

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592195

研究課題名(和文) GOLPH3 関連遺伝子制御による骨軟部腫瘍治療研究

研究課題名(英文) Role of GOLPH3 and GOLPH3L in the proliferation of human rhabdomyosarcoma

研究代表者

小宮 節郎 (Komiya, Setsuro)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：30178371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：骨軟部肉腫の発生・増殖におけるGOLPH3とそのアイソフォームであるGOLPH3Lの機能の解析を行った。横紋筋肉腫の患者腫瘍組織におけるGOLPH3/GOLPH3Lの発現を検討したところ正常筋肉組織と比較して横紋筋肉腫組織ではGOLPH3/GOLPH3Lの発現が亢進していた。また横紋筋肉腫の細胞株でも正常筋芽細胞と比較してGOLPH3/GOLPH3L分子が発現亢進していた。GOLPH3/GOLPH3Lの横紋筋肉腫における機能解析のためにGOLPH3/GOLPH3LをRNAiを用いて選択的にノックダウンすると横紋筋肉腫細胞の増殖が抑制された。

研究成果の概要(英文)：GOLPH3 was originally identified by proteomic analyses of Golgi proteins localized in the trans-Golgi network. Recently, it was reported that GOLPH3 is up-regulated in various types of malignancies. In order to explore the function of GOLPH3 and its isoform, GOLPH3L, in the pathogenesis of rhabdomyosarcoma, we investigated the expression and knockdown effects of GOLPH3/GOLPH3L in human rhabdomyosarcoma. Western blot analysis and real-time PCR revealed that human rhabdomyosarcoma cell lines and biopsy specimens exhibited an increased expression of GOLPH3/GOLPH3L. GOLPH3/GOLPH3L knockdown by siRNA prevented the proliferation of human rhabdomyosarcoma cell lines. In addition, double-knockdown of GOLPH3/GOLPH3L also prevented the proliferation of rhabdomyosarcoma cell lines. Our findings improve the understanding of rhabdomyosarcoma pathogenesis and suggest that the knockdown of GOLPH3/GOLPH3L may be an effective treatment for rhabdomyosarcoma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：横紋筋肉腫 GOLPH3 GOLPH3L 外科系臨床医学・整形外科

1. 研究開始当初の背景

Golgi phosphoprotein 3 (以下 GOLPH3) (別名 GOPP1; GPP34; MIDAS; FLJ90675 と呼ばれる)はゴルジ複合体に局在する蛋白質として同定された。GOLPH3 のゴルジ体での正常な機能は phosphatidylinositol 4-kinases、phosphatidylinositol 4-phosphate (PtdIns4P)や PtdIns4P 結合蛋白と協調的にゴルジ小胞形成や targeting を行っている。一方で GOLPH3 はゴルジ体のみならず、エンドソームや細胞膜にも局在することが明らかとなっている。

Scott らは肺がん、卵巣がん、乳がん、前立腺がん、メラノーマの患者腫瘍組織における染色体増幅を検討した結果、高頻度に 5p13 領域の遺伝子増幅が認められることを見出した。この領域にコードされる遺伝子の発現を検討した結果、がん組織ではゴルジ装置タンパクである GOLPH3 が高発現しており、腫瘍化や細胞増殖に関与している新たながん原遺伝子であることを報告した。GOLPH3 が高発現している腫瘍細胞で GOLPH3 の発現をノックダウンすると腫瘍細胞の増殖が抑制された。一方で正常細胞に GOLPH3 を強制発現すると形質転換して腫瘍化することを示した。そのメカニズムとして GOLPH3 はレトロマー複合体の構成タンパクである VPS35 と結合して mammalian target of rapamycin (mTOR)を介した増殖シグナルを異常活性化し、腫瘍細胞の増殖や生存を誘導していることが示された。

GOLPH3 発現上昇による腫瘍化および細胞増殖メカニズムは未だ不明な点が多いが、

ゴルジ装置の重要な機能のひとつとして小胞体から送られてきたタンパク質に糖鎖を付加する機能がある。古くから細胞のがん化に伴い糖鎖構造が変化することは知られているが、発現亢進した GOLPH3 が糖転移化酵素の機能を修飾してリガンドやレセプターの糖鎖修飾を変えることで細胞増殖シグナルを異常活性化していることが示唆されている。

細胞膜におけるレセプターのエンドサイトーシスによるレセプター数の増減は増殖因子によるシグナルの活性化を調整していることが知られている。発現が亢進した GOLPH3 はゴルジ装置と細胞質内をダイナミックに移動してレトロマー複合体の VPS35 と結合することにより、細胞膜上のレセプターの内部移行・再利用の系に異常を起こして WNT や mTOR のなどの細胞増殖シグナルを異常活性化していることが示唆されている。

また GOLPH3 は構造上、多数のリン酸化部位やミリスチル化を受けると推測される配列を持っており、これらの部位が修飾されることにより活性化や細胞内局在が変化して、腫瘍化の機能が制御されていることが示唆されている。しかし骨軟部肉腫における機能は明らかとされていない。

