

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09496

研究課題名(和文) 婦人科がんの発生および悪性形質獲得における三量体Gタンパクの役割

研究課題名(英文) The role of heterotrimeric G protein in the progression of gynecological cancer

研究代表者

八木 裕史 (Yagi, Hiroshi)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：70623552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：三量体GタンパクのひとつであるGa13は、様々な癌種において高発現していることが報告されているが、癌の進展における役割については十分明らかになっていない。本研究においては子宮体癌の進展におけるGa13の役割について解析を行った。その結果、子宮体癌細胞においてはGa13の高発現に伴いGa13-Rho細胞内シグナルが活性化し、それに伴い細胞増殖能が亢進することが示された。また、Ga13-Rhoシグナルを負に制御する因子の一つであるARHGAP35の遺伝子変異がこのシグナル経路の増強に関与していることが示唆された。今後はこのシグナル経路を標的とした治療法の開発に取り組む予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜表面の分子として最大のファミリーを形成しているGPCRは、治療標的分子として代表的なものである。現在の治療薬の約35%がGPCRを標的としているが、標的となっているGPCRは、ヒトのGPCR(800種類以上)のうちの15%に過ぎない。このような現状から、これまで詳細な解析が困難であったG13シグナル伝達経路を解析し、癌の発生および悪性形質の獲得における役割を明らかにすることが、新たな治療標的の同定、治療法の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Ga13, a heterotrimeric G protein, has been reported to be highly expressed in various cancers. However, its role in cancer progression is not fully understood. In this study, we evaluated the role of Ga13 in the progression of uterine endometrial cancer. In uterine endometrial cancer cells, highly expressed Ga13 induced Rho activation, leading to cell proliferation. In addition, Mutations in ARHGAP35, one of the factors that negatively regulates Ga13-Rho signaling, were involved in the enhancement of this signaling pathway. Now, we are working on the development of therapies targeting this signaling pathway.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：婦人科腫瘍 GPCR シグナル伝達

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜 7 回貫通型の G タンパク共役受容体(GPCR)は細胞表面の分子として最大のファミリーを形成しており、これまでにヒトでは 800 種類以上が同定されています。GPCR シグナルの制御には、GPCR やそのリガンドだけでなく、細胞内で coupling する三量体 G タンパク、低分子量 G タンパク(Rho、Rac、Ras、Cdc42)、エフェクター分子など様々な分子が関わっており、その活性化により、細胞の増殖、運動、分化など多岐にわたる現象を制御しています。近年、ヒト癌組織を用いた大規模かつ網羅的な遺伝子解析の結果、GPCR、三量体 G タンパク、エフェクター分子の遺伝子変異や過剰発現などの genetic な変化が癌化および癌の進展において重要な役割を果たしていることが明らかとなりました。

三量体 G タンパクの一つである  $G_{13}$  は、乳癌、胃癌、前立腺癌、卵巣癌、口腔癌など様々な癌種で高発現しており、その発現レベルが臨床的予後と相関することが報告されています。その一方で、 $G_{13}$  が制御するシグナル伝達経路や、癌化および癌の進展における役割、その発現制御機構については十分に明らかになっていません。その理由のひとつとして、 $G_{13}$  シグナルを解析するためのツールの問題が挙げられます。

三量体 G タンパクには  $G_i$ 、 $G_q$ 、 $G_s$ 、 $G_{12/13}$  の 4 つのサブファミリーがあり、それぞれが異なる様々なシグナルを制御しています。それぞれの GPCR が coupling する三量体 G タンパクには特異性があり、多くの GPCR は複数種の三量体 G タンパクと coupling すると考えられています。これまで三量体 G タンパク下流のシグナル伝達経路を解析するためには、解析対象の G タンパクのみと特異的に coupling する GPCR、そのリガンドを同定し実験に利用することや、三量体 G タンパクの恒常的活性化型遺伝子変異体(constitutively active mutant)を利用する手法が用いられてきました。しかし、 $G_{13}$  と coupling する GPCR には多くの orphan GPCR が含まれることや、 $G_{13}$  のみと特異的に coupling する GPCR が同定されていないことなどから、そのシグナル伝達経路やその活性化が癌の発生や進展に及ぼす影響については十分な解析が行われていないのが現状です。

### 2. 研究の目的

以上のような背景から、本研究の目的は、 $G_{13}$  が制御するシグナル伝達経路を解析し、癌の発生や悪性形質獲得における役割を明らかにすることです。

### 3. 研究の方法

我々は、細胞内に純粋な  $G_{13}$  シグナルを再構築するために、GPCR の遺伝子変異体と三量体 G タンパクのキメラタンパクを用いた実験系を確立しました。 $G_i$  receptors activated solely by synthetic ligands(RASSL)は、 $G_i$  と特異的に coupling する GPCR であるムスカリン受容体 M4 の遺伝子変異体で、内在性のリガンドには反応せず、人工的なリガンドである Clozapine N-oxide (CNO)により活性化されます。これに  $G_{13}$  と  $G_i$  のキメラタンパクである  $G_{13i5}$ (C 末端の 5 アミノ酸を  $G_i$  の C 末端の 5 アミノ酸と置換したものを)を組み合わせることで、純粋な G

