し、その異常な活性化は細胞の癌化を誘導する。実際にヒトの乳癌、子宮癌、前立腺癌など多くの悪性腫瘍でその活性化

が認められている。特に浸潤性の高い悪性腫瘍と Akt の活性化には正の相関があり、Akt がいかなるメカニズムで悪性腫瘍の浸潤を促進するかは治療法開発にも直結する重要な課題である。細胞が浸潤性を獲得するためには運動能の上昇が必要であるが、Akt がどのような機構で細胞運動および細胞骨格を制御するかは不明であった。私達は酵母

two-hybrid 法を用いたヒト精巢 cDNA ライブラリーのスクリーニングにより、アクチン細胞骨格と結合する Akt の新規基質「Girdin」(girders of actin) を同定し、線維芽細胞を用いた実験で Akt 依存的な細胞運動が Girdin のリン酸化を介して行われていることを示した。以上の背景をもとに、私達は悪性腫瘍の進展・浸潤における Akt/Girdin シグナル伝達の意義を様々な組織型由来の腫瘍細胞を用いて個体レベルで解明するための研究に着手した。一方、研究開始当時、Girdin のファミリー分子として「Daple」(Dishevelled-associating protein with a highly frequency of leucine residues) が発見されていた。Daple は発生や悪性腫瘍の進展において重要な Wnt シグナル伝達系の制御分子として同定された分子である。本研究では Girdin および Daple の生体内における機能を解明するために両分子の遺伝子改変マウスの作成も目標に掲げて研究を開始した。

2. 研究の目的

(1) Girdin およびそのファミリー分子群、特に Daple の発生における機能を遺伝子改変マウスと培養細胞を用いて解明する。

(2) 悪性腫瘍の進展・浸潤における Akt/Girdin シグナル伝達および Wnt/Daple シグナル伝達の意義を様々な組織型由来の腫瘍細胞を用いて個体レベルで解明する。

(3) Girdin および Daple の腫瘍における発現の意義を臨床病理検体を用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) Girdin および Daple の遺伝子改変マウスの作製

Girdin をノックアウトするためのターゲティングベクターを作製し、組換え ES 細胞を樹立後、キメラマウス及びノックアウトマウスを作製する。また Akt による Girdin のリン酸化の意義を個体レベルで検討するため、1417 番目のセリンをアラニンに置換したノックインマウスの作製を試みる。また Daple のノックアウト ES 細胞は米国 BayGenomics consortium より購入し、上記と同様の方法でノックアウトマウスを作成する。各マウスを作成後は、2 種のマウスともに胎生致死ではなく出生したので、それぞれの表現系を解析した。

(2) 腫瘍細胞の浸潤・転移における Girdin の役割の検討

以前の研究で RNA 干渉法により Girdin を一過性にノックダウンすると線維芽細胞の

運動能が抑制されることを *in vitro* の実験系 (Boyden chamber assay 法) で確認していた。ヒトの悪性腫瘍由来の多くの細胞株で Girdin が高発現していることも確認していたので、本研究ではこれらの腫瘍細胞の浸潤能における Girdin の機能を *in vitro* invasion assay で確認した。本実験には様々な種類の組織型由来の細胞株を用いた (線維肉腫、乳がん、扁平上皮癌、悪性黒色腫、消化管管状腺癌、神経芽細胞腫など)。さらに、Girdin の発現抑制が局所浸潤および転移に与える影響を個体を用いて検討した。

(3) 臨床病理検体における Girdin および Daple の発現の検討

臨床における多数の悪性腫瘍の生検材料あるいは手術材料を用いて、Girdin およびの悪性腫瘍細胞における発現を検討した。Daple に関しては抗体の作製に着手した。

(4) 神経細胞の分化における Girdin の役割の検討

それまでの検討で Girdin は中枢神経系に高発現していることを確認していた。本研究では神経系の発生および分化における Girdin の機能をラット海馬神経細胞を用いて解析する。神経細胞の軸索形成における Akt シグナル伝達系と Girdin の機能を解明するため、ラット胎仔脳海馬から得られる神経細胞において Girdin をノックダウンした場合、あるいは Girdin の非リン酸化型変異体を発現させた場合に、神経細胞の突起形成および極性決定に与える影響を形態学的に観察した。Lipofectamine を用いて海馬神経細胞へ shRNA および Girdin 各種 cDNA を導入し、2~5 日後の神経突起形成を免疫組織学的手法によって観察した。樹状突起および軸索をそれぞれ特異的に発現する抗 MAP2 抗体および抗 Tau 抗体を用いて免疫染色を行い、各神経突起の長さや形態および極性を観察した。

