

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461023

研究課題名(和文) 低分子量 G タンパク質の膵癌浸潤・転移への関与

研究課題名(英文) Roles of small G-proteins in regulating pancreatic cancer cell invasion and metastasis

研究代表者

岩崎 信二 (Iwasaki, Shinji)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授

研究者番号：10232654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、膵癌細胞の浸潤・転移を抑制する分子としてBARTを同定した。本研究では以下の項目の実験を終了した。(1) BARTは低分子量 G タンパク質であるARL2の活性を抑制し、Rho GTPaseであるRhoA活性を亢進させて膵癌細胞の浸潤・転移を抑制する。BARTと結合するARL2内の特異的結合部位を同定した。(2) BARTはRho GTPaseであるRac1に直接結合し、Rac1活性を低下させて膵癌細胞の浸潤・転移を抑制する。BARTと結合するRac1内の特異的結合部位を同定した。これらの実験により、BARTとARL2およびRac1との結合を阻害するペプチドを合成することができた。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that BART inhibited pancreatic cancer cell invasion and metastasis. This project seeks to identify the mechanisms by which BART inhibits the invasiveness and metastasis through regulating specific small G-proteins. The data provided here could provide important information to aid to improve the clinical outcome of pancreatic cancer patients. We determined the binding sites of two small G-proteins ARL2 and Rac1 with endogenous BART in pancreatic cancer cells. Furthermore, a specific ARL2-peptide and a specific Rac-1 peptide that could inhibit their binding with BART were found. Each peptide functioned in altering the activities of ARL2 and Rac1, and thereby inhibited pancreatic cancer cell motility and invasion. These discovery based studies will provide insight into the manner in which BART acts on the specific small G-proteins that are important to the motility and invasiveness of pancreatic cancer cells.

研究分野：消化器病学

キーワード：膵臓学 低分子量Gタンパク質 膵臓がん 浸潤・転移

1. 研究開始当初の背景

癌の進展（増殖、運動、浸潤、転移）に関わる分子の探索が進行し、詳細な機構が明らかにされつつあり、癌転移を標的とした治療薬の開発が欧米で精力的に進められている。しかし、血管新生抑制薬やマトリックスメタロプロテアーゼインヒビターなど癌組織の微小環境に関連したものがほとんどであり、癌細胞自体を対象とした治療・創薬への展開は遅れている。癌細胞自体の浸潤・転移能を抑制することができれば、癌組織中の血管新生などの環境応答も二次的に抑制され、その結果原発癌が限局される可能性がある。

したがって、治療・創薬への展開を目指した癌細胞自体の浸潤・転移のメカニズムを解析することが重要である。膵癌では原発巣が小さく転移巣が見つからない段階で、すでに微小転移していることが多く、膵癌細胞の浸潤・転移を抑制するという視点から原発巣に膵癌細胞を封じ込めておくことが治療成績を向上させるためには必要である。

申請者は、膵癌細胞の浸潤・転移抑制分子である binder of Arl Two (BART) を同定した。その後の我々の BART に関する機能解析により具体的には、次のような研究結果を得た。

1. BART は低分子量 G タンパク質である ADP-ribosylation factor-like 2 (ARL2) の活性を抑制することにより低分子量 G タンパク質 Rho GTPase ファミリーの一つである RhoA 活性を亢進させて膵癌細胞の浸潤・転移を抑制している。

2. BART は低分子量 G タンパク質 Rho GTPase ファミリーの一つである Rac1 に直接結合し、Rac1 活性を低下させることにより膵癌細胞の浸潤・転移を抑制している。

以上の実験データから、BART は様々な癌細胞の浸潤・転移に必須である Rho GTPase の活性調節に関与することにより、膵癌細胞の浸潤・転移を抑制する機能を有することが明らかとなった。

2. 研究の目的

低分子量 G タンパク質は、GDP 結合型と GTP 結合型のコンホメーション転換により、上流からのシグナルを下流に伝達する“分子スイッチ”として、細胞内情報伝達系の中心的な役割を果たしている。Ras の例に代表されるように、低分子量 G タンパク質を介する情報伝達系の乱れは、癌をはじめとする疾患の原因にもなっている。GDP/GTP 交換タンパク質 (GEF) および GTP アーゼ活性化タンパク質 (GAP) の調節を受けながら、GTP と GDP を結合した状態がそれぞれオン/オフに相当する分子スイッチとして機能している。我々の実験結果から、BART は低分子量 G タンパク質に対する GAP としての機能を有する可

