

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460421

研究課題名(和文) RhoGDI2の大腸癌転移機構への関与の検討

研究課題名(英文) Effect of RhoGDI2 expression on progression of colon cancer

研究代表者

及川 浩樹(Oikawa, Hiroki)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：50285582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：15例のリンパ節転移を有す大腸癌例に関してRhoGDI2の発現を免疫染色で検討すると、原発巣に比較し、リンパ節転移巣で有意にRhoGDI2の発現は低かった。RhoGDI2の発現が低い大腸癌細胞株HCT116でRhoGDI2を発現亢進させると、足場依存性の増殖、浸潤、足場非依存性の増殖は抑制された。RhoGDI2の発現亢進によりRac1の活性化、Pak1、Aktのリン酸化は抑制されており、 $\beta$ -cateninの量は減少していた。RhoGDI2の発現亢進で変化するmRNAをmicroarrayにより網羅的に解析すると、2倍以上増加した分子は517個、2倍以上低下した分子は135個であった。

研究成果の概要(英文)：Fifteen cases of colon cancers with lymph node metastases were immunohistochemically examined. Metastatic lesions in lymph nodes showed lower expression on RhoGDI2 compared with primary lesions. Stable overexpression of RhoGDI2 protein in HCT116 suppressed proliferation, invasion and anchorage-independent growth. Overexpression of RhoGDI2 induced the inhibition of Rac1 activity, phosphorylation of Pak1 and Akt, and decrease of  $\beta$ -catenin protein. Microarray analysis showed that overexpression of RhoGDI2 induced upregulation of 517 genes and downregulation of 135 genes by >2-fold, respectively. In these genes, expression of S100A14 displayed a >8-fold decrease and the decrease was verified by RT-PCR and immunoblot.

研究分野：人体病理、肝臓病理、腎臓病理、実験病理

キーワード：大腸癌の進展 RhoGDI2

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は腫瘍の進展が局所にとどまらずにリンパ節や他臓器に転移をおこしうることを特徴とする。この転移の成立は生命を危機的状況に陥れるため、その制御は生命維持において極めて重要である。転移は、①腫瘍細胞の原発巣における浸潤と脈管への侵襲、②腫瘍細胞の脈管内での生存、③転移先の臓器あるいはリンパ節における腫瘍細胞の脈管からの遊出、生着および増殖の各ステップが成立することにより生じる。

近年、発癌に関わることなく、転移に関わるステップを調節することにより転移を抑制する分子として metastasis suppressor protein の存在が提唱された。Metastasis suppressor protein として NM23、MKK4、KAI1、KISS 1、RhoGDI2 (RhoGDPase dissociation inhibitor 2) などいくつかの分子がその候補と考えられ、研究が進められているが、これらがすべての悪性腫瘍の転移を共通に調節しうるかは明らかでない。

RhoGDI2 は、膀胱癌でその発現低下が転移と相関し、その発現を亢進させると転移を抑制することがはじめて示された。それ以来、卵巣癌、乳癌、胃癌、Hodgkin lymphoma で RhoGDI2 の発現状態と転移の関連について検討されているが、その発現増加が転移を抑制するという報告と逆に発現低下が転移を抑制するという報告があり、一定の見解は得られていない。また、大腸癌においても2つ報告があるが、発現と予後あるいは転移に関しては、相反した結果で、詳細については解析されていない。

RhoGDI は、Rho-GDPase を制御する因子で、RhoGDI1、RhoGDI2、RhoGDI3 の3種が存在する。膀胱癌、卵巣癌、乳癌において RhoGDI2 は Rac1 と結合し、活性化状態を調節することにより、その下流の因子である JNK および p38 のリン酸化を変化させ、足場依存性の喪失に影響を与えることが検討されて

