

3. 低分子量 G 蛋白質 Rho と転移・浸潤

成宮 周*

転移・浸潤はがんの転帰を決定する最も大きな因子である。細胞はがん化に伴い増殖コントロールの異常とともに細胞間接着能を消失し、運動性を亢進する。がん細胞のこの生物学的特徴が、がんの原発巣よりの離脱を惹起し浸潤・転移を起こす。このことは増殖と運動の情報伝達経路が細胞内で密接にリンクしていることを意味する。このリンクとして働いているのが Rho である。Rho は細胞の細胞外基質や血管内皮への接着を制御している分子で、細胞はこの接着を支点にしてアクチン細胞骨格を制御して組織内を遊走、細胞間隙を通り抜ける。Rho は生理状態では刺激依存性に働くが、Ras による悪性化細胞では強く活性化され、細胞の悪性化に寄与する。Rho は活性化体の GTP 結合型が下流のエフェクター分子に働いてその作用を発揮する。このエフェクターの一つが Rho 結合キナーゼ(ROCK)であり、myosin や Na⁺/H⁺交換体、LIM キナーゼ コフィリン系に働き、アクトミオシン系の形成とこれを介した収縮に働く。Rho 経路のがんの転移・浸潤への関与は、まず *in vitro* の浸潤モデル系で Rho の不活化酵素 C3 を用いて示唆されたが、ついで ROCK の特異的阻害薬 Y-27632 が *in vitro* のみならず数種の *in vivo* のモデル系で転移・浸潤を有意に抑制することが示された。また、転移・浸潤の帰趨を決定する血管内皮や腹膜中皮などの細胞層の通り抜けにおいて、ROCK はがん細胞の接着、運動を亢進するだけでなく、ホストの細胞層のタイトジャンクションを開いて、転移・浸潤に寄与する可能性も報告されている。さらに臨床例や高転移性がん細胞株で、Rho の一つ RhoC が選択的に高発現していることも報告されている。以上の所見は臨床がんの転移抑制の標的として Rho-ROCK 経路の重要性を示唆するものである。

Small GTPase Rho in tumor metastasis and invasion

SHUH NARUMIYA Department of Pharmacology, Kyoto University Faculty of Medicine



*なるみや・しゅう：京都大学大学院医学研究科神経・細胞薬理学教授。昭和54年京都大学大学院医学研究科卒業。昭和61年京都大学医学部第1薬理学助手。昭和63年同助教授。平成4年現職。主研究領域/薬理学、生化学、細胞生物学 (Rho の機能、生理的意義と情報伝達、プロスタノイド受容体の病的意義)。

Key words

Rho 蛋白質
細胞接着
細胞移動
転移浸潤

1. 低分子量 G 蛋白質 Rho の作用と情報伝達

Rho は Ras 類似の低分子量 G 蛋白質の一つで、不活性の GDP 結合型と活性化型の GTP 結合型の間を往復して細胞反応の分子スイッチとして働く。その作用は細胞基質間接着、細胞移動、神経突起の退縮、細胞質分裂、細胞周期の G₁ S 期進行などさまざまである。この一見多彩な作用の多くは、アクチン細胞骨格の時間空間特異的な再編成によって発揮されている。たとえば細胞基質間接着は、間期線維芽細胞では細胞接着斑とストレスファイバーの形成としてみられるが、ストレスファイバーは接着斑にアンカーするアクトミオシン線維の束であり、Rho はこれら構造の形成にあずかる。またストレスファイバーは分裂期で消失するが、Rho は分裂期では分裂面にアクトミオシン束よりなる収縮環を形成して細胞質分裂を開始、遂行する。すなわち Rho は細胞周期に応じて異なった場所では特異的なアクチン細胞骨格を誘導する。

このような Rho の機能は、活性型 Rho が下流のエフェクター分子に働くことにより発揮される。主なエフェクター分子は、蛋白質リン酸化酵素 ROCK (Rho 結合キナーゼ) とアダプター分子 mDia である (図 1, A)。ROCK は、N 端にキナーゼドメインを、中央にコイルド・コイル形成領域を、C 端に膜結合ドメインを持つ分子量 160 K のセリン・スレオニンリン酸化酵素である。この酵素の働きは種々の変異体や ROCK 特異的阻害薬 Y-27632 を用いて解析され、いくつかの経路でアクチン骨格を制御することがわかった¹⁾。一つはミオシン脱リン酸化酵素の不活化およびミオシン軽鎖に対する直接リン酸化で、ミオシンを活性化しアクトミオシンの収縮力を惹起する。また、一つは LIM キナーゼの活性化で、

