

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290041

研究課題名(和文) 低分子量GTP結合蛋白質RalおよびRalGAPの発癌・癌浸潤・転移における役割

研究課題名(英文) Elucidation of roles of small GTPase Ral and its negative regulator RalGAP in tumorigenesis, and cancer invasion and metastasis

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は低分子量ヒトの発癌・癌悪性化に重要であるGTP結合蛋白質Ralの抑制性制御因子GAPを世界に先駆けてRalGAPを同定し、RalGAPの発現低下が膀胱癌悪性化に重要であることを報告した。本研究では以下研究を進展させた：(1)腸炎および炎症性大腸発癌におけるRal及びRalGAPの重要性について明らかにした(2)Ral結合リン酸化酵素を同定し解析中である(3)膀胱がんにおけるRalGAP発現低下メカニズムがDNAメチル化等エピジェネティックな機序によることを見出した(4)RalGAP-cKOマウスを導入し組織特異的にRalGAP-KOマウスを作成している(5)Ralに関する総説を発表した

研究成果の概要(英文)：We have first identified negative regulators of small GTPases, Ral, that plays important roles in human tumorigenesis; RalGAP (JBC, 2009) and reported its important role in bladder cancer progression (Oncogene, 2013). We proceeded the investigation in this investigation as follows: (1) We found that Ral and RalGAP play an important role in inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer formation. (2) We identified Ral-associated kinase and have been analyzing it. (3) We investigated the mechanism of reduced expression of RalGAP in bladder cancer cells and found an involvement of an epigenetic mechanism such as DNA methylation. (4) We have prepared its conditional KO mice in our laboratory. Currently, we are preparing its tissue specific KO mice. (5) We have summarized recent findings of Ral by focusing on RalGAP and published as a review article.

研究分野：生化学、腫瘍生物学、血栓止血学

キーワード：腫瘍 低分子量GTP結合蛋白質 Ral

1. 研究開始当初の背景

低分子量GTP結合蛋白質Rasは多くの細胞成長因子の下流で働くシグナルのスイッチである。その活性は、活性化因子 GEF (GDP/GTP 交換因子) と不活性化因子 GAP (GTPase 活性化因子) のバランスによって制御されている。ヒトの多くの癌で変異を来している Ras は、Raf、PI3 キナーゼおよび RalGEF (低分子量 GTP 結合蛋白質 Ral の活性化因子) を直接のエフェクターとする。最近、RalGEF を介した Ral の活性化がヒトの癌で重要であるという報告が相次いでいる。

Ral の抑制性制御因子、RalGAP GAP はこれまで不明であったが、2009 年、我々は世界に先駆けてを同定した (JBC, 2009)。哺乳類における RalGAP は活性ドメインをもつ RalGAPalpha1 あるいは RalGAPalpha2 サブユニットと、共通の RalGAPbeta サブユニットのヘテロ複合体であった。そして RalGAPalpha2 サブユニットの発現低下が膀胱癌における悪性化に重要な働きをしていることを報告した (Oncogene, 2013)。

2. 研究の目的

Ral および RalGAP の発がん、癌悪性化における役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) Ral および RalGAP の腸炎および炎症性大腸発がんにおける役割の解明 : RalGAPalpha2 KO マウスは正常に成育するが、本 KO マウスに、デキストラン硫酸を服用させる実験的腸炎モデル、および azoxymethane (AOM) を併用する炎症性大腸発がんモデルを適用し、大腸炎および大腸発がんを解析する。

(2) Ral 結合リン酸化酵素の同定 : 低分子量 GTP 結合蛋白質の標的分子としてリン酸化酵素が重要である場合が多い。われわれは活性型 RalA 結合蛋白質として RalGAP を同定したが、そのサンプル中にリン酸化酵素活性を有するものがあり、本研究でカラム等を用いてそのリン酸化酵素を同定する。

(3) 膀胱がんにおける RalGAPalpha2 サブユニット発現低下メカニズム : RalGAP の発現低下が膀胱がん悪性化に重要であることを報告した (Oncogen, 2013) が、その発現低下メカニズムについて、バイサルファイト法や CHIP 法を用いてエピジェネティックな制御を解析する。

(4) 組織特異的 RalGAPbeta サブユニット KO マウスの導入 : RalGAPbeta サブユニットは、RalGAP 活性には必須であり、RalGAPbeta サブユニット KO マウスは胎生致死であった。そのため、RalGAPbeta サブユニット・コンディショナル KO マウスはさらなる解析のため重要なツールであり、開発する。

4. 研究成果

(1) Ral および RalGAP の腸炎および炎症性大腸発がんにおける役割の解明 : RalGAPalpha2 KO マウスにデキストラン硫酸によって腸炎を誘発したところ、野生型に比べて、激しい炎症が生じた (発表準備中)。さらに AOM 炎症性大腸癌を誘発すると特徴的な様相を呈した。現在、そのメカニズムについてマウス骨髄移植等を用いて解析中である。

