

機関番号：33303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591596

研究課題名（和文）大腸癌の細胞極性の制御異常と悪性化促進における RhoGDI  $\beta$  の機能解析研究課題名（英文）Analysis of function of RhoGDI $\beta$  in the regulation of cell polarity and progression in colon cancer

研究代表者

太田 隆英 (OTA TAKAHIDE)

金沢医科大学・付置研究所・准教授

研究者番号：10152141

研究成果の概要（和文）： Rho ファミリータンパク質の制御分子である RhoGDI  $\beta$  (Rho GDP-dissociation inhibitor  $\beta$ )は癌の悪性進展に関わることが知られているが、その役割は依然として不明である。本研究では、免疫蛍光染色法や GFP 標識 RhoGDI  $\beta$  を用いて RhoGDI  $\beta$  の細胞内局在を明らかにするとともに、RNAi により RhoGDI  $\beta$  をノックダウンした時の影響を詳細に観察し、RhoGDI  $\beta$  が centrosome の機能の制御や細胞極性の制御を通じて癌悪性伸展に関与することを示した。

研究成果の概要（英文）： RhoGDI $\beta$  (Rho GDP-dissociation inhibitor  $\beta$ ) is one of the regulators of Rho proteins that has been implicated in cancer progression; however, the specific role of RhoGDI $\beta$  in cells has been unclear. We examined its subcellular localization and the effects of RhoGDI $\beta$  knockdown by RNAi in cancer cells. Our results suggest that dysregulated expression of RhoGDI $\beta$  contributes to cancer progression through the regulation of centrosome function and cell polarity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小腸大腸肛門外科学

キーワード：大腸癌、悪性化、RhoGDI  $\beta$ 、中心体、有糸分裂、細胞極性、DLD-1、HeLa

## 1. 研究開始当初の背景

がん転移はがん治療における最大の障壁であり、その機構の解明とそれに基づく転移抑制法の開発はがん研究の重要課題である。我々はヒト大腸癌細胞株から転移誘導遺伝子を分離し、これが RhoGDI  $\beta$  の C 末欠失変異型であることを同定し、Rac1 を細胞膜にリクルートすることにより Rac1 シグナル系を活性化し、がん細胞の

転移を促進していることを明らかにしてきた。我々は、転移過程における RhoGDI  $\beta$  の機能の解析をさらに進め、正常、がんにかかわらず、免疫蛍光染色で調べた限り全ての上皮性細胞株 (11 種類) において、M 期中期において RhoGDI  $\beta$  が centrosome に局在することを見だし、また、いくつかの上皮性細胞株において、RNAi による RhoGDI  $\beta$  のノックダウンにより細胞間接着

や染色体分配が異常になることも予備実験で見いだしていた。

上皮性がん細胞では、細胞間接着の脆弱化や細胞極性の乱れが悪性進展を促進する。また、M期の制御の異常も悪性進展の原因であることを既に我々は示してきた。細胞間接着およびM期の分裂極性の制御には、Rhoファミリーの蛋白質群が重要な役割を果たしている。RhoGDI $\beta$ はRhoファミリーの蛋白質群の制御分子であり、我々が既に示してきたように、転移過程の制御にも関与している。これらの事実を総合すると、RhoGDI $\beta$ は細胞間接着構造や centrosome が関与する細胞極性の制御に関わっており、その制御異常が癌を悪性進展させている可能性が強く示唆された。そこで、本研究では RhoGDI $\beta$  が centrosome が関与する細胞極性の制御に関わっているか検証を行った。

## 2. 研究の目的

(1) 大腸癌細胞株を含む上皮性細胞株において、RhoGDI $\beta$  が centrosome および細胞間接着部位に局在することを複数の手段で明確に示す。細胞間接着部位に関しては、どの部分(Tight junction, Adherens junction, Gap junction など)にRhoGDI $\beta$  が局在するか明らかにし、関与する細胞間接着構造を同定する。

(2) M期進行に伴う RhoGDI $\beta$  の細胞内局在の継時変化を明らかにし、M期での機能を推定する。

(3) RNAi により RhoGDI $\beta$  をノックダウンした細胞において、細胞間接着に生じる異常およびM期の進行における異常を詳細に観察し、RhoGDI $\beta$  の機能を推定する。