活性化された LIM キナーゼは、ついでアクチン結合蛋白質コフィリンをリン酸化し不活化する。これによりコフィリンのアクチン脱重合活性は抑制され、繊維化アクチンの増加が惹起される。また、一つは 1 型 Na⁺/H⁺ 交換体に対する作用で、ROCK はこれをリン酸化し活性化する。この活性化は交換体と ERM 蛋白質の結合を誘導し、これがアクチンの細胞膜への結合に寄与するものと考えられている。このような ROCK の作用は、相まって細胞膜に結合したアクトミオシン束の形成を引き起こすものと考えられる (図 1 B)。

一方、mDia は細胞の極性に関する Formin 蛋白質の一つで、N 端の Rho 結合領域に加え、Formin 蛋白質群で保存度の高い FH 1, FH 2, FH 3 という領域を持つ (図 1 A)。このうち FH 1 は poly-proline 配列に富み、これを介してアクチン結合蛋白質プロフィリンを結合する。これにより繊維化アクチンの増加を引き起こす。また、FH 2 領域は微小管の配向に関与する。これらの結果から、mDia は細胞内の微小管とアクチン骨格の二つを統合し、これにより細胞内でのアクチン束の Rho 依存性の配列を決定するものと考えられる²⁾ (図 1 B)。

2. 細胞の接着・移動と Rho ファミリー G 蛋白質

細胞の移動は進行方向への糸状突起 (フィロポディア) 膜状突起 (ラメリポディア) の進展と先端部での細胞外基質への接着、これを支点にしての胞体の牽引と尾部の脱離が繰り返されて行われる。これらの運動はアクチン骨格の時空間的編成によって行われている。フィロポディア、ラメリポディアはいずれもアクチンよりなる構造であるし、牽引はアクトミオシンの収縮力で行われる。Rho は、このうち牽引の過程に働いている。この牽引は、

