

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19209013

研究課題名(和文) Aktの新規基質Girdinとそのファミリー分子の機能多様性と病態における役割

研究課題名(英文) Physiological functions of the Akt substrate Girdin and its family proteins and their roles in pathogenesis

研究代表者

高橋 雅英 (TAKAHASHI MASAHIDE)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40183446

研究成果の概要(和文)：Aktキナーゼの新規基質Girdinの機能について、細胞生物学的研究および遺伝子組み換えマウスを用いた個体レベルの研究を推進した。線維芽細胞、様々ながん細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞など培養細胞において、siRNAを用いてGirdinをノックダウンすると、いずれも細胞運動能が有意に低下した。その際、運動する細胞先端部のラメリポディア構造の形成に異常が生じており、Girdinがラメリポディア形成のためのアクチン細胞骨格の再構成に関与していることが示唆された。Girdinノックアウトマウスの解析により、生体内ではGirdinが生後の血管新生、神経新生に重要な役割を果たしていることが判明した。Girdinノックアウトマウスでは生後の血管新生部位として知られている網膜血管や大脳の血管新生が野生型マウスに比べ60-70%に低下していた。さらに神経系においては、生後も神経新生がおきることが知られている海馬歯状回の顆粒神経細胞の位置異常とそれに伴う構造異常を示すことが明らかになった。Girdinのファミリー蛋白Gipieの機能解析を行い、GipieはERストレス反応の調節因子であるGRP78と結合することにより、ERストレスによって誘導されるアポトーシスから血管内皮細胞を保護する作用を有すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the physiological roles of Akt substrate Girdin using a variety of cell lines and gene-targeting mice. Girdin knockdown by siRNA in various cell lines including fibroblasts, cancer cells, endothelial cells and vascular smooth muscle cells, significantly impaired their migration. Impaired cell migration by Girdin knockdown was due to the impairment of lamellipodia formation at the leading edge of migrating cells, suggesting that Girdin plays a role in actin reorganization at the leading edge. In addition, analysis of Girdin knockout mice demonstrated that Girdin plays a crucial role in postnatal angiogenesis and neurogenesis. Vascular development in the retina and brain cortex in Girdin knockout mice decreased to 60-70% compared with that of wild-type mice. Girdin deficiency also leads to overextended migration and mispositioning of the dentate granule cells, resulting in profound cytoarchitectural disorganization of the dentate gyrus which is known to develop during the early postnatal period. A novel Girdin family protein, Gipie, is expressed in endothelial cells, where it interacts with GRP78, a master regulator of ER stress. Our study indicated that Gipie/GRP78 interaction protects endothelial cells against ER stress-induced apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2008年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2009年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2010年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
年度			
総計	38,100,000	11,430,000	49,530,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：Girdin、Akt、アクチン結合蛋白、細胞運動、がん細胞の浸潤、血管新生、神経新生

1. 研究開始当初の背景

セリン・スレオニンキナーゼである Akt (別名：Protein Kinase B; PKB) は増殖因子など様々な細胞外からの刺激により活性化され、細胞増殖、生存、代謝など細胞機能に重要な役割を果たすことが知られている。また近年 Akt が、白血球、線維芽細胞、血管内皮細胞、がん細胞の運動に重要であることが示され、特に Akt の発現の高い癌では悪性度が高く、予後が悪いと報告されるようになった。しかしながら Akt の活性化がどのようなメカニズムで細胞運動を促進するかについては、がんの治療法の開発にも直結する重要な課題であるにもかかわらず、長年不明であった。われわれは最近、酵母 two-hybrid 法を用いたスクリーニングにより、Akt の新規基質である Girdin (Girders of actin filament の略) を発見し、Girdin が Akt の下流で細胞運動に重要な役割を果たしていることを明らかにした (Enomoto et al., Dev. Cell, 9: 389-402, 2005)。機能解析により Girdin が新規アクチン結合蛋白であり、Akt によってリン酸化を受けるとアクチン線維の再構成を生じ、細胞運動に重要な役割を果たす細胞先端のラメリポディアの形成に関与していることを証明した。Girdin の発現をノックダウンしたり、Akt によるリン酸化部位に変異を導入した Girdin を発現させたりすると、形態異常と著明な細胞運動能の低下を生じ、Akt-Girdin シグナル系の細胞運動における重要性が明らかになった。