(4) がん治療への応用を視野に入れ、RhoGDI $\beta$  ノックダウンに癌細胞特異的な傷害性があるか検証する。

## 3. 研究の方法

(1) RhoGDI $\beta$  の細胞内局在の解析

①免疫蛍光染色: 細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定後、0.5% Triton X-100 で透過処理を行い蛍光ラベルした抗 RhoGDI $\beta$  抗体で染色した。

②GFP 標識 RhoGDI $\beta$  の細胞内局在の観察: GFP 標識 RhoGDI $\beta$  を細胞に発現させ、生細胞において GFP 標識 RhoGDI $\beta$  の局在を観察した。さらに、①と同様の固定細胞においても抗 GFP 抗体による免疫蛍光染色を行った。

観察は通常の蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡により行った。

(2) M期進行に伴う RhoGDI $\beta$  の細胞内局在の

継時変化の解析

GFP 標識 RhoGDI $\beta$  発現ベクターを HeLa 細胞に移入し、安定発現する細胞株を選択し、タイムラプス蛍光顕微鏡下で継時的に GFP 標識 RhoGDI $\beta$  の局在を観察した。

(3) RNAi による RhoGDI $\beta$  ノックダウンの影響の解析

3種類の shRNA を用いて RhoGDI $\beta$  をノックダウンした細胞において、細胞形態や免疫蛍光染色した細胞間接着部位、centrosome の数と配置を観察し、さらにフローサイトメトリーにより ploidy の変化を観察した。

## 4. 研究成果

(1) ヒト大腸癌細胞株および HeLa 細胞の M 期における RhoGDI $\beta$  の centrosome 局在は免疫蛍光染色により確認できた(図1)。この centrosome 染色は抗原ペプチド前処理により消失した。また、エピトープの異なる抗体によっても同様の染色結果が得られた。

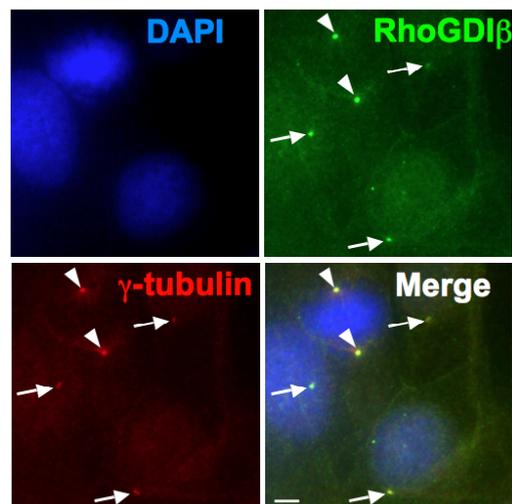


図1 DLD-1 細胞において抗 RhoGDI $\beta$  抗体により centrosome が染色される

GFP 標識 RhoGDI $\beta$  を発現する HeLa 細胞においても、生細胞(図2)および固定細胞(図3)において GFP-RhoGDI $\beta$  の centrosome 局在を確認することができた。

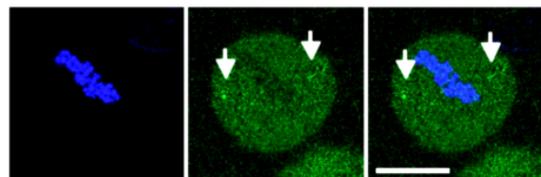


図2 GFP-RhoGDI $\beta$  を安定発現する生きた HeLa 細胞において GFP-RhoGDI $\beta$  は centrosome に局在する(共焦点顕微鏡像)

