

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430109

研究課題名(和文)アクチン重合蛋白質mDiaの細胞悪性化への寄与

研究課題名(英文)Roles of mDia, an actin nucleation factor, in cell transformation

研究代表者

石崎 敏理 (Ishizaki, Toshimasa)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：70293876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Rhoシグナリングは様々な細胞反応への関与が報告されており、癌においても浸潤転移への関与をはじめとして、Rasの下流でRafとともに細胞悪性化への関与が報告されている。しかしながら、その詳細な分子機序は未だ不明である。本研究では、Ras変異が起因となる腫瘍形成モデルであるDMBA/TPA二段階化学発癌モデルおよび培養細胞におけるRasシグナリングへの、Rho下流シグナル分子mDiaの関与を検討した。その結果、DMBA/TPA塗布による腫瘍形成がmDia1 KOマウスでは著しく減弱すること、それはRas下流シグナル分子の中でERKの活性化が減弱によるものであることが判明した。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that Rho signaling is involved in several cellular processes such as cell migration and cell adhesion. In cancer cells, Rho regulates cancer metastasis and tumorigenesis. However, its underlying molecular mechanism is still unknown. In this study, we examined whether mDia, which is a downstream protein of Rho, is involved in Ras-dependent tumorigenesis utilizing DMBA/TPA two-stage chemical carcinogenesis model in mice and examined activation of Ras downstream proteins such as Raf-MEK-ERK and AKT in mDia deleted cultured cells. In conclusion, it was found that the number of papilloma was significantly decreased in mDia1 KO mice. Moreover we found depletion of mDia1 caused to the suppression of MEK-ERK pathway in cultured cells. These results indicate that Rho-mDia signaling plays an important role in Ras-dependent tumorigenesis through MEK-ERK activation.

研究分野：分子生物学

キーワード：Rho mDia 癌化 Ras

1. 研究開始当初の背景

低分子量 G 蛋白質 Rho はアクチン細胞骨格制御因子であることから運動・接着という観点から、癌細胞での役割を論じられることが低分子量 G 蛋白質 Rho はアクチン細胞骨格制御因子であることから運動・接着という観点から、癌細胞での役割を論じられることが多い。しかし、臨床癌の多くで、Rho の発現レベルが亢進していることに加え、Rho の活性化因子である GEF (Guaninenucleotide exchange factor) は癌原遺伝子と考えられている。また、RhoGAP (GTPase activating protein) の DLC-1 (Deleted in liver cancer-1) は多くの臨床癌で欠失が確認されており、がん抑制遺伝子と考えられている。これらのことを併せると、Rho の活性は細胞増殖・悪性化に必要であることが示唆される。Rho の活性化が細胞悪性化に関与することは、培養細胞レベルでも支持されている。活性型 RhoA と Ras 標的分子 Raf が協調して foci を形成すること、また oncogenic Ras による foci 形成は Rho の dominant negative 体の発現により抑制されることから、Rho シグナリングは、細胞悪性化 (癌化) に不可欠であると考えられる。しかしながら、Rho の下流でどの標的分子が細胞悪性化に寄与しているかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

これまでの研究で我々は Rho の mDia や ROCK といった下流標的蛋白質を同定、またその生理的な機能解析をそれぞれの遺伝子改変マウスを用いて解析してきた。本研究では、これまで不明であった Rho による細胞悪性化に関与する Rho 標的蛋白質を明らかにするために mDia 遺伝子欠損マウスおよびそのマウスより得られた mDia 欠損細胞を用い、癌化への寄与とその分子機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) In vivo における Rho - mDia 経路の癌

化への寄与に関する研究

mDia 遺伝子欠損マウスに DMBA/TPA を塗布しパピローマ形成これまでの研究で我々は Rho の mDia や ROCK といった下流標的蛋白質を同定、またその生理的な機能解析をそれぞれの遺伝子改変マウスを用いて解析してきた。本研究では、これまで不明であった Rho による細胞悪性化に関与する Rho 標的蛋白質を明らかにするために mDia 遺伝子欠損マウスおよびそのマウスより得られた mDia 欠損細胞を用い、癌化への寄与とその分子機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究方法

(1) In vivo における Rho - mDia 経路の癌化への寄与に関する研究

mDia 遺伝子欠損マウスに DMBA/TPA 投与塗布による皮膚発ガンモデルを用い、mDia1 (DIAPH1) の関与を発癌・腫瘍数・腫瘍径について検討した。