(5) Daple および Girdin に結合するタンパク質の同定

Daple は Dishevelled 以外の結合分子や細胞内局在等は明らかにされておらず、その細胞生物学的な機能は未知である。本研究では Daple の結合タンパク質を酵母 two-hybrid 法を用いて検索した。また質量分析と免疫沈降法を組み合わせた方法で、Girdin の新たな結合タンパク質の同定も試みた。

4. 研究成果

(1) 腫瘍細胞の浸潤・転移における Girdin の役割の検討

様々な組織型由来の悪性腫瘍細胞株における Girdin の発現をウエスタンブロット法で

確認した。子宮頸癌由来の HeLa 細胞、乳癌由来の MDA-MB-231 細胞、皮膚扁平上皮癌由来の A431 細胞など多くの細胞株に Girdin の発現が確認された。以降の研究には、高い運動能・転移能を有することで知られる MDA-MB-231 細胞を用いた。Girdin に対する siRNA (small interfering RNA) および shRNA (short hairpin RNA) をリポフェクション法あるいはレトロウイルス発現系を用いて MDA-MB-231 細胞に導入し、Girdin が一過性あるいは恒常的にノックダウンされた細胞株で機能実験を行った。コントロール細胞と比較して、Girdin siRNA あるいは shRNA を導入した細胞では、MDA-MB-231 細胞の IGF-1 (インスリン様増殖因子) 依存的な細胞運動能が顕著に低下していた。この Girdin のノックダウンによる細胞運動能の低下は、野生型の Girdin を再び強制発現させることにより回復させることができたが、Akt リン酸化部位に変異を導入した Girdin では十分に回復させることができなかった。以上の結果より Akt 依存的な Girdin のリン酸化が MDA-MB-231 細胞の運動能に重要であることが明らかとなった。

次に Girdin をノックダウンした MDA-MB-231 細胞をヌードマウス皮下に移植すると肺への転移が有意に抑制された。このことは Girdin の機能を抑制すると生体内における腫瘍細胞の運動能を抑制できることを示している。

(2) 臨床組織検体における Girdin の発現の検討

実際の悪性腫瘍における Girdin の発現を臨床検体を用いて検討した。臨床検体 (生検標本および手術材料) は大垣市民病院病理科の岩田博士のご協力により入手したものと、市販で購入可能な組織アレイを用いた。その結果、消化管悪性腫瘍 (腺癌)、子宮頸癌、乳癌、肺癌、および甲状腺癌のそれぞれ約 15、10、10、25、50% の症例に Girdin の発現が観察された。正常の乳腺組織では腺管の筋上皮細胞に Girdin の弱い発現が認められるのみであった。

今後は Girdin の発現と悪性腫瘍の分化度、さらには患者の予後との関連を詳細に検討する必要があると考えている。Daple についても抗体を作成しているので、同様の検討を開始する予定である。

(3) 血管新生における Girdin の役割および遺伝子改変マウスの作製と解析

Akt は細胞の癌化の他に、血管新生で重要な働きをするキナーゼである。特に血管内皮細胞による VEGF (血管内皮増殖因子) 依存的

な血管新生には VEGF 受容体の下流で活性化される Akt が必須である。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) に Girdin の発現が認められることを見だし、血管新生における Girdin の役割の解析を行った。HUVECs を VEGF で刺激すると Akt 依存的な Girdin のリン酸化が観察された。HUVECs で Girdin を siRNA でノックダウンすると、HUVECs の VEGF 依存的な細胞運動能、血管形成能が有意に低下した。Girdin に対する shRNA をコードするアデノウイルスを細胞外基質と一緒にヌードマウス皮下に導入すると、同部位で誘導される血管新生が有意に低下した。

次に Girdin の生体内の血管新生における機能を解明するため、Girdin のノックアウトマウスを作成した。Girdin のノックアウトマウスは正常に生まれ、出生直後は野生型マウスと比較して肉眼的な相違を認めなかったが、生後 6 日目程より発育が悪くなり、体重が次第に減少する傾向を認めた。生後 14 日目ではほぼ 3 割のノックアウトマウスが死亡し、28 日目になるとほぼすべてのマウスが生存不可能であった。血管系では少なくとも発生における血管形成には異常が認められなかったため、次に生後の特定条件下における血管新生を解析した。マウス網膜の血管新生は生後に開始することが知られている。生後 3 日目および 7 日目の Girdin ノックアウトマウスの網膜における新生血管を観察すると、網膜末梢までの血管内皮の移動が障害されていることが明らかとなった。網膜の血管構造は 3 層を形成することが知られており、網膜表層の視神経細胞層 (ganglion cell layer) を水平方向に広がった血管構造は次に深部、すなわち内顆粒層 (inner nuclear layer, INL) の上下の 2 層に向かって形成されていくことが知られている。網膜の断面を観察すると、生後 18 日目の Girdin ノックアウトマウスでは正常マウスと比較して深部における網膜新生血管の形成が障害されていることが明らかとなった。

