

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	齊藤 亮一
論文題目	Downregulation of Ral GTPase-activating protein promotes tumor invasion and metastasis of bladder cancer (RalGAPの発現低下は膀胱癌の浸潤及び転移を促進する)		
(論文内容の要旨)			
【背景】低分子量G蛋白質 Ral は膀胱癌、大腸癌、膵癌など多くの癌種で高度に活性化しており、細胞増殖、細胞遊走、浸潤や転移に関与する。Ral はRalGEFs (guanine nucleotide exchange factors) により活性化され、RalGAP(GTPase-activating protein)により不活化される。RalGAP は酵素活性を有するαサブユニット (α 1またはα 2) とβサブユニットからなるヘテロダイマーである。膵癌や大腸癌の多くでは変異型 Ras が発癌や癌の進展に関与するので、活性型 Ras がそのエフェクターの一つであるRalGEF を介し Ral を活性化すると考えられている。一方膀胱癌では Ras 変異の頻度は低く、Ral がどのように活性化されるかは不明である。 【目的】本研究の目的は、RalGAP の発現低下または機能低下が Ral 活性化を介して膀胱癌の発癌または進展に関与するかどうかを明らかにすることである。 【方法】膀胱癌細胞株 (非浸潤性 3 種類、浸潤性 4 種類) を用いて Ral プルダウンアッセイにより Ral 活性を評価した。RalGAP α2 サブユニット (α2) の機能解析を行うために、α2 低発現細胞株でレンチウイルスを用いて野生型α2 と GAP 活性を欠く変異型α2 (N1742K) の強制発現を行った。アクチン細胞骨格をPhalloidin 染色にて、細胞遊走はWound healing assay と Trans-well migration assay にて評価した。さらに膀胱癌の発癌や進展におけるα2 の in vivo での機能解析のために、Ralgapa2 (α 2) KO マウス (エクソン 2-3 を欠失) を作製し、0.025% BBN (N-butyl-N-nitrosamine)を継続投与するマウス膀胱化学発癌モデルで検討した。膀胱癌臨床検体のα 2 発現量を免疫染色で検討した。膀胱癌の転移におけるα2 の機能を、ルシフェラーゼを発現する KU7 細胞をヌードマウスに経静脈的に接種する肺転移モデルで検討した。 【結果】浸潤性細胞株では非浸潤性細胞株と比べ Ral 活性が高く、逆にα2 のタンパク発現量が低かった。Ral 活性と Ras 活性、RalGEF、α1 発現量との相関は認めなかった。次にα2 低発現細胞株 KU7 細胞と TCCSUP 細胞に野生型α 2 を強制発現させたサブクローンは、コントロールベクター及び変異型α2 発現サブクローンに比べて細胞遊走が有意に抑制され、TCCSUP 細胞ではストレスファイバーの形成が抑制された。Ralgapa2 -/-マウスでは+/+マウスに比べ膀胱の活性型 Ral が 2.5 倍に増加していた。両群に BBN を 16 週間継続投与した際の膀胱の組織学的変化を検討した。+/+マウスの 65%に膀胱癌を認め、全て非浸潤性であったのに対し、-/-マウスの全例に膀胱癌を認め、うち 43%が浸潤性であった。さらに臨床検体のα 2 発現量を免疫染色で検討した。正常尿路上皮は全てα 2が高発現であった。膀胱癌組織では非筋層浸潤癌の 52%に、筋層浸潤癌では 93%にα 2の発現量低下を認めた。有転移症例では、転移のない症例に比べ有意にα 2発現量低下を認めた。最後に上述の肺転移モデルでは、α 2を強制発現した KU7 サブクローンは、コントロールベクター及び変異型α2 を発現させたサブクローンに比べて肺転移巣の形成能が有意に抑制されていた。 【結論】RalGAP α 2 の発現低下は Ral 活性化を介して膀胱癌の浸潤及び転移を促進すると考えられた。RalGAP/Ral 経路の解析により、膀胱癌の新規分子標的の探索につながると期待される。			

（論文審査の結果の要旨）			
低分子量G蛋白質Ralは細胞遊走や癌細胞の増殖などに重要な分子で、進行膀胱癌でのRal mRNA発現増加が報告されている。RalはRalGEFsで活性化され、RalGAPで不活化される。これまでヒトの癌では、RalGAPの異常によるRal活性と表現型変化については未知である。申請者は膀胱癌においてRal活性化レベルとRalGEF/RalGAP発現量との関連性を検討し、RalGAPのRal活性化状態と表現型への影響について検討した。 まず膀胱癌細胞の活性型Ralをプルダウンアッセイで評価した。浸潤性細胞株では非浸潤性株に比べ活性型Ralが多く、逆にRalGAPを構成する2つのサブユニット（αサブユニット（α1又はα2）とβサブユニット）の内、RalGAPα2（α2）発現量が低下していた。そこでα2低発現株にレンチウイルスを用いて野生型α2を強制発現すると、細胞遊走が抑制された。次にα2KOマウスを作出し、BBN継続投与で誘導されるマウス膀胱癌を組織学的に検討すると、野生型に比べKOマウスで発癌頻度と浸潤癌の割合が増加していた。続いてヒト膀胱癌組織のα2発現量を免疫染色で検討したところ、正常上皮と比べ非筋層浸潤癌の52%、筋層浸潤癌の93%にα2発現低下を認め、また有転移症例では転移のない症例に比べα2発現量低下を認めた。最後に免疫不全マウスの尾静脈内への癌細胞注射による肺転移モデルで、α2を強制発現した膀胱癌細胞は、コントロールに比べて肺転移形成が有意に抑制された。以上により、α2の発現低下はRal活性化を介して膀胱癌の浸潤及び転移を促進すると考えられた。 以上の研究は、膀胱癌の浸潤・転移に関与する分子機序の解明に貢献し、Ralの関与が示唆されている他癌腫における癌進展機序の理解につながる可能性がある。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成24年3月28日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			