

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07342

研究課題名(和文) RalGAPとビグアニドによる腫瘍抑制の分子機構

研究課題名(英文) Molecular Mechanism of Tumor Suppression by RalGAP and Biguanides

研究代表者

白川 龍太郎 (Shirakawa, Ryutaro)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：50581039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：RalはRasファミリーに属する低分子量GTP結合タンパク質であり、細胞の増殖、膜輸送、アクチン細胞骨格の制御など多様な機能を担っている。また、Ralの異常な活性化はがんの悪性を促進することが知られる。本研究ではRalの恒常的な活性化が膵臓がん細胞の浸潤・転移を促進することを明らかにした。また、遺伝子発現解析によりRalの活性化に伴い発現、分泌の上昇するサイトカインを同定し、浸潤・転移を担うRal下流の分子機構の一部を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの多くの知見は、Ralの異常な活性化が、がん化、がんの浸潤・転移に重要であることを示している。特に膵臓がんにおいてはRalの活性化が顕著であることが知られる。しかし、がんの悪性を制御するRal下流の分子メカニズムについてはこれまで不明であった。本研究において膵臓がんの浸潤・転移におけるRalの役割を明らかにした。現在、Ral経路を標的とする抗がん剤の開発が進められており、本成果は膵臓がんに対する新たな治療薬の開発につながりうるものである。

研究成果の概要(英文)：Ral is a low molecular weight GTP-binding protein belonging to the Ras family and regulates diverse cellular processes including cell proliferation, membrane traffic, and actin cytoskeleton reorganization. Aberrant activation of Ral is known to promote malignant transformation of cancer. In this study, we found that the constitutive activation of Ral promoted the invasion and metastasis of pancreatic cancer cells. In addition, gene expression analysis identified a cytokine whose expression and secretion increased with Ral activation. These findings reveal the molecular mechanisms downstream of Ral that play a role in invasion and metastasis of pancreatic cancer cells.

研究分野：生化学

キーワード：Ral RalGAP Ras 膵臓がん PDAC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Ras ファミリーの低分子量 GTP 結合蛋白質 Ral は、細胞増殖、膜輸送、アクチン細胞骨格の制御など、多様な細胞機能を担っている。哺乳類では RalA と RalB の 2 つのアイソフォームがある。他の G タンパク質と同様に、Ral は GTP 結合型あるいは GDP 結合型で存在し、GTP 結合型で下流のエフェクタータンパク質に作用しシグナルを伝達する。これまでの多くの知見は、膵臓がんをはじめとした多くのがんにおいて Ral の異常な活性化が見られること、Ral の恒常的な活性化が、がん化、浸潤・転移に重要であることを示している。代表者は、これまでに Ral の不活性化因子、Ral GTPase-activating protein (RalGAP) を分子同定し、がん細胞株、および RalGAP ノックアウトマウスを用いた解析により、RalGAP の発現低下による Ral の異常な活性化が膀胱癌や大腸癌の浸潤・転移に重要であることを明らかにした。しかし、がんの浸潤・転移を担う Ral 下流の分子メカニズムについてはほとんどわかっておらず、本分野における重要な課題となっている。一方、抗糖尿病薬として広く用いられているピグアナイド薬は血糖降下作用のみならず、抗炎症、抗腫瘍作用を持つことが疫学的に明らかにされつつある。しかし、ピグアナイド薬による腫瘍抑制のメカニズム、特に Ral の活性に及ぼす影響については全くわかっていない。

2. 研究の目的

本研究は、Ral の活性化が膵臓がん細胞の浸潤・転移に及ぼす影響を明らかにすること、および浸潤・転移における Ral 下流の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RalGAP は サブユニットと サブユニットからなるヘテロ複合体である。サブユニットには 1(RALGAPA1) と 2(RALGAPA2) があり、サブユニット(RALGAPB) は両者に共通している。GAP 触媒ドメインは サブユニットにあるが、その活性には サブユニットとの複合体化が必要である。本研究では代表的な pancreatic ductal adenocarcinoma(PDAC) 細胞である PANC-1 と MIA PaCa-2 を用い、CRISPR/Cas9 法により RalGAP 共通サブユニットである RALGAPB 遺伝子を欠損させ、Ral が恒常的に活性化した PDAC 細胞を作製した。野生型および RALGAPB KO PDAC 細胞を用いて wound healing アッセイ、マトリゲル浸潤アッセイにより *in vitro* での細胞の遊走能、浸潤能を評価した。また、ヌードマウス皮下移植モデル、脾臓注入モデルを用いて *in vivo* での増殖、浸潤・転移能を評価した。

(2) がんの浸潤・転移における Ral 下流の分子メカニズムを明らかにするために、野生型、RALGAPB KO PDAC 細胞を用いて遺伝子発現の比較を行った。同定された遺伝子について上記 *in vitro/vivo* アッセイを用いて関与を検討した。