(4) Girdin ノックアウトマウスの神経系の異常

上述のように Girdin ノックアウトマウスは外見上、明らかな異常を認めないが、脳の組織切片を観察したところ、海馬および嗅球の構造に発生の異常が認められた。この構造異常の詳細については現在も検討を続けている。本研究期間中では、培養神経細胞を用いて Girdin の神経突起、特に軸索形成における役割を解析した。培養海馬神経細胞において内因性の Girdin をノックダウンすると Tau1 で標識される軸索の形成が顕著に低下することを明らかにした。一方、Girdin の非リン酸化変異体の導入を試みたが、リポフェクション法においては導入効率が低く、結論を得

られる程の十分なデータを取得できなかった。

(5) Daple ノックアウトマウスの作成

研究の方法に記した方法で Daple ノックアウトマウスを作成した。これまでに出生時には異常を認めないが、生後、次第に体重が減少することが判明している。この理由については現在検討しているが不明である。Daple の機能を解明するために、まず培養細胞を使用して細胞生物学的な観点から解析を開始した。

Daple の結合分子を探索した結果、細胞骨格分子の一つである微小管と結合することが明らかとなった。試験管内 (in vitro) で重合させた微小管を用いた sedimentation assay により結合領域を探索したところ、Daple の C 末端ドメインが微小管と結合することが明らかとなった。以上のことから Daple は Dishevelled の上流あるいは下流で細胞内の Rac の活性や細胞骨格を制御している可能性がある。今後はその詳細な分子メカニズムを解析する予定である。

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 12 件)

- (1) Muteliefu G, Enomoto A, Jiang P, Takahashi M, Niwa T. Indoxyl sulphate induces oxidative stress and the expression of osteoblast-specific proteins in vascular smooth muscle cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* in press, 2009. (査読有)
- (2) Muteliefu G, Enomoto A, Niwa T. Indoxyl sulfate promotes proliferation of human aortic smooth muscle cells by inducing oxidative stress. *J. Ren. Nutr.* 19:29-32, 2009. (査読有)
- (3) Hasegawa T, Enomoto A, Kato T, Kawai K, Miyamoto R, Jijiwa M, Ichihara M, Ishida M, Asai N, Murakumo Y, Ohara K, Niwa Y, Goto H, Takahashi M. Roles of induced expression of MAPK phosphatase-2 in tumor development in RET-MEN2A transgenic mice. *Oncogene* 27:5684-95, 2008. (査読有)
- (4) Hasegawa M, Moritani S, Murakumo Y, Sato T, Hagiwara S, Suzuki C, Mii S, Jijiwa M, Enomoto A, Asai N, Ichihara S, Takahashi M. CD109 expression in basal-like breast carcinoma. *Pathol Int.* 58:288-94, 2008. (査読有)
- (5) Jijiwa M, Kawai K, Fukihara J, Nakamura A, Hasegawa M, Suzuki C, Sato T, Enomoto A, Asai N, Murakumo Y, Takahashi M. GDNF-mediated signaling via RET tyrosine

1062 is essential for maintenance of spermatogonial stem cells. *Genes Cells.* 13:365-74, 2008. (査読有)

- (6) Jiang, P., Enomoto, A., Jijiwa, M., Kato, T., Hasegawa, T., Ishida, M., Sato, T., Asai, N., Murakumo, Y., Takahashi, M. An actin-binding protein Girdin regulates the motility of breast cancer cells. *Cancer Res.* 68, 1310-8. 2008. (査読有)
 - (7) Kitamura, T.*, Asai, N.*, Enomoto, A., (*Joint first authorship), Maeda, K., Kato, T., Ishida, M., Jiang, P., Watanabe, T., Usukura, J., Kondo, T., Costantini, F., Murohara, T., Takahashi, M. Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin. *Nat Cell Biol.* 10, 329-37. 2008. (査読有)
 - (8) Suzuki, C., Murakumo, Y., Kawase, Y., Sato, T., Morinaga, T., Fukuda, N., Enomoto, A., Ichihara, M., Takahashi, M. A novel GDNF-inducible gene, BMZF3, encodes a transcriptional repressor associated with KAP-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 366, 226-32. 2008. (査読有)
 - (9) Enomoto, A., Niwa, T. Roles of organic anion transporters in the progression of chronic renal failure. *Ther Apher Dial.* 11 Suppl 1, S27-31. 2007. (査読有)
 - (10) Dambara, A., Morinaga, T., Fukuda, N., Yamakawa, Y., Kato, T., Enomoto, A., Asai, N., Murakumo, Y., Matsuo, S., Takahashi, M. Nucleolin modulates the subcellular localization of GDNF-inducible zinc finger protein 1 and its roles in transcription and cell proliferation. *Exp Cell Res.* 313, 3755-66. 2007. (査読有)
 - (11) Shin, H.J., Anzai, N., Enomoto, A., He, X., Kim, D.K., Endou, H., Kanai, Y. Novel liver-specific organic anion transporter OAT7 that operates the exchange of sulfate conjugates for short chain fatty acid butyrate. *Hepatology.* 45, 1046-55. 2007. (査読有)
 - (12) Ishida, M., Ichihara, M., Mii, S., Jijiwa, M., Asai, N., Enomoto, A., Kato, T., Majima, A., Ping, J., Murakumo, Y., Takahashi, M. Sprouty2 regulates growth and differentiation of human neuroblastoma cells through RET tyrosine kinase. *Cancer Sci.* 98, 815-21. 2007. (査読有)
- [学会発表] (計 10 件)
- (1) Enomoto, A., Asai, N., Taya, S., Tsuboi, D., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Takahashi, M. Roles of Disrupted-In-Schizophrenia 1-Interacting Protein Girdin in Postnatal Development of the Dentate Gyrus. The American Society of Cell Biology, 48th Annual Meeting, San Francisco, 2008.12.13
 - (2) Kato, T., Shimono, Y., Hasegawa, M., Jijiwa, M., Enomoto, A., Asai, N., Murakumo, Y.,

