

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月10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

研究課題名（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）

GCF2 Promotes Cancer Metastasis and Invasion through its interaction with Dishevelled

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

研究成果の概要（和文）：

GCF2 の細胞骨格の調節に関与する機能から、その癌細胞の浸潤・転移への関与について検討した。GCF2 発現抑制株マウス脾臓内注入（肝転移形成）モデルでは、GCF2 発現抑制株で肝転移の形成が著明に減少し、その転移形成能に大きく関与することが示唆された。また、Fibronectin を刺激とした RhoA の活性化、細胞移動・浸潤能への関与を検討、GCF2 の抑制により、RhoA の活性化は得られず、さらに移動・浸潤能も強く抑制された。GCF2 は Integrin を介した RhoA 活性化に必須であり癌細胞の転移・浸潤過程に深く関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

A recent comprehensive analysis of human cancer has demonstrated that GCF2/LRRFIP1 is one of the cancer associated genes that are categorized as transcriptional regulators. Up to now, however, the precise relationship between the GCF2 expression and carcinogenesis has not been established. Recently, a new function of GCF2 as a regulator of cell migration through the RhoA activity was identified. From these works, I hypothesized that GCF2 may regulate cancer cell invasion or metastasis. To clarify the metastatic potential of GCF2 in colorectal cancer, I established HT-29 cells stably suppressing the GCF2 expression and injected them into the spleen of the SCID mouse. In this work, we found GCF2 suppression reduced the number of liver metastases. Furthermore, mechanistic analyses indicated that the inhibition of GCF2 reduced the fibronectin induced cell adhesion, migration and invasion activities. Downstream the integrin signaling pathways, GCF2 regulate the activity of RhoA interacting with the RGS domain of Leukemia associated RhoGEF (LARG). These results suggest that GCF2 has an important role in colorectal cancer cells metastasis regulating the RhoA induced cell adhesion, migration and invasion activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：消化器外科学

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：GCF2、LRRFIP1、Dishevelled、RhoA、シグナル伝達、癌、外科

1. 研究開始当初の背景

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. **273** (34): p. 21594-602.)。その後、GCF2 の機能に関し、PDGF や TNF- α といった遺伝子の転写を抑制する事が報告され、その転写抑制因子としての機能が明らかにされつつある (Khachigian, L. M., et al., Circ Res, 1999. **84** (11): p. 1258-67, Suriano, A. R., et al., Mol Cell Biol, 2005. **25** (20): p. 9073-81.)。

他方、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、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, K. S. and H. G. de Couet, Genomics, 1999. **58** (2): p. 146-57.)。

申請者は、2004 年より、米国国立癌研究所 Alfred Johnson 博士の研究室にて GCF2 の機能解析に従事し、癌細胞における GCF2 の機能、とくに細胞骨格、運動調節機構に関して、さまざまな興味深い知見を得た。GCF2 は正常組織のみならず、癌細胞とくに乳癌、子宮頸癌、肺癌、大腸癌、膵癌などの細胞株で高発現していることが示された。さらに、SiRNA の手法を用いて細胞内における GCF2 の発現を低下させる事により、癌細胞 (Hela, MCF7, DLD-1) の細胞運動が著明に抑制されることが明らかになり、GCF2 は細胞運動において、正の作用を有することが示唆された。さらに、GCF2 発現抑制癌細胞では、small-GTPase 蛋白 RhoA の活性化が著明に抑制され、その細胞移動、骨格調節能に重要である可能性が示唆された。また、GCF2 は Wnt signal pathway における重要な mediator である Dishevelled (Dvl) と細胞質において結合することが明らかになった。

近年、乳癌において GCF2/LRRFIP1 遺伝子の遺伝子変異が報告されるなど、oncogene としての機能が示唆された。本研究では、これらの知見より GCF2 がその細胞骨格、移動能の制御機能により癌細胞の浸潤・転移に重要な働きをもつものとの仮説のもとに本研究を行った。

2. 研究の目的

上記のように、申請者の3年間の米国国立癌研究所における研究により、GCF2 が細胞骨格、運動調節において極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。しかしながら、GCF2 が実際に Wnt シグナル伝達系を構

成する1分子として機能するか、RhoA 蛋白質の活性化調節の詳細なメカニズムなど不明な点も多かった。そこで、本研究では、GCF2 の RhoA 活性化調節の詳細な検討を行うこと、また、細胞の骨格調節、移動能における機能をさらに詳細に検討することを目的とした。

また、これまでの研究により GCF2 は細胞の移動能にきわめて大きな機能を有すると考えられることから、癌細胞の浸潤・転移において重要なはたらきをもつものと考えられた。癌細胞の転移形成には、癌の局所での増殖、間質・脈管への浸潤、脈管外への浸潤、標的臓器への生着・増殖など多段階のプロセスを有すると考えられる。マウスなど動物実験系を用いて、これらの転移形成プロセスのどの過程において GCF2 が機能するかについて検討を行う。

