

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22700885

研究課題名(和文) RacGAP因子FilGAPの癌の浸潤、転移における機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of RacGAP FilGAP in tumor invasion and metastasis

研究代表者

斉藤 康二 (SAITO, KOJI)

北里大学・理学部・助教

研究者番号：70556901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：FilGAPは低分子量GTP結合蛋白質であるRacを特異的に不活化する因子である。本研究ではFilGAPの癌の浸潤、転移における機能解析を行った。(1) FilGAPは上皮由来癌細胞の間葉系遊走-アメーバ様遊走転換に関与する。(2) FilGAPはRacを不活化することでアメーバ様遊走を誘導する。(3) RhoA/ROCK依存的なFilGAPのリン酸化がアメーバ様遊走を誘導する。(4) FilGAPは癌細胞の浸潤、転移に対して亢進的に働く。以上、ROCKによるFilGAPのリン酸化が癌細胞のアメーバ様遊走を誘導し、結果としてFilGAPは癌の浸潤、転移を促進していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：FilGAP is a small GTPase Rac-specific GTPase-activating protein. I have studied the role of FilGAP in tumor invasion and metastasis. (1) FilGAP is required for mesenchymal-to-amoeboid transition in carcinoma cells. (2) Inactivation of Rac by FilGAP induces amoeboid migration. (3) Phosphorylation of FilGAP by ROCK mediates RhoA/ROCK-induced amoeboid migration. (4) FilGAP appears to mediate carcinoma cell invasion and metastasis. Thus, phosphorylation of FilGAP by ROCK promotes amoeboid migration of carcinoma cells, and FilGAP contributes to tumor invasion and metastasis.

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：細胞運動 細胞接着 細胞骨格 低分子量GTP結合蛋白質 浸潤、転移

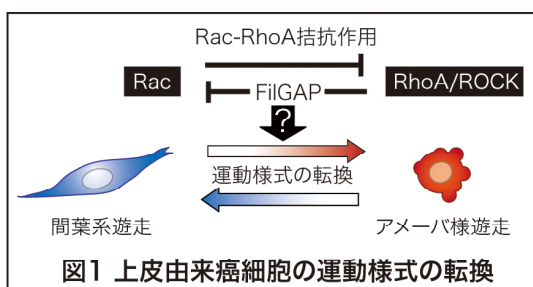
1. 研究開始当初の背景

(1) 癌の大半を占める上皮細胞由来の悪性腫瘍は、運動能の亢進による浸潤と転移をその性質として示す。癌細胞が運動能を獲得して浸潤するとき、外部環境に応じて間葉系遊走とアメーバ様遊走の二つの運動様式を可逆的に変化させ、効率的に浸潤、転移する手段を獲得していると考えられている。しかしこの運動様式の転換に関わる分子機構は不明な点が多かった。

(2) 低分子量 GTP 結合蛋白質である Rac と RhoA は細胞運動において中心的な役割を果たしている。FilGAP は現所属研究室で同定された Rac を特異的に不活化する因子である (ohta *et al.*, Nat. Cell Biol. vol.8, p803-814, 2006)。FilGAP は Rac 活性を抑制することで葉状仮足の形成や細胞の伸展に関与し、RhoA の標的分子である ROCK によりリン酸化されると細胞内で活性が上昇することが明らかになっている。しかし FilGAP の細胞運動への関与は不明であった。

2. 研究の目的

(1) 間葉系遊走ではその進行方向側先端部における Rac の活性化が重要である。一方、アメーバ様遊走には RhoA/ROCK シグナルが重要な役割を果たす。一般に Rac と RhoA は互いに拮抗的 (抑制的) に作用することから、間葉系遊走とアメーバ様遊走の運動様式の転換は、細胞内の Rac と RhoA の活性のバランスによって制御されていると考えられている (図1)。上記のとおり FilGAP は、ROCK によるリン酸化でその活性が上昇する。したがって、FilGAP は RhoA/ROCK による Rac の拮抗作用を仲介する分子として機能する。そこで本研究では、Rac の不活化因子である FilGAP の癌細胞の運動様式およびその転換への関与を調べる。

