

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		肺がん細胞の増殖・薬剤耐性における Ror1-Rif 経路の役割と HGF-Met 系との相互作用
研究代表者	所属・職名・氏名	神戸大学大学院医学研究科・准教授・西田満
研究分担者	所属・職名・氏名	神戸大学大学院医学研究科・教授・南康博
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	肺がんは日本における死亡者数および死亡率の最も高いがんであり、中でも肺腺がんは肺がんの60%程度を占める。受容体型チロシンキナーゼ Ror1 はヒト肺腺がんにおいて高発現し、がん細胞の生存や増殖を促進するだけでなく、分子標的薬に対する獲得耐性にも関与することが示唆されている。しかしながら、その分子基盤についてはほとんど解明されていない。 我々は、ヒト子宮がん細胞株 HeLa を用いて、Ror1 が Rho ファミリー低分子量 G タンパク質である Rif を介して糸状突起形成を誘導することを見出している。本研究では、Ror1-Rif 経路による肺腺がん細胞の増殖制御機構の解明を目的とした。	
【研究内容・成果】	本研究では Ror1 と Rif を高発現しており、上皮成長因子受容体遺伝子 (<i>EGFR</i>) に活性型変異を有するヒト肺腺がん細胞株 PC-9 を用いて解析を行った。まず、Ror1 と Rif の糸状突起形成への関与について検討するため、<i>Ror1</i> と <i>Rif</i> をそれぞれノックダウン (KD) し、1 μm 以上の長さの糸状突起の数を計測した。その結果、コントロール細胞に比べ、<i>Ror1</i> KD 細胞と <i>Rif</i> KD 細胞では糸状突起の数が顕著に減少した。さらに、糸状突起形成に関与する別の低分子量 G タンパク質 Cdc42 やアクチン核化因子 mDia2 の KD によっても同様に糸状突起の数が減少した。次に、Rif が Ror1 の下流で機能している可能性を検討するため、<i>Rif</i> KD 細胞における Ror1-GFP 過剰発現の影響を検討した。その結果、Ror1-GFP の過剰発現によって促進される糸状突起形成は、<i>Ror1</i> KD によって抑制されなかった。したがって、PC-9 細胞においては、Ror1 は Rif 非依存的に糸状突起形成を誘導することが示唆された。 次に、<i>Ror1</i>、<i>Rif</i> の KD が PC-9 細胞の増殖に及ぼす影響を解析した。その結果、<i>Ror1</i> KD、<i>Rif</i> KD どちらも細胞増殖を有意に抑制した。また、<i>Cdc42</i> KD も同様に細胞増殖を抑制したが、<i>mDia2</i> KD についてはコントロールと比べ増殖率に有意差は認められなかった。前述のように、<i>mDia2</i> KD は糸状突起形成はを阻害することから、PC-9 細胞の増殖には糸状突起は必要ではないと考えられる。さらに、<i>Ror1</i> や <i>Rif</i> が浸潤に関与する可能性について検討するため、matrigel invasion assay を行った。その結果、<i>Ror1</i> KD、<i>Rif</i> KD どちらも浸潤能を有意に抑制することが明らかになった。 以上の結果から、Ror1 や Rif は PC-9 細胞の糸状突起形成、増殖、浸潤をそれぞれ促進していることが示された。Ror1 や Rif による細胞機能制御の分子基盤を明らかにするため、細胞内シグナル伝達経路について解析を行ったが、EGFR やその下流シグナル因子である Ras, Raf, Rac, Cdc42, Erk, Akt の活性は、<i>Ror1</i> や <i>Rif</i> の KD によってほとんど影響を受けなかった。そこで、<i>Ror1</i> KD によって変動する細胞内代謝産物を同定するため、メタボローム解析を行った。その結果、<i>Ror1</i> KD によって細胞内のポリアミン（プロリン、スベリミジン）含量が減少することを見出した。ポリアミンはすべての生物に存在し、DNA 合成や遺伝子発現などを制御することによって細胞の増殖や分化などに必須な役割を担っている。一般に、がん細胞ではポリアミンの生合成や細胞外からの取り込みが亢進しており、がん細胞におけるポリアミン濃度の上昇は、増殖・浸潤といったがんの悪性進展に関与していると考えられている。現在、Ror1/Rif がポリアミンの代謝や取り込みを調節することで、肺腺がん細胞の悪性進展に関与している可能性について検討している。	
【成果等】	【主な論文発表】 - Endo, M., <u>Nishita, M.</u>, Fujii, M., and Minami, Y. Insight into the role of wnt5a-induced signaling in normal and cancer cells. <i>Int. Rev. Cell Mol. Biol.</i> 314: 117-148, 2015. <u>Nishita, M.</u>, Qiao, S., Miyamoto, M., Okinaka, Y., Yamada, M., Hashimoto, R., Iijima, K., Otani, H., Hartmann, C., Nishinakamura, R., and Minami, Y. Role of Wnt5a-Ror2 signaling in morphogenesis of the metanephric mesenchyme during ureteric budding. <i>Mol. Cell. Biol.</i> 34:3096-3105, 2014. 【学会発表】 <u>Nishita, M.</u>, Role of Wnt5a-Ror2 signaling in tumor invasion. University of Washington and Kobe University International Joint Symposium. Kobe, 2014 【その他特筆事項】 なし	