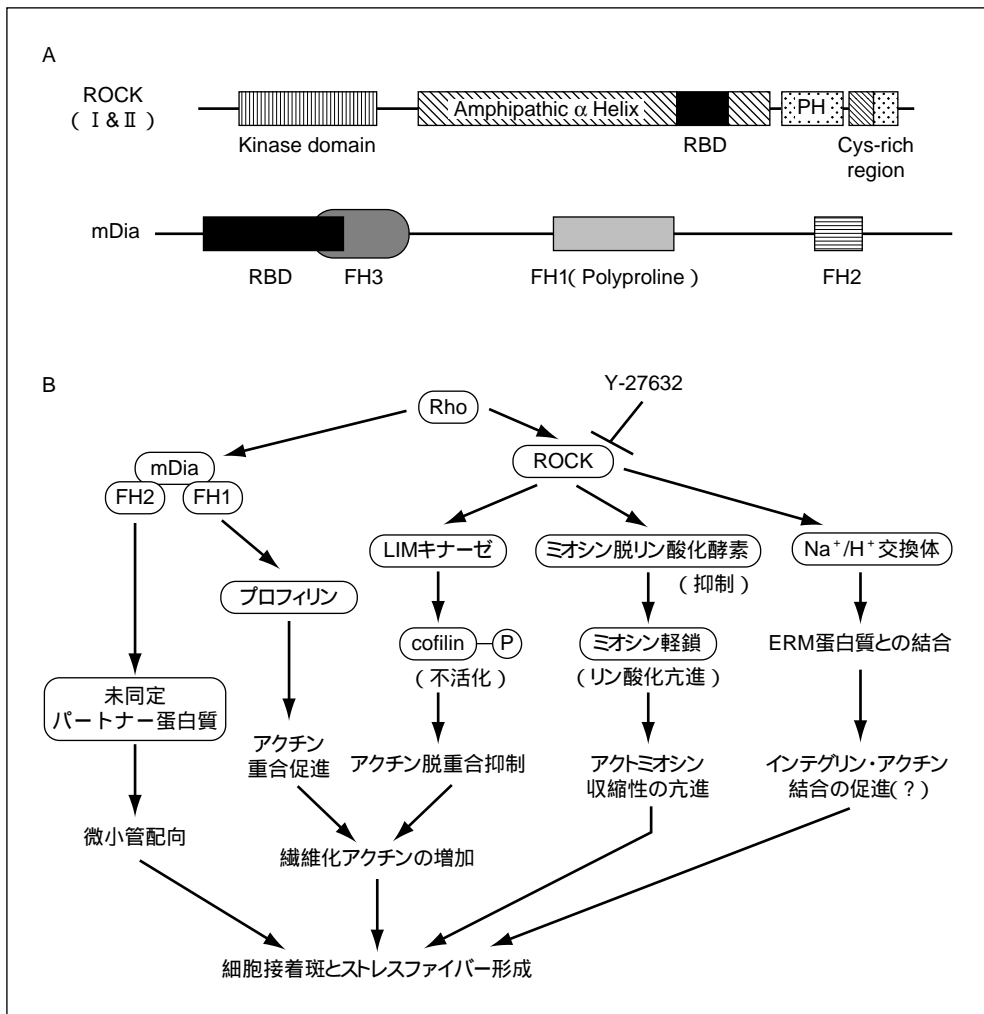


図1 Rho エフェクター，ROCK と mDia，の構造(A)とストレスファイバー形成に至る情報伝達経路(B)

無刺激の細胞でランダムに細胞を横切って存在していたストレスファイバーと同様の構造が，移動細胞では前後方向に配列して発揮されると解されている．このことは移動細胞において前後軸という極性を決める機構が存在することを示唆するが，これまでの研究からこの極性の形成には微小管が重要であることが明らかになっている．いくつかの実験から，前項で述べた mDia による微小管の配向決定は，この場で働いていることが示唆されてい

る．おそらく細胞の進展縁で活性化された mDia は微小管を前後方向に配向し，それに沿ったようにアクトミオシン束を配列するものと思われる．Y-27632 で移動細胞を処理すると一定方向への移動が制御されることから，前後方向に配列したアクトミオシンは ROCK 依存性に収縮力を発揮して細胞移動に働くものと考えられる．このような Rho の働きに加え，フィロポディアとラメリポディアが各々 Cdc42 と Rac の活性化によって誘導

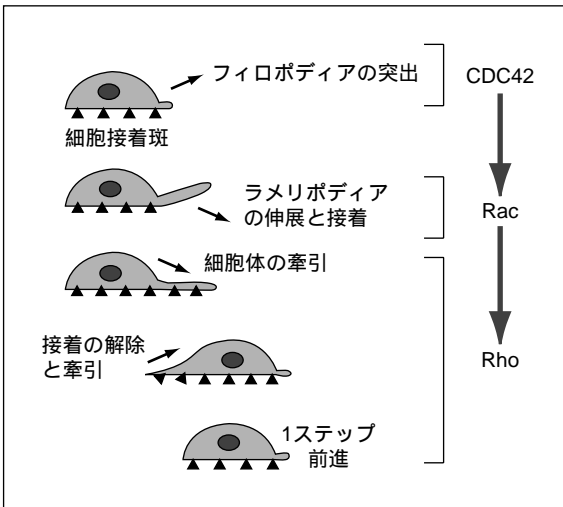


図2 細胞移動の模式図と各ステップでの Rho ファミリー蛋白質の関与

されることから、細胞移動は Rho ファミリー G 蛋白質が順番に活性化されて進行すると考えられている(図2)。このように細胞の移動では、Rho ファミリーの各々の蛋白が空間特異的に段階を追って活性化されることが必要で、一つの蛋白だけの強い活性化は移動についてはマイナスに働くとされる。たとえば細胞移動の解析に頻用される単層培養を用いた *in vitro* の wound healing assay では、Rho の過度の活性化も完全な不活化もどちらも細胞の移動を阻害することが示されている。

3. Rho とがんの転移・浸潤

1) *in vitro* の解析

がん細胞は原発巣からの離脱、基底膜の破壊、組織内遊走と組織外(血管、リンパ管、胸腹腔)への脱出、そして標的臓器の宿主細胞バリアーへの接着と通り抜けにより、転移浸潤をおこす。この中で血管やリンパ管の内皮、胸腹膜の中皮細胞などの宿主細胞バリアーへの接着と通り抜けは転移に特徴的で、またその成立に決定的なステップである。この過程

