

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08634

研究課題名(和文)非小細胞肺癌細胞の増悪進展におけるRor1-Rifシグナルの機能

研究課題名(英文)Functional analysis of Ror1-Rif signaling in malignant progression of non-small cell lung cancer cells

研究代表者

西田 満(Nishita, Michiru)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30379359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：非小細胞肺癌細胞の浸潤能におけるRor1の役割について検討し、PC-9細胞がRhoファミリー低分子量Gタンパク質Rifを介して、三次元マトリゲル内での方向性を持ったフィロポディア形成とそれら周囲のマトリゲル分解を誘導することを見出した。また、Wnt5a-Ror1-Dvlシグナルの恒常的活性化が浸潤能の亢進に寄与していることも見出した。さらに、Rif結合タンパク質として見出したSmgGDSが、Rifを介した浸潤制御に関わっていることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってRor1、Rif、SmgGDSを介した新たなフィロポディア形成機構が見いだされたことは、細胞生物学的知見として重要である。また、がん細胞浸潤におけるフィロポディアの役割を見いだしたことは、社会的にも意義が多岐にわたる。特に、肺癌は本邦におけるがんによる死亡原因の1位であり、中でも肺癌の8割を占める非小細胞肺癌では、化学療法や放射線治療が有効でないことが治療の大きな障害になっていることから、本研究成果は、有効な治療方法を開発する上でも重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：We studied the role of Ror1 in invasive properties of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. We have shown that, in PC-9 NSCLC cells, Ror1 induces formation of polarized filopodia through the Rho-family small GTPase, Rif, in 3D-Matrigel. These filopodia were spatially associated with degradation of Matrigel. Suppressed expression of Ror1 or Rif inhibited both filopodia formation and Matrigel degradation. We have also shown that PC-9 cells express high levels of Wnt5a, leading to constitutively activated Wnt5a-Ror1-Dvl signaling, which is required for their invasiveness. Furthermore, SmgGDS was identified as a Rif-binding partner that promotes Rif-induced filopodia formation and invasion in PC-9 cells. Taken together, these results suggest that Wnt5a-Ror1 signaling mediated by SmgGDS and Rif regulates filopodia formation to promote invasion of NSCLC cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：非小細胞肺癌 Ror1受容体型チロシンキナーゼ Rif低分子量Gタンパク質 フィロポディア がん細胞浸潤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼ Ror1 は、非小細胞肺癌(NSCLC)や乳がん細胞等において発現亢進し、それらの増殖に参与することが示されている。しかし、NSCLC 細胞における Ror1 シグナルの分子機構は多くが不明のままである。我々は、Ror1 がフィロポディア形成を誘導し、その分子機構に Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 (Rho GTPase)である Rif (Rho in filopodia: RhoF)が必須な役割を担っていることを明らかにしている。また、Ror1 と Rif が共に NSCLC 細胞において高発現し、フィロポディア形成の誘導だけでなく、細胞の増殖と浸潤の促進にも関与していることも見出している。一方、これまでの報告から、Rif はアクチン核化因子である mDia を介してフィロポディア形成を誘導することが知られているが、mDia 以外の Rif エフェクターや Rif の活性制御機構およびその生理的・病理的意義はほとんど明らかにされていない。そこで我々は Rif の新規エフェクターや活性制御因子を明らかにするため、LC-MS/MS 解析によって Rif と会合するタンパク質を探索した。その結果、SmgGDS (Small G protein GDP dissociation stimulator)を見出した。SmgGDS は NSCLC や前立腺がんなどで発現亢進していることが報告されており、その機能については、複数の Ras GTPases および Rho GTPases に対する GEF (GDP/GTP 交換因子)としての機能が報告されている。しかし、SmgGDS は構造上これまでに知られている GEF とは全く異なり、その GEF としての機能の分子機構は明らかではない。また、G タンパク質などの C 末端には CAAX モチーフ(C: システイン、A: 脂肪族アミノ酸)が存在し、そのシステイン残基がプレニル化(ゲラニルゲラニル化またはファルネシル化)されているが、SmgGDS は Ras GTPases および Rho GTPases の CAAX モチーフのゲラニルゲラニル化を促進することで、それら GTPases の膜局在を制御していることも示唆されている。しかし、その分子機構についてもほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、Ror1 と SmgGDS、Rif の関連を明らかにし、NSCLC 細胞の増悪・進展におけるそれらを介したシグナル経路の役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