(3) ピグアナイド化合物である phenformin を用いて、培養細胞中の Ral の活性をプルダウン法により解析した。

(4) 口腔扁平上皮がん細胞を用いて RalGAP の発現が遊走・浸潤に及ぼす影響を解析した。RALGAPA2 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化、ヒストン修飾を解析した。

4. 研究成果

(1) 膵臓がん細胞における役割を解析するために、代表的な PDAC 細胞である AsPC-1, BxPC-

3, SUI2, SW-1990, PANC-1, MIA PaCa-2 の計 6 細胞株を用いて RalGAP の発現を解析した。このうち、PANC-1 と MIA PaCa-2 細胞を用いて CRISPR Cas9 法により RALGAPB KO 細胞株を作製した。Ral エフェクター-Sec5 の Ral 結合ドメインを用いたプルダウンアッセイにより GTP 結合型 Ral を定量したところ、野生型細胞に比べ RALGAPB KO MIA PaCa-2 細胞では GTP 結合型 RalA, RalB が約 3 倍に、PANC-1 細胞では約 5 倍に増加していた。これらの RalGAP KO PDAC 細胞は野生型細胞に比べ、in vitro で高い遊走能、浸潤能を示した。また、ヌードマウス皮下移植において RALGAPB KO MIA PaCa-2 細胞は野生型よりも強い増殖能を呈した。一方、二次元培養での増殖に差はなかった。ヌードマウス脾臓注入モデルを用いて in vivo での浸潤・転移能を解析したところ、野生型に比べ RALGAPB KO MIA PaCa-2 細胞は高い肝転移能を示した。また RALGAPB KO 細胞を移植した約半数のマウスにおいて野生型には見られない腹膜播種を認めた。これらの結果は Ral の恒常的な活性化が PDAC 細胞の浸潤・転移に寄与することを示す(文献 1)。

(2) 上記の結果は RalGAP の欠失に伴う Ral の恒常的な活性化が膵臓がん細胞の浸潤・転移の亢進に重要であることを示すが、浸潤・転移を担う Ral 下流の分子機構についてはほとんど明らかになっていない。本研究では膵臓がんにおける Ral 下流経路を解析するために、野生型および RALGAPB KO MIA PaCa-2 細胞を用いて遺伝子発現の比較を行った。その結果、RALGAPB KO 細胞において一貫して発現の上昇する遺伝子として TGFB1 を同定した。ELISA 法により RALGAPB KO PDAC 細胞培養上清中の TGFB1 の増加を確認した。RALGAP2 の過剰発現により TGFB1 の mRNA 量、分泌量は低下したが、RalGAP 活性を欠く変異体の導入では影響なかったことから、Ral の活性化が TGFB1 の発現上昇に直接関与していると考えられた。RALGAP B KO PDAC 細胞の遊走、浸潤の亢進は TGF 受容体阻害剤により顕著に抑制された。また、マウス脾臓注入モデルを用いた in vivo での解析においても TGF 受容体阻害剤は RALGAPB KO 細胞の浸潤・転移を抑制した。Ral から TGFB1 へと至るシグナル経路については JNK の関与が示唆された。TGFB は初期のがんでは細胞増殖に抑制的にはたらくが、進展したがんにおいては上皮間葉転換を誘導し、浸潤・転移を促進することが知られる。これらの結果は Ral の活性化に伴う TGFB1 の発現上昇とオートクラインによる作用が膵臓がんの浸潤・転移に関わっていることを示唆する。

(3) 培養細胞を用いてピグアノイド化合物が Ral の活性に与えることを見いだした。ピグアノイド化合物による RalGAP 複合体のリン酸化、翻訳後修飾に注目し解析を進めた。

(4) 口腔扁平上皮がん細胞株を用いた解析により RALGAP2 の発現が低い細胞株は高い遊走・浸潤能を持つことを明らかにした。口腔扁平上皮がん検体において RALGAP2 の発現は低下しており、エピジェネティックな制御による発現抑制が示唆された(文献 2)。

