

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791709

研究課題名(和文) 婦人科悪性腫瘍の転移を制御するシグナル伝達経路の解析

研究課題名(英文) The role of GPCR signaling in the progression of gynecological cancer

研究代表者

八木 裕史 (Yagi, Hiroshi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70623552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌の浸潤、転移においてはSDF1/CXCR4/Ga13/Rhoシグナル経路が重要な役割を果たしていることを、これまで我々は報告した。本研究においては子宮頸癌、卵巣癌などの婦人科領域の悪性腫瘍の浸潤、転移におけるCXCR4を中心としたGPCRシグナル経路の役割について解析を行った。浸潤能が高い子宮頸癌細胞株においては、乳癌の場合と異なり、SDF1/CXCR4/Gai/Racシグナル経路の活性化が細胞浸潤を制御していること、さらにSDF1/CXCR4/Gaiシグナル経路はp38の活性化を介して、リンパ管新生を誘導するVEGF-Cの発現を制御していることが示された。

研究成果の概要(英文)：The GEP oncogene, members of the Ga12 family of heterotrimeric G proteins (Ga12/13), is involved in the progression of human cancers including breast and prostate. This study is focused on evaluating the role of GEP oncogene in human gynecological cancer progression. Expression levels of Ga12/13 in human ovarian cancer tissues were elevated compared to those in normal ovarian tissues. In human cervical cancer cell lines, activation of SDF-1/CXCR4/Gai/Rac signaling pathway induced migration in vitro. In addition, SDF-1/CXCR4/Gai signaling pathway upregulated VEGF-C expression through p38 activation. Increased expression of GEP oncogene, Ga12/13, can result in enhanced signaling downstream of CXCR4, thereby influencing cell migration of ovarian cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・婦人科腫瘍学

キーワード：シグナル伝達 転移

## 1. 研究開始当初の背景

近い将来、本邦では男性の2人に1人、女性の3人に1人ががんで死亡することが報告されています。がんによる死亡の90%以上は転移によるものであり、そのメカニズムを解明することが予後の改善につながると考えられます。癌細胞のリンパ節転移、臓器選択的転移においては膜7回貫通型のGタンパク質共役型受容体(GPCR)であるケモカイン受容体が重要な役割を果たしていることが知られています。ケモカイン受容体の生理学的役割は様々な免疫反応において白血球の炎症局所への遊走を制御することですが、癌細胞はケモカイン受容体を高発現し、その細胞遊走活性を利用することで浸潤、転移を来たと考えられます。

ケモカイン受容体の一つであるCXCR4は乳癌細胞で高発現しており、臓器選択的転移において中心的な役割を果たしていることがよく知られていますが(Muller A et al., Nature, 2001)、卵巣癌、子宮頸部腺癌などの婦人科悪性腫瘍の転移においてもその関与が報告されています。しかしながら、CXCR4が癌細胞の浸潤、転移を制御するメカニズムは明らかになっていません。CXCR4は他のケモカイン受容体同様、Gタンパク質サブユニットの中でもG<sub>i</sub>と結合することが知られており、CXCR4/G<sub>i</sub>シグナルは白血球の遊走活性を制御しています。しかし、悪性度の高い乳癌細胞の浸潤、転移においては既知のCXCR4/G<sub>i</sub>シグナルではなく、G<sub>13</sub>の高発現に伴うCXCR4/G<sub>13</sub>/Rhoシグナルの活性化が中心的な役割を果たしていることを我々は報告しました(Yagi H et al., Sci Signal, 2011)。

一方、転移能の低いタイプの乳癌においては、ほとんどの場合、CXCR4の活性化は細胞浸潤を誘導せず、一部のサブタイプ(luminal-type)で細胞浸潤が誘導される場合にはCXCR4/G<sub>i</sub>シグナルによる低分子量G

タンパク質 Rac1の活性化が重要であることを我々は報告しました(Sosa MS et al., Mol Cell, 2010)。CXCR4という同一の細胞膜表面受容体を介した細胞浸潤でありながら、それを制御するシグナル経路が細胞によって異なることはとても興味深いことです。

以上の研究成果と背景から、*in vivo*における転移能が高い癌細胞においてはCXCR4依存性の細胞運動が亢進していると考え以下の検討を行うこととしました。

- A. 様々な婦人科悪性腫瘍細胞株のCXCR4依存性細胞浸潤、およびそれを制御する細胞内シグナルを解析し、各癌細胞株のマウスモデルでの造腫瘍能、転移能と比較検討する。
- B. これまで我々は転移の初期の段階である運動能の亢進に焦点をあてて検討を行ってきたが、それ以外の転移の過程、特にリンパ管新生の誘導に着目し、CXCR4の役割を検討する。
- C. CXCR4/G<sub>i</sub>シグナル経路、およびCXCR4/G<sub>13</sub>/Rhoシグナル経路における標的分子を探索し、シグナル選択的な分子標的治療の*in vivo*マウスモデルにおける効果を検討する。