各種ヒト NSCLC 細胞株を用いて、Western blot とリアルタイム PCR により、それぞれ各種タンパク質と mRNA の発現量を解析した。遺伝子の発現阻害実験のため、トランスフェクション試薬を用いて siRNA を各種細胞に導入した。細胞が形成するフィロポディアや浸潤突起は、アクチン動態または細胞膜の形状を共焦点レーザー顕微鏡観察することによって評価した。Rif と SmgGDS の *in vitro* 結合実験のため、大腸菌の発現系を用いた Rif と SmgGDS の組換えタンパク質を調整した。培養細胞におけるそれらの結合は共免疫沈降実験によって検討した。三次元マトリゲル中を浸潤している PC-9 細胞の形態解析のため、牛胎児血清でコーティングしたカバーガラス上に 2 倍希釈したマトリゲルの層を形成させ、その上にアクチン蛍光プローブ (Lifeact-Ruby) を発現させた PC-9 細胞を播種した。30 分～2 時間後に細胞を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。分解されると蛍光を発する DQ コラーゲン IV をマトリゲルに混合し、同様の解析を行うことで、細胞形態とコラーゲン IV の分解の空間配置について検討した。

4. 研究成果

8 種類のヒト NSCLC 細胞株を用いて Ror1、Rif、SmgGDS の発現を解析した結果、全ての細胞株においてそれらの発現が確認された。また、SmgGDS については、全長(SmgGDS-607)

とそのスプライシングバリエーション (SmgGDS-558) の発現が用いた全ての NSCLC 細胞において検出された。Rif とそれら 2 つの SmgGDS アイソフォームとの結合について解析した結果、Rif は *in vitro* においては両アイソフォームと同程度に結合したが、細胞内において SmgGDS-607 と特異的に結合することを明らかにした。PC-9 細胞を用いて SmgGDS-607 を特異的に発現阻害した結果、Ror1 または Rif を発現阻害した場合と同様に、フィロポディア形成、増殖、浸潤が顕著に阻害された。これまでの報告から、NSCLC 細胞の増殖・浸潤には SmgGDS-607 ではなく SmgGDS-558 が重要であると考えられているが、本研究から少なくとも PC-9 細胞において SmgGDS-607 がフィロポディア形成、増殖、浸潤に重要な役割を担っていることが示唆された。

PC-9 細胞におけるフィロポディア形成と浸潤能との関係について検討するため、三次元マトリゲル中を浸潤している PC-9 細胞のアクチン動態を解析した。その結果、一方向に極性を持って形成されるフィロポディアが観察された。そのようなフィロポディア形成は、Ror1 または Rif を発現阻害することで阻害された。一方、恒常的活性型 Rif を強制発現させた PC-9 細胞においては、極性を持ったより長いフィロポディアが観察された。二次元培養での PC-9 細胞の形態観察では、フィロポディアは細胞全体に認められ、また、恒常的活性型 Rif は細胞全体により長いフィロポディアの形成を誘導した。したがって、三次元マトリゲル中を浸潤しているがん細胞においては、Ror1-Rif 経路は極性を持ったフィロポディア形成に寄与していることが示唆された。さらに、DQ コラーゲン IV をマトリゲルに加えて同様の解析を行った結果、コラーゲン IV の分解はフィロポディアの周囲において特異的に認められ、Ror1 または Rif を発現阻害することでその分解は阻害された。以上の結果から、PC-9 細胞の浸潤において、Ror1-Rif 経路は極性を持ったフィロポディア形成を誘導することで、フィロポディア局所での細胞外基質の分解を促進する役割を担っていることが示唆された。

