

膵癌において Ral GTPase-activating protein (RalGAP)の
発現低下は腫瘍形成や転移・浸潤能を促進する

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

外科病態学講座消化器外科学分野

吉町信吾

I. 要約

背景: 低分子量 GTP (guanosine triphosphate) 結合蛋白質 Ras (rat sarcoma) の変異は、膵癌発症に大きく関与している。Ral (Ras like) は Ras ファミリーのメンバーであり、Ras の主要な下流情報伝達経路を担う。Ral は Exocyst 複合体や RalBP1 (Ral-binding protein 1) などいくつかの下流のシグナルを介して、エンドサイトーシスやエクソサイトーシス、細胞増殖や細胞骨格形成などに関与している。他の低分子量 GTP 結合蛋白質 (small GTPase) と同様に、Ral は GTP 結合型が活性型で、GDP (guanosine diphosphate) 結合型が不活性型である。活性化反応は GDP/GTP 交換因子 (guanine nucleotide exchange factor: GEF)、不活性化反応は GTPase 活性化因子 (GTPase-activating protein: GAP) によって担われる。RalGEF のいくつかは Ras の直接の下流分子であり、Ras によって活性化される。RalGAP は触媒サブユニットである $\alpha 1$ または $\alpha 2$ と、共通サブユニットである β からなるヘテロ複合体である。膵癌における Ral の重要性に関する報告は散見されているが、RalGAP の役割や Ral の活性上昇が膵癌に与える影響についてはほとんど明らかになっていない。

目的: 膵癌における RalGAP の役割や、Ral の活性上昇が膵癌に与える影響について解析する。

方法: 膵癌細胞株にて RalGAP β の発現を CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats – CRISPR associated proteins 9) を用いて knockout し、Ral の活性や増殖・浸潤・転移能を *in vitro* および *in vivo* にて評価する。

結果: 膵癌細胞株では、RalGAP β の knockout によって Ral の活性は上昇した。*in vitro* の解析では、細胞遊走制御に重要な Rac1 や Cdc42 の活性上昇、filopodia 形成など細胞の形態学的な変化、および遊走能や浸潤能の上昇を認めた。免疫不全マウスへの皮下移植実験、および脾臓注入による肝転移実験を行ったところ、RalGAP β の knockout は移植巣の腫瘍増大および転移促進を引き起こした。

考察: RalGAP β の knockout により Ral の活性が上昇したことが、膵癌細胞で腫瘍成長や浸潤・転移を促進したと考えられた。

結語: 膵癌細胞における RalGAP の発現低下による Ral の活性化は、*in vitro* における遊走能・浸潤能、*in vivo* における腫瘍形成・転移に重要な役割を果たしている可能性がある。

II. 研究背景

膵癌は診断後の5年生存率は10%以下と、最も予後が悪い癌の一つと言われている。悪性度が高く高率に転移を引き起こすこと、早期発見が難しく症状出現時には既に進行していることが多いこと等が、その理由として挙げられる。膵癌は細胞成長を担う低分子量GTP結合蛋白質 *KRAS* の活性型変異がまず生じ、細胞周期を担うサイクリン依存性リン酸化酵素抑制蛋白質 p16^{INK4A}(inhibitors of cyclin-dependent kinase 4A) や癌抑制遺伝子 *p53* などの癌抑制遺伝子の欠失や変異が加わり、多段階的に発生すると報告されている^{1, 2)}。*KRAS* の遺伝子変異が最初に生じるということで、変異 *KRAS* 遺伝子は、膵癌の driver gene と呼ばれている。Ras の下流経路としては、MAPK (mitogen-activated protein kinase) 経路や、PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 経路が癌化において重要であるとされているが、ヒト細胞の癌化には第3のRas下流経路であるRal経路も癌化に必須であることが報告されている^{3, 4)}。