## 2. 研究の目的

### A. 婦人科癌細胞株の転移を制御するCXCR4シグナルの解析

CXCR4依存性の細胞運動がG<sub>i</sub>シグナル、G<sub>12/13</sub>シグナルのどちらによって制御されているかを解析することを目的としました。

CXCR4のリガンドであるstromal cell derived factor-1(SDF-1)により誘導される細胞運動、浸潤を卵巣癌細胞株、子宮頸癌細胞株、子宮体癌細胞株を用いて検討しました。またさらに、各細胞株の*in vitro*における生物学的特性とマウスモデルにおける造腫瘍能、転移能とを比較検討しました。

## B. リンパ管新生の誘導における CXCR4 シグナルの役割の解析

VEGF ファミリーのひとつである VEGF-C はリンパ管新生において中心的な役割を果たしています。癌細胞が分泌する VEGF-C がリンパ管新生を誘導し、それにより自身の増殖やリンパ管への侵入を促進しています。SDF-1 刺激により、乳癌細胞株内の VEGF-C mRNA 量、および分泌される VEGF-C タンパク質量が増加することが予備実験において示されました。本研究では婦人科癌細胞株、及び乳癌細胞株を用いて、CXCR4 により制御される VEGF-C mRNA 量、タンパク質量の変化を解析し、G<sub>i</sub> シグナル、G<sub>13</sub> シグナルのどちらによって VEGF-C mRNA 量が制御されているのかを検討しました。さらに、CXCR4 を介した VEGF-C mRNA の発現制御が転写調節によるものなのか、3' UTR を介した mRNA 安定化によるものなのかを解析しました。

## C. CXCR4 下流のシグナル選択的治療の効果についての解析

CXCR4/ G<sub>12/13</sub>/ Rho シグナル経路を標的とする場合には Rho 下流のエフェクターのひとつである Rho kinase (ROCK) に対する特異的阻害剤である fasudil が治療薬として有用であることを我々は報告しました (Yagi H et al., Sci Signal, 2011)。一方、G<sub>i</sub> 下流のどのようなシグナル経路が癌細胞の浸潤を制御しているかについては明らかになっていません。本研究では、低分子量 G タンパク質 Rho ファミリー (RhoA, Rac1, Cdc42) に着目し、G<sub>i</sub> 下流で細胞骨格、細胞運動を制御している分子を同定することを目的としました。

### 3. 研究の方法

様々な卵巣癌、子宮頸癌、子宮体癌細胞株を用いて、CXCR4 依存性の細胞浸潤能、*in vivo* における造腫瘍能、転移能、およびそれを制御する細胞内シグナル経路を解析しました。また、細胞内シグナルの詳細な解析のために、

阻害剤、siRNA、shRNA、GPCR 変異体を用いました。

## A. 婦人科癌細胞株の転移を制御する CXCR4 シグナルの解析

### 1) SDF-1 依存性の細胞浸潤能の評価

CXCR4 のリガンドである SDF-1 依存性の細胞浸潤を様々な癌細胞株を用いて検討しました。また、SDF-1 依存性の細胞浸潤が既知の細胞内シグナルである CXCR4/G<sub>i</sub> を介したものであるかを、G<sub>i</sub> の GPCR への共役能を阻害する百日咳毒素を用いて検討しました。

### 2) CXCR4/ G<sub>13</sub>/Rho シグナル経路の細胞浸潤における役割の評価

各種細胞株における SDF-1 依存性の Rho の活性化を Rho pull down assay で検討しました。また、C3 毒素を用いて Rho を不活化することの細胞浸潤への影響を評価しました。shRNA を用いて CXCR4 及び G<sub>12/13</sub> 発現抑制細胞株を作成し、SDF-1 により誘導される Rho の活性化、細胞浸潤を評価しました。

### 3) GPCR 変異体を用いた解析

receptors activated solely by synthetic ligand (RASSL) という GPCR の変異体 (Conklin BR et al., Nat Methods .2008) を用いて G<sub>i</sub> シグナル、G<sub>13</sub> シグナルを細胞内に再構築し、それぞれのシグナルの細胞浸潤における役割を評価しました。

## B. リンパ管新生の誘導における CXCR4 シグナルの役割の解析

我々の予備実験において、乳癌細胞株 MDA-MB-231、子宮頸部腺癌細胞株 HeLa では SDF-1 刺激により VEGF-C mRNA 量及び培養上清中への VEGF-C タンパク質の分泌が増加することが示されました。