は、単層培養した宿主細胞上にがん細胞を添加し、細胞層下の侵入を観察することで *in vitro* で再現できる。このような *in vitro* の実験系を用いて、Rho ファミリーの G 蛋白質ががん浸潤に重要であることが示された。オランダの Collard らは、これを用いて Rac の活性化因子である TIAM-1 が浸潤促進をおこすことを示した³⁾、明渡らは、Rho がここで必須の役割を果たすことを明らかにした⁴⁾。明渡らの実験系は、宿主細胞層に腹膜中皮細胞を、がん細胞に MM 1 肝がん細胞を用いたもので、彼らはこれを用いて MM 1 細胞の浸潤には血清中のリゾホスファチジン酸(LPA)が必要なことを見だし、ついで LPA が Rho の強い活性化刺激であることから Rho の関与を疑い、C₃ 酵素を用いてこれを明らかにした。さらにこの実験系を用いて、この過程での Rho エフェクターの関与も解析され Rho の下流で ROCK が、また ROCK の下流で Na⁺/H⁺ 交換体が関与していることが、特異的阻害薬 Y-27632 とアミロライドを用いて確かめられた。この結果は LPA から Rho、ROCK を介する経路が細胞層の通り抜けに重要な役割を果たすことを示唆するものであった。

2) 臨床がん と *in vivo* 転移モデルにおける Rho 遺伝子発現の検討

上述の *in vitro* の研究に鑑みて、臨床がんにおける Rho 遺伝子発現が転移との関連で調べられている。Suwa らは、33 の膵管がん症例においてがん組織、転移巣における RhoA、B、C の遺伝子の発現を正常膵組織と比較し、がん組織では RhoC の発現が有為に高いこと、また転移巣では原発巣に比べて発現が強く、転移浸潤を示すがんはそうでないものに対して高発現であること、RhoC の発現が高いものは低い群に比べ予後が悪いことを報告している⁵⁾(図3)。この Suwa らの結論は、実験動物を用いた包括的なゲノム解析によっても裏付けられた。Clark らは、ヌードマウスに

