

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861332

研究課題名(和文) 婦人科悪性腫瘍の転移を制御するGPCRシグナルの解析

研究課題名(英文) The role of GPCR signaling in gynecologic cancer progression

研究代表者

八木 裕史 (Hiroshi, Yagi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70623552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：三量体Gタンパク質のひとつであるG12/13は乳癌や前立腺癌の進展において重要な役割を果たしていることが報告されています。今回の解析の結果、ヒト卵巣癌組織ではG12/13が高発現していること、卵巣癌細胞においてはG13の高発現に伴うHippoシグナル経路の活性化が細胞増殖を促進していることが明らかとなりました。このシグナル伝達経路を抑制することが卵巣癌の新たな治療につながると期待されます。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells can co-opt the activity of G protein coupled receptors (GPCRs) signaling. Recent analyses revealed that not only GPCRs or its ligands, but also heterotrimeric G proteins play critical roles in cancer progression. Among G proteins, we have focused on G12/13. In immunohistochemical analysis, G12/13 is highly expressed in ovarian cancer tissues. Increased expression of G13 promotes cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo. To further examine underlying mechanisms of G13-regulated cell proliferation, we took advantage of synthetic biology approach using mutant GPCR and G protein. Detailed analysis revealed that the activation of G13 induces dephosphorylation and nuclear translocation of YAP, which is a core component of Hippo pathway. In addition, inhibition of YAP activity by shRNA or specific inhibitor blocked proliferation of ovarian cancer cells. These data represents G13-YAP signaling axis as a novel therapeutic target of ovarian cancer.

研究分野：シグナル伝達

キーワード：GPCR 卵巣癌 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

近い将来、本邦では男性の2人に1人、女性の3人に1人ががんで死亡することが報告されている。がんによる死亡の90%以上は転移によるもので、そのメカニズムを解明することが予後の改善につながると考えられる。癌細胞の転移においては膜七回貫通型のGタンパク質共役受容体(GPCR)が重要な役割を果たしており、その一つであるCXCR4は癌のリンパ節転移や臓器選択的転移を促進するGPCRとして知られている(Muller A et al., Nature, 2001)。CXCR4はG_i結合型のGPCRと考えられているが、悪性度の高い乳癌細胞の浸潤、転移においては既知のCXCR4/G_iシグナルではなく、G₁₃の高発現に伴うCXCR4/G₁₃/Rhoシグナルの活性化が中心的な役割を果たしていることを我々は明らかにした(Yagi H et al., Sci Signal, 2011)。また、卵巣癌においては、腹水中に高濃度に含まれるリソホスファチジン酸(LPA)が、癌細胞の発現するLPA受容体(LPAR)を介してRhoを活性化し、増殖、進展を促進することが報告されている(Bast RC Jr et al., Nat Rev Cancer, 2011)。

Rhoシグナルの癌の進展における役割は徐々に明らかになっているが、その生物学的な意義には不明な部分も多く残されている。発癌や腫瘍の増殖には関与せず、癌の転移のみを抑制するmetastasis suppressor geneの中にはGPR54、GPR56などのGPCR、DLC1やRHOGD12などRhoシグナルに関与する分子が多く含まれる(Smith SC et al., Nat Rev Cancer, 2009)。しかしGPCRを介したRhoシグナルの活性化が転移を抑制する詳細なメカニズムは不明である。

また、近年のヒト癌組織を用いた網羅的遺伝子解析の結果から、GPCR自体の遺伝子変異やGPCRリガンドの高発現だけでなく、細胞内の三量体Gタンパクの発現上昇や遺伝子変異が癌の進展に関与していることが明らかになってきた。

2. 研究の目的

以上のような研究成果と背景から、Rhoシグナルの活性化を制御する三量体GタンパクであるGa12/13の卵巣癌進展における役割を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

ヒト卵巣癌組織におけるGa12/13の発現を免疫組織染色で解析した。

ヒト卵巣癌細胞株を用いてin vitroの解析を行った。Ga13高発現細胞株およびshRNAを用いたGa12/13発現抑制株を樹立した。それらの細胞株を用いて細胞増殖能におけるGa12/13の役割を解析した。また造腫瘍能の

解析も行った。

Ga12/13の活性化により制御される細胞増殖を促進する細胞内シグナル伝達経路についての解析を行った。

4. 研究成果

九州大学倫理審査委員会で承認され、インフォームドコンセントを得たヒト正常卵巣組織および卵巣癌組織を用いて、Ga12/13の発現を免疫組織染色で解析した。その結果、正常卵巣と比較して、卵巣癌組織ではGa12/13が高発現していることが明らかとなった(図1)。さらに、Ga12/13は卵巣癌の特定の組織型に限らず、様々な組織型において高発現していることが明らかとなった。