Ras や Ral などの低分子量 GTP 結合蛋白質は、GTP 結合型が活性型で、GDP 結合型が不活性型となり、細胞増殖や細胞接着、遊走等の細胞内情報のスイッチとして機能している(図1)^{5, 6)}。活性化反応は GDP/GTP 交換因子 (GEF)、不活性化反応は GTPase 活性化因子 (GAP) によって担われる⁶⁾。Ral は RalA と RalB の2種類が同定されており(図2a)、RalGEF はこれまでに RalGDS、RGL1、RGL2、RGL3、RalGPS1、RalGPS2 の6種類が特定さ

れている(図 2b)。そのうちの RalGDS と RGL1、RGL2、RGL3 の 4 種類は Ras の直接のエフェクター(下流分子)である為、Ras の活性は Ral を活性化させる(図 2b)⁶⁾。一方、Ral の抑制性制御因子である RalGAP は、2009 年に白川、堀内等によって同定され、世界に先駆けて報告された⁷⁾。RalGAP は触媒サブユニット $\alpha 1$ または $\alpha 2$ と、両者に共通の調節サブユニット β からなるヘテロ複合体である(図 2c)⁷⁾。触媒サブユニット $\alpha 1$ および $\alpha 2$ はユビキタスに発現するが相補的であり、脳では $\alpha 1$ が、肺・肝・膀胱では $\alpha 2$ が主要な RalGAP の触媒サブユニットであった⁷⁾。膀胱癌では、表在性膀胱癌と比べて浸潤性膀胱癌にて、RalGAP $\alpha 2$ サブユニットの発現が著明に低下すること、RalGAP $\alpha 2$ 低下群では予後が悪いことが報告されている⁸⁾。

Ral は Exocyst 複合体や RalBP 1 などいくつかの下流のシグナルを介して、エンドサイトーシスやエクソサイトーシス、細胞増殖や細胞骨格形成などに関与している(図 1)^{5, 7, 9-12)}。Ral は悪性度の高い膀胱癌で高度に活性化されていること⁸⁾、動物実験で前立腺癌の骨転移に必須な役割を果たすことが報告されており¹³⁾、Ral は最近、癌の悪性化を来す因子のひとつとして注目されている。

膀胱癌における Ral の役割については、臨床検体の解析で膀胱正常組織と比較して膀胱癌組織では Ral の活性が著しく上昇していること¹⁴⁾、動物実験では Ral を knockdown すると増殖能や転移能が低下すること¹⁴⁾、*in vitro* では RalGEF の knockdown によって Ral の活性が低下

し増殖能や浸潤能が低下すること等が報告されており¹⁵⁾、Ral も膵癌の発生や進行に影響を与えることが示唆されている⁵⁾。

Ral は膵癌を含め、様々な癌腫で癌化や癌悪性化に深く関わっていることが示唆されている。しかし、膵癌における Ral の抑制性制御因子である RalGAP の働きや、膵癌組織で見られるように、Ral の活性が亢進した時の影響については未だ系統的な解析はない。

Ⅲ. 研究目的

膵癌における RalGAP の働きや、Ral の活性上昇が膵癌に与える影響について、*in vitro* および *in vivo* で解析する。

IV. 研究方法

1. *RAS* mutation 解析

細胞株の *HRAS*, *KRAS*, *NRAS* の mutation について、cDNA のシーケンスにて解析した。

製造者記載法に従い、Isospin Cell & Tissue RNA kit (NIPPON GENE, Tokyo, Japan)により

抽出した RNA を ReverTra Ace kit (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いて逆転写反応し、以下

のプライマーを用いて PCR (polymerase chain reaction)を行い、*HRAS*, *KRAS*, *NRAS* の

変異を評価した。

HRAS

(Forward) 5' -GCAGTCGCGCCTGTGAACGGTG-3'

(Reverse) 5' -AATTTACTGTGATCCCATCTGTGCCCGAC-3'

KRAS

(Forward) 5' -GCCATTTCCGACTGGGAGCGAG-3'

(Reverse) 5' -AACTCTGGGAATACTGGCACTTAGAGGA-3'

NRAS

(Forward) 5' -TCCCGGCTGTGGTCCTAAATCTGTC-3'

(Reverse) 5' -GGAAGTCAGGACCAGGGTGTTCAGT-3'

