

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008 ～2011

課題番号：20689025

題名（和文） 癌細胞の浸潤と転移における、新規 Dishevelled 関連蛋白 GCF2 の機能解析

研究課題名（英文）

The functional analysis of GCF2, a novel Dishevelled interacting protein

研究代表者 大塚 英郎 (OHTSUKA HIDEO)
東北大学・病院・助教

研究者番号：50451563

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、シグナル伝達、外科

1. 研究計画の概要

本研究の目的は、癌細胞の浸潤、転移における新規 Dishevelled 関連タンパク：LRRFIP1/GCF2 のはたらきを明らかにすることにある。

GCF2/LRRFIP1（以下 GCF2）は米国国立癌研究所の Alfred Johnson 博士らが 1998 年にクローニングした 752 アミノ酸よりなる蛋白質である。博士らは、GCF2 が細胞の核内で EGFR のプロモーター領域と結合しその転写を抑制する事を明らかにした (Reed, A.L., et al., J Biol Chem, 1998)。その後、Fong らは、actin 関連蛋白質 Flightless-1 の Leucine Rich Repeat (LRR) 領域を bait として Yeast two hybrid を行い、GCF2 が Flightless-1 と結合することを報告し、actin を中心とした細胞骨格の調節に関与することを示唆した (Fong KS. Genomics, 1999)。

申請者はこれまで GCF2 の細胞骨格、運動調節機構に関して、さまざまな興味深い知見を得た。

(1) GCF2 は細胞運動において、正の作用を有する。

(2) GCF2 の発現は small G protein RhoA の活性化に必須である。

(3) GCF2 は Wnt signal pathway における重要な mediator である Dishevelled(Dvl) と結合する。

これらの知見から本研究プロジェクトでは、GCF2 が癌細胞の浸潤・転移機構のなかでも重要な機能を有しているとの仮説のもとに以下の点について明らかにすべく研究を行った。

(1) 細胞内骨格の制御における GCF2 の役

割を分子レベルで明らかにする。すなわち、培養細胞をもちい細胞運動が起こる際の Actin fiber の再構成、すなわち、stress fiber や filopodia、lamellipodia の形成における GCF2 の関与、また、同じく細胞運動に極めて重要な微小管安定化における GCF2 の役割について明らかにする。

(2) 癌細胞の転移、浸潤における細胞の接着性に GCF2 が関与するか、特に Rho-Rho kinase を介した integrin 複合体いわゆる Focal adhesion の形成への関与、または Dishevelled- β catenin を介した E-cadherin 複合体への関与について明らかにする。

(3) in vivo における癌の転移に与える影響を検討する。すなわちヌードマウス癌移植モデルを用いて、その転移巣の形成への関与を明らかにする。

2. 研究の進捗状況

これまでに、integrin 複合体いわゆる Focal adhesion の形成への関与、および in vivo における GCF2 の癌の転移に与える影響について解析を行った。

SiRNA の手法を用いて大腸癌細胞株 (HT-29)GCF2 の発現を恒常的に抑制した HT-29^{shRNA1}, HT-29^{shRNA2} を作成しマウスの脾臓に注入する Xenograft モデルを作成、GCF2 と肝転移との関係について検討した。GCF2 の発現を抑制した細胞株では、肝臓における転移形成が有意に減少した。GCF2 は細胞の増殖能に影響を与えないことから、癌細胞の血管外より extravasate していく過程に深く関与しているものと考えられた。

Extravasation は血管内皮への接着、内皮間の移動、間質への浸潤と 3 段階を必要とす

るため、まず GCF2 の発現を抑制した上で細胞外基質に対する接着能の測定を行った。この結果 GCF2 の発現を抑制することで、特に Fibronectin に対する接着能が有意に抑制されるという結果が得られた。Fibronectin は受容体である Integrin を介した細胞移動・浸潤能も調節していることから、GCF2 の発現を抑制したうえで、Fibronectin を刺激とした機能解析を行うこととした。結果 GCF2 の発現を抑制することで、Fibronectin を刺激とした移動・浸潤能が顕著に低下することが明らかとなった。以上より Integrin を介した細胞接着・移動並びに浸潤能を調節することで、癌細胞が血管外へと Extravasate していく過程を制御している可能性が示唆された。

次に Integrin の下流におけるシグナル伝達系に対する GCF2 の作用機序に対する検討を行った。Fibronectin coating plate に再接着させることで刺激を加え RhoA の活性化を測定したところ、GCF2 の発現を抑制することで RhoA の活性化が低下することが示された。また GCF2 の発現は RhoA の活性化を介した Actin stress fiber の形成にも重要な役割を担っており、その発現を抑制することで Stress fiber の形成不全につながることを確認された。その分子メカニズムを解明すべく、Integrin の下流における RhoA 活性化機序についての検討を行ったところ、Rho 活性化因子である LARG(Leukemia associated Rho GEF)と結合することが免疫沈降法で明らかにした。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

GCF2 が癌細胞において RhoA の活性調節を行い、その移動能に深く関与すること、また、RhoA の活性調節が Dvl、Wnt pathway を介して行われることを英文誌で発表した。

これまでに GCF2 の癌細胞の浸潤、転移における関与を、in vivo、in vitro の両面から解析を行い、さまざまな新しい知見を得ることができた。とくに Fibronectin-Integrin 系を介した RhoA の活性化、Focal adhesion の形成に GCF2 が深く関与することで癌細胞の血管内皮細胞への接着、転移形成に重要な働きを持つことが明らかになったことは大きな成果であると考えられる。

4. 今後の研究の推進方策

GCF2 の機能を考える上で、現在抱えている最大の問題は、癌の原発巣と転移巣の間でその発現量に有意な違いが認められないことである。In vivo の転移形成モデル、あるいは臨床検体を用いた解析においても、転移巣で GCF2 の発現が多いといった事象は認められない。GCF2 が癌細胞の転移形成に重要であ

るとすると、癌細胞の血管内への浸潤、内皮細胞への接着、血管外への浸潤といった過程の中でのみ機能していると考えられる。この過程において、近年上皮間葉移行という概念が提唱され、TGF β などさまざまな分子機構が明らかとされている。今後は、GCF2 が上皮間葉移行のメカニズムの中でどのような関与を有するかについて明らかにしたい。

5. 代表的な研究成果

(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. Ohtsuka H, Oikawa M et al. GCF2 interacts with Dishevelled and regulates the activation of RhoA in carcinoma cells. Int. J. Cancer 2011. (査読あり)

2. Fukase K, Ohtsuka H, et al. Bile acids repress E-cadherin through the induction of Snail and increase cancer invasiveness in human hepatobiliary carcinoma. Cancer Sci. 99(9), (2008), 1785-1792 (査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

1. Ariake K, Ohtsuka H, et al. GCF2 has an indispensable role for colorectal cancer extravasation (第 69 回日本癌学会 2010 年 9 月 24 日) 大阪市

2. 有明恭平、大塚英郎、他. 新規 RhoA 活性化調節因子 GC-binding factor 2 (GCF2) による、消化器癌浸潤・転移制御の可能性 (第 19 回日本がん転移学会学術集会総会 2010 年 6 月 16 日) 金沢市

3. 有明恭平、大塚英郎、他. GC-binding factor 2 がもたらす癌細胞の転移・浸潤メカニズムの解明 (第 110 回日本外科学会総会 2010 年 4 月 10 日) 名古屋市