

## 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：小林恭  
(京都大学大学院医学研究科)  
植垣正幸  
(京都大学大学院医学研究科)

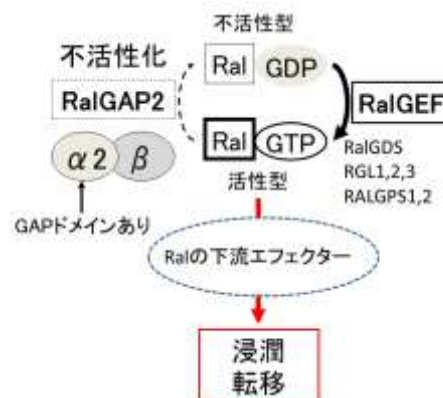
研究費：物件費18万円, 旅費12万円

### [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, 2013)が、本研究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、実験の進捗状況や方針の確認を行ってきた。共同研究者の植垣は東北大学加齢研基礎加齢研究教室に2015年10月20日から27日まで滞在し、堀内教授の実験指導を受けた。

### [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後に、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175例に増やして、RalGAP $\alpha$ 2の免疫染色を施行した。グリソンスコアと染色強度が相関について現在、解析中である。

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PC3細胞株の左心室内投与による骨転移モデルでは、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。(平成25年度 課題19参照)今年度は学堀内教授の実験指導下に、RalGAP $\alpha$ 2を強制発現させた前立腺癌細胞株PC3、DU145においてRal活性が低下し、RalGAP $\alpha$ 2をノックダウンした前立腺癌細胞株MDA Pca 2bにおいてRal活性が上昇することを確認した。またRalGAP $\alpha$ 2を強制発現させたDU145は細胞運動能が低下し、RalGAP $\alpha$ 2をノックダウンしたMDA Pca 2bは浸潤能が上昇することがわかった。

さらに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。現在PSACreERT2 hetero/PTEN flox homo/RalGAP $\alpha$ 2(KO or hetero or wild type)マウスを作出し、順次解析している。また、RalGAP $\alpha$ 2 KOで前立腺上皮以外の組織におけるRalGAP $\alpha$ 2欠失の影響で計画通りに実験が進まない場合にはRalGAP $\beta$ サブユニットの flox-cKOマウスを用いる。RalGAP共通のサブユニットであるRalGAP $\beta$ サブユニットをCre依存的にKOすることで、前立腺conditional にRalGAP活性を完全に消失させることができる。前立腺癌の発生や局所進展に特化して解析を行う予定である。

### (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。

### [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