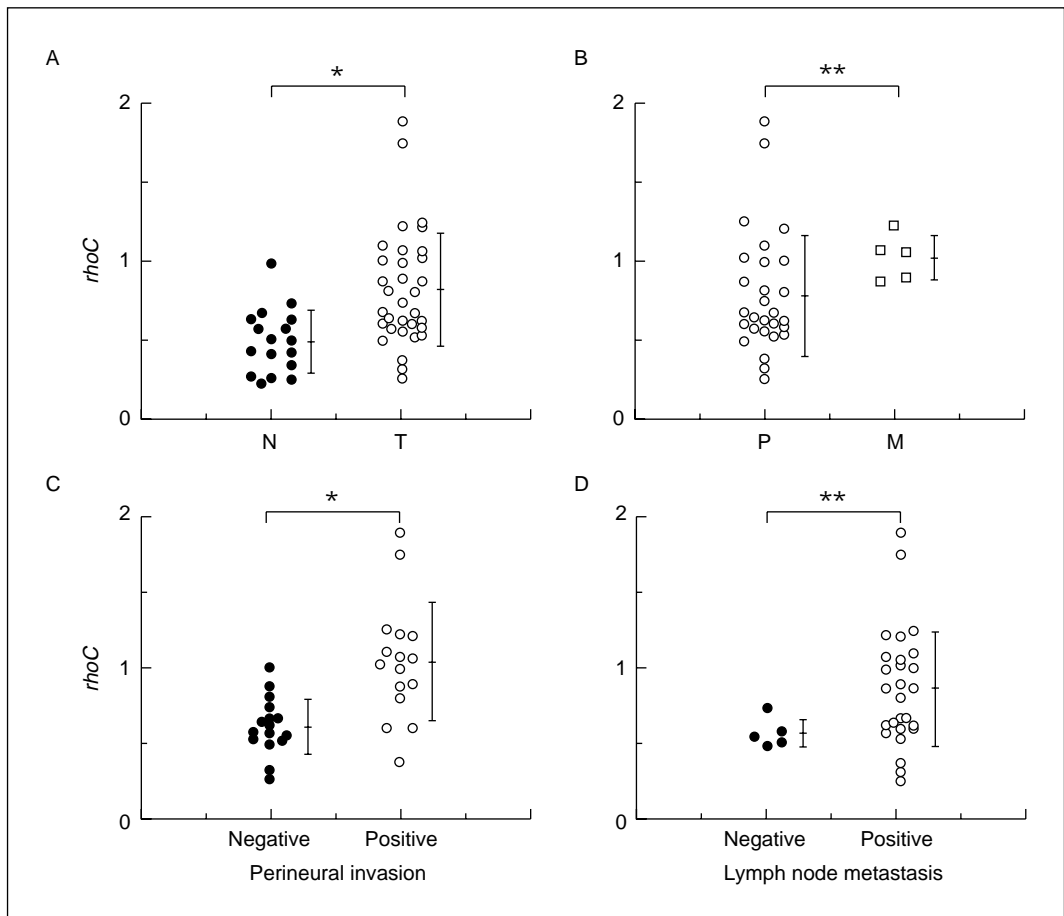


図3 膵管がんにおける RhoC 遺伝子発現の亢進

A: 腫瘍(T)と正常組織(N), B: 原発巣(P)と転移巣(M), C: 神経組織への浸潤の有無, およびD: リンパ節への転移の有無の各々で RhoC の発現を定量的 RT-PCR 法で比較した (文献5より)

*: $p < 0.001$, **: $p < 0.05$

ヒトやマウスのメラノーマ細胞を移植し, これにより生じた肺転移巣から細胞を回収, これを *in vitro* で培養するという操作を繰り返すことにより, 原株に比べて強い転移能をもつ亜株を樹立した. ついでこれと元株の細胞の間で microarray 解析を行い, 転移能強化に伴う遺伝子発現を検索した⁶⁾. その結果, 高転移株でフィブロネクチンやコラーゲンなどの細胞外基質蛋白質に加えて, RhoC の高い発現が認められた. また彼らは RhoC を低

転移性細胞にトランスフェクトしたところ, RhoC発現は転移能を誘導したと報告している.

さて, 特異的 ROCK 阻害薬 Y-27632 の発見により, Rho-ROCK 経路の転移浸潤での役割を *in vivo* の個体レベルで解析することが可能になった. これまで3つのモデル系でその効果が検討されている. Itoh らは, ラット肝がん MMI 細胞を syngenetic 系ラットの腹腔内へ注入する腹膜播種モデルを用い Y-27632 の効果を検討した⁷⁾. この実験では, 腫瘍細胞

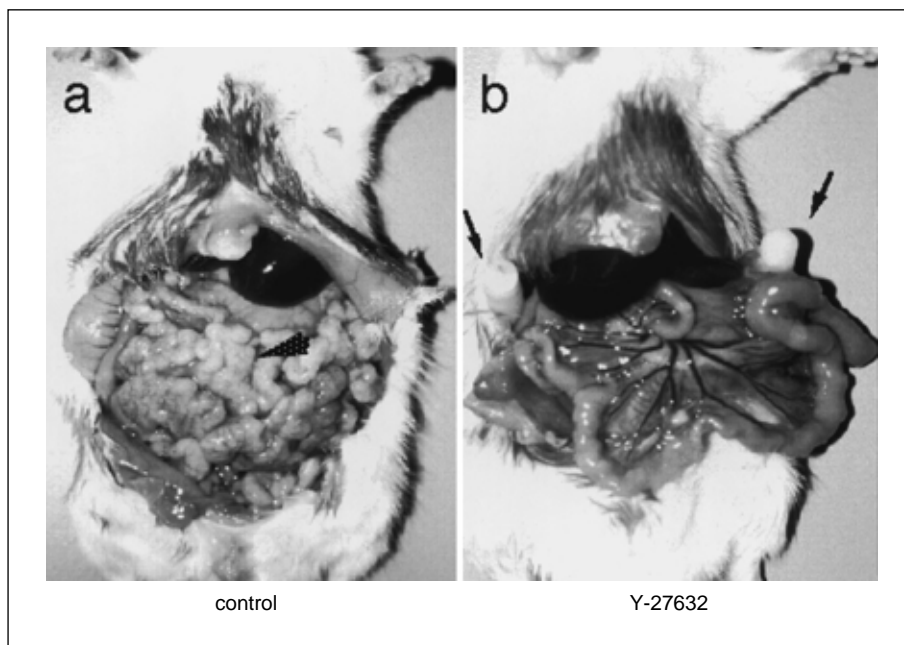


図4 ラット肝がん細胞の腹膜播種モデルでの ROCK 阻害薬 Y-27632 の作用
 Y-27632 はミニ浸透圧ポンプで持続投与を行った。投与ラット (b) では対照ラット (a) に比し腫瘍の播種，腫瘍形成が強く抑制されている (文献 7 より)