いるが、その他知られている Rac1 の下流因子 (PAK や WAVE 2 の活性化状態とアクチンフィラメントの状態や PI4P5 キナーゼを介した focal adhesion の形成状態) についての検討はなされていない。また、膀胱癌において RhoGDI2 の発現亢進が endothelin-1 (ET-1)、neuromedin U あるいは versican の発現を抑制し、これが転移を抑制する一因であることが報告されているが、これらの分子の発現がどのように制御されているかについても明らかではない。RhoGDI2 が制御する分子の詳細が分かれば、新たな治療戦略の開発に繋がる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では大腸癌の転移機構に RhoGDI2 が関わっているかを明らかにすると共に、RhoGDI2 が制御する分子機構を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) ヒト大腸癌原発巣とリンパ節転移巣における RhoGDI2 の発現の検討  
15例のヒト大腸癌例の組織標本に関して RhoGDI2 の免疫染色を行った。染色強度は-、1+、2+、3+の4段階で評価し、30%以上の腫瘍細胞が2+以上を示した時、陽性と判定した。加えて原発巣の連続切片で D2-40 の免疫染色を行い、リンパ管侵襲部での RhoGDI2 の発現も検討した。
- (2) 大腸癌細胞株5種での RhoGDI2 の発現の検討  
immunoblot および RT-PCR にて RhoGDI2 の発現を検討した。
- (3) RhoGDI2 の発現亢進における増殖能、浸潤能の検討  
RhoGDI2 の発現の低い HCT116 で RhoGDI2 を高発現する stable cell line を作製し、以下を検討した。control として mock vector から作製した stable cell line を使用した。
  - ① Cell-Titer Glo にて 72 時間後の増殖を検討した。
  - ② Matrigel invasion assay にて 24 時間後の浸潤を検討した。
  - ③ BrdU incorporation assay により増殖能を検討した。
- (4) RhoGDI2 の発現亢進における足場非依存性の増殖の検討  
HCT116 で RhoGDI2 の発現亢進を示す stable cell line を soft agar の上で培養し、21 日目で colony 数を検討した。
- (5) Rac1 の活性化の検討と下流分子の検討

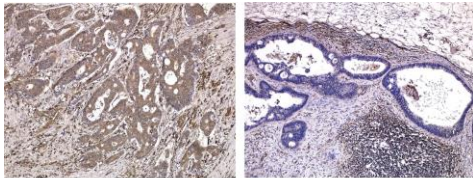
上記 stable cell line のタンパクを使って以下の検討を行った。

- ① pull down Rac1 GTPase activation assay により Rac1 の活性化の検討を行った。
- ② immunoblot により Rac1 の下流分子の検討を行った。
- (6) RhoGDI2 の発現亢進により変化する分子の網羅的検討  
上記 stable cell line を対象に microarray analysis (TORAY) で変化する mRNA を網羅的に検討した。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト大腸癌原発巣とリンパ節転移巣における RhoGDI2 の発現の検討

15 例の大腸癌例の原発巣とリンパ節転移巣に関して、RhoGDI2 の発現状態を免疫組織化学的に検討すると、原発巣は広い範囲で強い染色性を示すのに対して、リンパ節では染色性を認めないか、弱い染色性を認めた。



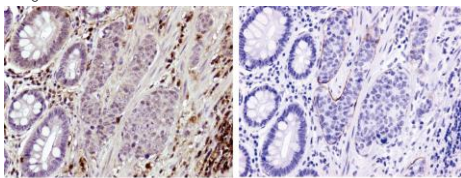
大腸 リンパ節  
大腸癌原発巣とリンパ節転移巣における RhoGDI2 の免疫染色像

30%以上の腫瘍細胞が 2+以上の染色強度を示す症例を陽性とする、大腸癌原発巣の多くは陽性であったが、リンパ節転移巣の多くは陰性でそれぞれの染色性には有意差を認めた。

大腸癌原発巣とリンパ節転移巣の RhoGDI2 発現の比較

	陽性	陰性	P-value
大腸	11/15 (73.3%)	4/15 (26.7%)	0.0034
リンパ節	3/15 (20%)	12/15 (80%)	

更に原発巣の連続切片で D2-40 の免疫染色をし、RhoGDI2 の発現を検討すると、リンパ管侵襲部では RhoGDI2 の発現は低い傾向にあった。



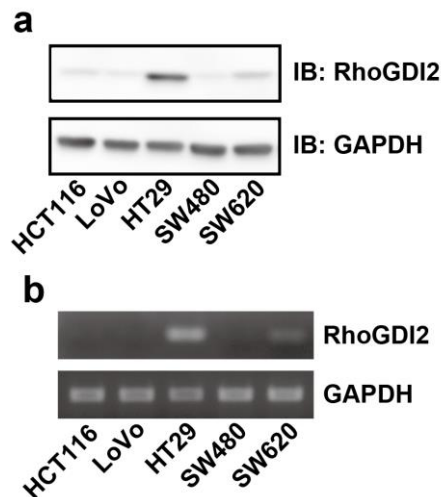
RhoGDI2 D2-40  
大腸癌原発巣のリンパ管侵襲部における RhoGDI2 の免疫染色像