Ror1 は Wnt5a の受容体として機能することが知られているため、PC-9 細胞の浸潤能と Wnt5a-Ror1 シグナルとの関係について検討した。その結果、PC-9 細胞において Wnt5a が高発現しており、Wnt5a-Ror1 シグナルによる Dishevelled のリン酸化が恒常的に誘導されていることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Uehara Shunsuke, Udagawa Nobuyuki, Mukai Hideyuki, Ishihara Akihiro, Maeda Kazuhiro, Yamashita Teruhito, Murakami Kohei, Nishita Michiru, Nakamura Takashi, Kato Shigeaki, Minami Yasuhiro, Takahashi Naoyuki, Kobayashi Yasuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Protein kinase N3 promotes bone resorption by osteoclasts in response to Wnt5a-Ror2 signaling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaan0023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aan0023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Daiki, Suzuki Hiroaki, Kakei Yasumasa, Yamakoshi Kimi, Minami Yasuhiro, Komori Takahide, Nishita Michiru	4. 巻 42
2. 論文標題 Expression of Ror2 Associated with Fibrosis of the Submandibular Gland	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 159 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.17019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishita Michiru, Satake Tomoko, Minami Yasuhiro, Suzuki Atsushi	4. 巻 162
2. 論文標題 Regulatory mechanisms and cellular functions of non-centrosomal microtubules	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvx018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishita Michiru, Park Seung-Yeol, Nishio Tadashi, Kamizaki Koki, Wang ZhiChao, Tamada Kota, Takumi Toru, Hashimoto Ryuju, Otani Hiroki, Pazour Gregory J., Hsu Victor W., Minami Yasuhiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Ror2 signaling regulates Golgi structure and transport through IFT20 for tumor invasiveness	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-016-0028-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Saji Takeshi, Nishita Michiru, Ogawa Hiroyuki, Doi Takefumi, Sakai Yasuhiro, Maniwa Yoshimasa, Minami Yasuhiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Critical role of the Ror-family of receptor tyrosine kinases in invasion and proliferation of malignant pleural mesothelioma cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 606 ~ 613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12599	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kishimoto Keishi, Tamura Masaru, Nishita Michiru, Minami Yasuhiro, Yamaoka Akira, Abe Takaya, Shigeta Mayo, Morimoto Mitsuru	4. 巻 9
2. 論文標題 Synchronized mesenchymal cell polarization and differentiation shape the formation of the murine trachea and esophagus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-05189-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aoki Tomoaki, Nishita Michiru, Sonoda Junya, Ikeda Taro, Kakeji Yoshihiro, Minami Yasuhiro	4. 巻 110
2. 論文標題 Intraflagellar transport 20 promotes collective cancer cell invasion by regulating polarized organization of Golgi associated microtubules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1306 ~ 1316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miao Wenyu, Sakai Katsuya, Sato Hiroki, Imamura Ryu, Jangphattananont Nawaphat, Takagi Junichi, Nishita Michiru, Minami Yasuhiro, Matsumoto Kunio	4. 巻 110
2. 論文標題 Impaired ligand dependent MET activation caused by an extracellular SEMA domain missense mutation in lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3340 ~ 3349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Weissenbock Martina, Latham Richard, Nishita Michiru, Wolff Lena Ingeborg, Ho Hsin Yi Henry, Minami Yasuhiro, Hartmann Christine	4. 巻 24
2. 論文標題 Genetic interactions between Ror2 and Wnt9a, Ror1 and Wnt9a and Ror2 and Ror1: Phenotypic analysis of the limb skeleton and palate in compound mutants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 307 ~ 317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12676	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ikeda Taro, Nishita Michiru, Hoshi Kyoka, Honda Takashi, Kakeji Yoshihiro, Minami Yasuhiro	4. 巻 111
2. 論文標題 Mesenchymal stem cell derived CXCL16 promotes progression of gastric cancer cells by STAT3 mediated expression of Ror1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1254 ~ 1265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14339	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagai Tomoaki, Ishikawa Tomohiro, Minami Yasuhiro, Nishita Michiru	4. 巻 167
2. 論文標題 Tactics of cancer invasion: solitary and collective invasion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 347 ~ 355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Michiru Nishita, Ikumi Nishikaku, Eri Yoshida, Koki Kamizaki, Hiroshi Shibuya, Kunio Matsumoto, Yasuhiro Minami
2. 発表標題 Ror1 promotes invasion of lung adenocarcinoma cells through small GTPase Rif-mediated filopodia formation
3. 学会等名 ASCB/EMBO 2018 meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青木 文明、西田 満、掛地 吉弘、南 康博
2. 発表標題 IFT20は微小管ダイナミックスを制御することで大腸癌細胞の浸潤能亢進に寄与する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西田 満、松本 邦夫、南 康博
2. 発表標題 Ror1はSmgGDS-Rif経路を介して肺腺がん細胞の糸状突起形成と浸潤を促進する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Michiru Nishita, Ikumi Nishikaku, Eri Yoshida, Hiroshi Shibuya, Kunio Matsumoto, Yasuhiro Minami
2. 発表標題 Rif small GTPase mediates Ror1 signaling to induce filopodia formation and invasion of lung adenocarcinoma cells
3. 学会等名 日本細胞生物学会 日本発生生物学会合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Michiru Nishita, Yasuhiro Minami
2. 発表標題 Wnt5a-Ror signaling in cancer cell proliferation and invasion
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田 満、松本 邦夫、南 康博
2. 発表標題 Wnt5a-Ror1シグナルはRifを介した糸状突起形成によって肺腺がん細胞の浸潤を促進する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田 太郎、西田 満、掛地 吉弘、南 康博
2. 発表標題 間葉系間質細胞由来のCXCL16は胃癌細胞においてSTAT3経路を介してRor1の発現を誘導し増殖と遊走を促進する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michiru Nishita, Koki Kamizaki, Ikumi Nishikaku, Hiroshi Shibuya, Kunio Matsumoto, Yasuhiro Minami
2. 発表標題 Ror1 signaling through Dvl and Rif promotes invasion of lung adenocarcinoma cells
3. 学会等名 ASCB/EMBO 2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taro Ikeda, Michiru Nishita, Yoshihiro Kakeji, Yasuhiro Minami
2. 発表標題 Mesenchymal stromal cell-derived CXCL16 promotes proliferation and migration of gastric cancer cells by inducing STAT3-mediated expression of Ror1
3. 学会等名 ASCB/EMBO 2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福島県立医科大学医学部生化学講座ホームページ
<https://www.fmu.ac.jp/home/biochem1/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	青木 丈明 (Aoki Tomoaki)		
研究協力者	池田 太郎 (Ikeda Taro)		
連携研究者	南 康博 (Minami Yasuhiro) (70229772)	神戸大学・医学研究科・教授 (14501)	