注入後 11 日後に腹膜への広範な播種と腫瘍形成，腹水貯留がみられる。このとき Y-27632 の持続注入は腹水の発現，貯留量の減少とともに腹膜播種・腫瘍形成も有意に減少した (図 4)。また Takamura らは，ヒト肝がん細胞を SCID マウス肝の漿膜下に注入する肝内転移モデルにより Y-27632 の効果を検討した⁸⁾。この系は 6~7 週の間肝各葉に腫瘍塞栓や転移巣を形成することから，肝内転移のモデルと考えられる。このとき，Y-27632 の腹腔内への持続注入をすると肝内転移の発生頻度は減少し，注入場所における腫瘍細胞の肝類洞への浸潤も抑制された。さらに Hanaki らは，膵がん細胞をマウス脾内へ注入し，肝への転移をみるという膵がんの肝転移モデルにおいても Y-27632 の有効性を見いだしている。このときには薬物の経口投与でも効果が認められたという (花木，有井，今村，

未発表)。これらの結果は，*in vivo* の転移・浸潤過程における Rho-ROCK 経路の重要性和 Y-27632 の有効性を示唆する所見といえよう。

3) Rho-ROCK 経路とバリアー機能

さて，がんの宿主細胞層通り抜けには二つの要素がある。一つはがん細胞の接着能と運動性であり，他は宿主細胞層のバリアー機能である。前者における Rho-ROCK 経路の重要性は述べてきた通りであるが，後者でもこの経路が大きな働きをしていることが最近明らかになった。これらの細胞は細胞間結合によって外部からの分子の通過を防いでいるが，このようなバリアー機能を担うのがタイトジャンクションである。タイトジャンクションは炎症刺激で leaky になることが知られ，何らかの制御機構があると想定されていた。最近 Hirase らは，刺激に伴うタイトジャンクションの開放機構に Rho-ROCK 経路が

関与していることを明らかにした⁹⁾。彼らによると、LPA 刺激により Rho-ROCK 経路が活性化され、ROCK はタイトジャンクションの構成分子の一つであるオクルージンのリン酸化を行い、これによりジャンクションの開放を行うという。これまでのところ、がん細胞浸潤における Rho-ROCK が寄与するタイトジャンクション機能の変化をみた研究はないが、がん細胞の宿主細胞層への接着は何らかのシグナルを宿主細胞層に惹起すると十分考えられ、その時に Rho-ROCK 経路が活性化されタイトジャンクションの開放に向かう可能性は高い。そうだとすると、Rho-ROCK 経路はがん細胞側と宿主細胞側の両方で通り抜け過程に働いており、ROCK 阻害薬はこの過程を二重に抑制することになる。

おわりに

以上、本稿では Rho-ROCK 経路が細胞の移動や接着で果たしている基本的な役割を述べ、この阻害ががん細胞の転移・浸潤の抑制に有効と考えられる根拠を論じた。すでに動物実験ではこの戦略の有効性が実証されており、今後の臨床例での検討が待たれる。

〔文献〕

- 1) Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, *et al.*: Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases and LIM-kinase. *Science* 1999; 285: 895-898.
- 2) Ishizaki T, Morishima Y, Okamoto M, *et al.*: Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia 1. *Nature Cell Biol* 2001; 3: 8-14.
- 3) Habets GGM, Scholtes EHM, Zuydgeest D, *et al.*: Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell* 1994; 77: 537-549.
- 4) Yoshioka K, Imamura F, Shinkai K, *et al.*: Participation of rho p 21 in serum-dependent invasion by rat ascites hepatoma cells. *FEBS Lett* 1995; 372: 25-28.
- 5) Suwa H, Ohshio G, Imamura T, *et al.*: Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal

adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Cancer* 1998; 77: 147-152.

