

令和元年5月24日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05148

研究課題名(和文) 低分子量GTP結合蛋白質Ralを介した病態制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of regulatory mechanism of diseases mediated by small GTPase Ral

研究代表者

堀内 久徳 (Horiuchi, Hisanori)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：90291426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量GTP結合蛋白質Ral阻害薬が開発され抗腫瘍効果が報告され(Nature, 2014)、Ralの活性制御は大きく注目されている。Ralの抑制性活性制御因子RalGAPは我々の研究室で見出し(JBC, 2009)、膀胱癌悪性化における役割を報告した(Oncogene, 2013)。本研究ではRalGAPの発現低下が前立腺癌悪性化に関与することを報告した(Carcinogenesis in press, 2019)。また、口腔内扁平上皮癌についてもRalGAP発現低下とその悪性化、およびRalGAP発現低下に影響する可能性のあるエピジェネティックな変化を明らかにした(論文リバイス中)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Ral阻害薬が抗がん剤としてのポテンシャルが示された。我々の研究成果は、前立腺癌や口腔内癌でもRalの活性化が、腫瘍悪性化に関与していることを示すものであり、Ral阻害薬開発の有用性をサポートする基礎データとなる。一方、Ralの活性化は血糖降下に寄与するという知見を得つつあり、Ralの活性制御については、代謝の面からの解析も必要と考えられる。Ralに関する基礎データを提供し、創薬等にも貢献していきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：An inhibitor of small GTPase Ral has been developed and shown to inhibit cancer growth (Nature, 2014). Thus, the control of Ral activity is strongly noted as a drug target. We have first identified the inhibitory regulator of Ral activity, RalGAP (JBC, 2009) and reported the important role in the progression of bladder cancer (Oncogene, 2013). In the research, we have reported that the low expression of RalGAP was associated with prostate cancer progression (Carcinogenesis, in press, 2019). Further, we have found the association between RalGAP low expression and oral squamous cell carcinoma progression and also epigenetic change of RalGAP gene (in revision).

研究分野：生化学、血栓止血学、循環器内科学

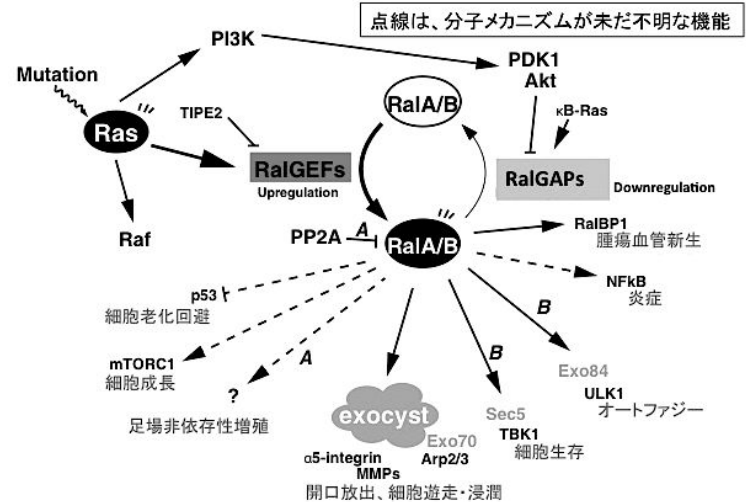
キーワード：がん 代謝 低分子量GTP結合蛋白質 Ral

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 低分子量 GTP 結合蛋白質 Ral の病態における役割(国内外の動向): Ral は Ras ファミ

リーに属する低分子量 GTP 結合蛋白質で、RalA と RalB が存在する(図1)(for review; Shirakawa & Horiuchi, *J Biochem*, 2015)。他の GTP 結合蛋白質と同様に GDP が結合した不活性型と GTP が結合した活性型の2つの立体構造をとる。活性化反応は GDP/GTP 交換因子(GEF)が担う。現在 6 種類の RalGEF が知られているが、そのうち 4 つは活性型 Ras との直接結合により活性化される。

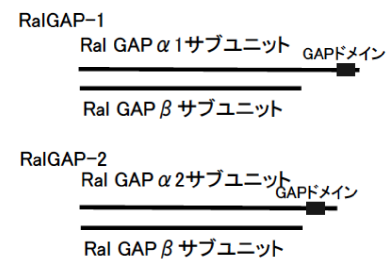
図1. がん・炎症等におけるRalを介した情報伝達。種々のがん/炎症細胞では、RalGEFの活性増強あるいはRalGAPの活性低下のため、Ralの活性は亢進している。活性化Ralは種々のエフェクターを介してがん化・がん悪性化や炎症を促進的に制御する。AはRalA特異的経路、BはRalB特異的経路を表す。