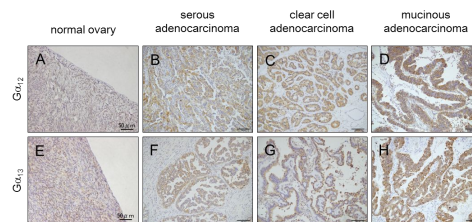


図1. ヒト卵巣組織におけるGa12/13の発現

ヒト卵巣癌細胞株RMG1を用いて解析を行った結果、Ga13の高発現に伴いin vitroにおけるコロニー形成能が亢進することが明らかとなった(図2)。

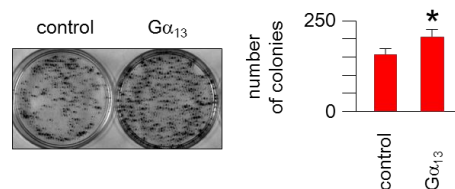


図2. 卵巣癌細胞株RMG1のコロニー形成能

また、マウス皮下腫瘍モデルを用いた解析の結果、Ga13過剰発現株では腫瘍形成能が亢進する(図3)のに対して、shRNAを用いたGa13発現抑制株においては、腫瘍形成能が

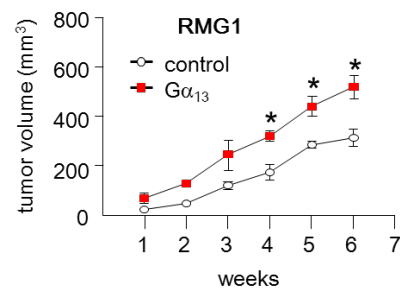


図3. マウスモデルにおける腫瘍形成能

抑制されることが明らかとなった(図4)。

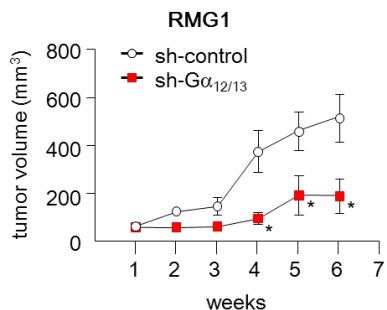


図4. マウスモデルにおける腫瘍形成能

細胞増殖を制御する Ga13 下流の細胞内シグナル伝達経路を解析するために、図5に示す GPCR および Ga13 の遺伝子変異体を用いた。この遺伝子変異体は人工のリガンドである Clozapine-N Oxide(CNO)とのみ結合することができ、それにより純粋な Ga13 シグナルが細胞内で活性化される。

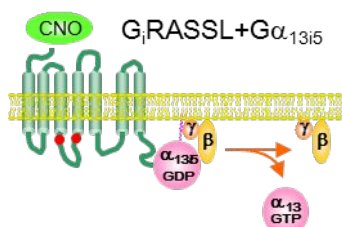


図5. GPCR および Ga13 遺伝子変異体

上記の実験系を用いた解析の結果、Ga13 は Hippo シグナル経路の活性化を介して細胞増殖を抑制することが明らかとなった。Hippo シグナル経路は臓器のサイズを抑制することがよく知られている。このシグナル経路において中心的な役割を果たしている YAP は、リン酸化された状態では細胞質内に局在するが、脱リン酸化されると核内に移行し、転写の co-activator として機能することが知られている。細胞免疫染色による解析の結果、Ga13の活性化により YAP の局在が細胞質内から核内へ変化することが明らかとなった(図6)。

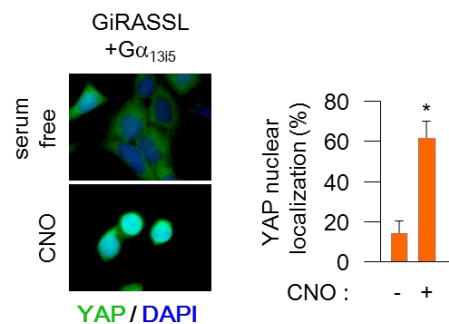


図6. 細胞免疫染色による YAP の局在の解析

またウエスタンブロット法による解析の結果、Ga13 の活性化により YAP の脱リン酸化が誘導されることも明らかとなった(図7)。

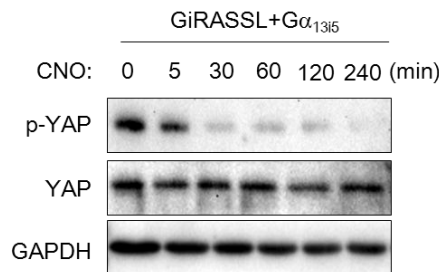


図7. ウエスタンブロット法による YAP のリン酸化の解析

次に Ga13-YAP シグナル経路を標的とすることが卵巣癌の新たな治療戦略につながるかどうかを検討した。卵巣癌細胞株における YAP の発現を shRNA を用いてノックダウンした結果、コロニー形成能が抑制されることが明らかとなった(図8)。

