

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22501009

研究課題名（和文）癌化における低分子量GTP結合蛋白質Ralの役割

研究課題名（英文）Roles of small GTPase Ral in tumorigenesis

研究代表者

堀内 久徳 (HORIUCHI Hisanori)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：90291426

研究成果の概要（和文）：

低分子量GTP結合蛋白質Rasは多くの細胞成長因子の下流で働くシグナルのスイッチである。その活性は、活性化因子GEF（GDP/GTP交換因子）と不活性化因子GAP（GTPase活性化因子）のバランスによって制御されている。ヒトの多くの癌で変異を来しているRasは、Raf、PI3キナーゼおよびRalGEF（低分子量GTP結合蛋白質Ralの活性化因子）を直接のエフェクターとする。RalGEFを介したRalの活性化がヒトの癌で重要であるという報告が相次いでいる。Ralの抑制性制御因子（GAP）はこれまで不明であったが、最近、我々は世界に先駆けてRalGAPを同定した（JBC, 2009）。そして、膀胱癌悪性化におけるRalGAPの役割を重点的に解析し、膀胱組織の主要なRalGAP活性サブユニットはRalGAP α 2だが、浸潤性膀胱癌細胞でRalGAP α 2の発現が著しく低下し、そのため、Ralの活性が上昇していることを見いだした。そして、浸潤性膀胱癌細胞へのRalGAP α 2の強制発現はマウスで肺転移を抑制すること、化学膀胱発癌を誘導すると野生型では認めなかった浸潤性膀胱癌がRalGAP α 2遺伝子KOマウスでは42%に生じたこと、癌組織でRalGAP α 2が発現低下したヒト膀胱癌患者の生命予後は不良であることを見だし、論文発表した。このようにRalGAP α 2の発現低下は膀胱癌悪性化に深く関わっている。

研究成果の概要（英文）：

Small GTPases are signaling switches acting downstream of many growth factor receptors. Their activity is regulated by the balance between positive and negative regulators, guanine nucleotide factors (GEFs) and GTPase activating proteins, respectively. Ras, an oncogene whose mutations are frequently detected in various human cancers, takes Raf, PI3 kinase, and RalGEF as direct effectors. Many reports have indicated that the signaling pathway mediated by the RalGEF-Ral pathway is important in human tumorigenesis. We have very recently identified RalGAPs for the first time (JBC, 2009). Then, we analyzed the role of RalGAP in bladder cancer progression. We reported in a paper in *Oncogene*, 2013 that 1) the dominant catalytic subunit of RalGAP in bladder is alpha-2 and it is strongly downregulated in invasive bladder cancer cell line compared with non-invasive cells, resulted in elevated activation of Ral in invasive cells, 2) exogenous expression of RalGAPalpha2 in invasive bladder cancer cells inhibited lung metastasis when injected to nude mice, 3) in a chemically-induced bladder cancer model, invasive bladder cancers were detected in 42% of RalGAPalpha2-KO mice whereas none in control mice, 4) low expression of RalGAPalpha2 was correlated with poor prognosis of bladder cancer patients. Thus, reduced expression of RalGAPalpha2 is deeply associated with bladder cancer progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：(1) 低分子量 GTP 結合蛋白質、(2) Ral、(3) 癌、(4) 膀胱癌

1. 研究開始当初の背景

低分子量 GTP 結合蛋白質 Ras は多くの細胞成長因子の下流で働くシグナルのスイッチである。その活性は、活性化因子 GEF (GDP/GTP 交換因子) と不活性化因子 GAP (GTPase 活性化因子) のバランスによって制御されている。ヒトの多くの癌で変異を来している Ras は、Raf、PI3 キナーゼおよび RalGEF (低分子量 GTP 結合蛋白質 Ral の活性化因子) を直接のエフェクターとする。最近、RalGEF を介した Ral の活性化がヒトの癌で重要であるという報告が相次いでいる。一方、Ral の抑制性制御因子については、その分子同定さえ遅れていた。

2. 研究の目的

Ral の抑制性制御因子、RalGAP GAP はこれまで不明であったが、2009 年、我々は世界に先駆けてを同定した (JBC, 2009)。そこで、本研究では RalGAP の癌における役割を解明することを目的とした。Ral は膀胱癌や前立腺癌、さらに大腸癌や膵癌で重要な働きをしていることがこれまでの研究で明らかとなっているが、我々はまず、最も関与が強いと判断した膀胱癌に焦点を当て、解析を進めることとした。

3. 研究の方法

RalGAP 各サブユニットに対するポリクローナル抗体をウサギを用いて作成し、以下の解析を行った。種々の組織、種々の膀胱癌細胞株の RalGAP 各サブユニットの発現をウェスタン法を用いて解析した。患者膀胱癌組織の RalGAP $\alpha 2$ サブユニットの発現を免疫組織化学法を用いて解析した。

RalGAP $\alpha 2$ サブユニットの発現の低い細胞

株に RalGAP $\alpha 2$ および活性を欠く RalGAP $\alpha 2$ 変異体を安定発現させ、ヌードマウスの尾静脈より接種し、6 週間後の肺転移を解析した。

RalGAP $\alpha 2$ サブユニット遺伝子 KO マウスを作成し、BBN 化学膀胱発癌モデルを適応し、発生した膀胱癌を解析した。

4. 研究成果

(1) 膀胱における主要 RalGAP:

我々は世界に先駆けて、RalGAP の同定に成功した (JBC, 2009)。そして、RalGAP-1 ($\alpha 1$ 活性サブユニットとそのパートナーである β サブユニットの複合体) および RalGAP-2 ($\alpha 2$ と β の複合体) と名付けた (JBC, 2009)。そして膀胱組織の主要な RalGAP 活性サブユニットは RalGAP $\alpha 2$ とあきらかにした。