(2) Ral 結合リン酸化酵素の同定 : 生化学的に Ral 結合リン酸化酵素を同定することができ、現在解析中である。

(3) 膀胱がんにおけるRalGAPalpha2サブユニット発現低下メカニズム：悪性度の高い膀胱がん細胞におけるRalGAPalpha2サブユニット発現低下にDNAメチル化が関与している可能性を見出した（発表準備中）。

(4) 組織特異的RalGAPbetaサブユニットKOマウスの導入：RalGAPbetaサブユニット・コンディショナルKOマウスが、米国カリフォルニア大学にて作出し、販売されてることが判明し、本研究中に我々の研究室に導入することができた。

(5) RalおよびRalGAPの総説：RalGAPに焦点Ralに関するこれまでの知見をまとめ、review articleを発表した（Shirakawa et al, JB (Tokyo), 2015）。

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13件)

1. K. Sakatsume, M. Akiyama, K. Saito, S. Kawamoto, H. Horiuchi, Y. Saiki (2016) Intractable bleeding tendency due to acquired von Willebrand syndrome after Jarvik 2000 implant (a case report). *J Artificial Organs* in press (査読有)
2. K. Shishikura, T. Horiuchi, N. Sakata, D-A Trinh, R. Shirakawa, T. Kimura, Y. Asada, H. Horiuchi* (2016) Prostaglandin E₂ inhibits neutrophil extracellular trap formation through production of cyclic AMP. *Br J Pharmacol*, 173, 319-331 doi: 10.1111/bph.13373 (査読有)
3. T. Handa*, K. Watanabe, K. Tanizawa, T. Oga, K. Aihara, K. Ikezoe, A. Sokai, Y. Nakatsuka, T. Hirai, S. Nagai, K. Chin, H. Horiuchi, M. Mishima (2015) Platelet aggregability in patients with interstitial pneumonia, *Sarcoidosis, vasculitis and diffuse lung disease* in press (査読有)
4. R. Shirakawa*, H. Horiuchi (2015) Ral GTPases: Crucial mediators of exocytosis and tumorigenesis. (a review) *J Biochem* (Tokyo) 157, 285-299. doi: 10.1093/jb/mvv029 (査読有)
5. T. Tamura, H. Horiuchi, M. Imai, T. Tada, H. Shiomi, M. Kuroda, S. Nishimura, Y. Takahashi, Y. Yoshikawa, A. Tsujimura, M. Amano, Y. Hayama, S. Imamura, N. Onishi, Y. Tamaki, S. Enomoto, M. Miyake, H. Kondo, K. Kaitani, C. Izumi, T. Kimura, Y. Nakagawa (2015) Unexpectedly high prevalence of acquired von Willebrand syndrome in patients with severe aortic stenosis as evaluated with a novel large multimer index *J Atherosclerosis Thrombosis* 22, 1115-1123 doi: 10.5551/jat.30809 (査読有)
6. N. Yaoita, R. Shirakawa, Y. Fukumoto, K. Sugimura, S. Miyata, Y. Miura, K. Nochioka, M. Miura, S. Tatebe, T. Aoki, S. Yamamoto, K. Satoh, T. Kimura, H. Shimokawa, H. Horiuchi* (2014) Platelets are highly activated in patients of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol*, 34, 2486-2494 doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304404 (査読有)
7. T. Kimura, R. Shirakawa, N. Yaoita, T. Hayashi, K. Nagano, H. Horiuchi* (2014) The antimalarial drugs chloroquine and primaquine inhibit pyridoxal kinase, an essential enzyme for vitamin B6 production.

FEBS Letter 588:3673-3676 doi:
10.1016/j.febslet.2014.08.011 (査読有)

8. Q. Chen, C. Quan, B. Xie, L. Chen, S. Zhou, R. Toth, DG Campbell, S. Lu, R. Shirakawa, H. Horiuchi, C. Li, Z. Yang, C. MacKintosh, H-Y Wang, S. Chen* (2014) GARNL1, a major RalGAP alpha subunit in skeletal muscle, regulates insulin-stimulated RalA activation and GLUT4 trafficking via interaction with 14-3-3 proteins. *Cellular Signalling* 26, 1636-1648 doi: 10.1016/j.cellsig.2014.04.012 (査読有)
9. 堀内久徳 (2015) 抗血小板薬の遺伝薬理学—ADP受容体拮抗薬の薬効に影響する遺伝子多型・日本人と欧米人の人種差—、血液フロンティア25, 81-89(査読無)
10. 白川龍太郎、堀内久徳 (2014) RalGAPの同定とその発現低下による膀胱がんの悪性化 生化学 86, 671-675 (ミニレビュー) (査読無)
11. 堀内久徳、田村俊寛 (2014) 後天性フォンウィルブランド病～高ずり応力が引き起こす後天性フォンウィルブランド病、血液フロンティア24, 1207-1212 (査読無)
12. 堀内久徳 (2013) 細胞質顆粒の放出機序、臨床免疫・アレルギー科 60, 228-237(査読無)
13. 堀内久徳「家族性血球貪食症候群のスクリーニング診断法の開発に繋がった血小板顆粒放出の分子メカニズムの研究」天理医学紀要 16, 59-69, 2013 (査読無)

