

受賞者

生沼 泉

京都大学大学院生命科学研究科生体システム学分野

研究テーマ

**RasファミリーG蛋白質R-Rasによる細胞接着因子受容体の活性化分子機構の解明と
がんの浸潤・転移の阻止への応用**

1. はじめに

がん細胞の原発巣からの遊離、基底膜・血管への浸潤、遠隔臓器への転移はがん治療を困難とする最大の要因であり、これらに深く関連した細胞接着や運動の分子機構を解明し、その分子を標的とした治療法を確立することが必要である。低分子量 GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) Ras は代表的な原がん遺伝子産物であり、増殖因子の刺激による細胞の分化・増殖における中心的な役割を担っている。最近、これまであまりがん研究の対象とされていなかった、Ras ファミリー G 蛋白質、R-Ras の細胞接着や運動における機能が注目されている。R-Ras は乳がんや、子宮頸がん、前立腺がんなど、種々のがん細胞においてその過剰発現が見られ、その発現量はがん細胞の悪性度に強く相関がある。申請者は最近、R-Ras が細胞接着因子、インテグリンによって活性化され、細胞接着・運動を促進することを明らかにした (Oinuma et al., 2006)。これらの知見をもとに、がんの浸潤・転移の新たな標的因子の発見につながる、R-Ras による細胞接着・運動の分子機構を解明することが本研究の目的である。

2. 方法

申請者は既に、細胞が細胞外マトリックスに接着すると R-Ras が活性化されるということ、また、この接着刺激により活性化された R-Ras が逆に、細胞内から細胞接着因子、インテグリンを活性化構造にし、さらなる細胞接着・運動を促進するという正のフィードバック機構が存在することを明らかにした (Oinuma et al., 2006)。しかしながら、これらの分子機構はいまだ明らかではない。具体的には、以下の点を中心に、R-Ras による、細胞接着・運動の分子機構の解明、さらにはがん細胞の浸潤や転移など、病態との関連を解析する。

(1) R-Ras によるインテグリン活性化に関わる分子の解析

R-Ras がどのような分子を介してインテグリンを活性化構造にし、細胞接着・運動を促進するのかわかっていない。Rasファミリー低分子量G蛋白質は一般的に、RA (Ras association domain)を分子内に持つ蛋白質と相互作用することが知られている。そこで、私は、蛋白質のドメインサーチを行い、既知のR-Ras結合RAドメインにhomologyを持つ蛋白質について、逐一R-Rasとの結合について検証し、そのうち結合したものについて、内在性蛋白質の発現を抑制するためにshRNAを作成し、さらにそのshRNAを恒常的に発現する繊維芽細胞株を作成した。それらのノックダウン細胞において、R-Rasが引き起こすインテグリン活性化が阻害されるかを指標に、ターゲット分子を探索した。

(2) 受容体の変異による R-Ras を介した発がんの分子機構の解析

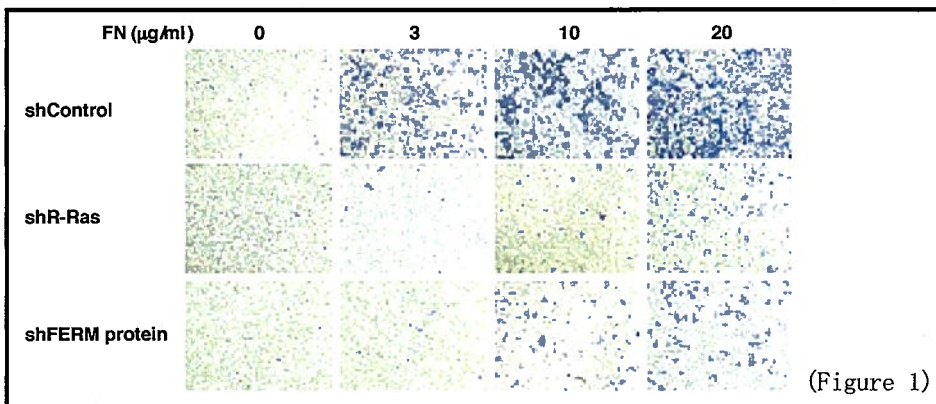
R-Rasは、全身の幅広い組織で、広範な時期において発現しており、細胞運動や増殖、血管新生を制御している。一方、反発性ガイダンス因子Semaphorin (Sema)ファミリーは、その特異的な細胞膜1回貫通型受容体 Plexin を介して細胞運動や血管新生の阻害を引き起こす因子である。申請者は、Plexinの細胞内領域がR-Rasに対する活性抑制因子、GAPとして働くことでR-Rasの活性を負に制御することを見いだした(Oinuma et al., 2004)。悪性度の高いがん細胞ではPlexinの細胞内領域に点変異が生じていることが知られており、申請者は既にこれらの変異がPlexinの細胞内領域のGAP構造の内部である知見を得ている。このことから、悪性度の高いがん細胞における各変異体PlexinのR-Ras GAP活性を生化学的に検証し、変異したPlexinがR-Rasに対するGAPとして機能することができないことが、細胞の過剰な運動や増殖を引き起こし、悪性化につながるのかどうかを種々の生化学的手法を用いて検討した。