乳癌、婦人科癌を含む各種癌細胞株を SDF-1 で刺激した後の VEGF-C mRNA 量、および培養上清中へ分泌される VEGF-C タンパク質量の経時的変化を定量的 PCR、および ELISA

を用いて検討する。また、G<sub>i</sub> シグナルと G<sub>13</sub> シグナルのどちらが VEGF-C の発現を誘導するのかを G<sub>i</sub> RASSL と G<sub>13/15</sub> を用いて解析しました。

#### 4. 研究成果

転移、浸潤能の高い子宮頸癌細胞株においては、乳癌の場合と異なり、SDF-1/CXCR4/ G<sub>i</sub>/Rac シグナル経路の活性化が細胞浸潤を抑制していることが、*in vitro* の実験で示されました。さらに、SDF-1/CXCR4/ G<sub>i</sub> シグナル経路は p38 の活性化を介して、リンパ管新生を誘導する VEGF-C の発現を制御していることが示されました。

卵巣癌においては、SDF-1/CXCR4/ G<sub>13</sub>/Rho シグナル経路の活性化が細胞浸潤ではなく細胞増殖を制御していることが示されました。今後はさらに Rho シグナルの下流のシグナル伝達経路について解析を行っていく予定です。

CXCR4 は癌細胞の臓器選択的転移を制御する分子としてよく知られており、様々な癌種においてその関与が報告されていますが、CXCR4 に対する癌分子標的治療は確立していません。その理由として、造血幹細胞の骨髄への homing/ retention など、G<sub>i</sub> を介した CXCR4 の生理学的機能が阻害されることに伴う大きな副作用が挙げられます。本研究において、我々が新たに同定した CXCR4/ G<sub>13</sub>/Rho シグナル経路に着目し、癌の進展における役割を解析することは、癌細胞のみで亢進しているシグナル経路を選択的に標的とした、副作用のより少ない新たな分子標的治療の開発につながると考えられます。また、現在の市場における治療薬の 25%以上が GPCR を標的としていることを考慮すると、GPCR のシグナルを選択的に阻害するという本研究のコンセプトはシグナル選択的な GPCR アンタゴニストやアロステリックタンパク質といった新たな治療薬の開発にもつながり、社会的意義は大きいものと考えられます。

#### 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 3 件)

Nojiri T, Yoshizato T, Fukami T, Obama H, Yagi H, Yotsumoto F, Miyamoto S. Clinical significance of amphiregulin and epidermal growth factor in colostrum. Arch Gynecol Obstet 286: 643-647 2012.

Milelis CM, Palmby TR, Simaan M, Li W, Szabo R, Lyons R, Martin D, Yagi H, Fukuhara S, Chikumi H, Galisteo R, Mukoyama YS, Bugge TH, Gutkind JS. PDZ-RhoGEF and LARG are essential for embryonic development and provide a link between thrombin and LPA receptors and Rho activation. J Biol Chem 288(17): 12232-43 2013.

八木裕史, 加藤聖子. 子宮頸癌を引き起こすヒトパピローマウイルスの発見/HPV の発見 (2008 年). Surgery Frontier 20(2): 19-23 2013.

〔学会発表〕(計 4 件)

八木裕史, 園田顕三, 小林裕明, 和氣徳夫. 癌の浸潤、転移における CXCR4/G $\alpha_{13}$ /Rho シグナル経路の役割. 日本産科婦人科学会 第 64 回学術講演会 (2012 年 4 月 13 日~4 月 15 日, 神戸市).

小林裕明, 八木裕史, 井上貴史, 河野善明, 兼城英輔, 奥川馨, 矢幡秀昭, 園田顕三, 和氣徳夫. 難治性膀胱腫瘍に対する腹式修復時の介在組織として腹直筋弁を使用した一例. 日本産科婦人科学会 第 64 回学術講演会 (2012 年 4 月 13 日~4 月 15 日, 神戸市).

山根敬子, 小野山一郎, 八木裕史, 北出尚子, 園田顕三, 小林裕明, 和氣徳夫. 卵巣癌腹膜播種に対する Tat ペプチドをベクターとしたカルボニン h1 遺伝子治療の試み. 日本産科婦人科学会 第 64 回学術講演会 (2012 年 4 月 13 日~4 月 15 日, 神戸市).

矢幡秀昭, 麻生佳愛, 八木裕史, 井上貴史, 兼城英輔, 河野善明, 奥川馨, 園田顕三, 加来恒壽, 小林裕明, 和氣徳夫. 3mm 以内の頸部間質浸潤に留まる子宮頸部腺癌 Ib1 期の術式は単純子宮全摘出術で十分か. 日本産科婦人科学会 第 64 回学術講演会 (2012 年 4 月 13 日~4 月 15 日, 神戸市).

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者 八木裕史  
(研究者番号 70623552)