

## 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 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591766

研究課題名（和文）GAP を介した泌尿器癌転移の分子機序の解明

研究課題名（英文）Research for a mechanism of urologic cancer metastasis through a GAP signaling pathway

研究代表者

大久保 和俊 (OKUBO KAZUTOSHI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：20511877

研究成果の概要（和文）：浸潤性膀胱癌において、RalGAP $\alpha$ 2 の発現低下により Ral が活性化されており、RalGAP $\alpha$ 2 強制発現により Ral 活性を抑制することで *in vitro* における細胞遊走能や *in vivo* における肺転移が抑制された。マウス膀胱化学発癌実験において、Ralgap $\alpha$ 2 をノックアウトしたマウスでは腫瘍浸潤能が助長された。膀胱癌組織の免疫染色の検討では、RalGAP $\alpha$ 2 低発現は臨床病期の進行や予後不良と相関していた。これらの結果より、RalGAP $\alpha$ 2 の発現低下は Ral 活性上昇を介して膀胱癌の進行に寄与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Ral was highly activated in invasive bladder cancer cells due to reduced expression of RalGAP $\alpha$ 2. Exogenous expression of RalGAP $\alpha$ 2 in bladder cancer cells with invasive phenotype resulted in attenuated cell migration *in vitro* and lung metastasis *in vivo*. Genetic ablation of Ralgap $\alpha$ 2 promoted tumor invasion in a chemically-induced murine bladder cancer model. Immunohistochemical analysis of human bladder cancer specimens revealed that lower expression of RalGAP $\alpha$ 2 was associated with advanced clinical stage and poor survival of patients. Collectively, these results are highly indicative that attenuated expression of RalGAP $\alpha$ 2 leads to disease progression of bladder cancer through enhancement of Ral activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：膀胱癌、前立腺癌

科研費の分科・細目：泌尿器科学、腫瘍学

キーワード：膀胱癌、前立腺癌、Ral、GAP(GTPase-activating protein)

## 1. 研究開始当初の背景

成長因子や接着因子などの細胞外からの刺激は多様なシグナル伝達経路により集約される。そのひとつに Ras に代表される低分子量 G 蛋白質経路がある。低分子量 G 蛋白

質のうち Ras、Rap1、Ral、Rheb が Ras subfamily を形成する。これらは分子スイッチとして機能し、GEF(guanine nucleotide exchange factor)により活性のある GTP 結合型となり（スイッチオン）、GAP(GTPase-activating protein)により不活性

の GDP 結合型となる (スイッチオフ)。Ras の GAP である NF1 の変異が神経線維腫症の原因であることや、Rheb の GAP(TSC1/2) の変異により結節性硬化症が発症することは広く知られている。また Rap1 の GAP である Spa-1 のノックアウトマウスはすべて白血病を発症することが知られており、Ras subfamily protein はそれぞれの GAP を介して、癌の生物学において重要な役割を果たしていると考えられる。Ral の GAP は連携研究者堀内らによって世界に先駆けて同定された分子であるが、癌における機能を含め、制御機構や下流シグナルなどの詳細は不明である。

転移を有する進行癌は、集学的治療を行っても根治は困難である。進行癌の治療成績向上のためには転移の分子機序に基づいた治療法開発が急務と考えられている。我々の専門である泌尿器癌では、進行性腎癌に対する抗血管新生療法の導入による生存率の向上が報告されているが、前立腺癌や膀胱癌では未だそのような成果は得られていない。

我々は、乳癌における SPA-1 の転移促進に関する報告 (文献 1) をもとに平成 20 年度基盤研究 C 『ヒト前立腺癌における Rap1 GAP SPA-1 を介した転移機序の解明』 (以下、先行基盤研究 C と略す。) を行い、前立腺癌における SPA-1 蛋白 (Rap1 の GAP) の発現量やその制御機構について検討した。その結果転移性前立腺癌組織における SPA-1 蛋白の高発現を、また前立腺癌細胞株を用いて SPA-1 蛋白発現と転移能の相関性を見出した。SPA-1 mRNA の発現は転写レベルでの制御である可能性が示唆され SPA-1 プロモーター解析にて、約 20 種類の転写因子が SPA-1 発現を制御する可能性を見出した。現在これらの転写因子の機能解析を行っている。