(2) 膀胱癌細胞株における RalGAP $\alpha 2$ の発現:

種々の膀胱癌細胞株における RalGAP $\alpha 2$ の発現を評価し、非浸潤性細胞に比べて、浸潤性膀胱癌細胞で RalGAP $\alpha 2$ の発現が著しく低下し、そのため、浸潤性膀胱癌細胞 Ral の活性が上昇していることを見いだした。

(3) RalGAP $\alpha 2$ 発現によるマウス膀胱癌細胞の肺転移抑制:

RalGAP $\alpha 2$ の発現が低い浸潤性膀胱癌細胞は、マウス尾静脈より接種すれば肺転移を来すが、その細胞への RalGAP $\alpha 2$ の強制発現は肺転移を抑制した。

(4) RalGAP $\alpha 2$ 遺伝子欠損による実験膀胱癌の悪性化:

RalGAP $\alpha 2$ 遺伝子欠損マウスを作成した。化学膀胱発癌を誘導すると野生型では認めなかった浸潤性膀胱癌が RalGAP $\alpha 2$ 遺伝子 KO マウスでは 42%に生じた。

- (5) ヒト膀胱癌組織での RalGAP $\alpha 2$ が発現低下は予後不良と相関：

RalGAP $\alpha 2$ の発現が低下したヒト膀胱癌患者の生命予後は不良であった。

このようにRalGAP $\alpha 2$ の発現低下は膀胱癌悪性化に深く関わっていることを見いだした。

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 6 件)

- (1) R Saito, R Shirakawa, H Nishiyama, T Kobayashi, M Kawato, T Kanno, K Nishizawa, Y Matsui, T Ohbayashi, M Horiguchi, T Nakamura, T Ikeda, K Yamane, E Nakayama, E Nakamura, Y Toda, T Kimura, T Kita, O Ogawa, H Horiuchi (2013) Downregulation of Ral GTPase-activating-protein causes tumor invasion and metastasis of bladder cancer. *Oncogene* 32, 894-902 (査読有)
- (2) S. Zografou, D. Basagiannis, A. Papafotika, R. Shirakawa, H. Horiuchi, D. Auerbach, M. Fukuda, S. Christoforidis (2012) Rab-genome analysis of Weibel Palade body exocytosis reveals an unexpected link between exocytic and endocytic RabGTPases. *J Cell Sci* 25, 4780-4790 (査読有) (doi: 10.1242/jcs.104174)
- (3) K Boswell, D James, J Esquibel, S Bruinsma, R Shirakawa, H Horiuchi, T Martin* (2012) Munc13-4 reconstitutes Ca^{2+} -dependent SNARE-mediated membrane fusion. *J Cell Biol* 197, 301-312(査読有) (doi: 10.1083/jcb.201109132)
- (4) Y. Murata, T. Yasumi*, R. Shirakawa, K. Izawa, H. Sakai, J. Abe, N. Tanaka, T. Kawai, K. Oshima, M. Saito, R. Nishikomori, O. Ohara, E. Ishii, T. Nakahata, H. Horiuchi*, T. Heike (2011) Rapid diagnosis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. *Blood* 118, 1225-1230(査読有) (doi: 10.1182/blood-2011-01-329540)
- (5) Y. Shirai, S. Morioka, M. Sakuma, K. Yoshino, C. Otsuji, N. Sakai, K. Kashiwagi, K. Chida, R. Shirakawa, H. Horiuchi, C. Nishigori, T. Ueyama, N. Saito (2011) Direct binding of RalA to PKC η and its crucial role in morphological change during keratinocytes differentiation. *Mol. Biol. Cell.* 22, 1340-1352(査読有) (doi: 10.1091/mbc.E10-09-0754)
- (6) T. Higashi, T. Ikeda, T. Murakami, R. Shirakawa, M. Kawato, K. Okawa, M. Furuse, T. Kimura, T. Kita, H. Horiuchi (2010) Flightless-I (Fli-I) regulates the actin assembly activity of Diaphanous-related formins (DRFs), Daam1 and mDial, in cooperation with active Rho GTPase. *J Biol Chem.* 285, 16231-16238(査読有) (doi: 10.1074/jbc.M109.079236)

[学会発表] (計 1 件)

平成 24 年度日本生化学会大会 (2012 年 12 月 14-16 日、福岡国際会議場)、一般演題「RalGAP 発現低下による膀胱癌悪性化」堀内久徳、齊藤亮一、白川龍太郎、木村朋寛、松井喜之、西山博之、小川修

[図書] (計 5 件)

1. 白川龍太郎、堀内久徳「血小板顆粒放出異常症と遺伝子異常」高久史麿血、小澤敬也、坂田洋一、金倉譲、小島勢二編、Annual review血液2013、pp182-189、2013年1月刊行
2. 堀内久徳「胸痛」北徹監修、横出正之、荒井秀典編健康長寿大事典：QOLからEBMまで、pp2229-231、西村書店2012年刊行
3. 堀内久徳「mTOR」日本血管生物医学会編集「血管生物医学事典」pp332-333、朝倉書店2011年発刊

4. 堀内久徳「低分子量GTP結合蛋白質」日本血管生物医学会編集「血管生物医学事典」 pp302-303、朝倉書店2011年発刊

5. 北徹、堀内久徳、柳田素子、猪原匡史、富本秀和、並河徹編、疾患モデルの作製と利用「循環器疾患」 Life-science Information Center社、2010発刊（編集担当）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/mcb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀内 久徳 (HORIUCHI Hisanori)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：90291426

(2) 研究分担者：なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者：なし

研究者番号：