3. 結果

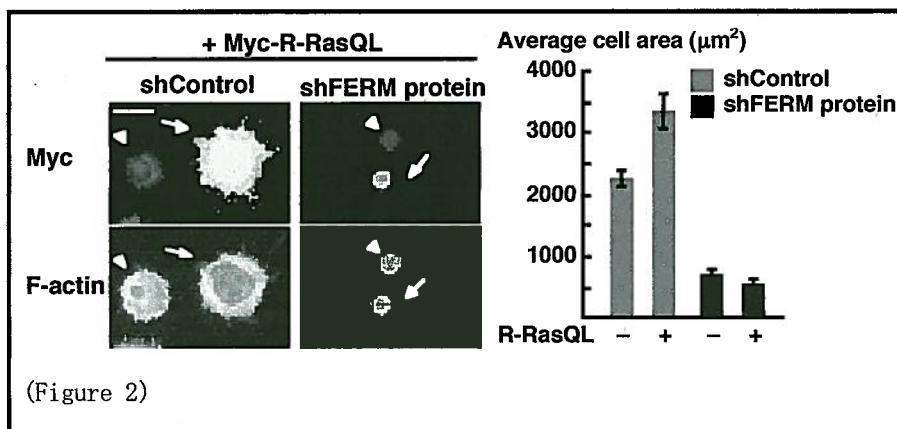
(1) R-Ras によるインテグリン活性化に関わる分子の解析

Rasファミリー低分子量G蛋白質は一般的に、RA (Ras association domain)を分子内に持つ蛋白質と相互作用することが知られている。そこで、私は、蛋白質ドメインサーチを行い、既知のR-Ras結合蛋白質のRAドメインにhomologyを持つ蛋白質について逐一R-Rasとの結合について検証したところ、あ

る種の FERM (protein4.1-ezrin-radixin-moesin) ドメインが RA ドメインに相同性を持ち、さらに、強制発現の系における免疫沈降実験において、活性型のR-Rasと相互作用することを見いだした。さらに、この FERM ドメイン保有蛋白質に対する shRNA を作成し、さらにそれを安定的に発現する繊維芽細胞(Swiss 3T3)株を樹立し、インテグリンリガンドであるファイブロネクチン(FN)刺激依存的な細胞運動を観察したところ、shRNA安定発現細胞はFN刺激に応答した細胞運動に著しい機能障害があることがわかった (Figure 1; shFERM protein)。



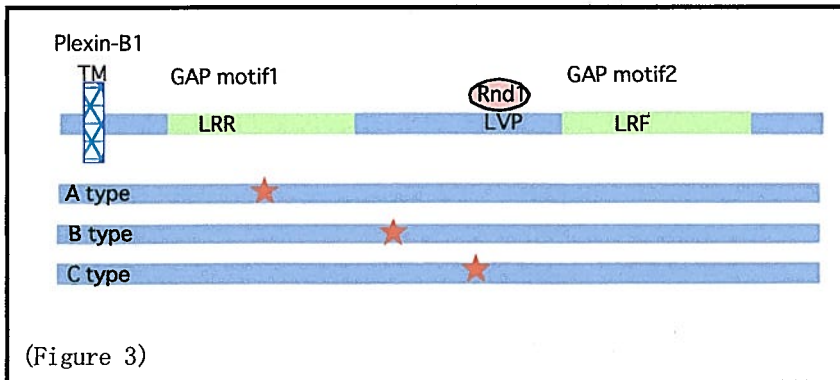
また、R-Rasとの関係を検討するために、活性型 R-Ras によって促進される細胞の接着・伸展が、この FERM 蛋白を介したものであるかを検討した。活性型 R-Ras により細胞の伸展が起こるが、それがこの FERM 蛋白のノックダウンにより阻害されていることがわかった (Figure 2)。