一方、他の研究者によって Girdin のファミリー分子である Daple (Dishevelled-associating protein with a highly frequency of leucine residues) が発生や悪性腫瘍の進展において重要な Wnt シグナル伝達系の制御分子であることが明らかとなった。さらに、もう 1 つのファミリー分子については、かずさ DNA 研究所により遺伝子として同定されているが (FLJ00354、本研究で Gipie と名付けた)、機能については全く解析されていない。これら 2 つのファミリー分子は Girdin とは C 末端の構造が大きく異なっており、進化の過程で機能多様性を獲得したものと推定された。

2. 研究の目的

本研究ではわれわれが発見した Akt-Girdin シグナル伝達系の細胞運動、特にがん細胞の浸潤・転移、血管新生、神経細胞の移動・極性決定における機能を細胞生物学的に解析するとともに遺伝子組み換え動物 (Girdin 遺伝

子のノックアウトマウス、Akt によるリン酸化部位に変異を導入したノックインマウスなど) を作製して個体レベルで解析し、その生理学的、病理学的意義を解明する。さらに Girdin のほかの 2 つのファミリー蛋白 (Daple, Gipie) の機能解析を推進し、ファミリー蛋白の細胞内、個体レベルでの機能多様性を明らかにすることにある。

3. 研究の方法

(1) Girdin ファミリー遺伝子の遺伝子改変マウスの作製と解析

Girdin 遺伝子のノックアウト、および Akt によってリン酸化されるセリン 1417 をアラニンに置換したノックインマウスを作製し、発生過程および個体レベルでの Girdin の機能解析、リン酸化の意義を明らかにする。

(2) 腫瘍細胞の浸潤・転移における Girdin の役割の解明

様々な組織由来の腫瘍細胞株に、レトロウイルス発現系を用いて Girdin が恒常的にノックダウンされた細胞株、あるいは Girdin を強制発現した細胞株を作製し、腫瘍細胞の浸潤、転移における役割を *in vitro*, *in vivo* で解析する。また臨床検体をもちいて Girdin およびリン酸化 Girdin の発現を調べ、癌細胞の悪性度との関連を明らかにする。

(3) 血管新生における Girdin の役割の解明

Akt-Girdin シグナル伝達系が血管新生において果たす役割について、shRNA (short hairpin RNA) を用いて Girdin を恒常的にノックダウンした培養血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて *in vitro* で解析し、さらに虚血や内膜障害を生じる動物モデルを用いた研究に展開する。Girdin のノックアウトマウスを用いて血管新生の異常について解析する。

(4) 神経細胞の移動・極性決定および大脳皮質形成における Girdin の役割の解明

shRNA を用いて Girdin を恒常的にノックダウンした培養神経細胞 (1) の項目で作製するノックアウトマウス、ノックインマウスを用いて、神経細胞の移動や神経系の形成における役割を *in vitro*, *in vivo* の系を用いて明らかにする。

(5) Girdin ファミリー蛋白の機能解析

Daple については Wnt シグナル伝達系における役割、Gipie については未知の機能について、細胞生物学的解析を進める。同時に Girdin ファミリー蛋白への結合蛋白を酵母 two-hybrid および質量分析計を用いて同定し、機能解析に資する。