さらに、細胞-細胞間接着、細胞-基質間接着といった細胞の接着性、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、あるいは fibronectin-integrin シグナルと浸潤能への関与などについて検討を行う。さらに外基質への浸潤能への関与について明らかにすることで、癌細胞の転移、浸潤機構における GCF2 の関与について詳細な検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) GCF2 の転移形成過程における関与の検討

大腸癌細胞株において GCF2 安定発現抑制株を ShRNA の手法にて作成。免疫不全マウス SCID マウスの脾臓内に癌細胞を移植し肝転移形成能について評価を行う。マウス脾臓内癌細胞移植モデルは、門脈内注入モデルと同様に肝転移形成能について検討するための動物実験モデルである。

(2) 癌細胞の外基質への接着能に関する検討
fibronectin, collagen I, IV, vitronectin などの細胞外基質との接着能について adhesion assay を用いて検討する。

(3) 癌細胞の移動能、浸潤能に関する検討

癌細胞の移動能、浸潤能に関する検討を行った。移動能については Scratch assay 及び Boyden chamber を用いた migration assay を、浸潤能については Matrigel invasion assay 法にて検討を行った。

(4) RhoA 活性化機構の検討

RhoA activation assay を行い、RhoA 活性化機構の検討を行う。GCF2 発現抑制癌細胞株を用いてさまざまな刺激による RhoA 活性化について検討を行った。さらに RhoA の活性化には GEF が働くことが必要であるが、RhoA に specific な GEF として、P115RhoGEF

や LARG の関与について検討を行った。

(5) Actin stress fiber など細胞骨格や接着斑などの検討

蛍光免疫染色法などを用いて Actin stress fiber など細胞骨格再構成や接着斑の形成における GCF2 の関与について検討した。

(6) GCF2 の上皮間葉転換 (EMT) への関与

癌細胞の細胞骨格変化、接着能の変化は、上皮間葉転換 (EMT) の概念から近年注目されている。そこで、GCF2 の発現と、間葉系マーカー Snail, Slug, ZO-1 などの変化について検討を行った。さらには、TGF- β , BMP などの EMT を惹起するとされる各種サイトカインなどの刺激下における GCF2 発現の変化について検討を行った。

(7) GCF2 と相互作用を有する新たな分子の検索

データベース検索により、GCF2 のアミノ酸配列は、脊椎動物において広く保存され、ゼブラフィッシュにおいても高い相同性を有する遺伝子が認められるなど、機能的にきわめて重要な働きをしていると予測される。しかしながら、そのアミノ酸配列は、他の蛋白質と相同性に乏しく、既知のドメイン構造を有しない。そこで、yeast-two-hybrid 法を用いて、GCF2 と相互作用を有する新たな分子を検索し、GCF2 がどのような蛋白質群の中で機能するのかについて検討を行った。

4. 研究成果

(1) GCF2 の転移形成過程における関与の検討

大腸癌細胞株 (HT-29) を用いて GCF2 の発現を恒常的に抑制した HT-29^{shRNA1}, HT-29^{shRNA2} を作成し、コントロール細胞 (HT-29^{shcont}) とともに免疫不全マウス (SCID mouse) の脾臓に注入する Xenograft モデルの作成を行い、GCF2 と肝転移との関係についての検討を行った。GCF2 の発現を抑制した細胞株では、肝臓における転移個数が有意に減少する結果が得られ、GCF2 の発現が肝転移形成に深く関与することが示唆された。さらにそのメカニズムに関して、転移形成の過程における①標的臓器における増殖能を調節する可能と、②血管内より extravasate していく過程を調節する可能性が考えられた。増殖能との関係について GCF2 発現抑制細胞で proliferation assay を施行したが、コントロールと比較し有意な変化は認めず、細胞の増殖能に対する影響は少なくその機能は Extravasation に関与していると考えられた。

(2) 癌細胞の外基質への接着能に関する検討

Extravasation の過程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 の細胞外基質への接着能について adhesion assay にて行った。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ことが明らかになった。

(3) 癌細胞の移動能、浸潤能に関する検討

Fibronectin は受容体である Integrin を介して細胞移動・浸潤能を調節していることから、GCF2 の発現を抑制したうえで、Fibronectin を刺激とした細胞移動・浸潤能に関して機能解析を行った。移動能については Scratch assay 及び Boyden chamber を用いた migration assay を、浸潤能については Matrigel invasion assay 法にて評価した。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証明された。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、GCF2 は大腸癌細胞が血管外へと Extravasate していく過程を選択的に制御している可能性が示唆された。