(Shirakawa, Horiuchi. *J Biochem*, 2015より)

RalGEF-Ral 経路は Raf-ERK 経路、PI3 キナーゼ-Akt 経路とともに、癌遺伝子 Ras の主要な情報伝達経路であり、癌化・癌悪性化を制御する。不活性化反応は我々が見出した Ral GTPase 活性化蛋白質(GAP)(後述)が担う。Ral は、癌化・癌悪性化以外にも細胞内小胞を形質膜に繫留する exocyst 複合体 (Ral が直接結合する Sec5 及び Exo84 を含む 8 つの蛋白質から構成) をエフェクターとして血小板、膵臓β細胞、細胞障害性 T 細胞、内皮細胞等で生理活性物質含有顆粒の開口放出を制御している。さらに脂肪細胞や筋細胞でインスリンに反応した糖輸送担体 GLUT4 の形質膜上への輸送、上皮細胞では E-cadherin や EGF 受容体の底側部側の形質膜への輸送、さらに神経ではグルタミン酸受容体のシナプス後膜への輸送を制御する。また exocyst 複合体は細胞内情報伝達の「場」にもなっている。Ral は、上述の exocyst 複合体構成因子 Sec5 を介して、IκB キナーゼの一つである TBK1 を活性化してがん細胞の生存に重要な働きをし、Exo84 を介してオートファジーを誘導するキナーゼ ULK1 を活性化してオートファジーを誘導する。また、Ral は RalBP1 をエフェクターとしてエンドサイトーシスを制御する。RalBP1 は細胞骨格を制御する低分子量 GTP 結合蛋白質 Rac1 や cdc42 の抑制性制御因子 GAP であり、Ral は RalBP1 を介して細胞骨格を制御する。さらに Ral は腫瘍抑制因子 p53 を抑制し、細胞内代謝の鍵制御因子 mTORC1 を活性化し、炎症に重要な NFκB を活性化することも報告されている。このように、Ral は癌、炎症、代謝等種々の病態の制御に重要な役割を果たしている。しかし、図1の点線で示されているように、これまでのところ直接のエフェクター分子が不明な経路も多い。

図2. RalGAPの構造



(2) RalGAP の同定とこれまでの成果:我々は形質膜透過型血小板を用いた顆粒放出アッセイ系を確立し、その系を用いて Ca<sup>2+</sup>シグナルを担う Rab27/Munc13-4 軸を見出し(Shirakawa et al, *J Biol Chem*, 2004)、Ral-exocyst 軸がその開口放出の Ca<sup>2+</sup>感受性を向上させることを報告した(Kawato et al, *J Biol Chem*, 2008)。そして癌研究分野等で長く待たれていた Ral の抑制性制御因子 RalGAP の同定に成功し世界に先駆けて報告した(Shirakawa et al, *J Biol*

*Chem*, 2009)。RalGAPは活性サブユニット $\alpha 1$ 又は $\alpha 2$ と、両者に共通した調節サブユニット $\beta$ からなるヘテロ複合体であり、それぞれ RalGAP1、RalGAP2 と命名した(図 2)。 $\alpha$  サブユニットは GAP ドメインをもち、 $\beta$  サブユニットは既知の蛋白質との相同性を持たない新規分子であり、両者の複合体形成は RalGAP 機能に必須であった。浸潤性膀胱癌では表在性に較べて Ral 活性の亢進が報告されていたが(Smith et al, *Clin Cancer Res*, 2007)、我々は膀胱で優位に発現する活性サブユニットは RalGAP $\alpha 2$  であり、浸潤性膀胱癌細胞株では、表在性と比べて、RalGAP $\alpha 2$  の発現が転写レベルで強く抑制されることで Ral の活性が上昇していること、RalGAP $\alpha 2$  を強制発現させた浸潤性膀胱癌細胞株はマウス移植モデルで肺転移が著しく抑えられたこと、RalGAP $\alpha 2$  KO マウスに化学膀胱癌を誘導すると野生型では見られなかった悪性度の高い浸潤性膀胱癌が高頻度に認められたこと、RalGAP $\alpha 2$  の発現が低下した膀胱癌組織を有する患者の生命予後は不良であったことを明らかにした(Saito et al, *Oncogene*, 2013)。このように、Ral および RalGAP は膀胱癌の、特に浸潤・転移という癌悪性化に深く関与している。また筋細胞で、インスリン刺激は RalGAP $\alpha 1$  を抑制して、Ral を活性化し、GLUT4 の形質膜上への輸送を増加させることを報告した(Q Chen et al, *Cell Signal*, 2014)。