以上から、大腸癌ではリンパ節転移において RhoGDI2 の発現が低下していることが示唆された。

(2) 大腸癌細胞株 5 種での RhoGDI2 の発現の検討

大腸癌細胞株 5 種で RhoGDI2 の発現を immunoblot および RT-PCR にて検討すると、HCT116、LoVo、SW480 で RhoGDI2 の発現が低

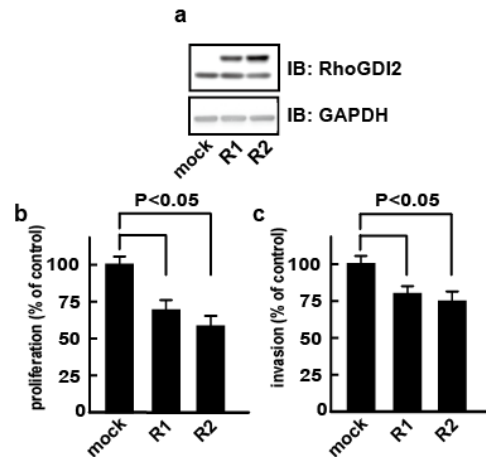
く、HT-29 で RhoGDI2 の発現が高いことを認めた。SW620 では中程度の発現を認めた。



大腸癌細胞株での RhoGDI2 の発現の検討  
a and b. 大腸癌細胞株 5 種で RhoGDI2 の発現を immunoblot および RT-PCR で検討した。

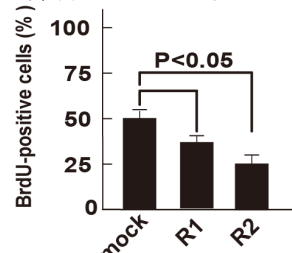
(3) RhoGDI2 の発現亢進における増殖能、浸潤能の検討

RhoGDI2 の発現亢進を示す HCT116 の stable cell line 2 種 (R1、R2) では control と比較し、増殖能、浸潤能は亢進していた。



RhoGDI2 発現亢進における増殖能、浸潤能の検討  
a. stable cell line (R1、R2) での RhoGDI2 の発現を immunoblot で検討した。b and c. RhoGDI2 の発現亢進を示す stable cell line で増殖能、浸潤能を検討した。