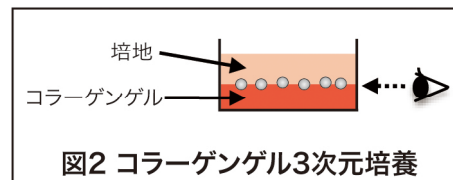


(2) 上記 (1) の結果を踏まえ、FilGAP が実際に癌の浸潤と転移に対してどのような役割を果たしているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 上皮由来の癌細胞株として、浸潤、転移能が高いヒト乳癌由来上皮細胞株である MDA-MB-231 (以下 MDA) を用いた。癌細胞の

運動は生体内において、コラーゲンなどの細胞外基質に囲まれた 3 次元環境を移動 (浸潤) することと同義である。したがって、生体内環境に近い状態で運動様式を解析するため、Hooper *et al.*, 2006 (Methods Enzymol. vol. 406, p625-643) の方法に従って、簡便なコラーゲングル 3 次元培養法を選択した (図2)。これは細胞が半分ゲルの中に埋まった状態で、その多くがゲル表面の同一焦点深度に存在するので顕微鏡観察が容易なのが利点である。本培養法を用いて以下の①~③の実験を行った。



① FilGAP に特異的な siRNA を用いてその遺伝子発現抑制を行ったとき、MDA 細胞の運動様式の転換に与える影響を調べた。さらに MDA 細胞以外のヒト上皮由来癌細胞株である A549 (肺癌)、PC3 (前立腺癌)、および SW620 (直腸癌) において、同様に遺伝子発現抑制による運動様式への影響を調べた。

② FilGAP を MDA 細胞で過剰発現させたとき、その運動様式の転換に与える影響を調べた。さらに、Rac を不活化できない FilGAP の変異体 (R175A および ΔGAP) を作製し、Rac 活性と運動様式の転換との関連についても調べた。

③ ROCK による FilGAP のリン酸化が運動様式の転換に関与するのかを調べるため、ROCK によるリン酸化部位をアラニンに置換した非リン酸化型 FilGAP (ST/A) およびアスパラギン酸に置換した疑似リン酸化型 FilGAP (ST/D) 変異体を作製した。また ROCK の阻害剤である Y27632 も実験に用いた。さらに FilGAP のリン酸化状態と運動様式との関連を調べるため、放射性同位体 P32 を用いて FilGAP のリン酸化アッセイを行った。

(2) FilGAP が癌の浸潤、転移に対してどのような役割を果たしているのかを調べるため、MDA 細胞を用いて生体外コラーゲングル浸潤アッセイ (浸潤解析) および生体内肺血管外遊走アッセイ (転移解析) を行った。

① コラーゲングル浸潤アッセイ: 方法は Sanz-Moreno *et al.*, 2008 (Cell vol.135, p510-523) に従い、肝細胞増殖因子 (HGF) 刺激したときコラーゲングル内に浸潤する MDA 細胞の数を計測した。まず、FilGAP の遺伝子発現抑制による浸潤への影響を調べた。次に GFP 融合 FilGAP を恒常的に過剰発現する安定発現 MDA 細胞株を作製し、その過剰発現による浸潤への影響を調べた。コントロー

ルとして GFP 安定発現 MDA 細胞も作製した。

② 肺血管外遊走アッセイ：方法は Sanz-Moreno *et al.*, 2008 (Cell vol.135, p510-523) に従った。これは MDA 細胞が肺に転移しやすい性質を利用している。まず GFP を恒常的に発現する GFP 安定発現 MDA 細胞を作製した。この細胞を用いて FilGAP の遺伝子発現抑制を行った後、細胞をヌードマウスの尾静脈から投与して 30 分および 6 時間後にそれぞれ肺を回収し、凍結切片を作製した。血管から肺組織側に浸潤した投与細胞 (GFP 発現細胞) を観察、解析した。

4. 研究成果

(1) FilGAP の遺伝子発現抑制による運動様式の転換への影響

① MDA 細胞をコラーゲンゲル上で培養すると間葉系遊走する細胞とアメーバ様遊走する細胞が約半分ずつ混在した。これらの細胞形態とその割合は、コラーゲンゲル内に MDA 細胞を埋め込んで 3 次元培養したときと同等であった (Wolf *et al.*, J. Cell Biol. vol.160, p267-277, 2003)。したがって今回実験に用いた培養法は、実際の 3 次元培養環境を再現できていると判断した。まず、MDA 細胞において FilGAP の遺伝子発現抑制を行ったところ、間葉系遊走細胞の顕著な増加が観察された (図 3)。一般にアメーバ様遊走細胞に比べて間葉系遊走細胞は伸張し、細胞面積が広い。実際 FilGAP の遺伝子発現抑制は有意な細胞伸張と面積の増加を引き起こした。さらに MDA 細胞以外の上皮由来の癌細胞株である A549、PC3 および SW620 細胞で FilGAP の遺伝子発現抑制を行ったところ、MDA 同様、間葉系遊走細胞が有意に増加した。