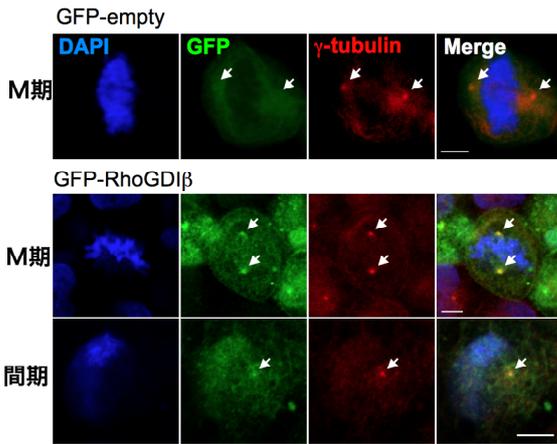


図3 GFP-RhoGDI $\beta$ を安定発現する HeLa 細胞の固定細胞において抗 GFP 抗体により centrosome が染色される

細胞間接着部位への局在に関しては、ヒト大腸癌細胞株 DLD-1 において RhoGDI $\beta$  は細胞間接着部位の頂端側に観察され、tight junction タンパク質である ZO-1 と共局在することが共焦点顕微鏡観察により明らかとなった(図4)。このような細胞間接着部位への RhoGDI $\beta$  の局在は、調べた8種類の大腸癌細胞株のうち、DLD-1 と HCT116 の2種類でのみ観察された。HeLa 細胞では観察されなかった。また、この細胞間接着部位への局在は GFP 標識 RhoGDI $\beta$  によっては確認できなかった。

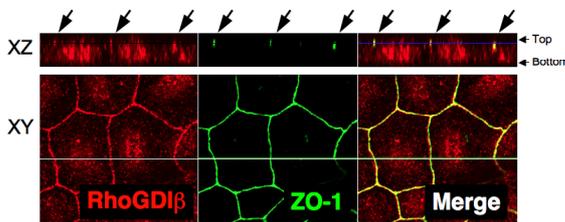


図4 DLD-1 細胞において RhoGDI $\beta$  と ZO-1 は細胞間接着部位の頂端側で共局在する

(2) M期進行に伴う RhoGDI $\beta$  の局在の変化を、GFP-RhoGDI $\beta$  を安定発現する HeLa 細胞を用いて生細胞で観察する試みは成功しなかった。これは、RhoGDI $\beta$  がもともと細胞質に多量に存在するタンパク質であるために、生細胞ではバックグラウンドが高くなり明瞭な局在の継時変化を観察し難いことが原因であった。

(3) HeLa 細胞では、RhoGDI $\beta$  ノックダウンにより M期での centrosome の数および配置の異常な細胞の頻度が増加した(図5)。

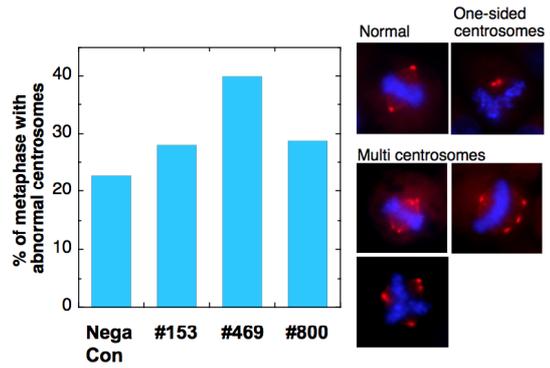


図5 HeLa 細胞における RhoGDI $\beta$  ノックダウンによる centrosome の異常

また、8倍体、16倍体が増加し ploidy の増加が観察された(図6)。DLD-1 細胞においては、HeLa 細胞ほど明瞭ではないが、同様の傾向が認められた。

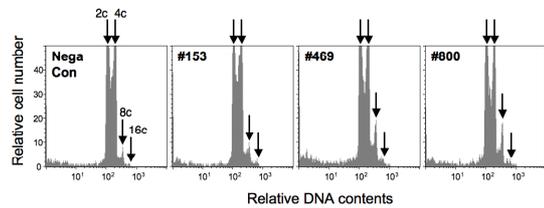


図6 HeLa 細胞において RhoGDI $\beta$  をノックダウンすると 8c, 16c などの細胞が増加する

細胞間接着や上皮型の細胞形態に関しては、HeLa 細胞、DLD-1 細胞ともに RhoGDI $\beta$  ノックダウンによって変化しなかった。

本研究のノックダウン実験進行の同時期に、RhoGDI ノックダウンにより RhoA, Rac1, Cdc42 などの主要な Rho ファミリーのタンパク質レベルが低下することが報告され、RhoGDI ノックダウン実験の結果の解釈に注意が喚起された。幸いにも、本研究の実験系では、RhoGDI $\beta$  ノックダウンは RhoA, Rac1, Cdc42 のタンパク質レベルに影響を及ぼさないことを確認できた(図7)。

