

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893093

研究課題名(和文) 上皮間葉転換を標的とした卵巣癌の浸潤、腹膜播種機構の解明と複合的治療の開発

研究課題名(英文) Development of complex treatment and clarification of the invasion and peritoneal dissemination mechanism of ovarian cancer which assumed epithelial mesenchymal transition a target

研究代表者

関谷 龍一郎 (SEKIYA, RYUICHIRO)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：40712352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：PLAGL2(Pleomorphic adenoma gene like-2)は卵巣癌で発現が見られる転写因子である。今回卵巣癌におけるPLAGL2の機能解析を行った。卵巣癌細胞においてPLAGL2を抑制させると細胞骨格および細胞遊走能に変化を認めることが分かった。この変化はアクチン骨格の構成に必要なRhoA、Rac1などのRho GTPaseの活性が関与していることが示唆され、特に細胞骨格にはRhoA、細胞遊走にはRac1が強く関与していた。また、Rac1の変化にはRac1に特異的なGTPase結合タンパクであるCHN1(chimerin1)も関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pleomorphic adenoma gene like-2 (PLAGL2), a member of the PLAG gene family, is a C2H2 zinc finger transcriptional factor that is involved in cellular transformation and apoptosis. We found that PLAGL2 depletion induced organization of stress fibers. In addition, formation of focal adhesions was promoted by PLAGL2 knockdown. Rac1 was inactivated in the absence of PLAGL2, whereas activity of RhoA was increased. Conversely, exogenous expression of PLAGL2 induced disruption of stress fiber formation and production of lamellipodia. Consistently, RhoA was suppressed and Rac1 was activated by PLAGL2 overexpression. PLAGL2 expression induced lamellipodia formation and disruption of stress fiber formation. Finally, we show that chimerin1(CHN1) expression is essential for Rac1 inactivation in PLAGL2-depleted cells.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：PLAGL2 卵巣癌 RhoA Rac1

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は様々な遺伝子変異の蓄積で無規律的な増殖能を獲得した細胞であり、浸潤、転移により他の臓器へ広がり、やがて個体を死に至らしめる。多くの癌細胞は上皮細胞に由来する。上皮細胞は周囲の細胞と密接に結合し影響を及ぼしあうことにより、個々の細胞が無規律的に増殖、移動することを妨げている。上皮細胞の細胞間接着には E-cadherin が重要な働きを担っている。このタンパク質の発現低下は細胞間接着の低下を促し、そして細胞内における増殖シグナルを活性化し、細胞の癌化を引き起こす一因となる。

上皮間葉転換 (Epithelial to Mesenchymal Transition: EMT) は、上皮細胞における細胞間接着が E-cadherin の発現抑制により低下し、細胞が線維芽細胞様の形態となる現象であり、癌化への重要な段階のひとつである。EMT の分子機構に関しては精力的な研究が過去 10 年にわたりおこなわれており、多くの知見が得られている。癌遺伝子である KRas の活性化、また TGF-β や TNF-α など癌の増殖に関与するサイトカインの刺激により EMT は引き起こされる。それらの刺激は様々なシグナル伝達経路を活性化し、Snail、Twist、Zeb1 などの転写因子を活性化する。これらの転写因子は E-cadherin の発現を抑制し、EMT を誘導する。様々な癌においてこれらの転写因子の発現が亢進し、それに伴い E-cadherin の発現が減少していることが報告されている。

2. 研究の目的

卵巣癌において EMT は、癌の浸潤、転移、また抗癌剤の耐性獲得に関与していると考えられている。EMT 関連タンパク質は、卵巣癌の分子標的治療のターゲットとして有望であり、これらの働きを阻害する薬剤は将来卵巣癌の治療薬として用いられる可能性がある。卵巣癌において EMT を制御する因子はいくつか報告されている。しかしながら、いまだ EMT の制御機構の詳細は不明であり、他にも多くの制御因子が存在すると推測されている。そこで我々は、siRNA を用いたスクリーニングにより、EMT を制御する可能性のある卵巣癌に発現がいみられる特異な新たな転写因子の同定を試みた結果同定された Pleomorphic adenoma gene like-2(PLAGL2)の機能解析を目的とする。

3. 研究の方法

(1) EMT は主に転写因子により制御される。卵巣癌では EMT を促進する遺伝子の発現が亢進していると推測される。そこでスクリーニングを行った。まず最初に Oncomine database (DNA アレイのデータベース) を用いて卵巣癌で発現が亢進している転写因子を 48 個選択した。そしてそれらの遺伝子に対する siRNA を購入し、48 穴に培養した卵