Takahashi, M. Characterization of the HDAC1 complex that regulates cancer cell sensitivity to oxidative stress. The American Society of Cell Biology, 48th Annual Meeting, San Francisco, 2008.12.13

(3) 加藤琢哉, 下野洋平, 榎本篤, 時々輪真由美, 村雲芳樹, 高橋雅英: TBP-2 の発現抑制に関わる転写複合体の解析. 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008.10.28

(4) 北村トモヤ, 浅井直也, 榎本篤, 前田健吾, 加藤琢哉, 石田麻紀, 姜平, 渡辺崇, 白倉治郎, Frank Costantini, 室原豊明, 高橋雅英: Akt の新基質である Girdin は血管新生を制御する. 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008.10.28

(5) 高橋雅英, 長谷川太作, 榎本篤, 加藤琢哉, 石田麻紀, 時々輪真由美, 浅井直也, 村雲芳樹, 後藤秀実. 遺伝性の癌 -その研究と臨床の最前線- RET チロシンキナーゼのシグナル伝達と発がん. 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008.10.28

(6) 榎本 篤, 浅井 直也, 高橋 雅英: 神経細胞分化におけるアクチン結合蛋白質 Girdin/Ccdc88a の機能解析. 第 30 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2007.12.11

(7) Kitamura T, Asai N, Enomoto A, Maeda K, Jiang P, Watanabe T, Usukura J, Frank C, Murohara T, and Takahashi M: Regulation of VEGF-Mediated Angiogenesis by the Akt/PKB Substrate Girdin. 第 66 回日本癌学会学術総会. 横浜, 2007.10.3

(8) 石田 麻紀, 市原 正智, 三井 伸二, 時々輪 真由美, 浅井 直也, 榎本 篤, 加藤 琢哉, 村雲 芳樹, 高橋 雅英: Sprouty2 は RET チロシンキナーゼ下流シグナルによる神経芽細胞腫の増殖と分化を調節する. 第 66 回日本癌学会学術総会. 横浜, 2007.10.3

(9) 長谷川 太作, 榎本 篤, 川井 久美, 加藤 琢哉, 時々輪 真由美, 浅井 直也, 村雲 芳樹, 後藤 秀実, 高橋 雅英: MAPK Phosphatase-2 (MKP-2) Regulates Proliferation and Apoptosis of Breast Cancer Cells Derived from MEN2A Transgenic Mice. 第 66 回日本癌学会学術総会. 横浜, 2007.10.3

(10) 姜 平, 榎本 篤, 加藤 琢哉, 長谷川 太作, 佐藤 朋子, 時々輪 真由美, 浅井 直也, 村雲 芳樹, 高橋 雅英: Regulation of cancer progression by the Akt/PKB substrate Girdin, a novel actin-binding protein. 第 66 回日本癌学会学術総会. 横浜, 2007.10.3

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: アクチン結合タンパク質の細胞運動関連疾患への利用

発明者: 高橋雅英、榎本篤、室原豊明

権利者: 平野眞一

種類: 国際出願

番号: PCT/JP2006/323040

出願年月日: 2006 年 11 月 10 日

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ

<http://www.iar.nagoya-u.ac.jp/tenure/enomoto/enomoto.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 篤 (Atsushi Enomoto)

名古屋大学・高等研究院・特任講師

研究者番号: 20432255