

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 24 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22791276
 研究課題名（和文） 新規 Rho ファミリーG 蛋白質活性化因子 DOCK4 を介した大腸癌進展機構の解析
 研究課題名（英文） Regulation of colon cancer progression by CDM protein DOCK4

研究代表者
 河田 健二（KAWADA KENJI）
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：90322651

研究成果の概要（和文）：新規 Rho ファミリー活性化因子である DOCK4 は、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 においては PDGF 刺激に対して、またヒト大腸癌細胞株 HCT116 においては EGF 刺激に対しての細胞運動能、RTK のエンドサイトーシスに Grb2 との複合体を形成して関与していることが明らかとなった。大腸癌臨床検体を用いた検討では、深達度が進むにつれ、また転移巣先では発現が亢進していた。DOCK4 発現によりマウス転移モデルにおける転移能がどのように変化するか解析中である。

研究成果の概要（英文）：Clinical studies with growth factor receptor tyrosine kinases (RTKs) inhibitors in cancer have met with a lot of promise and underscore the importance of this pathway in tumor biology. We present evidence for a novel intracellular signaling pathway linking RTK to the CDM Rac exchange factor DOCK4 via adaptor protein Grb2. In NIH3T3 cells, DOCK4 is required for PDGF-dependent cell migration and PDGF receptor β (PDGFR β) endocytosis. In HCT116 cells, DOCK4 is required for EGF-dependent cell migration and EGFR endocytosis. In addition, DOCK4 expression is increased in proportion to invasion depth and metastasis. These data may indicate that DOCK4 is a potential regulator of tumor progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：癌、転移、浸潤

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌細胞では細胞骨格の制御異常により

接着、運動、浸潤といった形質を獲得するが、その細胞内シグナルには RhoA, Rac, Cdc42 を

中心とした Rho ファミリーが中心的な役割を担っている。Rho ファミリーの活性化因子 (GEF) は 2 つのグループからなり、1 つは DH ドメインを触媒にもつ古典的な Rho-GEF グループで、もう一つが DHR2 ドメインを触媒にもつ CDM 蛋白 (Ced5-DOCK180-Mbc) と呼ばれるグループ (DOCK ファミリー) である。DOCK ファミリーはヒトにおいて 11 種類存在するが、癌との関連では DOCK4 についてのみヒトの骨肉腫、大腸癌、前立腺癌などで変異が報告されている。

(2) 大腸癌では EGFR, c-met, PDGFR といった受容体型チロシンキナーゼ (RTK) が高発現しており、腫瘍細胞の増殖や悪性化に関与することは報告されているが、それらのシグナルの細胞運動・浸潤における機序についてはまだ解明されていない。

(3) 申請者らはマウス由来線維芽細胞株 NIH3T3 において DOCK4 がアダプター分子 Grb2 と結合することを発見し、Grb2 を介して DOCK4 が PDGFR β および Dynamin と複合体を形成し PDGFR β のエンドサイトーシスを制御しているという新規の機能を今までに明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は大腸癌の RTK シグナルにおける DOCK4 の役割に焦点を当てその分子機構を明らかにするとともに、大腸癌治療のターゲットに結びつくか解析することである。

3. 研究の方法

(1) 癌遺伝子同定のために汎用される NIH3T3 細胞を用いた形質転換アッセイでは、KRAS 変異を導入すると増殖能亢進、足場非依存的増殖、接触阻止の喪失などの形質を獲得するが、成長因子 (PDGF) に対する細胞運動は逆に抑制される。KRAS 変異を導入した NIH3T3 細胞において、DOCK4 を強制発現させた場合にはどのような形質変化が生じるかを、migration assay、細胞増殖アッセイ、寒天培地での colony formation assay、ビオチン標識 PDGFR β の internalization assay, FACS などで検討する。

(2) KRAS 変異を正常腸管上皮細胞株 IEC6 に遺伝子導入して樹立した細胞株に、DOCK4 を強制発現させることでどのような形質変化

が生じるかを、(1) と同様の種々のアッセイ (migration assay、細胞増殖アッセイ、colony formation assay、ビオチン標識 EGFR の internalization assay, FACS) で検討する。

(3) ヒト大腸癌細胞株 HCT116 細胞は KRAS 遺伝子変異を内包している。そこで相同組み替えによる変異 KRAS アリルを特異的に欠失させた細胞株 (Hke3) において、細胞運動や RTK のエンドサイトーシスにおいてどのような変化があるのかを migration assay、ビオチン標識 EGFR の internalization assay などで検討する。

(4) HCT116 細胞に DOCK4 を強制発現させたり、miRNA を遺伝子導入して DOCK4 の発現抑制させることで、どのような形質変化が生じるのかを、in vitro 実験 (migration assay、細胞増殖アッセイ、ビオチン標識 EGFR の internalization assay) を行なって検討する。さらに in vivo 実験 (マウスの転移モデル) を行なってその転移能がどのように変化するかを解析する。

(5) ヒト大腸癌の臨床検体を用いて検討する。具体的には手術切除標本を用いて正常大腸上皮、大腸癌原発巣、大腸癌転移巣 (リンパ節、肝臓、肺) における DOCK4 発現を免疫組織染色、定量的 RT-PCR 法などで解析する。

4. 研究成果

(1) NIH3T3 細胞に KRAS 変異を導入すると PDGF に対する細胞運動能が migration assay では有意に抑制された。しかしながら DOCK4 を強制発現させると、抑制された PDGF に対する細胞運動能が劇的に回復された。また internalization assay, FACS では、KRAS 変異を導入すると PDGFR β のエンドサイトーシスは消失していたが、DOCK4 を強制発現させることで、PDGFR β のエンドサイトーシスも回復することが確認された。一方、細胞増殖アッセイや colony formation assay では DOCK4 強制発現は何も変化を生じなかった。