2. **研究の目的:**本研究ではこれまでの研究を発展させて以下を明らかにし、Ral 及び RalGAP が制御するがんや炎症、代謝等に関わる種々の疾患の病態理解を深め、診断・治療へ貢献することを目的とする。

3. **研究の方法:**本研究では以下の研究を目指した。

- (1) **RalGAP の活性制御機構の解明:**脂肪細胞において RalGAP $\alpha 2$  サブユニットが Akt によってリン酸化され、その活性が抑制されることが報告された(X Chen et al, *Mol Biol Cell*, 2011)。我々は、筋肉細胞で RalGAP $\alpha 1$  サブユニットが Akt によってリン酸化され、その活性が抑制されることを報告した(Q Chen et al, *Cell Signal*, 2014)。翻訳後修飾の RalGAP の活性制御における役割を明らかにする。また、RalGAP の発現制御機構におけるエピジェネティック制御機構を解明する。
- (2) **新規活性型 Ral 結合蛋白質の解析:**我々は、複数の新規活性型 Ral 結合蛋白質を同定しており、その機能を明らかにする。
- (3) **がんにおける Ral および RalGAP の役割の解明:**前立腺癌および口腔内扁平上皮癌、膵癌において、Ral および RalGAP の役割を解明する。
- (4) **炎症・炎症性発癌:** RalGAP KO マウスおよび野生型マウスに DSS 腸炎および AOM-DSS 炎症性大腸癌を誘導し、その比較によって、Ral および RalGAP の大腸炎症および炎症性大腸癌発症における役割を解明する。

#### 4. 研究成果

- (1) **RalGAP の活性制御機構の解明:**翻訳後修飾の RalGAP 修飾と活性・局在部位への影響については詳細については解析中である。口腔内細胞癌で、RalGAP 2 遺伝子のエピジェネティック変化を解析し、RalGAP 2 遺伝子発現における DNA メチル化、アセチル化の意義を解明した(論文投稿中)。
- (2) **新規活性型 Ral 結合蛋白質の解析:**複数の新規活性型 Ral 結合蛋白質を同定しており、解析中である。

(3) **がんにおける Ral および RalGAP の役割の解明**: 前立腺癌における Ral および RalGAP を解析し以下の知見を得て論文を発表した (*Carcinogenesis* in press)。すなわち、(1) ヒト前立腺癌組織では、正常部位と比べて、RalGAP 2 の発現低下があった、(2) Ral の活性化はがん細胞増殖には大きな影響はなかったが、細胞運動、浸潤性を高めた、(3) コンディショナル PTEN KO マウスにおける前立腺癌形成モデルにおいて、RalGAP 2 KO は、前立腺癌の大きさを変えなかったが、浸潤癌を増やした。以上のデータを元に、RalGAP の発現低下による Ral の活性化は、がん細胞の増殖というより、浸潤性等の悪性化を制御している、と結論した。また、口腔内細胞癌においても RalGAP 2 の発現量の低下がその悪性化につながり、RalGAP 2 の発現はそのプロモータ・エンハンサー領域の DNA メチル化やヒストンメチル化・アセチル化というエピジェネティック制御を強く受けることを明らかにした (論文投稿中)。

(4) **炎症・炎症性発癌**: RalGAP KO マウスおよび野生型マウスに DSS 腸炎を誘導し、現在、解析中である。AOM-DSS 炎症性大腸癌を誘導し、その比較によって、Ral および RalGAP の炎症性大腸癌発症における役割を解明し、現在、論文投稿中である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. M Uegaki, Y Kita, R Shirakawa, Y Teramoto, R Saito, T Yoshikawa, H Sakamoto, T Goto, S Akamatsu, T Yamasaki, T Inoue, A Suzuki, H Horiuchi, O Ogawa, T Kobayashi (2019) Downregulation of RalGTPase-activating protein promotes invasion of prostatic epithelial cells and progression from intraepithelial neoplasia to cancer during prostate carcinogenesis. *Carcinogenesis* in press

[学会発表] (計 1 件)

1. 第 26 回日本がん転移学会学術集会 (2017. 7. 27-28 大阪国際会議場) シンポジウム「がん微小環境における免疫細胞誘導と制御」にて、堀内久徳「低分子量 GTP 結合蛋白 Ral のがん浸潤・転移における役割」

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等：<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/mcb/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者:なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:小川 修(京都大学大学院医学研究科泌尿器科教授)

ローマ字氏名: Osamu Ogawa

研究協力者氏名:仲瀬 裕志(京都大学大学院医学研究科消化器内科講師、現、札幌医科大学消化器内科教授)

ローマ字氏名: Hiroshi Nakase

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。