巣癌細胞株 ES-2 細胞に導入した。ES-2 細胞は卵巣明細胞腺癌の細胞株であり、線維芽細胞用の形態を示している。EMT を促進する遺伝子が siRNA によりその発現が抑制されれば、ES-2 細胞の形態は上皮細胞様に変化すると推測された。そしてスクリーニングの結果、PLAGL2 に対する 2 つの siRNA の導入により ES-2 細胞が上皮細胞様の形態に変化することが観察された。そこで、siRNA を用いたスクリーニングにて同定された転写因子 PLAGL2 をターゲットとし、卵巣癌細胞株 ES-2 および Hey を用いて機能解析を行った。機能解析には Rho GTPase の活性を確認するために GST beads を用いた Pull down assay を用い検討を行った。また、細胞遊走能の変化を確認するために Boyden Chamber を使用し遊走能の変化を確認した。次に過剰発現系として乳癌細胞株 MDA-MB-231 を使用し、GFP 融合タンパク質として PLAGL2 を発現させた。同様に GST beads を用いた Pull down assay、遊走能の変化を確認した。また、PLAGL2 の Deletion mutant をいくつか作成し、MDA-MB-231 細胞での局在、形態変化について検討を行った。

(2) PLAGL2 の発現抑制に対するマイクロアレイ解析にて CHN1(chimerin1)の発現が上昇することが判明した。そこで CHN1 の siRNA を導入し Rho GTPase の活性変化を検討した。また、CHN1 の shRNA を作成し、同時に PLAGL2 も抑制することにより PLAGL2 と CHN1 の関連性を多面的に解析した。解析には Rho GTPase の活性変化、遊走能の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) PLAGL2 抑制による Rho GTPase ファミリーである RhoA、Rac1、Cdc42 の活性変化を GST ビーズを用いた pull down assay にて検討した。すでに以前の研究で PLAGL2 抑制により ES-2 細胞の形態変化において、アクチンストレスファイバーの増加が見られていた。RhoA はアクチンストレスファイバーの形成に関与し、Rac 1 は lamellipodia の形成に関与していることが知られている。その変化と一

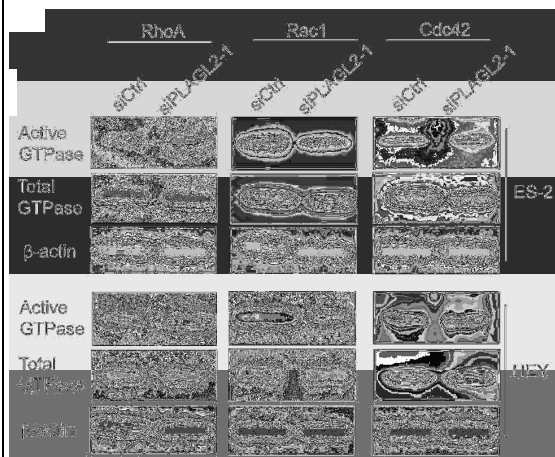


図1 PLAGL2抑制によるRho GTPaseの変化

致するように PLAGL2 抑制により RhoA の活性が上昇していた。(図 1) また、興味深いことに Rac1 の活性は減少しており、Cdc42 の活性に関しては明らかな変化は認めなかった。

(図 1)

このストレスファイバー形成の変化が RhoA による変化であることを確かめるために Rho/ROCK シグナルのインヒビターである Y27632 および dominant negative RhoA(T19N) を ES-2 細胞に導入し、PLAGL2 抑制による形態変化が抑制されるかを検討した。siRNA により PLAGL2 を抑制した ES-2 細胞に Y27632 を添加し形態変化を観察したところ、PLAGL2 抑制により出現したアクチンストレスファイバーは消失していた。また、T19N を遺伝子導入した ES-2 細胞に siRNA にて PLAGL2 を抑制させたところ control siRNA ではアクチンストレスファイバーの形成を認めたものの T19N を導入させた ES-2 細胞ではアクチンストレスファイバーは認めなかった。以上のことから PLAGL2 抑制によるアクチンストレスファイバーの増強は RhoA 活性の変化によるものであることが示唆された。

次に PLAGL2 抑制による細胞遊走能の変化を確認するため migration assay を行った。siRNA にて PLAGL2 を抑制し、Boyden chamber を使用し 2 時間後、4 時間後、6 時間後の 3 段階に分けて確認した。その結果、どの時間帯においても Control に比べ PLAGL2 抑制により細胞遊走能が優位に低下していた。続いてこの遊走能の変化にも Rho GTPase の変化が関与しているかを確認するため、Y27632 を使用し同様に実験を行った。その結果では PLAGL2 抑制により低下した細胞遊走能は Y27632 添加により開腹を認めた。このことから PLAGL2 抑制による細胞遊走能の変化も Rho GTPase 活性の変化が関与していることが示唆された。