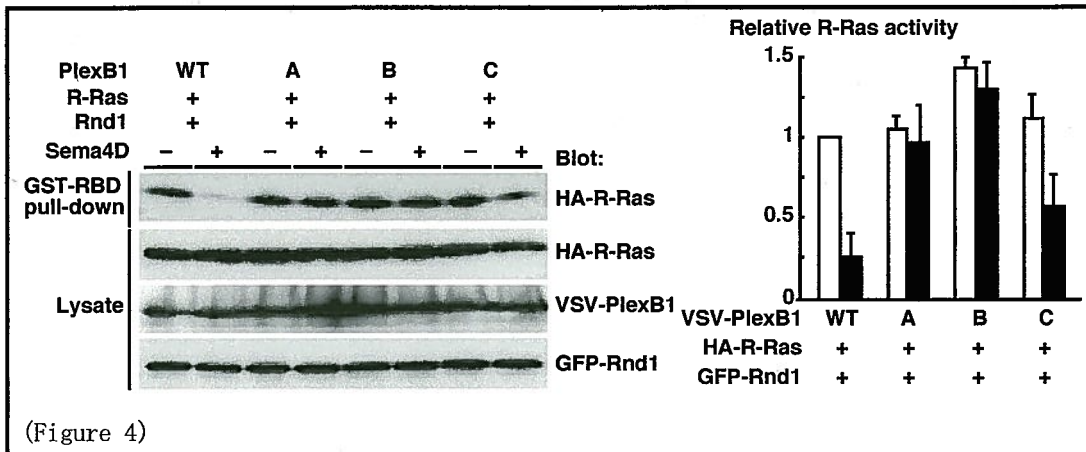
(2) 受容体の変異による R-Ras を介した発がんの分子機構の解析

この研究はがん臨床の専門家グループとの共同研究を行い、基礎から臨床までをカバーしたものを目指し行った。骨転移を起こすような転移能の高い前立腺癌に罹患している患者からの術後組織のパラフィンブロックを用い、Plexin-B1 の遺伝子変異について検討したところ、Plexin-B1の細胞内領域

の、R-Ras不活性化に必要なドメインに変異が入っているケースが多く見つかった (Figure 3)。



そこで、それら変異 Plexin が実際に R-Ras GAP 活性をもつかどうか検討したところ、いずれの変異体も R-Ras GAP 活性を持たなかった (Figure 4)。



また、これらの変異体 Plexin-B1 を発現している細胞は野生型 Plexin-B1 を発現している細胞と比較して、リガンドである Sema4Dによる細胞運動の抑制がかからなくなっていることがわかった。

4. 考察

Ras ファミリーの中でも、R-Ras は細胞接着や細胞膜伸展に必要な細胞接着因子受容体、インテグリンを活性化することが知られている。インテグリンを介した細胞接着は細胞の最も基本的な機能の一つであり、がん細胞の原発巣からの遊離、基底膜・血管への浸潤、遠隔臓器への転移のメカニズムを明らかにする上で、それらの機能に重要な関わりをもつ細胞接着や運動の仕組みを解明することが必要である。細胞が細胞外マトリックスに接着すると R-Ras が活性化されるということ、また、この接着刺激により活性化されたR-Ras が逆に、細胞内から細胞接着因子、インテグリンを活性化構造にし、さらなる細胞接着・運動を促進するという正のフィードバック機構が存在する。がん細胞に対し

て、この正のフィードバックループ上の1点を抑制することで、効率よくその運動性を抑制し、悪性度の高いがん細胞の浸潤・転移を効果的に阻止する、新たな創薬のターゲットの発見につながると考えられる。実際に今回の研究で、悪性度の高いがん細胞において、R-Ras を不活性化させる受容体、Plexin に変異が入っており、R-Ras を不活性化できなくなっていることがわかった。今後、発がんの分子機構の解明という観点からも、接着刺激によるR-Ras の活性化の分子機構や R-Ras によるインテグリン活性化の分子機構の解明に注目が集まる可能性が高い。本研究は、世界に先駆けてこれらの解明に取り組んだものである。

5. 発表論文、参考文献

(発表論文)

Oscar Gee-Wan Wong, Tharani Nitkunan, Izumi Oinuma, Chun Zhou, Veronique Blanc, Richard S. D. Brown, Simon R. J. Bott, Joseph Nariculam, Gary Box, Phillipa Munson, Jason Constantinou, Mark R. Feneley, Helmut Klocker, Suzanne A. Eccles, Manabu Negishi, Alex Freeman, John R. Masters, and Magali Williamson (2007) Plexin-B1 mutations in prostate cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 104:19040-19045.

(参考文献)

Izumi Oinuma, Hironori Katoh, and Manabu Negishi (2006) Semaphorin 4D/Plexin-B1-mediated R-Ras GAP activity inhibits cell migration by regulating b1 integrin activity. **J. Cell Biol.** 173:601-613.

Izumi Oinuma, Yukio Ishikawa, Hironori Katoh, and Manabu Negishi (2004) The semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. **Science** 305:862-865.