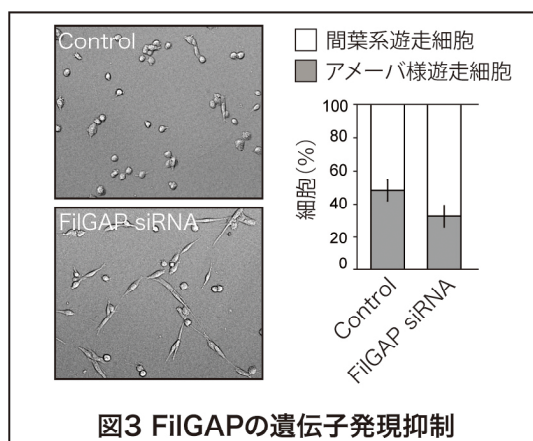


図3 FilGAPの遺伝子発現抑制

② 次に MDA 細胞において可逆的に起こる間葉系遊走とアメーバ様遊走の運動様式の転換をタイムラプス顕微鏡を用いて動画撮影し、運動解析を行った。その結果、FilGAP の遺伝子発現抑制により、間葉系遊走からアメーバ様遊走への変化 (MAT) が顕著に減少した。以上の結果から、FilGAP は上皮由来癌細胞

において MAT に関与することが示された。

(2) FilGAP の過剰発現による運動様式の転換への影響

① MDA 細胞において FilGAP を過剰発現させると、アメーバ様遊走細胞が有意に増加した (図 4)。さらにタイムラプス顕微鏡を用いた動画解析から、FilGAP の過剰発現により MAT を引き起こす細胞が増加することが示された。

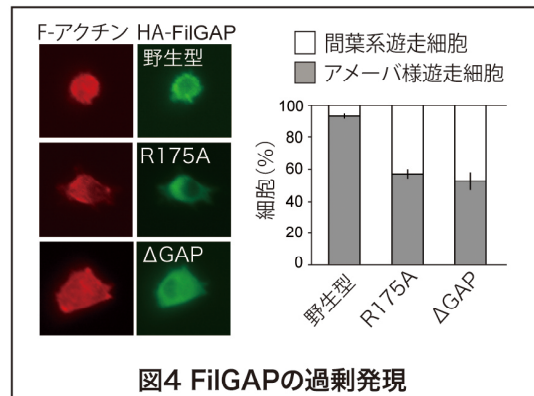


図4 FilGAPの過剰発現

② 次に FilGAP の過剰発現によるアメーバ様遊走細胞の増加が Rac の不活性化によるものかどうかを調べた。その結果、Rac を不活性化できない FilGAP R175A および Δ GAP 変異体を MDA 細胞で過剰発現させたとき、アメーバ様遊走細胞の増加はみられなかった (図 4)。同様の結果は恒常活性化型 Rac G12V 変異体を発現させたときに観察された。逆に Rac の遺伝子発現抑制はアメーバ様遊走細胞の増加を引き起こした。以上の結果より、FilGAP は Rac を不活性化することで癌細胞のアメーバ様遊走を誘導することが明らかになった。

(3) ROCK による FilGAP のリン酸化と運動様式の転換との関連

① MDA 細胞において、FilGAP の過剰発現によるアメーバ様遊走細胞の増加は、ROCK の阻害剤である Y27632 処理で顕著に低下した。逆に ROCK の過剰発現によって増加したアメーバ様遊走細胞は、FilGAP の遺伝子発現抑制により減少した。これらの結果は、癌細胞の運動様式の転換における ROCK による FilGAP の活性制御機構の存在を示唆した。

② ROCK による FilGAP のリン酸化が運動様式の転換に重要かどうかを調べるため、非リン酸化型 FilGAP ST/A 変異体と疑似リン酸化型 FilGAP ST/D 変異体をそれぞれ MDA 細胞で過剰発現させた。その結果、FilGAP ST/A 変異体では、野生型 FilGAP の過剰発現に比べてアメーバ様遊走細胞の増加を誘導できなかった。また MDA 細胞を Y27632 で処理しても、FilGAP ST/D 変異体の過剰発現はアメーバ様遊走細胞を増加させる効果があった。これら