(2) in vitro における Rho-mDia1 経路の癌化への寄与

活性型 Ras 恒常的発現細胞 MCF10ATCA1 および mDia1 遺伝子欠損 MEF (mouse embryonic fibroblast) 細胞を用いて、TPA 刺激後の Ras の下流分子 (MEK, ERK) の活性化を生化学的に解析した。

4. 研究成果

(1) In vivo における Rho - mDia 経路の癌化への寄与に関する研究

in vivo における Rho-mDia1 経路の癌化への本モデルは遺伝子背景に強く依存し、FVB 背景のマウスでは再現性よくパピローマ形成が認められることが確認されている。そこで C57/B6 背景の mDia 遺伝子欠損マウスを FVB の遺伝子背景に戻し、DMBA/TPA 投与塗布による皮膚発ガンモデルを実施した。その結果、パピローマが野生型、mDia1 ヘテロ (HT) マウスにおいては TPA 塗布後約 6 週目から形成され始めるのに対し、mDia1 ノックアウト

(KO)マウスでは10週以降に形成され始め、パピローマ形成時期が著しく遅延することが判明した(図1)。また、その後20週までTPAを塗布し続けた結果、1匹当たり形成されたパピローマ数も、野生型では 11.0 ± 3.74 個、HTマウスでは 10.5 ± 5.02 個に対し、mDia1KOマウスでは 1.75 ± 0.83 個と著しい差を認めた。さらに、パピローマの大きさも野生型が直径4mm以上のものが全体の約4割に達しているのに対し、HTマウス、KOマウスでは直径2mmのものがそれぞれの全体の3割、6割と最も多かった。加えて、KOマウスでは3mm以上のものが認められなかった。これらのことから、本モデルにおいてmDia1はパピローマ形成およびその生長に深く関与していることが判明した。

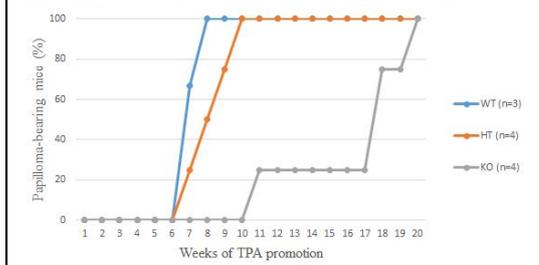
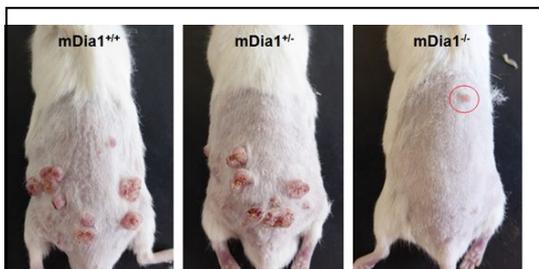


図1 DMBA/TPA 二段階化学発癌モデル

上図：塗布後20週でのそれぞれの遺伝子型マウスのパピローマ形成

下図：TPA塗布後のパピローマが形成された個体の割合

In vitroにおいてmDia1(DIAPH1)が細胞増殖に関与するのかを検討した。MCF10ATCA1は活性化型Rasが恒常的に発現している細胞であり、本細胞にRNAi法によりmDia1(DIAPH1)を枯渇させ、細胞増殖能について解析した。その結果、培養皿に接着した状態での細胞の増殖はmDia1(DIAPH1)の有無にかかわらず同

程度であった。

癌細胞は様々な形質を獲得するが、その1つとして足場非依存性増殖能を獲得する。そこで、mDia1(DIAPH1)が足場非依存性増殖能に影響を及ぼすかについて、軟寒天培地内での増殖能を検討した(soft agar colony formation assay)。その結果、mDia1(DIAPH1)枯渇細胞において有意にcolony数の減少を認めた(図2)。しかしながら、そのサイズに有意差は認めなかった。