PLAGL2 抑制系により Rho GTPase との関連性が示唆されたことから、次に PLAGL2 の GFP 誘導タンパク質を作成し、ES-2 及び Hey に導入を試みた。ところが GFP-PLAGL2 発現細胞はすぐに消失してしまった。以前の報告では PLAGL2 は細胞死のメカニズムに関与しているとの報告もありその関与が示唆された。そこで、乳癌細胞株 MDA-MB-231 を使用し PLAGL2 を遺伝子導入した。PLAGL2 を強制発現させると、MDA-MB-231 細胞で見られていたアクチンファイバーは消失し、lamellipodia の形成を認めた。Lamellipodia は Rho GTPase である Rac1 が形成に関与していることが知られており、次に Rho GTPase の活性の変化を検討した。抑制系と同様に GST ビーズを用いた Pull down assay を行った。すると、lamellipodia の形成に同調するように Rac1 の活性が上昇していた。対して RhoA の活性は低下を認めた。(図 2) Cdc42 は抑制系と同様に明らかな変化は認めなかった。細胞遊走能に関しては PLAGL2 過剰発現にて上

昇を認めた。

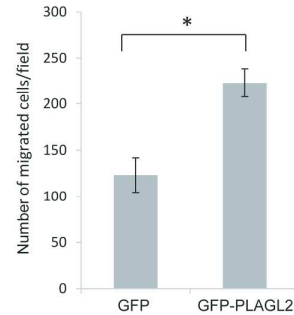
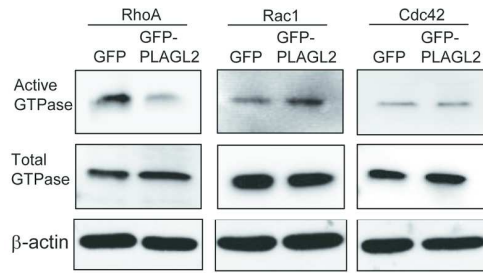


図2 PLAGL2強制発現によるRho GTPaseの変化および細胞遊走能の変化

PLAGL2 は C2H2 ドメインを持ち、C 末端には activation ドメイン、その間に repressor ドメインを保つ構造をしている。そこで、次にこの形態変化に PLAGL2 の転写活性が必要であるかを検討するため GFP で tag 付けされた mutant PLAGL2 を作成し MDA-MB-231 に遺伝子導入し形態変化を確認した。Full length も含め図 3 に示すように 6 種類の mutant PLAGL2 を作成し MDA-MB-231 細胞に導入し形態変化を確認した。FL、 ΔN 、 ΔRep では PLAGL2 は核内にとどまっていたものの、 $\Delta 234$ 、 $\Delta C2H2$ では核内及び細胞質にも認められた。 ΔAct は Activation ドメインが無いものの核小体内にとどまっていた。そして ΔN 、 ΔRep では FL と同様にアクチンストレスファイバーの消失を認め、lamellipodia の形成を認めた。また一方で ΔAct 、 $\Delta 234$ 、 $\Delta C2H2$ ではアクチンストレスファイバー、lamellipodia の変化は認めなかった。(図 3)

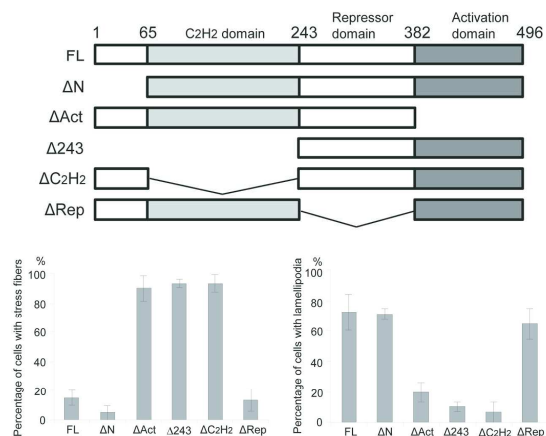


図3 mutant PLAGL2での形態変化

この結果から、PLAGL2 が仲介すると考えられる MDA-MB-231 細胞におけるアクチンストレスファイバーの消失及び lamellipodia の形成はこの転写活性が必要であることが示された。