PCR 産生物は製造者記載法に従い、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

(Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて Thermal

Cycling を施行後、3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific)

にてシーケンスを解析した。mutation の hot spot である G12、G13、A59、Q61、K117、

A146 などを含め、コーディング領域の塩基配列の評価を行った。

2. 細胞培養

6 種類のヒト膵癌細胞株 (PANC-1、MIA PaCa-2、AsPC-1、BxPC-3、SUIT-2、SW-1990)

を使用した。すべての細胞は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA,

USA)より購入し、High Glucose Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Fujifilm Wako

Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)に 10% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum, FBS;

Thermo Fisher Scientific)、および 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (Nacalai Tesque, Kyoto,

Japan)を添加した培地にて、37°C CO₂: 5%の環境下にて培養した。

3. Western blotting

細胞は lysis buffer (50 mM HEPES/KOH pH7.4、100 mM NaCl、4 mM MgCl₂、2 mM EGTA、

1 mM dithiothreitol、0.5% (w/v) Triton X-100、10 mM β-glycerophosphate、10 mM NaF、1

mM Na₃VO₄、protease inhibitor cocktail (F. Hoffmann-La Roche, Ltd, Basel, Switzerland、1

錠を 1000 μl の超純水に溶かして、lysis buffer 1000 μl に対して 20 μl を使用))を用いて溶

解し、80,000 rpm (602,000 × g)で 10 分間遠心し、上清を細胞抽出液とした。上清は 5%

β -ME を含む Laemuli 緩衝液 (SDS buffer: 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2.2% SDS、10% glycerol、0.01% BPB、5% β -ME)に溶解し、5%~20%のポリアクリルアミドグラジエントゲル

(ATTO corporation, Tokyo, Japan)により電気泳動後、ポリビニルデンフルオイド膜 (PVDF 膜, Millipore, Darmstadt, Germany)に転写して、Western blotting を以下の一次抗体を用いて行った。

抗 RalGAP α 1 抗体 (1 : 1000、自家製⁷⁾)、抗 RalGAP α 2 抗体 (1 : 1000、自家製⁷⁾)、抗 RalGAP β 抗体 (1 : 1000、自家製⁷⁾)、抗 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 抗体 (1 : 1000, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)、抗 RalA 抗体 (1 : 1000, BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA)、抗 RalB 抗体 (1 : 500, Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、抗 Ras 抗体 (1 : 1000, Millipore)、抗 Rac1 (Ras-related C3 botulinus toxin substrate 1) 抗体 (1 : 500, Millipore)、抗 RhoA (Ras homolog gene family, member A) 抗体 (1 : 500, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)、抗 Cdc42 (cell division control protein 42 homolog) 抗体 (1 : 500, BD Transduction Laboratories)。二次抗体は、RalA、Ras、Rac1、Cdc42、GAPDH については HRP (horseradish peroxidase) conjugated anti-mouse IgG blotting reagents (1 : 2000, GE Healthcare, Chicago, IL, USA)、RalGAP α 1、RalGAP α 2、RalGAP β 、RalB、RhoA については HRP conjugated anti-rabbit IgG blotting

reagents(1 : 2000, GE Healthcare)を使用した。最終的には、immuno star basic(Thermo Fisher Scientific)または immuno star zeta(Thermo Fisher Scientific)を用いた化学発光により、X-フィルム(GE Healthcare)に感光して検出した。

4. Pull-down assay

各種 small GTPase の GTP 結合型のみ結合するエフェクタードメインを、グルタチオン S-転移酵素 (glutathione S-transferase: GST) エフェクタードメインを大腸菌で作成後に精製し、pull-down assay を施行して活性型の比率を解析した。各 small GTPase に対する tag タンパクは以下の通りである。