(4) RhoA 活性化機構の検討

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。これまでの研究から GCF2 は Wnt PCP pathway において Dishevelled と結合することで、RhoA の活性化に関与することが明らかとなっており、Integrin の下流における RhoA の活性化についての検討を行うこととした。GCF2 の発現を抑制した細胞を回収したのち、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証明された。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及び免疫染色法によって明らかとなった。また本経路に対し、GCF2 が転写調節因子として関与している可能性を検討するため、GCF2 の発現を抑制するとともに Integrin 並びに下流に存在する FAK, Src の発現量について測定したが、明らかな変化は認められなかった。以上の結果より、GCF2 は Integrin の下流において Rho 特異的 GEF である LARG と結合することで RhoA の活性化を調節していることが証明された。

(5) Actin stress fiber など細胞骨格や接着斑などの検討

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いることが予想されることから、その

発現を抑制することで Stress fiber の形成不全につながる事が確認された。

(6)GCF2 の上皮間葉転換 (EMT) への関与

GCF2 の細胞骨格調節能、移動能への関与より、GCF2 が癌細胞の上皮間葉転換に関与することが予想される。GCF2 の発現抑制細胞では、Snail, Slug などの間葉系マーカーが著明に上昇していることが示唆された。EMT の初期段階において、RhoA の不活化とそれに伴い微小管の安定性が失われることが重要であるとの報告がある。GCF2 の発現抑制は RhoA の不活化をもたらすことから、GCF2 が EMT のきわめて初期の段階に重要な機能を有する可能性があると考えられる。現在、さらなる詳細な機能解析のために研究を継続している。

(7)GCF2 と相互作用を有する新たな分子の探索

GCF2 の関連タンパク質の候補として Heat shock protein 20 および Heat shock protein 27 が検出された。これに対して免疫沈降を施行したところ、癌細胞の細胞内における HSP27 と GCF2 との結合が確認された。HSP27 と癌細胞の浸潤能に関する報告もあることから、これらの検討も現在継続して行っている。

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 2 件)

①Ariake K, Ohtsuka H, Motoi F, Douchi D, Oikawa M, Ariake K, Rikiyama T, Katayose Y, Unno M, .GCF2/LRRFIP1 Promotes Colorectal Cancer Metastasis and Liver Invasion through Integrin-Dependent RhoA Activation. Cancer letters. (修正再投稿中) (査読有り)

②Ohtsuka H, Oikawa M, Ariake K, Rikiyama T, Motoi F, Katayose Y, Unno M, Johnson AC. GC-binding factor 2 interacts with dishevelled and regulates Wnt signaling pathways in human carcinoma cell lines. Int J Cancer. 2011, 129(7):1599-610. (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

①Kyohei Ariake, Hideo Ohtsuka, Fuyuhiko Motoi, Toshiki Rikiyama, Yu Katayose, Shinichi Egawa, Michiaki Unno. GCF2/LRRFIP1 Controls Extravasation Of Colorectal Cancer Cells and Formation Of

Liver Metastasis Regulating The Activation Of RhoA. AACR 102nd Annual Meeting. (2011 年4月 4 日、オランダ、米国)

②有明恭平, 大塚英郎, 元井冬彦, 力山敏樹, 深瀬耕二, 片寄友, 江川新一, 海野倫明: GCF2 has an indispensable role for colorectal cancer etravasation. 第69回日本癌学会 (2010年9月22日、大阪)

③有明恭平, 大塚英郎, 元井冬彦, 力山敏樹, 片寄友, 江川新一, 海野倫明: GC-binding factor 2がもたらす大腸癌細胞の転移・浸潤メカニズムの解明. 第14回日本がん分子標的治療学会学術総会 (2010年7月7日、東京)

④有明恭平, 大塚英郎, 元井冬彦, 力山敏樹, 片寄友, 江川新一, 海野倫明: 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17日、金沢)

⑤有明恭平, 大塚英郎, 元井冬彦, 大村範幸, 川口桂, 藤川奈々子, 力山敏樹, 片寄友, 江川新一, 海野倫明: 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)

⑥有明恭平, 大塚英郎, 元井冬彦, 片寄友, 力山敏樹, 江川新一, 海野倫明: Heat shock protein 20を介した癌細胞の浸潤転移メカニズムの解明. 第18回日本がん転移学会学術集会 (2009年7月23日、旭川)

⑦大塚英郎, 及川昌也, 力山敏樹, 元井冬彦, 片寄友, 江川新一, 海野倫明: 新規 Dishevelled関連蛋白; GC binding factor 2 (GCF2)は、RhoAの活性化を制御する. 第67回日本癌学会学術総会(名古屋)(平成20年10月29日)

⑧大塚英郎, 及川昌也, 力山敏樹, 片寄友, 江川新一, 海野倫明: 癌細胞の細胞運動における新規Dishevelled関連蛋白: GCF2/LRRFIP1の機能解析. (ワークショップ) 第17回日本がん転移学会学術集会総会(鹿児島)(平成20年7月24日)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者