[学会発表](計 13 件)

1. 第44回人工心臓と補助循環懇話会 (2016. 3. 4-5、松島 大観荘)特別講演 1 堀内久徳「高ずり応力が引き起こす後天性フォンウィルブランド症候群」
2. 日本生化学会大会 (2015. 12. 2) 神戸国際会議場、木村朋寛・宍倉匡祐・堀内高弘・坂田菜摘・Trinh Duc-Anh・白川龍太郎・堀内久徳「Prostaglandin E2 inhibits neutrophil extracellular traps formation through production of cyclic AMP」
3. 国際血栓止血学会 (ISTH) (2015. 6. 20-25) トロント、Metro Toronto Convention Center ポスター、K. Saito, K. Sakatsume, R. Shirakawa, T. Kimura, M. Akiyama, Y. Saiki, H. Horiuchi「Acquires von Willebrand syndrome in patients treated with left ventricular assist device」
4. 第79回日本循環器学会学術集会 (2015年4月24-26日、大阪、大阪国際会議場他) 会長特別企画「Rapid development of antithrombotic therapy: current status and future directions」にて、Hisanori Horiuchi「Antiplatelet therapy; basic aspect」
5. 第79回日本循環器学会学術集会 (2015年4月24-26日、大阪、大阪国際会議場他) 会長特別企画「日本人の血栓性素因」にて、堀内久徳「Effect of single nucleotide polymorphisms and ethnic difference on the antiplatelet effects of ADP receptor antagonists」
6. 第9回日本血栓止血学会学術標準化委員会(SSC)シンポジウム (2015年2月28日 (野村コンファレンスプラザ日本橋) 血小板部会シンポジウム「抗血小板薬の

- 分子標的とそのリスクベネフィット」において 堀内久徳「オーバービュー」
7. 第9回日本血栓止血学会学術標準化委員会(SSC)シンポジウム(2015年2月28日(野村コンファレンスプラザ日本橋) VWD/TTP 部会シンポジウム「VWD/TTPの診断と治療の進歩」において 堀内久徳「循環器疾患に合併する後天性 VWD の解析」
 8. 第28回日本冠疾患学会学術集会(2014年12月12-13日、東京、ステーションコンファレンス東京)抗血栓フォーラムにて、堀内久徳「ADP受容体拮抗薬の至適抗血小板効果について—日本人と欧米人との比較—」
 9. 第62回日本心臓病学会学術集会(2014年9月26-28日、仙台)シンポジウム4「抗血小板療法と抗凝固療法を必要とする患者の管理」において、堀内久徳「抗血小板薬効果モニタリングの現状と展望」
 10. 第46回日本動脈硬化学会学術集会(2014年7月10,11日、東京、京王プラザホテル)明日へのシンポジウム1「動脈硬化関連疾患における血液凝固異常」において、堀内久徳、田村俊寛「大動脈弁狭窄症に合併する後天性フォンヴィルブランド病」
 11. 第45回日本動脈硬化学会学術集会(2013年7月18,19日、東京、京王プラザホテル)シンポジウム2「抗血栓療法の評価—モニタリングは可能か、必要か?」において、堀内久徳「抗血栓療法モニタリングの現状と問題点」
 12. 国際血栓止血学会(ISTH)2013 アムステルダムRAI 2013. 6. 29-7.4 ポスター Horiuchi, N. Yaoita, R. Shirakawa「Evaluation

of activation states of small GTPases in patient platelets」

13. 国際血栓止血学会(ISTH)2013 アムステルダムRAI 2013. 6. 29-7.4 ポスター Horiuchi, K. Yamane, T. Kita, T. Kimura「Effects of platelet reactivity on long-term clinical outcomes and bleeding events in Japanese patients receiving aspirin therapy」

〔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

6. 研究組織
(1)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

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
小川 修 (OGAWA, Osamu)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：90260611

西山 博之 (HIROYUKI, Nishiyama)
筑波大学・人間総合科学研究科(系)・教授
研究者番号：20324642

仲瀬 裕志 (NAKASE, Hiroshi)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：60362498