Ral : Sec5-GST¹⁶⁾

Ras : Raf-GST¹⁶⁾

Cdc42 : PAK1-GST¹⁶⁾

Rac1 : PAK1-GST¹⁶⁾

RhoA : Daam1-GST¹⁶⁾

細胞株を 60 mm dish に 80% confluent になるように培養した後、FBS free の培地で 6 時間培養し、その後、FBS 10% 培地で 5 分間培養し (stimulation)、上述の lysis buffer を用いてタンパクを溶出した。Pull-down 法 (アフィニティ法) は、Glutathione Sepharose 4B (GE healthcare) と各種 tag タンパク、細胞抽出液を用いて、4°C で 1 時間反応させ、ビーズに結

合した蛋白質を SDS buffer を用いて溶出し、Western blotting にて定量評価した。定量評価の際は感光時間を統一するため、GTP-form と total-form は同一のフィルムで検出した。

5. 共免疫沈降

各種細胞株における RalGAP α 1 と α 2 の存在比率を確認するため、共免疫沈降を行った。

抗 RalGAP α 1 および抗 RalGAP α 2 抗体、control rabbit-IgG 結合 protein G-sepharose beads (GE healthcare) を用い、細胞抽出液より免疫沈降し、RalGAP β を Western blotting にて解析した。

6. 定量 PCR

上述のように RNA 抽出および逆転写反応を行った。目的の遺伝子の発現量は、製造者記載法に従い、TB Green™ Premix Ex Taq™ II kit (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて、定量 PCR 機 StepOne (Thermo Fisher Scientific) で測定した。目的の遺伝子の mRNA の発現量は、内部標準遺伝子の発現量で補正し、サンプル間の比較を行う相対定量で評価した。内部標準遺伝子には GAPDH の遺伝子を用いた。諸家既報に従い、 $\Delta\Delta$ Ct 法にて相対的 mRNA 発現量を求めた¹⁷⁾。

各プライマーの配列は以下の通りである。

RALGAPA1

(Forward) 5' -CTCCTACCCAGAGATTCTACCCA-3'

(Reverse) 5' -CATGTTATGGCAGACACATGAAGGC-3'

RALGAPA2

(Forward) 5' -AGAACGTTTCATCTTCAGGCTCT-3'

(Reverse) 5' -AGGGTTGAGTTATTTGCTGCCTA-3'

RALGAPB

(Forward) 5' -CTCAGTTAAACACGTGCATTGGT-3'

(Reverse) 5' -CAACTGAGTAGAAGGCTGTGACT-3'

RALGDS

(Forward) 5' -GAGTTGACAGTCCCATGGCA-3'

(Reverse) 5' -CTGAAGTCATCCACAGGCGA-3'

RGL1

(Forward) 5' -GGTGGCTCCAGGATGTTAGG-3'

(Reverse) 5' -CCCAGGCCTGAGTTCATGTT-3'

RGL2

(Forward) 5' -GGACCAGCTAACCAACGACA-3'

(Reverse) 5' -GGGTGTTTTCGGCTTCCTCT-3'

RGL3

(Forward) 5' -CAACGCCTCCAAAAAGCCAA-3'

(Reverse) 5' -ACAGTGATGGGGCTGTATGC-3'

RALGPS1

(Forward) 5' -AGGGGCCTCTGAGAAGAAAA-3'

(Reverse) 5' -GAAATCGGGAACCAGTCTGA-3'

RALGPS2

(Forward) 5' -TTGTGTGGGACACAGCTTTT-3'

(Reverse) 5' -AGGCTGCACTCAAATGCTTA-3'

GAPDH

(Forward) 5' -GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'

(Reverse) 5' -GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'

7. siRNA (small interfering RNA)を用いた RalGAP 発現抑制実験

RalGAP α 1、RalGAP α 2、RalGAP β の siRNA (10 nM; Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を使用した。コントロールとして、siRNA Negative Control (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)を使用した。Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Waltham, MA, USA)を用いて、製品説明書に従って Lipofection 法にて siRNA を導入した。使用した siRNA の配列はそれぞれ以下の通りである。

si RalGAP α 1 (ID: s48469)

sense, 5' – CGAGGAGUAUAGUACGGCATT–3'

antisense, 5' – UGCCGUACUAUACUCCUCGCC–3'

si RalGAP α 2 (ID: s32857)

sense, 5' – GAGCUUCUAUGAAGAGCGATT–3'