2. 研究の目的

新たな癌遺伝子として注目されている GOLPH3 とそのアイソフォームである GOLPH3L の機能の解析を行った。骨肉腫細胞株・横紋筋肉腫細胞株および患者腫瘍サンプルにおける GOLPH3/GOLPH3L 遺伝子の機能を検討した。

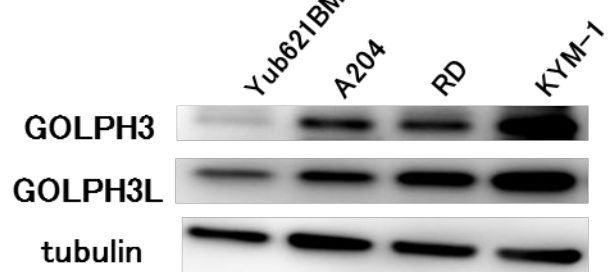
3. 研究の方法

ヒト横紋筋肉腫細胞株における GOLPH3 遺伝子の発現を real time PCR を用いて確認した。ヒト横紋筋肉腫細胞株 A204、RD、KYM-1 にて、GOLPH3 の siRNA を用いて knock down し細胞増殖能の検討を行った。また、同様に、GOLPH3 遺伝子の相同体である GOLPH3L 遺伝子を GOLPH3L の siRNA を用いて knock down し細胞増殖能の検討を行った。さらに、上記 2 遺伝子を同時に knock down し細胞増殖能の検討を行った。

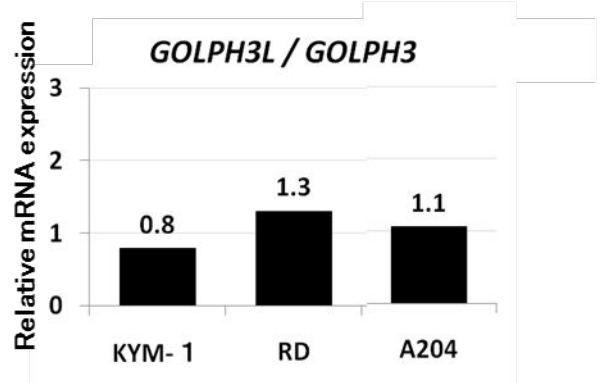
4. 研究成果

real time PCR にてヒト横紋筋肉腫細胞株において GOLPH3 の発現が messenger RNA のレベルで上昇している細胞株が見られた。同様に western blot においてタンパク質のレベルにおいても正常筋芽細胞、間葉系幹細胞よりも、横紋筋肉腫細胞株において GOLPH3 の発現の上昇が見られた。また患者生検組織でも正常骨格筋組織に比べて GOLPH3 の発現は上昇していた同様に、GOLPH3L 遺伝子も発現は上昇していた。(Fig.1 A-D)。

A



B



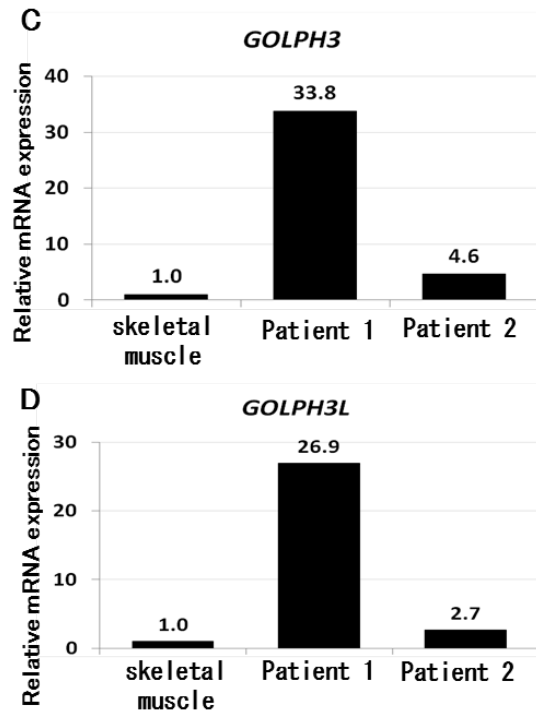


Fig. 1

横紋筋肉腫細胞株、A204、RD、KYM-1においてGOLPH3をsiRNAを用いてknock downするとMTT assay、WST-1 assayにて増殖抑制効果が認められた。(Fig. 2 A-D)