(2) in vitroにおけるRho-mDia1経路の癌化への寄与

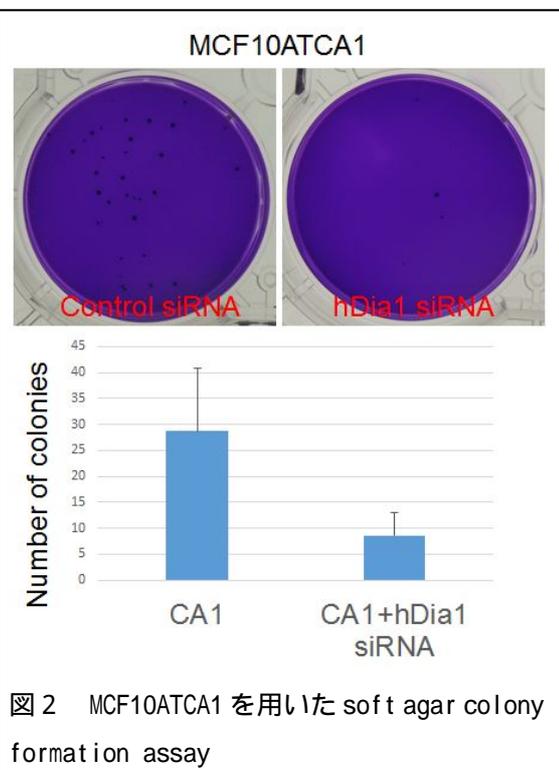


図2 MCF10ATCA1を用いたsoft agar colony formation assay

活性型Ras恒常的発現細胞であるMCF10ATCA1においてmDia1を枯渇させたところ、接着状態では細胞増殖能およびRas下流分子の活性化に差を認めなかった。一方で、methylcellulose中に細胞を撒きこみ、足場非依存性の増殖を検討したところ、siRNAを用いたDIAPH1枯渇細胞では有意にその細胞塊大きさが減少していることを見出した。さらにDIAPH1枯渇細胞ではTPA刺激後、MEK,

ERK, p90RSK のリン酸化が有意に減少していることを見出した(図3)。

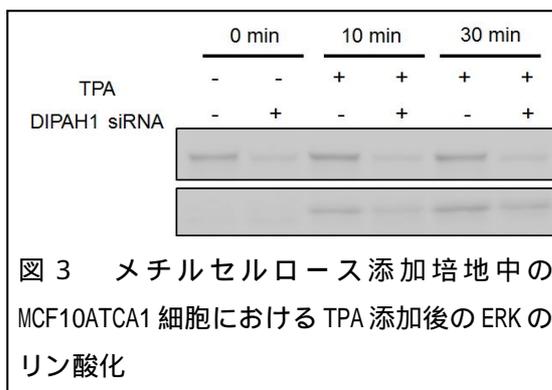


図3 メチルセルロース添加培地中のMCF10ATCA1細胞におけるTPA添加後のERKのリン酸化

上記の結果を確認するために、Dia1 遺伝子欠損マウスより単離したMEF(mouse embryonic fibroblast)にDIAPH1を発現させ、TPAで刺激したところ、ERKのリン酸化が有意に上昇していることを確認した(図4)

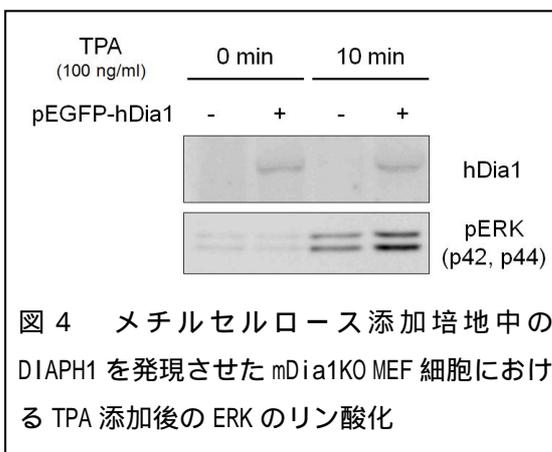


図4 メチルセルロース添加培地中のDIAPH1を発現させたmDia1KO MEF細胞におけるTPA添加後のERKのリン酸化

本研究の最も困難なことは *in vivo* の現象の分子機序を明らかにする際の *in vitro* の実験が十分確立していない点であった。具体的には、癌細胞は特性の1つである足場非依存性増殖能の評価は軟寒天培地内での増殖能の検討が主であった。しかしながら、この方法は細胞を回収し、生化学的な解析ができず、詳細な機序の解析には不向きである。本研究では、足場非依存性増殖の検討ならびにその状態の細胞内で情報伝達経路の解析を目的にmethylcellulose内での培養での解析を実施し、Rho-mDia1経路がRas下流