の結果は、癌細胞の運動様式の転換における ROCK による FilGAP のリン酸化の重要性を示唆した。

③ これまでの結果から、FilGAP のリン酸化が癌細胞のアメーバ様遊走を誘導することが示唆された。そこで実際 FilGAP のリン酸化状態と運動様式の転換に関連があるのかを調べた。実験は、MDA 細胞を無血清飢餓状態にした後、LPA 処理により RhoA を活性化した。このとき MDA 細胞では短期的なアメーバ様遊走細胞の増加が観察された。この系を利用して、FilGAP のリン酸化状態とアメーバ様遊走細胞の増加との関連を調べた。その結果、アメーバ様遊走細胞が最も多くなる LPA 刺激後 30 分で、FilGAP のリン酸化状態も最も高くなり、運動様式とリン酸化状態の相関が確認できた (図 5)。したがって、FilGAP はアメーバ様遊走細胞で高いリン酸化状態を維持していることが示唆された。以上の結果より、RhoA/ROCK 依存的な FilGAP のリン酸化が癌細胞のアメーバ様遊走を誘導することが示された。

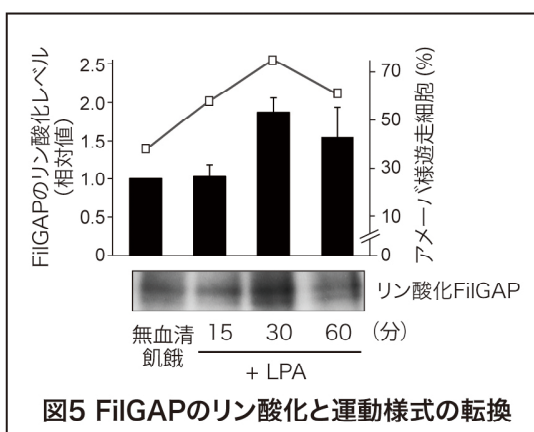


図5 FilGAPのリン酸化と運動様式の転換

(4) FilGAP の癌の浸潤、転移における役割

① FilGAP の癌細胞の浸潤への関与を調べるため、MDA 細胞を用いてコラーゲンゲル浸潤アッセイを行った。まず、FilGAP の遺伝子発現抑制による浸潤への影響を調べたところ、その抑制により浸潤能が有意に低下した。またゲル内に浸潤した細胞ではアメーバ様遊走細胞の減少がみられた (図 6)。次に FilGAP の過剰発現による浸潤への影響を調べるため、GFP 融合 FilGAP を恒常的に過剰発現する安定発現 MDA 細胞株を作製した。その結果、FilGAP の過剰発現により浸潤能が有意に亢進された。またゲル内に浸潤した細胞ではアメーバ様遊走細胞の増加がみられた (図 7)。これらの結果から、FilGAP が癌細胞の浸潤を促進していることが示された。さらに MDA 細胞がコラーゲンゲル内を浸潤するとき、間葉系遊走細胞よりアメーバ様遊走細胞の方が効率的に運動している可能性が示唆された。