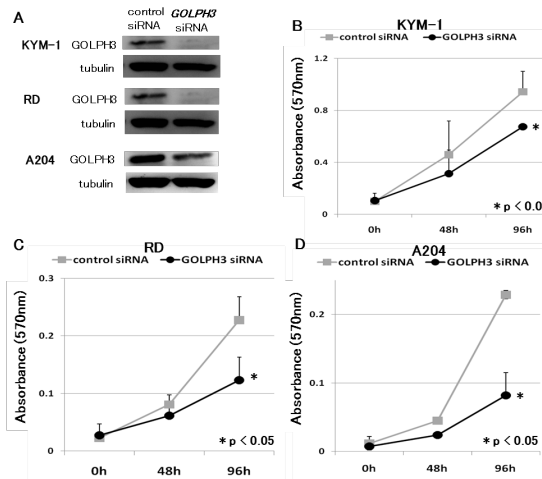


Fig. 2

さらに、GOLPH3L遺伝子のknock downでも同様の結果が得られた (Fig. 3 A-D)。

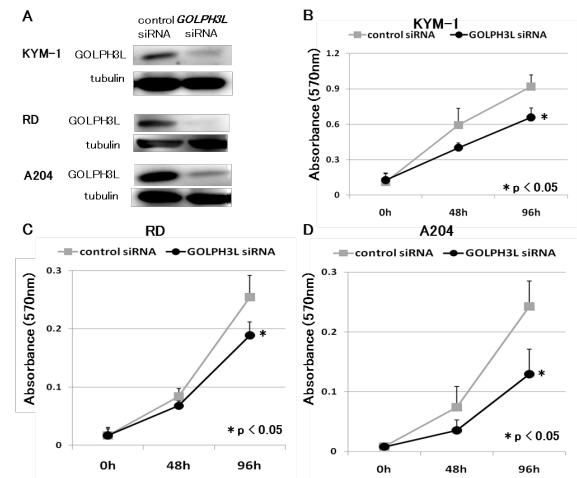


Fig. 3

またGOLPH3とGOLPH3Lを同時にノックダウンすると相加的に横紋筋肉腫の増殖が抑制された (Fig. 4 A-C)

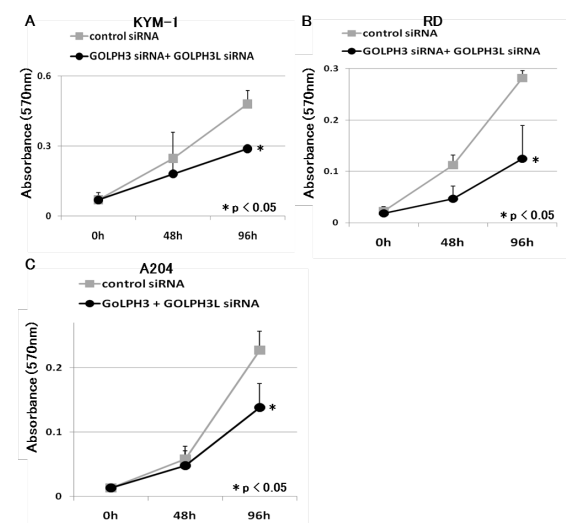


Fig. 4

また骨肉腫組織でも正常骨組織と比較してGOLPH3/GOLPH3Lは強発現していた。さらにGOLPH3/GOLPH3Lをノックダウンするとin vitroで骨肉腫の増殖が抑制された。

またshRNAを用いてGOLPH3をノックダウンした骨肉腫細胞をヌードマウスの皮下に移植するとコントロールの骨肉腫細胞と比較して有意に腫瘍の増大が抑制された。GOLPH3の発現低下に伴う骨肉腫細胞増殖抑制メカニズムの解析のために、細胞をSA-beta-Gal染色したところ、骨肉腫細胞でGOLPH3をノックダウンすると細胞老化が誘導されることが示唆されている。

また他のグループからは中枢神経系の悪性腫瘍であるグリオブラストーマやアストロサイトマでGOLPH3が高発現しており、GOLPH3の高発現は予後悪化因子であること

を示唆するデータが報告されている。
細胞内小器官の中でエネルギー産生や酸化ストレスと密接に関与するミトコンドリアの機能異常とがん化については多数の報告があるが、ゴルジ装置関連遺伝子の機能異常とがん化についての研究は未だ端緒についたばかりである。ゴルジ装置関連タンパクのダイナミックな細胞内局在の変化や多彩な機能が明らかになるにつれ、がん化への関与の詳細なメカニズムも明らかとされ、新たな分子標的治療ターゲットとなることが期待される。

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1件)

Role of GOLPH3 and GOLPH3L in the proliferation of human rhabdomyosarcoma
Kunigou O., Nagao H., Kawabata N., Ishidou Y., Nagano S., Maeda S., Komiya S., and Setoguchi T. †

† Corresponding author

Oncology Reports. 2011;5:1337-42 「査読有」

[学会発表](計1件)

第45回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会

横紋筋肉腫における GOLPH3 遺伝子の高発現とその機能解析

Functional analysis of over-expressed GOLPH3 in rhabdomyosarcoma

救仁郷修、瀬戸口啓夫、松野下幸弘、佐々木裕美、永尾宗子、小宮節郎

東京国際フォーラム

2012年7月14日(土)・15日(日)

[図書](計1件)

骨軟部肉腫におけるゴルジ装置タンパク GOLPH3 と GOLPH3L の発現上昇と細胞増殖への関与

瀬戸口啓夫、救仁郷 修、中村俊介、永野 聡、横内雅博、小宮節郎

生体の科学 ISSN 0370-9531 (Print) ISSN 1883-5503 (Online) 63巻5号(2012.10)

P.420-421

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小宮 節郎 (Komiya Setsuro)

鹿児島大学大学院・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30178371

(2)研究分担者

瀬戸口啓夫 (Setoguchi Takao)

鹿児島大学大学院・医歯学総合研究科・特任

准教授