

RalGAP $\alpha 2$ 発現調節を介した 尿路性器癌の発癌進展機構の解明

[1] 組織

代表者：小川 修

(京都大学大学院医学研究科)

対応者：堀内 久徳

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

松井 喜之 (京都大学大学院医学研究科)

研究費：物件費20万円

[2] 研究経過

Ras に代表される低分子量 GTP 結合蛋白質はヒトでは約 150 種存在し、Ras スーパーファミリーを形成している。このうち Ral は Ras、Rap、Rheb とともに Ras サブファミリーを形成する (図1)。他の GTP 結合蛋白質と同様に、Ral は GTP の結合した活性型と、GDP の結合した不活性型の 2 つの立体構造をとり、その活性化、不活性化はそれぞれ GEF(guanine nucleotide exchange factor)、GAP(GTPase-activating protein)により制御される。これまでに6つの RalGEF が見いだされているが、2つは PH ドメインを有し、4つは Ras の直接のエフェクターである。それらを介して、Ras の活性化によっても Ral は活性化される。一方、Ral の不活性化因子 RalGAP の分子については長らく不明であったが、今共同研究対応者の堀内らは RalGAP を同定し、RalGAP1($\alpha 1$ 活性サブユニットと調節 β サブユニットの複合体)および RalGAP2($\alpha 2$ 活性サブユニットと調節 β サブユニットの複合体)と名付けて報告した(Shirakawa et al, J Biol Chem, 2009)。近年の研究で、Ral は大腸癌や膵癌、膀胱癌でその活性が強く上昇しており、その浸潤・転移に重要な働きをしていることが報告されている。

我々は、堀内らと共同研究を行い、RalGAP $\alpha 2$ サブユニット発現低下によって、Ral の活性が上昇し、膀胱癌の発癌・進行重要な働きを果たしている可能性を見いだした (Saito et al, Oncogene in press,

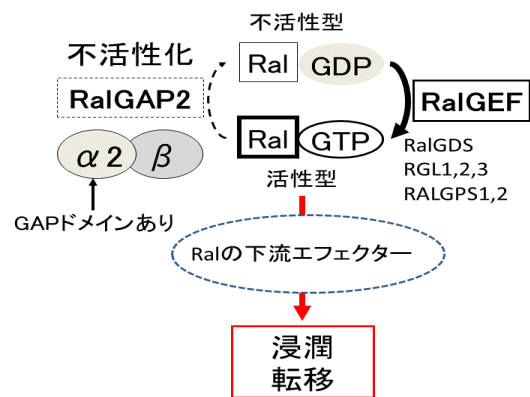
2012) が、本研究では、その研究をさらに発展させ尿路性器癌における RalGAP の役割を解明することを目的とした。具体的には、

(1) 進行癌で RalGAP $\alpha 2$ の発現が低下するメカニズムの解明

(2) 前立腺癌における RalGAP $\alpha 2$ 発現の評価

(3) RalGAP 発現低下に基づく尿路性器癌悪性化の早期診断法の開発。

の3点に重点をおいて研究を行った。



我々は随時電話・メールにて対応者の堀内と連絡をとりあい、さらに定期的な meeting を開催し実験の進捗状況や方針の確認を行ってきた。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

(1) 進行癌で RalGAP $\alpha 2$ の発現が低下するメカニズムの解明

当研究室にて保持している種々の膀胱癌細胞株を東北大学加齢医学研究所堀内らに送付し、epigenetic 制御の関与についての解析を現在進行中である。細胞株レベルでの解析を終了したのちに、当科の保持する臨床サンプルでの解析を継続して行う予定としている。

(2) 前立腺癌における RalGAP $\alpha 2$ 発現の評価

前立腺癌にて前立腺全摘術を行った症例によって作成した tissue microarray での解析から正常組織と比較して癌部において RalGAP $\alpha 2$ の発現が低下