antisense, 5' – UCGCUCUUCAUAGAAGCUCTG–3'

si RalGAP β (ID: s32781)

sense, 5' – GCGUUGAUGUAUUAUACAGATT–3'

antisense, 5' – UCUGUAUUAUCAUCAACGCAA–3'

siRNA はそれぞれ 3 種類ずつ条件検討を行い、knockdown 効率や細胞障害性などを考慮

し、最適なものを選択した。

8. CRISPR/CAS9 system

PANC-1、MIA PaCa-2 における RalGAP β ノックアウト細胞株を樹立するため、諸家既報

に従い CRISPR/CAS9 システムを用いた¹⁸⁾。

RALGAPB のシングルガイド RNA (single guide RNA: sgRNA) のターゲット、および使用した sgRNA の配列は以下の通りである。それぞれの top と bottom の sgRNA を annealing した。

RALGAPB sgRNA target: ACCTCTCGTCCAACGCTCTC

top; 5' - caccgACCTCTCGTCCAACGCTCTC -3'

bottom; 5' - aaacGAGAGCGTTGGACGAGAGGTc -3'

Vector は pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (Addgene, Watertown, MA, USA) を使用した。

制限酵素 Bbs1 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) を用いて Vector を切断し、Ligation

Mix (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて、上記の annealing 後の sgRNA を Ligation した。

Ligation 後のベクターは、Panc1 は Electroporation、MiaPaCa2 は Lipofection 法にて

transfection した。製造者記載法に従って、Electroporation は 4D-Nucleofector (Lonza,

Basel, Swiss) および nucleofector solution SE (Lonza) を用いて、Lipofection 法は

Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を用いて行った。

培地に 2.0 µg/ml となるように Puromycin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加し、72 時

間の薬剤選択をした細胞を、cloning にて単一 colony より細胞を継代し、RalGAP β knockout

細胞を樹立した。遺伝子変異とタンパク質の発現消失はそれぞれ Sequence と Western

blotting により確認した。

9. Wound healing assay⁸⁾

60 mm dish に confluent になった細胞に、2 μ l のピペットチップを用いて傷(直線)を形成し、傷形成直後と 18 時間または 21 時間後の創傷部を比較することで細胞移動面積を計測した。計測は 6 箇所、移動面積はソフトウェア Image J (NIH、<https://imagej.nih.gov/ij/>)を使用し計測した。同様の実験を独立して 3 回繰り返した。

10. 細胞遊走能と細胞浸潤能解析

細胞遊走能の解析は Transwell Permeable Supports, 24-well 8.0 μ m (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) を、細胞浸潤能の解析は Matrigel Invasion chamber 24-well 8.0 μ m (Corning Incorporated) を用いて、それぞれボイデンチャンバー法にて行った。まず下部 24 穴プレートに血清入りの使用細胞に合った培地を添加し、その上にインサートを静置したのち、無血清培地に懸濁した細胞(PANC-1 は 0.5×10^5 個、MIA PaCa-2 は 2.0×10^5 個)を播種した。24 時間後にインサートメンブレン上面に存在する細胞を綿棒で全て除去した後、インサートメンブレン下面に移動した細胞をクリスタルバイオレット溶液(4.2% ホルマリン、0.1% クリスタルバイオレット、10% エタノール)に 15 分間浸すことで、固定および染色した。染色後のメンブレンを蒸留水でよく洗った後に、乾燥させ顕微鏡下で目視にて遊走および浸潤した細胞数を計測した。各検体に chamber は 3 つずつ使用し、それぞれ独立した 5 視野の細胞数をカウントして平均した。同様の実験を独立して 3 回繰り返した。

11. Proliferation assay

6-well dish または 60 mm dish に PANC-1 は 4×10^3 個、MIA PaCa-2 は 2×10^3 個を播種して培養を行い、1・3・5・7 日目に細胞を回収して、細胞数を計測した。計測には Z1 Coulter Counter (Beckman coulter) を用いた。同様の実験を独立して 3 回繰り返した。