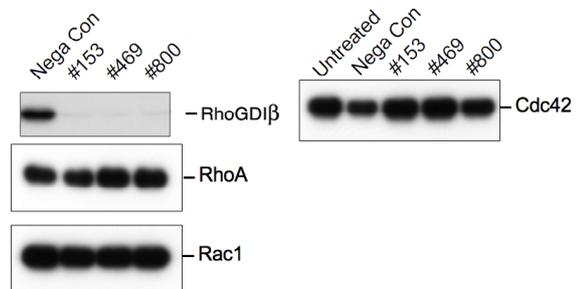


図7 HeLa 細胞において RhoGDI $\beta$  ノックダウンは RhoA, Rac1, Cdc42 のタンパク質レベルを変化させない

(4) RhoGDI  $\beta$  ノックダウンが癌細胞特異的な傷害性をもつかどうかは、残念ながら検証できなかった。

本研究では、RhoGDI  $\beta$  が centrosome の機能制御に関わっていることを示すことができた。近年、種々の癌で RhoGDI  $\beta$  の発現の変化が癌の悪性度と正あるいは負に相関することが報告されており、抗がん標的分子の候補にも挙げられている。癌悪性化における RhoGDI  $\beta$  の役割はよくわかっていなかったが、本研究で我々は、RhoGDI  $\beta$  が centrosome の機能制御に関わっていることを示すことにより、RhoGDI  $\beta$  の制御異常が細胞極性の異常を惹起し、その結果、癌を悪性進展させている可能性を示した。これらの知見が悪性進展を阻止するための手段の開発に役立つと期待できる。

いくつかの単細胞および多細胞の真核生物において RhoGDI は細胞極性の制御に関わっていることが知られている。脊椎動物には3種類の RhoGDI ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) が存在するが、どの RhoGDI が細胞極性を制御する役割を果たしているのか不明であった。本研究により脊椎動物では、少なくとも RhoGDI  $\beta$  が細胞極性制御の役割を担っていることが明らかになったことは、基礎生物学的にも大きな成果である。

## 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)

- ① Jiang, Y.-S., Jin, Z.-X., Umehara, H., and Ota, T., Cholesterol-dependent induction of dendrite formation by ginsenoside Rh<sub>2</sub> in cultured melanoma cells, *Int. J. Mol. Med.*, 査読有, Vol. 26, No.6, 2010, pp.787-793.

[学会発表] (計 23 件)

- ① 達家雅明・岡本茉佑美・古賀里美・三木智晴・渡辺健多・古家早苗・藤井幹子・太田隆英、胸腺アポトーシスにおけるカスパーゼ活性化経路の解析:電離放射線誘発過程と紫外線誘発過程の相違について、日本放射線影響学会 第 53 回大会、2010.10.20-22、京都。
- ② 太田隆英・金哲雄・達家雅明・梅原久範、B16 黒色腫細胞および Jurkat T 細胞におけるリポドラフトを介したジンセノサイド Rh<sub>2</sub> の作用、第 69 回日本癌学会、2010.9.22-24、大阪。
- ③ 三木智晴・古賀里美・岡本茉佑美・渡辺健多・太田隆英・嶋本文雄・達家雅明、サイバインの細胞内分布変化とアノキス抑制効果、第 69 回日本癌学会、2010.9.22-24、大阪。
- ④ 古賀里美・岡本茉佑美・渡辺健多・三木智晴・太田隆英・達家雅明、3 型カスパーゼによ