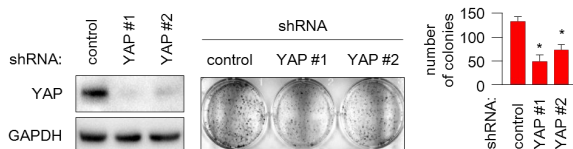


図8. shRNA を用いた YAP の発現抑制に伴うコロニー形成能の変化

以上の結果より、ヒト卵巣癌組織においては Ga12/13 が高発現しており、invitro の解析の結果、Ga12/13 の高発現に伴う Hippo シグナル経路の活性化が細胞増殖を誘導していることが明らかとなった。また、このシグナル伝達経路が卵巣癌の新たな分子標的となる可能性が示唆された。

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7件)
GEP oncogene promotes cell proliferation through YAP activation in ovarian cancer.
Yagi H, Asanoma K, Ohgami T, Ichinoe A, Sonoda K, Kato K.
Oncogene. 2016 [Epub ahead of print]

Tumor-To-Tumor Metastasis of Poorly Differentiated Gastric Carcinoma to Uterine Lipoleiomyoma.

Kiyokoba R, Yagi H, Yahata H, Kawano Y, Kaneki E, Okugawa K, Sonoda K, Kato K. Case Rep Obstet Gynecol. 2015 [Epub 2015 Nov 25]

Identification of the Critical Site of Calponin 1 for Suppression of Ovarian Cancer Properties.

Yamane T, Asanoma K, Kobayashi H, Liu G, Yagi H, Ohgami T, Ichinoe A, Sonoda K, Wake N, Kato K. Anticancer Res. 2015 Nov;35(11):5993-9.

Regulation of the Mechanism of TWIST1 Transcription by BHLHE40 and BHLHE41 in Cancer Cells.

Asanoma K, Liu G, Yamane T, Miyanari Y, Takao T, Yagi H, Ohgami T, Ichinoe A, Sonoda K, Wake N, Kato K. Mol Cell Biol. 2015 Dec;35(24):4096-109.

SNP55, a new functional polymorphism of MDM2-P2 promoter, contributes to allele-specific expression of MDM2 in endometrial cancers.

Okamoto K, Tsunematsu R, Tahira T, Sonoda K, Asanoma K, Yagi H, Yoneda T, Hayashi K, Wake N, Kato K. BMC Med Genet. 2015 Aug 21;16:67.

Retrospective Analysis of Concurrent Chemoradiation with Triweekly Cisplatin

Yagi H, Sonoda K, Kato K.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

八木 裕史 (YAGI, Hiroshi)
九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号 : 70623552

plus 5-Fluorouracil Versus Weekly Cisplatin in Cervical Cancer.

Sonoda K, Yahata H, Ichinoe A, Okugawa K, Kaneki E, Kawano Y, Kenjo H, Ohgami T, Yagi H, Ohga S, Asai K, Nakamura K, Honda H, Kato K.

Anticancer Res. 2015 Jun;35(6):3447-54.

Uterine myxoid leiomyosarcoma with tumor embolism extending into the right atrium.

Imai H, Yagi H, Okugawa K, Kenjo H, Ohgami T, Kawano Y, Kaneki E, Ichinoe A, Asanoma K, Yahata H, Sonoda K, Kobayashi H, Kaku T, Kato K.

Case Rep Obstet Gynecol. 2015;2015:316262.

〔学会発表〕(計2件)

第68回日本産科婦人科学会学術講演会 (2016年4月21日-4月23日、東京国際フォーラム)

LATS1 phosphorylation at serine 909 by Ga₁₃ is involved in YAP activation in ovarian cancer cells.

Yagi H, Ohgami T, Onoyama I, Ichinoe A, Asanoma K, Sonoda K, Kato K.

第67回日本産科婦人科学会学術講演会 (2015年4月9日-4月11日、パシフィコ横浜)

The Ga_{12/13}-YAP signaling axis driving proliferation of ovarian cancer cells.