Spa-1/Rap1 シグナルと低分子量 G 蛋白質 Ral のシグナル経路は RalGDS (前述の Ral を活性化する GEF のひとつ) と Rap1 の相互作用を通じてクロストークを有することは以前から知られていたが、その意義については全く分かっていない。近年 Ral 経路は発癌や癌転移に関与するシグナルのひとつとして重要視されるようになってきている (文献 2)。前立腺癌と膀胱癌においては Ral とこれらの癌の転移との関連性を示唆する報告が出始めている (文献 3・4)。従って泌尿器癌転移における SPA-1/Rap1 シグナルの下流標的分子を明らかにする上で、SPA-1/Rap1 経路と Ral 経路のクロストークの意義を明らかにすることは非常に重要であると思われる。さらに連携研究者である堀内らによって同定された Ral を不活化する RalGAP の癌における知見は未だ皆無であるので、泌尿器癌における RalGAP/Ral 経路に関する研究が新しい癌研

究分野を拓いていくことが期待できる。

(文献)

- 1 Park YG, Zhao X, Lesueur F, et al. Sipal is a candidate for underlying the metastasis efficiency modifier locus Mtes1. Nat Genet. 2005 Oct;37(10):1055-1062.
- 2 Brian O. Bodemann and Michael A. White. Ral GTPases and cancer: linchpin support of the tumorigenic platform. Nat Rev Cancer. 2008 Feb; 8: 133-140.
3. Yin J, Pollock C, Tracy K, Chock M, Martin P, Oberst M, Kelly K. Activation of the RalGEF/Ral pathway promotes prostate cancer metastasis to bone. Mol Cell Biol. 2007 Nov;27(21):7538-50.
4. Smith SC, Oxford G, Baras AS, Owens C, Havaleshko D, Brautigam DL, Safo MK, Theodorescu D. Expression of ral GTPases, their effectors, and activators in human bladder cancer. Clin Cancer Res. 2007 Jul 1;13(13):3803-13.

## 2. 研究の目的

SPA-1/Rap1 経路とクロストークを有する RalGAP(Ral を負に制御する)/Ral 経路の泌尿器癌における機能の検証を行い、GAP を介した泌尿器癌転移の分子機序の解明を目的とした。

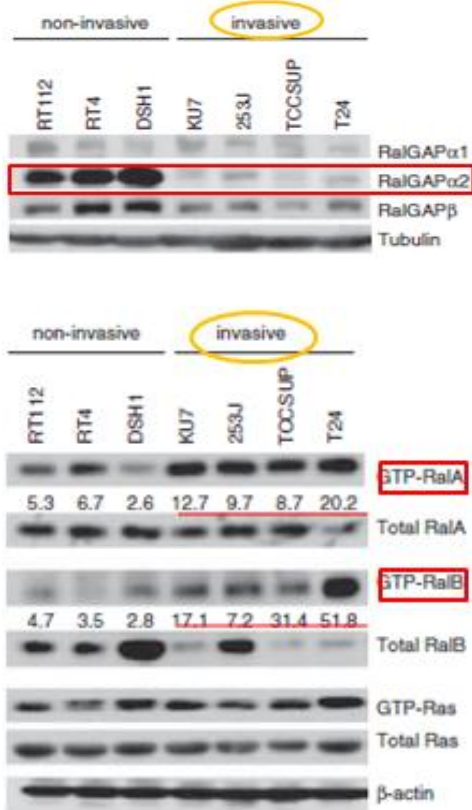
## 3. 研究の方法

- 1) 膀胱癌細胞株および膀胱癌組織検体を用いて、RalGAP/Ral 経路の膀胱癌における機能を検討する
- 2) 膀胱癌細胞株における RalGAP シグナルの強制発現および発現抑制を行い、遊走能や浸潤能など表現型の変化を検討する
- 3) RalGAP  $\alpha 2$  ノックアウトマウスを用いた BBN 経口摂取による膀胱化学発癌実験を行い、発癌への影響について検討する
- 4) 膀胱癌手術組織検体の免疫染色を用いて、ヒト膀胱癌における RalGAP  $\alpha 2$  発現の臨床的意義について検討する
- 5) RalGAP を強制発現した膀胱癌細胞株をヌードマウスの尾静脈に接種する肺転移モデルを用いて、転移に関与しているかどうか検討する
- 6) 上記 1)~5) の方法に準じ、前立腺癌における RalGAP/Ral 経路の機能について検討する