4. 研究成果

(1) Akt-Girdin シグナル伝達系の腫瘍細胞の浸潤、増殖における役割について MDA-MB-231 ヒト乳がん細胞を用いて検討した。MDA-MB-231 細胞に Girdin の short hairpin 型 siRNA をトランスフェクトし、Girdin の発現をノックダウンした細胞株を樹立した (以下 MDA-Girdin KO と呼ぶ)。ポイデンチャンバー法や Wound healing 法により、IGF-1 非存在下、存在下における MDA 細胞と MDA-Girdin KO 細胞の細胞運動能を比較したところ、IGF-1 存在の有無に関わらず MDA-Girdin KO 細胞の運動能が有意に低下していることが判明した。また細胞増殖能を検討した結果、MDA-Girdin KO 細胞の増殖能は MDA 細胞に比較して軽度に低下するものの、両者の間に有意差は認めなかった。さらに、両細胞株を 3×10^6 個ノードマウスの皮下に移植して 10 週間後の肺への転移能を比較した結果、MDA-Girdin KO 細胞の転移能は著しく低下した。以上の結果より Girdin のノックダウンにより引き起こされるアクチン線維の再構成の異常は、MDA-MB-231 細胞の運動能を低下させることより、肺への転移を抑制することが明らかになった。がん転移に対する治療法として、Akt-Girdin シグナル伝達系を制御することの有用性が示唆された。

次に Girdin の発現を免疫染色法にてヒトの乳がんおよび消化器がん組織で検索した。その結果、正常乳腺上皮や消化管粘膜上皮には発現を認めないものの、がん細胞の約 10-20% の症例で Girdin が高発現し、20-30% の症例で中等度に発現していることが判明した。今後 Girdin の発現ががん細胞の悪性度に関与しているかどうか検討する必要がある。

(2) Girdin は生体内では未熟な血管内皮細胞、周皮細胞に発現が観察された。まずヒト血管内皮細胞 HUVEC を用いて、Girdin の機能を解析した。HUVEC 細胞にて Girdin の発現をノックダウンすると、VEGF 依存性の細胞運動能とマトリゲル内での管腔形成能が著しく低下した。さらに作製した Girdin ノックアウトマウスにおける血管形成の異常の有無を検討した。出生後の VEGF (血管内皮増殖因子) 依存性の血管形成としては目の網膜血管が良く研究されている。そこで、生後 3 日目と 7 日目の網膜血管形成を調べたところ、Girdin ノックアウトマウスでは wild type に比べ、約 40% 減少していることが明らかになった。また生後 3 日目の大脳における血管形成 (VEGF 依存性かどうかは明らかではない) についても検討した結果、Girdin ノックアウトマウスにおいて約 30% 減少していた。また生後 7 日目の大動脈を採取し、コラーゲンゲル上で培養

すると、VEGF 依存性に毛細血管が伸長することが知られている。そこで、大動脈を 7 日間培養し、毛細血管のゲル内への伸長面積を調べた結果、Girdin ノックアウトマウスの大動脈からの伸長は、wild type に比べ約 50% 減少していた。以上の結果より、Girdin は出生後の VEGF 依存性の血管新生に関与していることが明らかになった。

(3) 免疫染色法による解析の結果、Girdin は神経系において海馬の神経細胞、嗅球の形成に重要な rostral migratory stream (以下 RMS) を構成する神経細胞で強く発現していた。Girdin のノックアウトマウスは生後 4 週間以内に死亡するが、その原因は現時点では不明である。ノックアウトマウスの組織学的な解析を行った結果、中枢神経系において海馬歯状回と嗅球の形態に異常があることが判明した。海馬歯状回では神経前駆細胞の位置異常が見られた。正常では神経前駆細胞は海馬歯状回の subgranular zone (以下 SGZ) に一層から数層に限局して存在するのに対し、ノックアウトマウスでは顆粒層の中やそれを越えた分子層に局在していた。Girdin の short hairpin RNA をレトロウイルスベクターに組み込み、海馬歯状回の神経前駆細胞に発現させたところ、ノックアウトマウスで観察されたように、神経細胞の位置異常を生じた。また嗅球の形成異常については、脳室周囲の脳室下帯 (subventricular zone, 以下 SVZ) から産生される神経前駆細胞が嗅球に向かって移動する過程において、遅延を生じていることが原因であった。そのためその経路である rostral migratory stream (RMS) の幅が著しく拡大していた。この結果は Girdin が出生後の海馬や嗅球の形成における神経前駆細胞の移動や位置決定に重要な役割を有する分子であることを示唆している。