していることが判明した(図1)。このことから前立腺癌の発癌進展においても RalGAP α 2 の発現が関与している可能性が示唆された。

さらに前立腺癌細胞株 LNCaP, DU145, PC3 において RalGAP α 2 の発現および Ral 活性を比較したところ、浸潤性の強い PC3 において RalGAP α 2 の発現が低下しており、同時に Ral 活性が上昇していることが判明した (図2)。そのため、PC3 細胞株に RalGAP α 2 を遺伝子導入し、細胞運動性、浸潤能の変化を wound healing assay および invasion assay にて観察したところ、RalGAP α 2 の導入によって細胞運動性および浸潤能がともに低下することが確認された。このことから、RalGAP α 2 の発現調節が前立腺癌の進行の制御に関与している可能性が示された。現在さらにマウス PC3 肺転移モデルにて RalGAP α 2 発現調節による転移能の変化を観察中である。また、RalGAP α 2KO マウスを現在繁殖中であり、それらを用いたゼノグラフト実験なども準備をすすめているところである。

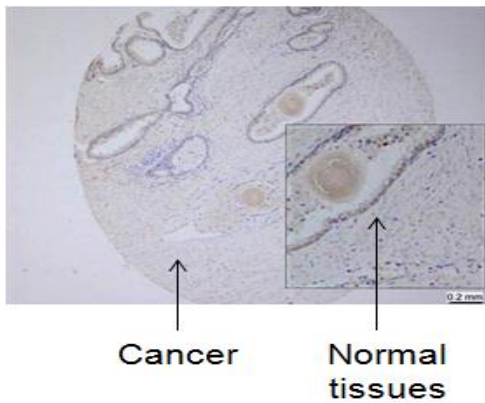


図1 前立腺組織における RalGAP α 2 発現

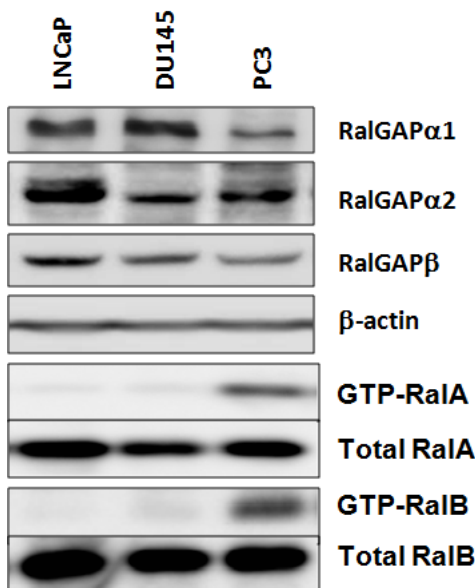


図2

前立腺癌細胞株での RalGAP α 2 発現と Ral 活性

(3-2) 波及効果と発展性など

我々は RalGAP α 2 サブユニットの発現低下が膀胱癌の悪性化・予後に深く関わることをすでに見いだしている (Saito et al, *Oncogene in press*) が、RalGAP α 2 の発現調節機構の解明は膀胱癌の新たな発癌・癌悪性化機構の解明につながる可能性がある。また前立腺癌でも RalGAP-Ral 経路の重要性が証明されれば、この経路の異常が多くの癌に関与している可能性が示唆され、今後の癌治療の新たな分子標的となりえる可能性を秘めている。また、我々は RalGAP α 2 の発現低下が膀胱癌の予後悪化と相関していることを報告したが、今後生検標本で RalGAP α 2 の発現を確実に評価できれば、膀胱癌の予後診断に大きく寄与する可能性がある。また尿検体での RalGAP 測定系が確立できれば、外来診療レベルで迅速簡便に膀胱癌悪性度を診断するツールとして診療に大きな貢献ができると考えられる。

[4] 成果資料

1. R Saito, R Shirakawa, H Nishiyama*, T Kobayashi, M Kawato, T Kanno, K Nishizawa, Y Matsui, T Ohbayashi, M Horiguchi, T Nakamura, T Ikeda, K Yamane, E Nakayama, E Nakamura, Y Toda, T Kimura, T Kita, O Ogawa, H Horiuchi* (2013) Downregulation of Ral GTPase-activating-protein causes tumor invasion and metastasis of bladder cancer. *Oncogene* 32, 894-902

(学会発表)

1. The expression of RalGAP α 2 has a significant impact on the survival of patients with bladder cancer. (Ryoiti Saito, Yoshiyuki Matsui, Atsuro Sawada et al)
2. Downregulation of Ral GTPase-activating protein promotes tumor invasion and metastasis of bladder cancer ((Ryutaro Shirakawa, Ryoiti Saito, Yoshiyuki Matsui, et al.)

上記はいずれも第 71 回日本癌学会学術総会 (2012/9/19-21, 札幌) にて発表された。