- 6) Clark EA, Goulb TR, Lander ES, *et al.*: Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 2000; 406: 532-535.
- 7) Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, *et al.*: An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nature Medicine* 1999; 5: 221-225.
- 8) Takamura M, Sakamoto M, Genda T, *et al.*: Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Hepatology* 2001; 33: 577-581.
- 9) Hirase T, Kaeashima S, Wong EYM, *et al.*: Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by RhoA-p 160 ROCK-dependent anandamide-independent mechanisms. *J Biol Chem* 2001; 276: 10423-10431.

質 疑 応 答

座長(成宮) それではご質問、ご議論をお願いいたします。

野田 亮(京都大) RhoC の話が出ましたが、ROCK に関して、RhoC も同じように働くのかということと、転移性のがんで RhoC がとくに出てきた理由というのは何か考えられますでしょうか。

座長 最初の RhoA, B, C が下流の effector に対して選択性があるかどうかというご質問ですが、現在のところ、実験的には RhoC は RhoA と同様に同じ程度の affinity で ROCK に結合します。また、今までに同定されている effector で、RhoA, B, C の間を区別するものは、知られていないと申し上げてよいと思います。

それからどうして RhoC なのかということですが、これはなかなかむずかしいのです。まずその背景に RhoA, B, C というものが、それぞれ異なった役割があるのか、あるいは redundant に働いているのかどうか、という問題があります。細胞内分布では、RhoA, B,

Cのうち、RhoBは細胞の中の小胞系にあり、endocytosisに関係しているということがいわれていますが、RhoAとRhoCには、明確な差はないということになっています。またRhoAと同様にRhoCも活性化体を発現させますとstress fiberを形成します。このことから、RhoAとRhoCはcomparativeな作用を持っているだろうといわれています。それではどうしてがんでRhoAではなくてRhoCなのかということですが、これはわかりません。Rho遺伝子の制御に関するpromotor領域は調べられていませんので、ひょっとすると、RhoC遺伝子のpromoterに何らかのoncogeneが発現した時に働くようなelementが乗っているという可能性もあるだろうと考えます。

釜井隆男(獨協医大) 私どももRhoのA、B、Cのprimerを設定して、RT-PCR法を行って泌尿器科の種々のがんをいろいろ調べました。それで、たとえば精巣腫瘍では早期の段階にリンパ行性にリンパ節に転移するのですが、これを調べたところRhoのAしか発現していないのです。BとCは発現していません。一方早期に血行性に転移するものとして腎細胞がんが多いのですが、こちらはA、B、Cすべて発現するのですが、どうもやはりCが多いようなのです。先ほどの先生と同じような質問になるかと思いますが、転移という場合には、血行性あるいはリンパ行性が考えられるかと思いますが、やはりそのA、B、Cの機能、あるいは分布というものに何かdifferenceがあるのかどうか伺いたいと思います。

座長 ただ今も申しましたように、Rhoの研究者は結構多いのですが、やっていますのはほとんどがRhoAでありまして、RhoAとRhoCで、本当に何か差異があるのかどうか

ということを調べた報告は、私の知る限りありません。私どもも扱っておりますのは大半の場合RhoAでして、とくにRhoCの機能を調べたことがありませんので、ご質問の点はこれからの研究テーマとして残っていると考えています。

北川雄光(慶應大) 臨床からのちょっとcrudeな質問で申しわけないのですが、細胞骨格との転移の関係を考えた場合に、最初のステップとして、たとえば肺の毛細管に白血球と同じようにがん細胞が行きますと、当然細胞のほうの方が径が大きいわけですから、そこでメカニカルなストレスを受けると思うのです。その場合に、こういう細胞骨格に逆にメカニカルストレスが起こった時にどう反応するかという観点で、このRhoとの関係は何かわかっておりますでしょうか。

座長 メカニカルストレスとの関係では、心筋細胞を用いた実験があります。心筋細胞をelasticな基質の上に培養して、基質を引っ張るとメカニカルストレスが生じますね。そういう時にRhoが活性化されるという報告があります。次の点は、血管の内皮と結合し接着が始まった時にRhoが活性化されるかということです。Rhoの活性化はLPAのようなsolubleなファクターと同時に、細胞外基質に接着し、それからシグナルが入ることによって活性化されることもあるのです。細胞外基質によって活性化されて、そのRhoがまた基質への接着を亢進するといった増幅反応が起こるようです。つまり、先生がおっしゃったような状況下では二つのことが考えられると思います。一つはストレッチによるRho活性化と、もう一つは細胞間同士の間での情報のやりとりによる活性化があると考えられるかと思います。