更に stable cell line で BrdU の取り込みを検討すると、RhoGDI2 の発現亢進により増殖が抑制されるのを認めた。

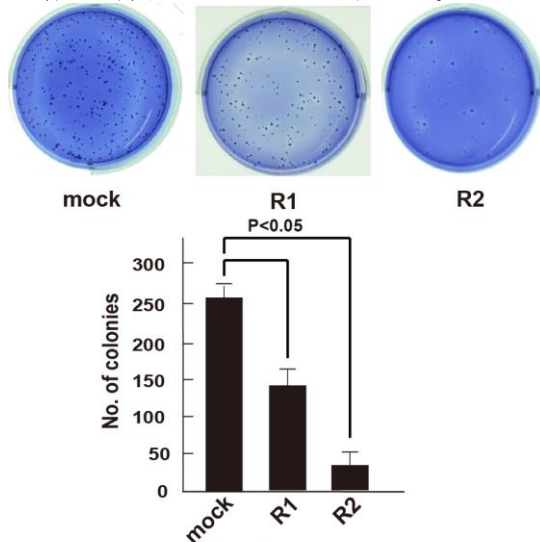


stable cell line における BrdU incorporation assay の検討

BrdU(10 $\mu$ M) を 2 時間反応させ、免疫染色を行った。

(4) RhoGDI2 の発現亢進における足場非依存性の増殖の検討

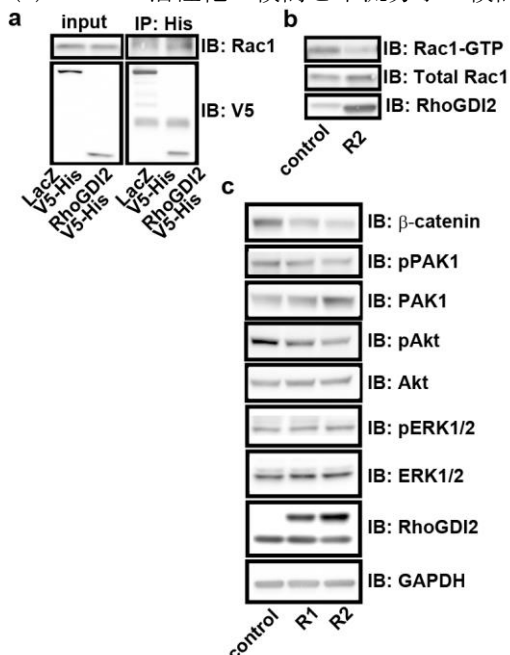
soft agar growth assay にて足場非依存性の増殖を stable cell line で検討した。その結果、RhoGDI2 の発現亢進を示す stable cell line ではコロニー数は少なく、足場非依存性の増殖は抑制されているのを認めた。



stable cell line における soft agar growth assay の検討

soft agar 上で培養し、21 間目でコロニー数をカウントした。

(5) Rac1 の活性化の検討と下流分子の検討



RhoGDI2 の発現亢進による Rac1 の活性化と下流分子の検討

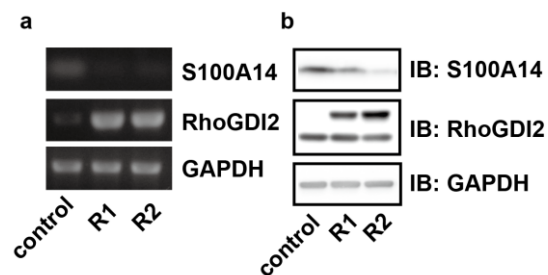
a. HCT116 に LacZ-V5-His vector あるいは RhoGDI2-V5-His vector をトランスフェクションし、His 抗体で免疫沈降し、RhoGDI2 と Rac の結合を検討した。b. stable cell line のタンパクを使って pull down Rac1 GTPase activation assay を行った。c. stable cell line で Rac1 活性化に関連した分子について immunoblot を行い、検討した。

Rac1 と RhoGDI2 が実際結合を示すか検討するため、HCT116 に LacZ-V5-His あるいは RhoGDI2-V5-His をトランスフェクションし、

His 抗体により免疫沈降し、検討すると、両分子の結合があるのを認めた。さらに stable cell line のタンパクを使って pull down Rac1 GTPase activation assay により Rac1 の活性化の検討を行った。その結果、RhoGDI2 の発現亢進により、Rac1 の活性化は抑制されることを認めた。更に Rac1 の下流分子である Pak1 のリン酸化と Akt のリン酸化が RhoGDI2 の発現亢進により、抑制されているのを認めた。更に  $\beta$ -catenin の細胞内量の減少も認めた。以上から、これらの分子の変化が上記の細胞機能変化を導いた可能性が示唆された。

(6) RhoGDI2 の発現亢進により変化する分子の網羅的検討

上記 stable cell line を対象に microarray (TORAY) で変化する mRNA を網羅的に解析すると、2 倍以上増加を認めた分子は 517 個で、2 倍以上低下した分子は 135 個であった。中でも 8 倍以上増加した分子は semaphorin-3A、angiopoietin-2、8 倍以上低下した分子は S100-A14 であったが、RT-PCR と immunoblot で S100A14 が変化することを認めた。



RhoGDI2 の発現亢進による S100A14 の発現変化の検討 a and b: RhoGDI2 の発現亢進に伴った S100A14 の発現変化を RT-PCR および immunoblot で検討した。

今後 S100A14 が大腸癌進展に関与するかを検討すると共に、他に変化する分子についても更に検討する予定である。

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 9 件)

1. Sugiyama I, Oikawa H, Masuda T, Sadzuka Y. Effect of liposomes with different double arms polyethyleneglycol on hepatic metastasis model mice and evaluation using a fluorescent imaging device. *Curr Drug Deliv. in press* (2016). doi:

- 10.2174/1567201813666160328113653.  
査読あり.
2. Okubo A, Yasuhira S, Shibazaki M, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (NQO1), protects melanin-producing cells from cytotoxicity of rhododendrol. *Pigment Cell Melanoma Res* 29 (2015) 306-16. doi: 10.1111/pcmr.12461. 査読あり.
  3. Kasai S, Arakawa N, Okubo A, Shigeeda W, Yasuhira S, Masuda T, Akasaka T, Shibazaki M, Maesawa C. NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase-1 Expression Sensitizes Malignant Melanoma Cells to the HSP90 Inhibitor 17-AAG. *PLoS One* 11 (2016) e0153181. doi:10.1371/journal.pone.0153181. 査読あり.
  4. Tatemichi Y, Shibazaki M, Yasuhira S, Kasai S, Tada H, Oikawa H, Suzuki Y, Takikawa Y, Masuda T, Maesawa C. Nucleus accumbens associated 1 is recruited within the promyelocytic leukemia nuclear body through SUMO modification. *Cancer Sci* 106 (2015) 848-56. doi: 10.1111/cas.12680. 査読あり.
  5. Hayashi K, Murai T, Oikawa H, Masuda T, Kimura K, Muehlich S, Prywes R, Morita T. A novel inhibitory mechanism of MRTF-A/B on the ICAM-1 gene expression in vascular endothelial cells. *Sci Rep* 5 (2015) e10627. doi: 10.1038/srep10627. 査読あり.
  6. Itoh T, Fusazaki T, Kimura T, Oikawa H, Sasou S, Ishikawa Y, Goto I, Komuro K, Nakajima S, Nakamura M, Morino Y. Clinical and pathological characteristics of homogeneous and nonhomogeneous tissue of in-stent restenosis visualized by optical coherence tomography. *Coron Artery Dis* 26 (2015) 201-11. doi: 10.1097/MCA.0000000000000225.
  7. Tsunoda K, Oikawa H, Maeda F, Takahashi K, Akasaka T. A case of cellular fibrous histiocytoma on the right elbow with repeated relapse within a short period. *Case Rep Dermatol* 22 (2015) 10-16. doi: 10.1159/000371790. 査読あり.
  8. Oikawa H, Maesawa C, Tatemichi Y, Nishinari Y, Nishiya M, Mizugai H, Ikeda A, Oikawa K, Takikawa Y, Masuda T. A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II on hepatic stellate cells. *Life Sci* 97 (2014) 137-44. doi: 10.1016/j.lfs.2013.12.028. 査読あり.
  9. Tsunoda k, Takahashi k, Maeda F, Oikawa H, Akasaka T. A case of atypical fibrous histiocytoma with positivity for CD163 and CD44. *Acta Derm Venereol* 93 (2013): 737-8. doi:10.2340/00015555-1563. 査読あり.  
[学会発表] (計 5 件)
    1. 及川浩樹, 及川寛太, 若杉優樹, 根岸駿, 水谷久太, 増田友之. afadin の肝細胞癌細胞機能への影響の検討. 第 105 回日本病理学会総会. 2016 年 5 月 12 日. 仙台市.
    2. 及川浩樹, 西谷匡央, 及川寛太, 水谷久太, 前沢千早, 増田友之. RhoGDI2 の発現変化による大腸癌進展の検討. 第 104 回日本病理学会総会. 2015 年 4 月 30 日. 名古屋市.
    3. 及川寛太, 及川純子, 及川慶一, 水谷久太, 西谷匡央, 阿保亜紀子, 及川浩樹, 佐藤孝, 前沢千早, 増田友之. 非アルコール性脂肪性肝疾患の病理組織学的な酸化ストレスマーカーの意義. 第 104 回日本病理学会総会. 2015 年 4 月 30 日. 名古屋市.

4. 及川 浩樹, 前沢 千早, 西谷 匡央,  
水谷 久太, 増田 友之. 肝星細胞にお  
ける angiotensin-EGFR transactivation  
の検討. 第 103 回日本病理学会総会.  
2014. 4 月. 広島市.

5. 及川 浩樹, 前沢 千早, 西成 悠, 増田  
友之. RhoGDI2 の大腸癌転移への関与.  
第 102 回日本病理学会総会. 2013. 6 月.  
札幌市.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

及川 浩樹 (Oikawa, Hiroki)  
岩手医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 50285582

### (2) 研究分担者

増田 友之 (Masuda, Tomoyuki)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 10199698

前沢 千早 (Maesawa, Chihaya)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 10326647

柴崎 晶彦 (Shibazaki, Akihiko)  
岩手医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 20445109

葛西 秋宅 (Kasai, Shyuya)  
東北大学・生命科学研究所・助教  
研究者番号 : 20609664

大塚 幸喜 (Otsuka, Koki)  
岩手医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 50316387

安平 進士 (Yasuhira, Shinji)  
岩手医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 90311729