12. RalGAP β rescue

Panc1、MiaPaCa2、およびそれぞれの RalGAP β が KO された細胞の合計 4 種類について、レンチウイルスを用いてプラスミド導入を行い、RalGAP β の rescue を行った。

まず、HEK 293T 細胞を 10cm dish で培養し、Fugene 6 (Promega, Madison, WI, USA) を用いて、RalGAP β 発現ベクターである pBOBI flag- β (pBIB)、およびレンチウイルスパッケージである pMDL、pVSVG、pREV を導入した。2 日培養した後、上清を回収し、ポリブレンを 1000 倍希釈になるように入れ、フィルターにかけた。予め細胞株を培養していた dish の medium を、上記の上清へ入れ替え、レンチウイルスの transfection を行った。培地は 24 時間後に、 $5 \mu\text{g/ml}$ の Blasticidin が入った medium に change し、1 週間に渡って薬剤選択を行った。transfection の確認は Western blotting にてタンパク発現量を解析して行った。

13. Rhodamine Phalloidin 染色

RalGAP の発現量と細胞骨格の構造と機能の関係を解析するため、Rhodamine Phalloidin 染色を行った。8-well の Microscope Cover Glass (Matsunami Glass Ind.,Ltd., Osaka, Japan)

にポリ-L-リジン(SIGMA)を用いてコーティングを行った後、細胞を播種して培養。4% パラホルムアルデヒドによる固定、0.1% Triton X-100 による透過処理、5% goat serum 溶液によるブロッキングを行った後、Rhodamine Phalloidin R415 (Invitrogen)を 500 倍希釈、4',6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochloride Solution (Dojindo co.,Ltd, Kumamoto, Japan)を 1000 倍希釈で用いて染色し、共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)を用いて観察した。

14. マウス実験

ヌードマウスの腹腔内に 3 種混合麻酔薬(メドミジン 0.3 mg/kg、ミダゾラム 4 mg/kg、ブトルファノール 5 mg/kg)を投与して麻酔した。

皮下移植は、PBS に懸濁した野生型および RalGAP β knockout MIA PaCa-2 細胞 (5.0×10^6 個)と Matrigel Matrix (Corning Incorporated)を 4:1 の割合で混合し、ヌードマウス(6~8 週齢)の両側腹部に移植し、1 週間ごとに腫瘍の大きさを測定した。体積は(縦 \times 横 \times 高さ)/2 の計算式にて算出した。9 週間観察した後、頸椎脱臼にて安楽死させ、腫瘍を摘出し、重量を測定した。

脾臓移植は、PBS に懸濁したルシフェラーゼ⁷⁾を発現する野生型および RalGAP β knockout MIA PaCa-2 細胞 (2.0×10^6 個)と Matrigel Matrix を 1:1 の割合で混合し、麻酔下に開腹したヌードマウス(6~8 週齢)の脾臓の被膜下へ 26G の注射針を用いて行った。1 週

間ごとにルシフェリン 200 μ l (3000 μ g; GORYO Chemical, Inc. Sapporo, Japan)を腹腔内に投与し、*In vivo* imaging system (IVIS; Summit Pharmaceuticals International, Tokyo, Japan)を用いて発光強度を確認した。6週間経過した後、頸椎脱臼にて安楽死させ、開腹して解剖した。脾臓内に形成された腫瘍を摘出し、腫瘍形成を確認した。また、肝転移数や腹膜播種数を目視にて確認し、転移能を確認した。

脾臓は一部、10%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋切片を作成した。薄切および脱パラフィン処理後、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、顕微鏡下に観察した。

15. 臨床検体解析実験

手術にて摘出された標本から、可及的速やかに脾正常部と腫瘍部を採取した。腫瘍は術前画像上腫瘍の局在が示唆される部位、かつ触診にて硬結を触知した部位から一部採取した。組織は5mm 区画以上の採取を目標とし、定量 PCR に使用する検体は RNA later solution () を使用して、RNA の分解を可能な限り防ぐようにした。RNA の抽出には Isospin Cell & Tissue RNA kit を使用し、上述のごとく解析を行った。Western blotting を行う検体は、cryo tube (Thermo Fisher Scientific) に入れ液体窒素で急速凍結を行い保管し、後日まとめて解析を行った。採取した組織の大きさに合わせて、重量 10mg 当たり 100 μ l の lysis buffer を入れ、ペッスルおよび Vortex で組織を砕き、遠心した後の上清を解析に使用した。pull-down assay や western blotting の解析については前述の通りの方法で行った。