能性が示唆された。BART は RGS や SH3 などの GAP ドメインを持たず、新しいタイプの GAP であることが推察された。BART の特異的な GAP 機構を明らかにするためには、BART と結合する低分子量 G タンパク質内の特異的結合部位を同定する必要があると考えた。本研究の目的は、BART と結合する低分子量 G タンパク質内の特異的結合部位を同定することである。特異的結合部位を同定することにより、BART が膵癌細胞の浸潤・転移を抑制する機序を解明し、将来の膵癌浸潤および転移を抑制する新規創薬のための基礎医学的知見を蓄積する。

3. 研究の方法

Rac1 および ARL2 それぞれの全アミノ酸配列に対し、N 末から約 30 アミノ酸毎に GST 融合タンパクを作成し、膵癌細胞株 S2-013 のライセートを用いて GST プルダウンを行う。推察される Rac1 および ARL2 内の BART との結合部位を同定し、BART と Rac1 および ARL2 との結合を阻害するペプチドを作成する。

(1) Rac1 および ARL2 由来 GST 融合タンパクの作成

GST 融合蛋白質発現用ベクター-PGEX-6P へ Rac1 および ARL2 それぞれの全アミノ酸配列に対し、N 末から約 30 アミノ酸毎に相当する DNA 断片をサブクローニングする。DNA 断片は膵癌細胞株 S2-013 から抽出した mRNA を用いて RT-PCR により得る。大腸菌で GST 融合タンパク質を発現させ、Glutathione Sepharose 4B を用いて大腸菌由来タンパク質を除去し、GST 融合タンパク質を精製する。

(2) GST プルダウン

S2-013 のライセートと精製した Rac1 および ARL2 由来 GST 融合タンパクを混ぜ合わせて、S2-013 に発現している内在性 BART と結合するアミノ酸配列を持った GST 融合タンパクをプルダウンする。市販の抗 BART 抗体を用いてウェスタンブロット法により同定する。

(3) BART と Rac1 および ARL2 との結合を阻害するペプチドの作成

膵癌細胞内在性 BART と結合する部位を含む 30 アミノ酸から成る Rac1 および ARL2 由来 GST 融合タンパクのアミノ酸配列を比較する。共通するアミノ酸配列があれば、その部位に相当するペプチドを合成する。ペプチドの N 末に 11 個のアルギニンを付加して、ペプチドを膵癌細胞の細胞膜を通過して細胞内に入れるようにする。まず、*in vitro* でペプチドの結合阻害作用を検討する。合成したペプチドを添加して、前述した GST プルダウン実験を行い、ペプチドが膵癌細胞内在性 BART と Rac1 および ARL2 との結合を阻害することを確認する。

これらの実験を行うことにより、BART が結合する低分子量 G タンパク質内の特異的結合部位を同定することが可能になる。この成果を基にして、引き続き結合部位の構造解析を行う予定である。これらの基礎医学的研究の蓄積により、膵癌細胞の浸潤・転移を抑制する新規創薬が可能になってくると考えている。