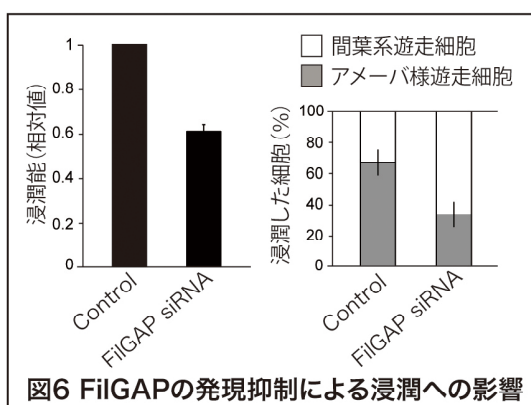


図6 FilGAPの発現抑制による浸潤への影響

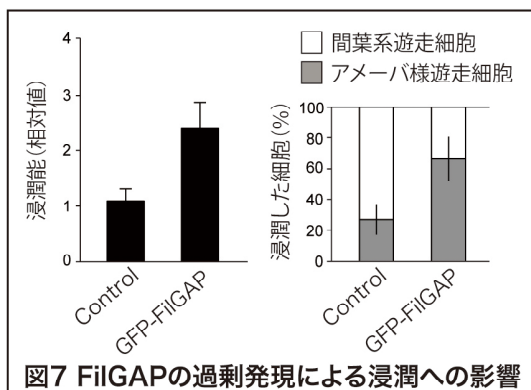


図7 FilGAPの過剰発現による浸潤への影響

② 最後に FilGAP の癌細胞の転移への関与を調べるため、MDA 細胞を用いて肺血管外遊走アッセイを行った。FilGAP の遺伝子発現抑制を行った GFP 発現 MDA 細胞をヌードマウスの尾静脈から投与し、30 分および 6 時間後に肺に転移した細胞を解析した。投与後 30 分では、MDA 細胞が肺組織に輸送されて血管壁に接着している様子が観察された。このとき FilGAP の遺伝子発現抑制による影響はみられなかった (図 8)。しかし、投与後 6 時間で肺に定着して残った細胞を調べたところ、FilGAP の遺伝子発現抑制により有意なその細胞の減少が観察された (図 8)。本アッセイは短期的な転移能を調べるものではあるが、これらの結果は FilGAP が生体内において癌細胞の転移に関与していることを示唆した。以上の結果より、FilGAP は癌細胞の浸潤、転移に対して亢進的に働く分子であることが示唆された。

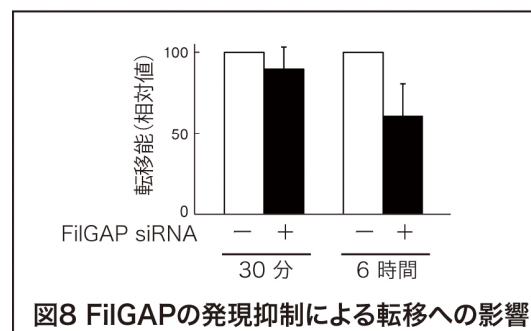


図8 FilGAPの発現抑制による転移への影響

以上、本研究により、上皮由来の癌細胞において、FilGAP がその運動様式の転換を制御し

ていることが明らかになった。特に間葉系遊走からアメーバ様遊走への転換（MAT）を促進する働きがあることが分かった。この分子機構として、RhoA/ROCK による Rac の拮抗作用が関与し、ROCK による FilGAP のリン酸化が Rac 活性の抑制に働くことで MAT を促進するというモデルが提唱された（図9）。さらに FilGAP によるアメーバ様遊走の誘導が結果として癌の浸潤、転移の促進に働いていることが示唆された。このように、FilGAP は癌細胞の運動にとって重要な分子であることが明らかになった。

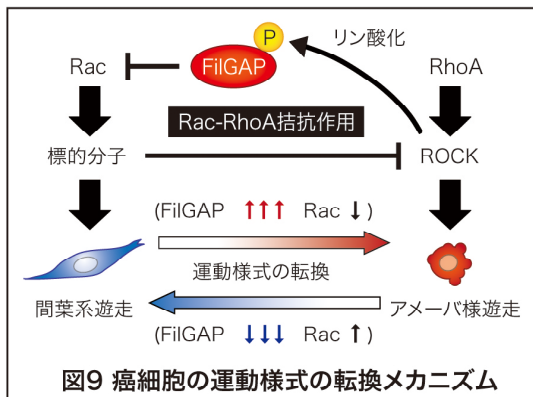


図9 癌細胞の運動様式の転換メカニズム

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 1 件)

① Saito, K., Ozawa, Y., Hibino, K., Ohta, Y., FilGAP, a Rho/Rho-associated protein kinase-regulated GTPase-activating protein for Rac, controls tumor cell migration. Mol. Biol. Cell 査読有 2012, vol. 23, p4739-4750.

[学会発表] (計 3 件)

① 斉藤康二, RacGAP 因子 FilGAP は癌細胞の運動を制御する, 平成 25 年度がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動公開シンポジウム, 2014 年 1 月 31 日, 一橋講堂学術総合センター (東京)

② Saito, K., a Rho/ROCK-regulated GAP for Rac controls tumor cell migration, アメリカ細胞生物学会年会, 2012 年 12 月 17 日, Moscone Center (サンフランシスコ)

③ 斉藤康二, RacGAP 因子 FilGAP は RhoA/ROCK 経路を通じて癌細胞の形態変化を制御する, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 16 日, パシフィコ横浜 (横浜)

[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://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/seibutsu/kino/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
斉藤 康二 (SAITO KOJI)
北里大学・理学部・助教
研究者番号：70556901

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：