#### 4. 研究成果

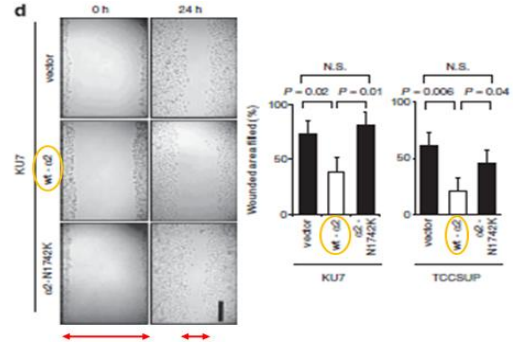
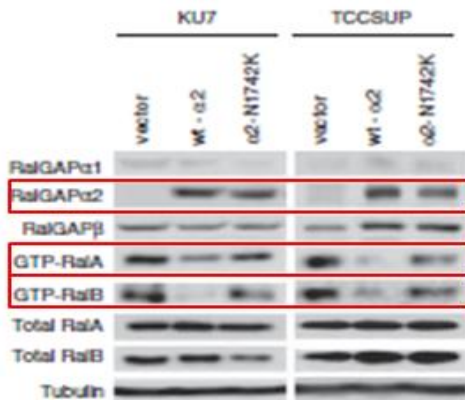
##### 1) RalGAP/Ral 経路の膀胱癌における機能の検討

膀胱癌細胞株において、浸潤性と Ral 活性化との正の相関がみられた。Ral の活性化は GEF の活性とは相関せず、GAP の活性低下と逆相関していた。RalGAP のうち膀胱では RalGAP  $\alpha 2$  が優位に発現し、 $\alpha 1$  は発現が低いため、Ral 活性化経路の主体は RalGAP  $\alpha 2$  の発現低下であることが示唆された。



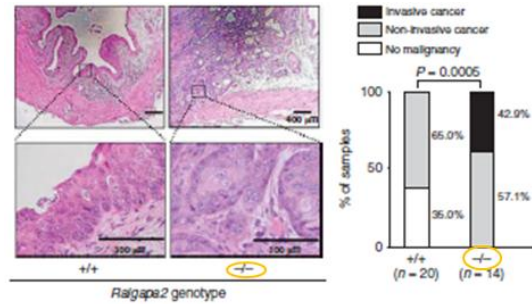
##### 2) RalGAP $\alpha 2$ の強制発現および発現抑制による膀胱癌細胞株の表現型の変化の検討

RalGAP  $\alpha 2$  低発現株に RalGAP  $\alpha 2$  を強制発現すると、活性化 Ral が減少し、さらに細胞遊走が有意に抑制された。



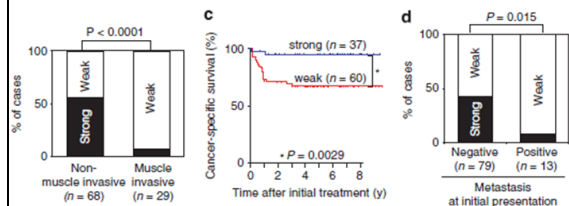
##### 3) RalGAP $\alpha 2$ ノックアウトマウスを用いた膀胱化学発癌実験

BBN を 16 週経口投与したところ、野生型マウスの 65% に筋層非浸潤癌を認め、残りの 35% には悪性所見がみられなかったが、RalGAP  $\alpha 2$  ノックアウトマウスの 57% に筋層非浸潤癌、43% に筋層浸潤癌を認め、腫瘍の進展に関与していることが示唆された。