り N 末欠失した RhoGDI2 の核移行と細胞死誘導、第 69 回日本癌学会、2010.9.22-24、大阪。

- ⑤ 岡本茉佑美・古賀里美・渡辺健多・三木智晴・太田隆英・達家雅明、胸腺アポトーシス過程での電離放射線と紫外線による 9 型カスパーゼ活性化動態の相違、第 69 回日本癌学会、2010.9.22-24、大阪。
- ⑥ 古家早苗・藤井幹子・岡本茉佑美・古賀里美・三木智晴・渡辺健多・太田隆英・達家雅明、ポリグルタミン結合蛋白質 PQBP1 の X 線照射による発現調節機構研究、第 35 回中国地区放射線影響研究会、2010.7.26、広島。
- ⑦ 藤井幹子・古家早苗・岡本茉佑美・古賀里美・三木智晴・渡辺健多・太田隆英・達家雅明、単極紡錘体形成変異因子結合蛋白質 MOB の解析:ストレス応答性キナーゼとの関連、第 35 回中国地区放射線影響研究会、2010.7.26、広島。
- ⑧ 姜永生・前田雅代・達家雅明・太田隆英、培養細胞における GFP-RhoGDI  $\beta$  の細胞内局在の検討、第 19 回日本がん転移学会学術集会、2010.6.16-17、金沢。
- ⑨ 達家雅明・太田隆英、染色体パッセンジャー Survivin/Aurora-B によるアノキス阻害とがん転移:シグナル経路の解析、第 19 回日本がん転移学会学術集会、2010.6.16-17、金沢。
- ⑩ 太田隆英・前田雅代・村上学・竹上勉・達家雅明、ヒト上皮系細胞株において RhoGDI  $\beta$  は中心体および頂端側細胞間接着部位に局在する、第 68 回日本癌学会、2009.10.1-3、横浜。
- ⑪ 達家雅明・嶋本文雄・太田隆英、サイバインによるアノキス阻害活性の検討、第 68 回日本癌学会、2009.10.1-3、横浜。
- ⑫ 岡本茉佑美・古賀里美・近藤尚太・上田真未・山田啓太・太田隆英・達家雅明、低分子量 G 蛋白質制御分子 RhoGDI  $\beta$  が介在する電離放射線応答シグナルの解析:N 末欠失部位依存的アポトーシス制御機構の存在について、第 34 回中国地区放射線影響研究会、2009.7.29、広島。
- ⑬ 太田隆英・姜永生・前田雅代・達家雅明、上皮性および非上皮性細胞における RhoGDI  $\beta$  の免疫蛍光染色による細胞内局在の検討、第 18 回日本がん転移学会学術集会、2009.7.23-24、旭川。
- ⑭ 達家雅明・太田隆英、大腸がんにおけるサイバイン発現細胞内分布と予後不良、第 18 回日本がん転移学会学術集会、2009.7.23-24、旭川。
- ⑮ 太田隆英・前田雅代・姜永生・村上学・達家雅明、HeLa 細胞の M 期への RhoGDI  $\beta$  ノックダウンの影響、第 19 回日本サイトメトリー学会、2009.6.20-21、松江。
- ⑯ 達家雅明・神田暁史・鎌田伸之・北島正二郎、

工藤保誠・高田隆・嶋本文雄・太田隆英、悪性腫瘍で過剰発現するオーロラ A は細胞核を標的として機能する、第 67 回日本癌学会、2008.10.28-30、名古屋。

- ⑰太田隆英・前田雅代・村上学・竹上勉・達家雅明、B16 メラノーマ細胞の実験転移に対する lapachol の二面的な作用、第 67 回日本癌学会、2008.10.28-30、名古屋。
- ⑱達家雅明・岡本茉佑美・太田隆英、v-Src 形質転換高転移性 BALB/c 3T3 細胞において X 線照射後に出現する新規分断化型 RhoGDI の解析、第 33 回中国地区放射線影響研究会、2008.7.30、広島。
- ⑲達家雅明・前田雅代・太田隆英、胸腺腫細胞の放射線誘発アポトーシスに対するオーロラ阻害剤の効果、第 17 回日本がん転移学会、2008.7.24-25、鹿児島。
- ⑳太田隆英・前田雅代・達家雅明、RhoGDI  $\beta$  は上皮系細胞の極性制御に関わっている、第 17 回日本がん転移学会、2008.7.24-25、鹿児島。
- ㉑太田隆英・前田雅代・村上学・竹上勉・達家雅明、RhoGDI  $\beta$  を介する大腸癌細胞の極性の異常化と悪性化、金沢医科大学医学会第 44 回学術集会、2008.7.19、内灘。
- ㉒Ota, T., Maeda, M., Zong, Z.-P., Murakami, M., Takegami, T., Tatsuka, M., Phosphorylation and localization of FAK in v-Src transformed fibroblast cells after anoikis induction, BIT Life Sciences' World Cancer Congress-2008, 2008.6.12-17, Shanghai.
- ㉓Zong, Z.-P., Maeda, M., Murakami, M., Takegami, T., Tatsuka, M., Ota, T., Effects of oral administration of lapachol on experimental metastasis of B16 melanoma cells in mice, BIT Life Sciences' World Cancer Congress-2008, 2008.6.12-17, Shanghai.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

太田 隆英 (OTA TAKAHIDE)  
金沢医科大学・付置研究所・准教授  
研究者番号：10152141