Girdin との結合蛋白を解析した結果、統合失調症や双極性障害 (躁うつ病) の脆弱因子として最近注目されている DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) と分子複合体を形成し、海馬における神経前駆細胞の移動と分化を制御している可能性を示す結果を得た。さらにラットの海馬を培養し、Girdin の局在を調べたところ、細胞体、神経突起、成長円錐にすべて陽性像を示した。Girdin の発現をノックダウンした結果、神経突起の長さや数が有意に減少したことから、海馬神経細胞の神経突起の形成や成熟に関与しているもと考えられた。この結果と一致して、Girdin ノックアウトマウスでは歯状回の顆粒層から海馬の CA3 領域へ投射される軸

索である mossy fiber の形成が著しく障害されていた。今後さらに Girdin を介したこれらの神経系の形成の分子機序を結合蛋白の同定などを通して、より詳細に解析する予定である。

(4) Girdin のファミリー蛋白で Gipie (GRP78-interacting protein induced by ER stress) と名付けた蛋白の機能解析を行った。Gipie は 1476 アミノ酸からなる蛋白をコードし、C 末端領域の配列が Girdin とは相同性がなく、ユニークな機能を有することが示唆された。その発現を RT-PCR あるいはウェスタンブロット法で検討した結果、主に血管内皮細胞とマクロファージに発現していることが判明し、細胞内では ER とゴルジ体に局在していた。質量分析法により結合蛋白を検索したところ、再現性良く検出できる蛋白として、ER に局在し、ER ストレスを制御する GRP78 を同定した。GRP78 は Gipie の C 末端領域と結合した。そこで Gipie の発現が種々の ER ストレス負荷により変化するかどうかを検討した結果、thapsigargin, tunicamycin, homocysteine 添加などによる ER ストレス負荷により、Gipie の発現が蛋白レベルで有意に増強した。機能解析の結果、Gipie は ER ストレスに関与する GRP78 と IRE1 の結合を安定化させることにより、IRE1 による JNK 活性化や CHOP の発現を抑制し、ER ストレスによる細胞死を抑制した。よって、Gipie は ER ストレス反応の調節因子であり、細胞保護作用を有すると考えられた。さらにラット頸動脈の内皮をバルーンで損傷し、内膜肥厚を引き起こすと、同部位に GRP78 と Gipie の発現が増強し、血管内皮の物理的傷害に伴うストレスに応答し、発現誘導されることが明らかになった。

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 9 件)

- ① .Matsushita, E., Asai, N., Enomoto, A., Kawamoto, Y., Kato, T., Mii, S., Maeda, K., Shibata, R., Hattori, S., Hagikura, M., Takahashi, k., Sokabe, M., Murakumo, Y., Murohara, T. and Takahashi, M.
Protective role of Gipie, a Girdin family protein, in endoplasmic reticulum stress responses in endothelial cell.
Mol. Biol. Cell. in press. 査読有
- ② Miyamoto, R., Jijiwa, M., Asai, M., Kawai, K., Ishida-Takagishi, M., Mii, S., Asai, N., Enomoto, A., Murakumo, Y., Yoshimura, A. and Takahashi, M.
Loss of Sprouty2 partially rescues renal hypoplasia and stomach hypoganglionosis but not intestinal aganglionosis in Ret Y1062F mutant mice.