(2) NIH3T3 細胞をもちいた免疫沈降アッセイでは、PDGF 刺激による DOCK4-Grb2 複合体の形成が KRAS 変異を導入すると認められなくなった。しかしながら DOCK4 を強制発現させると DOCK4-Grb2 複合体が再び確認できるようになった。

(3)MAP キナーゼや PI 3 キナーゼといった PDGFR β の下流シグナルについて検討したところ、DOCK4 強制発現させることでとくに変化は認められなかった。Rho ファミリー蛋白の検討では、DOCK4 強制発現しても Rho, Cdc42 は変化がなかったが、Rac, Rap に関しては活性化型 (GTP 結合型) が増加することが GST プルダウン・アッセイで確認された。

(4) IEC6 細胞に KRAS 変異を導入すると EGF に対する細胞運動能が migration assay では有意に抑制された。この結果は NIH3T3 細胞における PDGF に対する細胞運動能の変化と同様の結果であった。さらに DOCK4 を強制発現させたところ、抑制された EGF に対する細胞運動能が有意に回復された。

(5)HCT116 細胞と Hke3 細胞の比較では、EGF に対する migration assay で Hke3 細胞の方が有意に細胞運動能が高いことが確認された。さらに Hke3 細胞に KRAS 遺伝子を再導入したところ、EGF に対する細胞運動能が有意に低下した。EGFR のエンドサイトーシスについては、Hke3 細胞では EGF 刺激により生じるものの、HCT116 細胞では殆ど消失していることが確認された。また Hke3 細胞に KRAS 遺伝子を再導入したところ、EGF による EGFR のエンドサイトーシスが殆ど消失することが確認された。以上の結果は、上述の NIH3T3 細胞や IEC 細胞を使った実験結果とも一致したものであり、大腸癌細胞の内在性の KRAS 遺伝子変異においても KRAS は RTK (EGF) の細胞運動、エンドサイトーシスに参与していることを示唆している。

(6)HCT116 細胞にレトロウイルスを使って、DOCK4 を強制発現させた安定細胞株と DOCK4 を発現抑制させた安静細胞株をそれぞれ樹立することに成功した。そこでこれらの細胞株を使って EGF に対する migration assay を行なったところ、DOCK4 を強制発現させた株では有意に細胞運動能が高く、一方 DOCK4 を発現抑制させた株では有意に細胞運動能が低いことが確認された。これらの細胞株におけるビオチン標識 EGFR の internalization assay は現在解析を進めているところである。またマウスを用いた転移実験もこれから行なう予定である。

(7) 70 症例の手術標本を用いて正常腸管、大腸癌、転移巣における DOCK4 の発現について

免疫組織染色を行なったところ、原発巣での深達度が進行するにつれ有意に DOCK4 の発現陽性率が高くなること、および転移巣では原発巣に比べ DOCK4 の発現陽性率が高くなること、が確認された。現在検討症例の数をさらに増やすとともに、凍結標本をもちいた定量的 RT-PCR 法での発現の検討も進めている。

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 5 件)

① Kawada K and Taketo MM. “Significance and Mechanism of Lymph Node Metastasis in Cancer Progression” *Cancer Res.* 2011. 71(4). 1214-18. 査読有.

DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1909

② Akagami M, Kawada K, Kubo H, Kawada M, Takahashi M, Kaganoi J, Kato S, Itami A, Shimada Y, Watanabe G, Sakai Y. “Transcriptional factor Prox1 plays an essential role on the antiproliferative action of Interferon-g in esophageal cancer cells” *Ann Surg Oncol.* 2011;18(13):3868-77. 査読有.

DOI: 10.1245/s10434-011-1683-6

③ Kawada K, Hasegawa S, Murakami T, Itatani Y, Hosogi H, Sonoshita M, Kitamura T, Fujishita T, Iwamoto M, Matsumoto T, Matsusue R, Hida K, Akiyama G, Okoshi K,

Yamada M, Kawamura J, Taketo MM, Sakai Y.
“Molecular mechanisms of liver metastasis” Int J Clin Oncol. 2011. 16(5). 464-72. 査読有.

DOI: 10.1007/s10147-011-0307-2

④Kawada M, Seno H, Kanda K, Nakanishi Y, Akitake R, Komekado H, Kawada K, Sakai Y, Mizoguchi E, Chiba T. “Chitinase 3-like 1 promotes macrophage recruitment and angiogenesis in colorectal cancer.” Oncogene. 2011 Nov 7. [Epub ahead of print]. 査読有.

DOI: 10.1038/onc.2011.498

⑤Kato S, Kawamura J, Kawada K, Hasegawa S, Sakai Y. “Fluorescence Diagnosis of Metastatic Lymph Nodes Using 5-Aminolevulinic Acid (5-ALA) in a Mouse Model of Colon Cancer.” J Surg Res. 2011 Nov 19. [Epub ahead of print].

DOI : 該当なし

〔学会発表〕 (計 1 件)

①河田健二、“細胞遊走は PDGF 受容体のエンドサイトーシスにより制御される” 第 69 回日本癌学会 (平成 22 年度 9 月 22 日、大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河田 健二 (KAWADA KENJI)
京都大学・大学院医学研究科. 助教

研究者番号 : 90322651

(2) 研究分担者 : なし

(3) 連携研究者 : なし