(2) PLAGL2 の発現抑制に対するマイクロアレイ解析にて CHN1(chimerin1)の発現が上昇することが判明した。CHN1 は GTPase 活性タンパクで RAC GTP-binding タンパクに特異的に結合し作用することが知られている。また、Rac1 に対して抑制的に働くことも知られている。この CHN1 が PLAGL2 抑制による Rac1 活性の低下、細胞遊走の低下に関与しているかを検討した。まず GFP 融合タンパクとして CHN1 を ES-2 細胞に遺伝子導入したところ、Rac1 の活性は低下を認めた。その一方で RhoA、Cdc42 の活性には変化は見られなかった。この結果は、CHN1 が Rac1 に抑制的に働くという報告と矛盾しない結果であった。次に CHN1 の shRNA を作成し ES-2 細胞に導入した後に PLAGL2 を siRNA にて抑制し機能解析を行った。まず形態変化においては、PLAGL2、CHN1 ともに抑制された状態でもアクチンストレスファイバーを認め、CHN1 単独で抑制した場合はアクチンストレスファイバーを認めなかった。このことから CHN1 はアクチンストレスファイバーの構築には関与していないことが示唆される。次に Rho GTPase の活性変化について検討した。RhoA は PLAGL2 抑制により活性が上昇していたが、CHN1 との共抑制でも活性は上昇したままであった。以上のことから CHN1 は PLAGL2 による RhoA の活性変化には関与しておらず、RhoA の作用による変化と思われるアクチンストレスファイバーの構築にも関与していないことが示唆された。一方で Rac1 の活性は PLAGL2 抑制により抑制されていたが、CHN1 との共抑制では抑制されず変化は認めなかった。(図 4) つまり、PLAGL2 による Rac1 活性の変化は RAC GTP-binding タンパクである CHN1 を介して行われていることが示唆される。

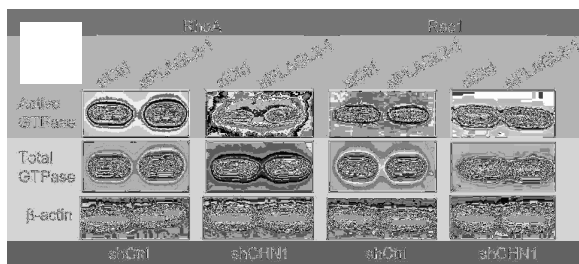


図4 CHN1、PLAGL2抑制によるRho GTPaseの変化

Rac1 は PLAGL2 による細胞遊走能の変化にも影響していることが考えられたため、

CHN1 抑制による細胞遊走能の変化についても検討した。まずコントロール shRNA にて PLAGL2 を抑制したところ以前のデータと同様に細胞遊走能は優位に低下した。次に CHN1 を共抑制させたところ PLAGL2 抑制により低下していた細胞遊走能は低下を認めずコントロールと差は認めなかった。このことより PLAGL2 による細胞遊走能の変化には Rac1 の活性が重要な役割を担っており、それには CHN1 が関与していることが示唆された。

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 1 件)

① Seikiya R, Maeda M, Yuan H, Asano E, Hyodo T, Hasegawa H, Ito S, Shobata K, Hamaguchi M, Kikkawa F, Kajiyama H, Senga T. PLAGL2 regulates actin cytoskeletal architecture and cell migration. *Carcinogenesis*. 査読あり 2014 Sep;35(9):1993-2001 doi:10.1093/carcin/bgu081

[学会発表] (計 4 件)

① 関谷龍一郎
PLAGL2 regulates actin cytoskeleton architecture and cell migration
15TH BIENNIAL MEETING OF THE INTERNATIONAL GYNECOLOGIC CANCER SOCIETY

2014 年 11 月 8 日 ~ 11 月 11 日
Melbourne, Australia

② 関谷龍一郎
PLAGL2 regulates cell migration and actin cytoskeleton organization
第 73 回日本癌学会学術総会
2014 年 9 月 25 日 ~ 9 月 27 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市西区みなとみらい)

③ 関谷龍一郎
PLAGL2 はアクチン細胞骨格の構築と細胞遊走を制御する
第 56 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
2014 年 7 月 17 日 ~ 7 月 19 日 栃木県総合文化センター (栃木県宇都宮市本町)

④ 関谷龍一郎
PLAGL2 は卵巣癌細胞においてアクチン骨格の構成と細胞遊走に関与する
第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会
2014 年 4 月 19 日 東京国際フォーラム (東京都千代田区丸の内)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関谷 龍一郎 (SEKIYA, Ryuichiro)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：40712352