<文献>

1. Ral GTPase-activating protein regulates the malignancy of pancreatic ductal adenocarcinoma. Yoshimachi S, Shirakawa R, Cao M, Trinh DA, Gao P, Sakata N, Miyazaki K, Goto K, Miura T, Ariake K, Maeda S, Masuda K, Ishida M, Ohtsuka H, Unno M, Horiuchi H. *Cancer Sci.* 2021 Aug;112(8):3064-3073.
2. Ral GTPase Activation by Downregulation of RalGAP Enhances Oral Squamous Cell Carcinoma Progression. Gao P, Liu S, Yoshida R, Shi CY, Yoshimachi S, Sakata N, Goto K, Kimura T, Shirakawa R, Nakayama H, Sakata J, Kawashiri S, Kato K, Wang XY, Horiuchi H. *J Dent Res.* 2019 Aug;98(9):1011-1019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yoshimachi Shingo, Shirakawa Ryutarō, Cao Mingxin, Trinh Duc Anh, Gao Pan, Sakata Natsumi, Miyazaki Kento, Goto Kota, Miura Takayuki, Ariake Kyohei, Maeda Shimpei, Masuda Kunihiro, Ishida Masaharu, Ohtsuka Hideo, Unno Michiaki, Horiuchi Hisanori	4. 巻 112
2. 論文標題 Ral GTPase-activating protein regulates the malignancy of pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3064 ~ 3073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakata Natsumi, Shirakawa Ryutarō, Goto Kota, Trinh Duc Anh, Horiuchi Hisanori	4. 巻 169
2. 論文標題 Double prenylation of SNARE protein Ykt6 is required for lysosomal hydrolase trafficking	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 363 ~ 370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shirakawa Ryutarō, Goto Ito Sakurako, Goto Kota, Wakayama Shonosuke, Kubo Haremaru, Sakata Natsumi, Trinh Duc Anh, Yamagata Atsushi, Sato Yusuke, Masumoto Hiroshi, Cheng Jinglei, Fujimoto Toyoshi, Fukai Shuya, Horiuchi Hisanori	4. 巻 39
2. 論文標題 A SNARE geranylgeranyltransferase essential for the organization of the Golgi apparatus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e104120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2019104120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamazaki Hiroyuki, Shirakawa Kotaro, Matsumoto Tadahiko, Kazuma Yasuhiro, Matsui Hiroyuki, Horisawa Yoshihito, Stanford Emani, Sarca Anamaria Daniela, Shirakawa Ryutarō, Shindo Keisuke, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 15
2. 論文標題 APOBEC3B reporter myeloma cell lines identify DNA damage response pathways leading to APOBEC3B expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0223463	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Trinh Duc-Anh, Shirakawa Ryutaro, Kimura Tomohiro, Sakata Natsumi, Goto Kota, Horiuchi Hisanori	4. 巻 9
2. 論文標題 Inhibitor of Growth 4 (ING4) is a positive regulator of rRNA synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53767-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iida Tomoya, Hirayama Daisuke, Minami Naoki, Matsuura Minoru, Wagatsuma Kohei, Kawakami Kentaro, Nagaishi Kanna, Nojima Masanori, Ikeuchi Hiroki, Hirota Seiichi, Shirakawa Ryutaro, Horiuchi Hisanori, Nakase Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Down-regulation of RalGTPase-Activating Protein Promotes Colitis-Associated Cancer via NLRP3 Inflammasome Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 277 ~ 293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2019.10.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gao P., Liu S., Yoshida R., Shi C.Y., Yoshimachi S., Sakata N., Goto K., Kimura T., Shirakawa R., Nakayama H., Sakata J., Kawashiri S., Kato K., Wang X.Y., Horiuchi H.	4. 巻 98
2. 論文標題 Ral GTPase Activation by Downregulation of RalGAP Enhances Oral Squamous Cell Carcinoma Progression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 1011 ~ 1019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034519860828	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamazaki Hiroyuki, Shirakawa Kotaro, Matsumoto Tadahiko, Hirabayashi Shigeki, Murakawa Yasuhiro, Kobayashi Masayuki, Sarca Anamaria Daniela, Kazuma Yasuhiro, Matsui Hiroyuki, Maruyama Wataru, Fukuda Hirofumi, Shirakawa Ryutaro, Shindo Keisuke, Ri Masaki, Iida Shinsuke, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Endogenous APOBEC3B Overexpression Constitutively Generates DNA Substitutions and Deletions in Myeloma Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43575-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uegaki Masayuki, Kita Yuki, Shirakawa Ryutaro, Teramoto Yuki, Kamiyama Yuki, Saito Ryoichi, Yoshikawa Takeshi, Sakamoto Hiromasa, Goto Takayuki, Akamatsu Shusuke, Yamasaki Toshinari, Inoue Takahiro, Suzuki Akira, Horiuchi Hisanori, Ogawa Osamu, Kobayashi Takashi	4. 巻 40
2. 論文標題 Downregulation of RalGTPase-activating protein promotes invasion of prostatic epithelial cells and progression from intraepithelial neoplasia to cancer during prostate carcinogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 1535 ~ 1544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgz082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 白川龍太郎、後藤-伊藤桜子、後藤孝太、深井周也、堀内久徳
2. 発表標題 新規ゲラニルゲラニル転移酵素GGT3によるYkt6のダブルプレニル化はゴルジ体の構造 と機能の維持に必須である
3. 学会等名 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白川龍太郎
2. 発表標題 新規プレニル転移酵素GGT3の分子機能解析
3. 学会等名 日本生化学会東北支部会例会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学加齢医学研究所基礎加齢研究分野
<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/mcb/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------