- Dev. Biol.** 349: 160-168 (2011). 査読有
- ③ Yamaguchi, M., Suyari, O., Nagai, R. and Takahashi, M.
dGirdin a new player of Akt /PKB signaling in Drosophila Melanogaster.
Front Biosci. 15: 1164-1171 (2010). 査読有
- ④ Weng, L., Enomoto, A., Ishida-Takagishi, M., Asai, N. and Takahashi, M.
Girding for migratory cues: Role of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis. 査読有
Cancer Sci. 101: 836-842 (2010). 査読有
- ⑤ Jiang, P., Enomoto, A. and Takahashi, M.
Cell biology of the movement of breast cancer cells: intracellular signaling and the actin cytoskeleton. 査読有
Cancer Lett. 284: 122-130 (2009).
- ⑥ Enomoto, A., Asai, N., Namba, T., Wang, Y., Kato, T., Tanaka, M., Tatsumi, H., Taya, S., Tsuboi, D., Kuroda, K., Kaneko, N., Sawamoto, K., Miyamoto, R., Jijiwa, M., Murakumo, Y., Sokabe, M., Seki, T., Kaibuchi, K. and Takahashi, M.
Roles of Disrupted-in-Schizophrenia 1-interacting protein Girdin in postnatal development of the dentate gyrus.
Neuron 63: 774-787 (2009). 査読有
- ⑦ Puseenam, A., Yoshioka, Y., Nagai R, Hashimoto R, Suyari O, Itoh M, Enomoto A., Takahashi M and Yamaguchi M.
A novel Drosophila Girdin-like protein is involved in Akt pathway control of cell size.
Exp. Cell Res. 315: 3370-3380 (2009). 査読有
- ⑧ Kitamura, T., Asai, N., Enomoto, A., Maeda, K., Kato, T., Ishida, M., Jiang, P., Watanabe, T., Usukura, J., Kondo, T., Costantini, F., Murohara, T. and Takahashi, M.
Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin.
Nature Cell Biol., 10:329-337 (2008). 査読有
- ⑨ Jiang, P., Enomoto, A., Jijiwa, M., Kato, T., Hasegawa, T., Ishida, M., Sato, T., Asai, N., Murakumo, Y. and Takahashi, M.
An actin-binding protein Girdin regulates the motility of breast cancer cells.
Cancer Res., 68:1310-1318 (2008). 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 高橋雅英
がん遺伝子の発見から個体レベルの研究へ
Akt-Girdin シグナル伝達系による細胞運動制御の個体レベルでの解析
平成 22 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ
2011 年 2 月 4 日(琵琶湖ホテル)(大津)
- ② 高橋雅英、北村倫也、三宅裕史、前田健吾、榎本篤、浅井直也、室原豊明
Regulation of angiogenesis and neointima formation by the Akt substrate Girdin
第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会
2010 年 12 月 8 日(神戸)⑩ Takahashi, M.
Role of a new Akt substrate, Girdin in cancer and angiogenesis.

Kyoto 21st Century COE international symposium 2007

Genomic analysis of disease model animals with multiple genetic alterations

June 1-2, 2007 (Kyoto)

③高橋雅英

Akt/Girdin シグナル伝達系による血管新生、新生内膜形成の制御

Recent advance in tumor angiogenesis 2010

2010年11月20日(浜松)

④高橋雅英

細胞運動を制御する新規蛋白 Girdin の発見と機能解析
第4回日本病理学会中部支部 夏の学校
2010 富山 2010年8月22日(富山)

⑤高橋雅英

Akt の基質蛋白 Girdin の細胞運動における役割

第82回日本生化学会大会 2009年10月23日(神戸)

⑥Takahashi, M.

Role of an actin-binding protein Girdin in cancer cell motility and angiogenesis.

Global Center of Excellence (COE) Program, 1st International Symposium

Signaling of Cancer Cells

January 23, 2009 (Nagoya)

⑦高橋雅英

アクチン結合蛋白 Girdin のがん転移、血管新生、神経系における機能

第1回グローバルCOE国内シンポジウム
2008年11月14日(名古屋)

第67回日本癌学会学術総会 2008年10月29日(名古屋)

⑧高橋雅英

Akt の新規基質 Girdin の細胞運動と血管新生における役割

第5回日本病理学会カンファレンス

「がん」と「幹細胞」 2008年8月1日
(湘南国際村)

⑨高橋雅英

Akt の新規基質 Girdin の細胞運動と血管新生における役割

第3次対がん10か年総合戦略

第2回合同シンポジウム「がんの罹患率と死亡率の激減を目指して」

2008年2月29日(東京)

⑩Takahashi, M.

Role of a new Akt substrate, Girdin in cancer and angiogenesis.

The 21st Century COE program,

4th international symposium on functional molecules linked to neurogeneration and oncogenesis -Towards molecular targeted therapy-

October 25-26, 2007 (Nagoya)

[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:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/patho2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 雅英 (TAKAHASHI MASAHIDE)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 40183446

(2) 研究分担者

浅井 直也 (Asai Naoya)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 80273233

榎本 篤 (Enomoto Atsushi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号: 20432255

(3) 連携研究者

なし