$G_{13}$  シグナルを細胞内に再構築し、解析することが可能となりました。この実験系を用いることにより、 $G_{13}$  の恒常的活性型遺伝子変異体を用いた場合と異なり、 $G_{13}$  の活性化が、細胞内のシグナル伝達経路、遺伝子やタンパクの発現、細胞形態や運動能などに及ぼす影響を経時的に解析することが可能となります。

正常卵巣表層上皮細胞株、正常子宮内膜細胞株、卵巣癌細胞株、子宮体癌細胞株に、 $G_{13}$  i RASSL および  $G_{13i5}$  を遺伝子導入した細胞株を樹立し、CNO 刺激による  $G_{13}$  の活性化が細胞に及ぼす影響を経時的に解析します。これまでの  $G_{13}$  恒常的活性型遺伝子変異体 ( $G_{13QL}$ ) を用いた実験系と異なり、 $G_{13}$  の活性化による一次的なシグナル伝達、それに伴う遺伝子およびタンパク発現の変化、最終的に誘導される phenotype を経時的かつ網羅的に解析することが可能となります。

#### 4 . 研究成果

子宮体癌組織を用いた解析の結果、 $G_{13}$  は初期の段階から高発現していることが示されました。 $G_{13}$  は低分子量  $G$  タンパクの Rho の活性化を介して、下流にシグナルを伝達することが知られています。興味深いことに、子宮体癌組織において特に高頻度に変異を認める遺伝子群の中には、ARHGAP35、FAT1-4 という  $G_{13}$ -Rho シグナルに関わるものが含まれます。GTPase activating protein (GAP) のひとつである ARHGAP35 は、Rho ファミリー分子の活性型から不活性型への変換を促進します。遺伝子変異体を用いた解析の結果、子宮体癌における ARHGAP35 の遺伝子変異の多くは機能欠失型であることが示され、 $G_{13}$ -Rho シグナルの増強に関与している可能性が示唆されました。また、子宮体癌細胞株を用いた解析の結果、ARHGAP35 の発現抑制が、 $G_{13}$  による AP-1 (cFOS、ATF3)、Hippo シグナルの制御に関与していること、AP-1 の発現誘導、Hippo シグナルの活性化は、子宮体癌の増殖能、造腫瘍能の亢進を誘導することが示されました。

一方、Atypical Fat cadherins (FAT1-4) は、細胞接着に関わるカドヘリンファミリーの分子で、tumor suppressor として知られています。子宮体癌の約 20% に遺伝子変異を認め、その多くは機能欠失型であると考えられています。その機能については十分明らかになっていませんが、近年、Hippo シグナル経路を介して細胞増殖を制御していることが示されました。予備実験の結果、FAT1-4 の機能欠失型の遺伝子変異が、 $G_{13}$  による Hippo シグナルの制御に関与していることが示唆され、さらなる解析が必要と考えられました。

$G_{13}$  は様々な癌種で高発現していることが報告されていますが、その発現制御機構については明らかになっていません。興味深いことに、乳癌においては上皮内癌の段階から  $G_{13}$  の発現が亢進しています。癌化の初期の段階において、ゲノムワイドな脱メチル化が誘導されることが知られていますが、 $G_{13}$  の発現制御における脱メチル化の関与については明らかになっていません。本研究では、子宮頸部の正常扁平上皮領域、上皮内病変および癌組織における  $G_{13}$  の発現レベルを免疫組織染色法で解析した結果、前癌病変の段階から  $G_{13}$  の発現が亢進していることが示されました。今後は、それぞれの組織および各種細胞株からゲノム DNA を抽出し、bisulfite sequencing 法、Methylation-specific PCR 法で、 $G_{13}$  のプロモーター領域のメチル化状態を解析する予定です。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yagi H, Onoyama I, Asanoma K, Kawakami M, Maenohara S, Kodama K, Matsumura Y, Hamada N, Hori E, Hachisuga K, Yasunaga M, Ohgami T, Okugawa K, Yahata H, Kato K.	4. 巻 30
2. 論文標題 Tumor-derived ARHGAP35 mutations enhance the G 13-Rho signaling axis in human endometrial cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Gene Ther	6. 最初と最後の頁 313-323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41417-022-00547-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八木裕史
2. 発表標題 三量体Gタンパクの機能解析に基づいた新たな婦人科がん治療の開発
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Yagi, Minoru Kawakami, Shoji Maenohara, Keisuke Kodama, Yumiko Matsumura, Ichiro Onoyama, Kazuo Asanoma, Kiyoko Kato
2. 発表標題 Tumor-derived ARHGAP35 mutations enhance the Ga13-Rho signalling axis in human endometrial cancer
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Yagi, Ichiro Onoyama, Kazuo Asanoma, Minoru Kawakami, Keisuke Kodama, Hiroshi Tomonobe, Nobuko Yasutake, Masafumi Yasunaga, Tatsuhiro Ohgami, Kaoru Okugawa, Hideaki Yahata, Kiyoko Kato
2. 発表標題 Induction of AP-1 by Ga13 contributes to cell proliferation in human endometrial cancer
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------