MEK-ERK-p90RSK経路を調節していることを見出した。加えて、mDia1によるERKリン酸化の調節は足場依存性増殖時では認められず、足場非依存性増殖の際に顕著になることが判明した。

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6件)

(1) Yamaoka M, Ando T, Terabayashi T, Okamoto M, Takei M, Nishioka T, Kaibuchi K, Matsunaga K, Ishizaki R, Izumi T, Niki I, Ishizaki T, Kimura T. PI3K regulates endocytosis after insulin secretion by mediating signaling crosstalk between Arf6 and Rab27a. *J. Cell Sci.* 129, 637-49, 2016 (査読あり)
doi: 10.1242/jcs.180141

(2) Yamaoka M, Ishizaki T, Kimura T. GTP- and GDP-dependent Rab27a effectors in pancreatic beta-cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38, 663-8, 2015 (査読あり)
doi: 10.1248/bpb.b14-00886.

(3) Yamaoka M, Ishizaki T, Kimura T. Interplay between Rab27a effectors in pancreatic beta-cells. *World Journal of Diabetes*, 6, 508-516, 2015 (査読あり)
doi: 10.4239/wjd.v6.i3.508.

(4) Okamoto M, Ishizaki T, Kimura T. Protective effect of hydrogen sulfide on pancreatic beta-cells. *Nitric Oxide*, 46, 32-36, 2015 (査読あり)
doi: 10.1016/j.niox.2014.11.007

(5) Kimura T, Yamaoka M, Taniguchi S, Okamoto M, Takei M, Ando T, Iwamatsu A, Watanabe T, Kaibuchi K, Ishizaki T, Niki I. Activated Cdc42-bound-IQGAP1 determines the cellular endocytic site. *Molecular and Cellular Biology*, 33, 4834-4843, 2013 (査読あり)
doi: 10.1128/MCB.00895-13

(6) Okamoto M, Yamaoka M, Takei M, Ando T, Taniguchi S, Ishii I, Tohya K, Ishizaki T, Niki I, Kimura T. Endogenous hydrogen sulfide protects pancreatic beta-cells from a high-fat diet-induced glucotoxicity and prevents the development of type 2 diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 442, 227-233, 2013

(査読あり)

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.023.

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) 山岡真美、寺林健、松永耕一、泉哲郎、仁木一郎、石崎敏理、木村俊秀 膵B細胞におけるエンドサイトーシスの時間的・空間的制御機構の解析. 第38回日本分子生物学会年会(2015年12月1日~4日)(神戸ポートアイランド;兵庫県神戸市)

(2) 山岡真美、安藤朋海、寺林健、松永耕一、泉哲郎、仁木一郎、石崎敏理、木村俊秀 膵B細胞におけるエンドサイトーシスの時間的・空間的制御機構の解析. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会 2015年5月21日~24日, 海峡メッセ下関(山口県下関市)

(3) 安藤朋海、山岡真美、寺林健、武井真大、石崎敏理、木村俊秀 グルコースによるメンブレンリサイクリングの分子メカニズム 第88回日本薬理学会年会, 2015年3月18日~20日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

(4) Yamaoka M, Ando T, Okamoto M, Terabayashi T, Matsunaga K, Ishizaki R, Izumi T, Niki I, Ishizaki T, Kimura T (Sep 2014) Identification of Rab27a-GAP-interacting proteins and its functional analysis in pancreatic beta-cells. 50th Annual meeting of European Association for the Study of Diabetes, 2014年9月15-19日 Reed Messe Vienna (Vienna, Austria)

(5) Okamoto M, Yamaoka M, Ando T, Takei M, Taniguchi S, Terabayashi T, Niki I, Ishizaki T, Kimura T Endogenous hydrogen sulfide protects pancreatic beta-cells from a high-fat diet-induced glucotoxicity and prevents the development of type 2 diabetes. 3rd International Conference on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine, 2014年6月4~6日 Kyoto University (Kyoto, Japan)

〔図書〕(計 1 件)

(1) Ishizaki T and Narumiya S, Springer, Ras Superfamily Small G Proteins: Biology and Mechanisms 1 pp 363-394 (2014)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.oita-u.ac.jp/pharmacology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石崎 敏理 (Toshimasa Ishizaki)

大分大学・医学部・教授

研究者番号: 70293876