##### 4) ヒト膀胱癌における RalGAP $\alpha 2$ 発現と予後の関連の検討

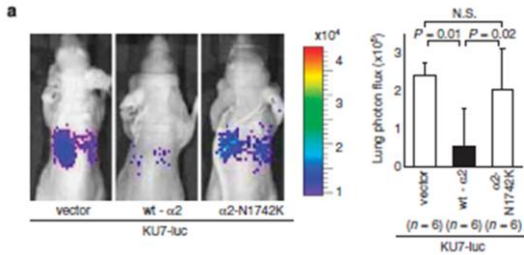
膀胱癌の臨床検体において RalGAP  $\alpha 2$  の発現を免疫染色で検討したところ、筋層非浸潤性膀胱癌と比較して筋層浸潤性膀胱癌において有意に RalGAP  $\alpha 2$  発現の低下がみられた。



##### 5) 膀胱癌肺転移モデルにおける検討

ヌードマウスを用いた膀胱癌細胞の肺転移モデルにおいては、RalGAP  $\alpha 2$  強制発現により肺転移結節数が有意に低下した。

これらの結果より RalGAP  $\alpha 2$  の発現低下が尿路上皮癌の浸潤転移に関係することが示唆された。



## 6) 前立腺癌における RalGAP/Ral 経路の解析

前立腺細胞株において、RalGAP $\alpha$ 2 発現量と Ral 活性化状態との関係を検討した結果、高悪性度株において RalGAP $\alpha$ 2 の発現低下と Ral の活性上昇を認めた。前立腺癌の臨床検体における RalGAP $\alpha$ 2 の免疫染色において、正常前立腺と比較して前立腺癌における RalGAP $\alpha$ 2 の有意な発現の低下がみられた。これらの結果より膀胱癌と同様に、RalGAP $\alpha$ 2 の発現低下が前立腺癌の浸潤転移に関与することが示唆された。

### 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 1 件)

Saito R, Ogawa O, et al.  
Downregulation of Ral GTPase-activating protein promotes tumor invasion and metastasis of bladder cancer.  
Oncogene (査読有り) 2013 Feb 14;32(7):894-902. doi: 10.1038/onc.2012.101.

[学会発表] (計 6 件)

①Saito R, Ogawa O et al.  
RalGAP, the Inactivator of Ral Small GTPase, Suppresses the Invasion and Metastasis of Prostate Cancer  
The 27th Annual SIU congress  
2012年9月30日～10月4日 福岡市

②齊藤亮一、堀内久徳、小川修 ほか  
RalGAP $\alpha$ 2 発現量は膀胱癌の生命予後規定因子のひとつである  
第 71 回日本癌学会学術総会 (2012 年 9 月 19 日～21 日) 札幌市

③齊藤亮一、大久保和俊、堀内久徳、小川修 ほか  
低分子量 G タンパク質 Ral 不活化因子 (RalGAP) を介した前立腺癌転移抑制機序の同定 第 100 回日本泌尿器科学会総会 (2012 年 4 月 23 日) 横浜市

④Saito R, Horiuchi H, Ogawa O et al.  
RalGAP, the inactivator of Ral small GTPase, suppresses the progression of prostate cancer  
27th Annual EAU Congress  
2012年2月24日～28日 パリ フランス

⑤齊藤亮一、堀内久徳、小川修 ほか  
RalGAP による腫瘍浸潤転移抑制機能の新規同定 第 99 回日本泌尿器科学会総会 (2011 年 4 月 22 日) 名古屋市

⑥Saito R, Horiuchi H, Ogawa O et al.  
RalGAP $\alpha$ 2, the inactivator of Ral small GTPase, is a metastasis suppressor of bladder cancer  
26th Annual EAU Congress  
2011年3月18日～22日 ウィーン オーストリア

⑦齊藤亮一、堀内久徳、小川修 ほか  
RalGAP $\alpha$ 2 の膀胱癌における役割  
第 69 階日本癌学会学術総会 (2010 年 9 月 22 日～24 日) 大阪市

[その他]

ホームページ等

<http://www.urology.kyoto-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大久保 和俊 (OKUBO KAZUTOSHI)  
京都大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 20511877

### (2) 研究分担者

小川 修 (OGAWA OSAMU)  
京都大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 90260611

吉村 耕治 (YOSHIMURA KOJI)  
京都大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 40397542

清水 洋祐 (SHIMIZU YOSUKE)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 00542094

### (3) 連携研究者

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