4. 研究成果

ARL2 および Rac1 それぞれの全アミノ酸配列に対し、N 末から約 30 アミノ酸毎に GST 融合タンパクを精製した。それぞれの GST 融合タンパクを用いて膵癌細胞株 S2-013 の細胞ライセートと混ぜ合わせてプルダウンを行った。抗 BART 抗体によるウエスタンブロット法により、BART と共沈した GST 融合タンパクを同定した。BART と共沈した GST 融合タンパクの ARL2 および Rac1 由来アミノ酸配列を検討した結果、Rac1 および ARL2 の両方に共通する配列はなかった。BART が特異的に結合する低分子量 G タンパク質内の特異的アミノ酸配列を認めなかったため、ARL2 内の BART 結合部位に対するペプチドと Rac1 内の BART 結合部位に対するペプチドをそれぞれ 3 種類ずつ合成した。S2-013 の細胞ライセートに合成した各ペプチドを添加し、前述した GST プルダウン実験を行い、膵癌細胞内在性 BART と Rac1 および ARL2 との結合を阻害するペプチドを同定することができた。膵癌細胞の細胞膜を通過して細胞内に入れるようにするため、結合阻害の機能を有するペプチドの N 末に 11 個のアルギニン付加した。アルギニン付加ペプチドを S2-013 の培養液中に添加して、ペプチドの結合阻害作用を検討した。その結果、11 個のアルギニン付加したペプチド添加により Rac1 および ARL2 の活性変化を検出できたが、いずれも結合阻害作用は弱かった。現在、ペプチドの細胞膜透過性を上げるために、ペプチドに付加する particle の検討を行っている。ペプチドの膜透過性を向上させることができれば、Rac1 および ARL2 の活性をコントロールすることを介して膵癌細胞の浸潤・転移を抑制する新規創薬に結びつく基礎的データの蓄積が可能になると考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Taniuchi K, Furihata M, Hanazaki K, Iwasaki S, Tanaka K, Shimizu T, Saito M, Saibara T: Peroxiredoxin 1 promotes pancreatic cancer cell invasion by modulating p38 MAPK activity. *Pancreas* 44:331-40, 2015 査読有
doi: 10.1097/MPA.0000000000000270.

- ② Taniuchi K, Furihata M, Iwasaki S, Tanaka K, Shimizu T, Saito M, Saibara T: RUVBL1 directly binds actin filaments and induces formation of cell protrusions to promote pancreatic cancer cell invasion. *Int J Oncol* 44: 1945-54, 2014. 査読有
doi: 10.3892/ijo.2014.2380.
- ③ Hasegawa T, Yamao K, Hijioka S, Bhatia V, Mizuno N, Hara K, Imaoka H, Niwa Y, Tajika M, Kondo S, Tanaka T, Shimizu Y, Kinoshita T, Kohsaki T, Nishimori I, Iwasaki S, Saibara T, Hosoda W, Yatabe Y: Evaluation of Ki-67 index in EUS-FNA specimens for the assessment of malignancy risk in pancreatic neuroendocrine tumors. *Endoscopy* 46:32-8, 2014 査読有
doi: 10.1055/s-0033-1344958.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Taniuchi K, Furihata M, Iwasaki S, Saibara T: BCL enhances cell motility and invasion of pancreatic cancer cells. *Asia-Pacific Digestive Week* 2015. Taipei (Taiwan), 2015/12/3-6.
- ② Taniuchi K, Furihata M, Iwasaki S, Shimizu S, Shimizu T, Saito M, Saibara T: Ruvbl1 directly binds actin filaments and induces formation of cell protrusions to promote pancreatic cancer cell invasion. *Asian Pacific Digestive week* 2014. Bali (Indonesia), 2014. 11. 22-25.
- ③ Taniuchi K, Furihata M, Iwasaki S, Shimizu S, Shimizu T, Saito M, Saibara T: Prdx1 promotes pancreatic cancer cell motility and invasion by modulating p38 mapk activity. *uegweek2014. vienna (Austria)*, 2014. 10. 18-22.
- ④ 谷内恵介, 岩崎信二, 西原利治: KIF20A は RNA 結合蛋白質とメッセンジャーRNA の複合体を郵送することにより膵癌浸潤・転移を亢進させる. 第 100 回日本消化器病学会総会. シンポジウム「消化管癌の分子病態学に関する進歩」. 東京国際フォーラム (東京), 2014. 4. 23-4. 26.
- ⑤ Taniuchi K, Furihata M, Saito M, Saibara T: B0031 enhances pancreatic cancer cell motility and invasion through binding to ANXA2. *IAP&KPBA 2013 Joint Meeting of the International Association of Pancreatology & the*

Korean Pancreatobiliary Association
2013. Seoul (Korea), 2013. 9. 4-7.

- ⑥ 谷内恵介：KIF20A が RNA 結合蛋白質を介して膵癌浸潤・転移を亢進させる機序. 第 44 回日本膵臓学会大会. トピックスセッション「膵疾患の克服を目指した基礎研究」. 仙台国際センター(宮城県仙台市), 2013. 7. 25-7. 26

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 信二 (IWASAKI, Shinji)
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授
研究者番号：10232654

(2) 分担研究者

谷内 恵介 (TANIUCHI, Keisuke)
高知大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：50626869