

## 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30万円

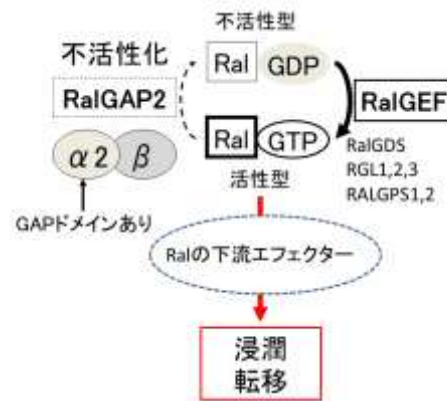
### [2] 研究経過

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の結合した不活性化型の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にはRalGAPを同定し、RalGAP1( $\alpha 1$ 活性サブユニットと調節 $\beta$ 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 $\beta$ 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前立腺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(平成24年度 課題27参照)。このことから前立腺癌の発癌進展においてもRalGAP $\alpha$ 2の発現が関与している可能性が示唆された。現在、tissue microarrayの症例数を増やし、再検討を予定している。浸潤性の強い前立腺癌細胞株PC3は他の前立腺癌細胞株(LNCaP, DU145)と比較して、RalGAP $\alpha$ 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(平成24年度 課題27参照)。そこで左心室内投与による骨転移モデルにおいて、浸潤性の強い前立腺癌細胞株PC3は他の前立腺癌細胞株(LNCaP, DU145)と比較して、RalGAP $\alpha$ 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(平成24年度 課題27参照)。そこで左心室内投与による骨転移モデルにおいて、RalGAP $\alpha$ 2のin vivoで機能を検討した。具体的には①PC3にRalGAP $\alpha$ 2を強制発現させた細胞、②PC3にRalGAP $\alpha$ 2のinactive mutant (N1742K)を導入した細胞、③PC3に空ベクターを導入した細胞を其々、免疫不全マウスに左心室投与した。結果はRalGAP $\alpha$ 2を強制発現させた群で骨転移が抑制された。(図1、図2) 前立腺癌においてRalGAP $\alpha$ 2はRal制御を介して骨転移巣形成を抑制すると考えられた。また今後前立腺癌自然発生モデルとして広く用いられているPtenのconditional KOマウスとRalGAP $\alpha$ 2のKOマウスを交配し、前立腺癌の発生や局所進展、転移能を評価する予定である。

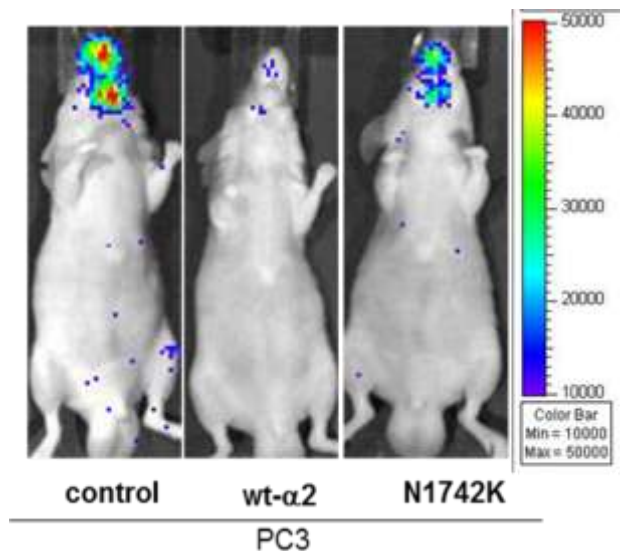


図1 PC3細胞を左心室投与されたマウス

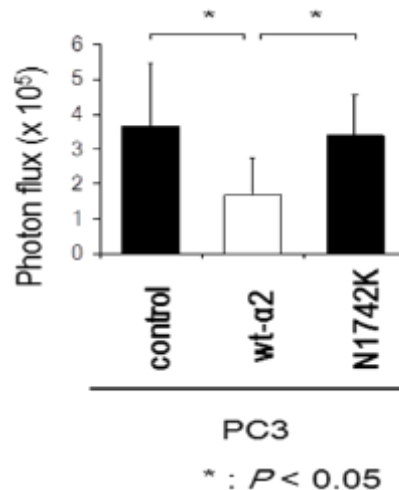


図2 転移部の発光強度

### (3-2) 波及効果と発展性など

我々はRalGAP $\alpha$ 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* 2013)が、RalGAP $\alpha$ 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がん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。

### [4] 成果資料

1. Saito R, Shirakawa R, Nishiyama H, Kobayashi T, Kawano M, Kanno T, Nishizawa K, Matsui Y, Ohbayashi T, Horiguchi M, Nakamura T, Ikeda T, Yamane K, Nakayama E, Nakamura E, Toda Y, Kimura T, Kita T, Ogawa O, Horiuchi H. Downregulation of Ral GTPase-activating protein promotes tumor invasion and metastasis of bladder cancer. *Oncogene*, 2013; 32(7): 894-902