16. 統計解析

定量データは、平均値および標準誤差 (Mean±SEM) を算出して表記した。2 群間の検定には Welch's t-test を用いて有意差を算出した。3 群間以上の検定には One-way ANOVA 解析後に、Tukey's multiple comparison test または Dunnett's multiple comparison test を施行し、有意差を算出した。P 値が 0.05 未満のものを統計学的に有意と評価した。

17. その他

全ての動物実験、遺伝子組換え実験および臨床検体解析実験は、東北大学より承認された実験計画に基づいて行われた。各種実験の承認番号と承認日は以下の通りである。

【動物実験】 承認番号:2017 加動-023、承認日:2017/06/27

【遺伝子組換え実験】 承認番号:2017 加組換-030、承認日:2017/09/05

【臨床検体解析実験】 承認番号:2017-1-338 、承認日:2017/07/26

V. 研究結果

1. 膵癌細胞株における RalGAP および RalGEF の発現量、Ral 活性化の解析

Ral は Ras の下流に存在することが知られている⁵⁾。RAS 遺伝子変異により G12D や G12C などのアミノ酸置換が生じると、Ras の GTPase としての機能が低下したり、GAP との相互作用に異常を来したりすることで、活性化状態が恒常的に維持され下流へシグナルを送り続ける¹⁹⁾。まずは使用する膵癌細胞株 6 種類について RAS mutation の解析を行った。

BxPC-3 のみ HRAS、NRAS、KRAS は全て wild type であったが、他 5 種類については KRAS について、G12D または G12C の活性型変異を認めた(図 3)。また、HRAS については、PANC-1、MIA PaCa-2、BxPC-3、SUIT-2 について、1 塩基変異を認めていたが、Amino acid mutation を伴わない silent mutation であった(図 3)。

続いて、膵癌細胞株 6 種類における RalGAP および RalGEF 発現量を Western blotting および定量 PCR によって、Ral 活性化度を pull-down assay 法を用いて解析した(図 4)。

RalGAP の発現量に関しては、RalGAP β については、全ての細胞株において、発現量に大きな差は認めなかった(図 4a)。RalGAP $\alpha 1$ については PANC-1、MIA PaCa-2、AsPC-1、RalGAP $\alpha 2$ については PANC-1 や MIA PaCa-2、SW-1990 において低い傾向を認めた(図 4a)。

RalGAP $\alpha 1$ と $\alpha 2$ の存在比率については、共免疫沈降を行い評価した(図 4b)。PANC-1、MIA PaCa-2、SUIT-2、SW-1990 については、RalGAP $\alpha 1$ の発現が多く、AsPC-1、BxPC-3 については RalGAP $\alpha 2$ の発現を多く認めた(図 4b)。

Ral の活性化については、RalA については PANC-1、MIA PaCa-2、AsPC-1、SW-1990 において、他細胞株に比較して上昇していた(図 4a)。BxPC-3 細胞での活性化が低いのは、*KRAS* の活性型変異を認めなかったことが影響している可能性がある。RalB に関しては、活性は全体的に低い傾向であった(図 4a)。また RalGAP の発現量が低い細胞株において RalA の活性は上昇していた(図 4a)。

RalGAP と RalGEF に関して、mRNA レベルでの発現量を定量 PCR にて解析した。RalGAP の mRNA レベルでの発現量については、Western blotting の結果と概ね同様の傾向を認めた(図 4a, c)。一方、RalGEF の mRNA レベルでの発現量と Ral の活性に関しては、一定の傾向を得る事は困難であった(図 4a, c)。例えば、MIA PaCa-2 や SW-1990 については、RalGEF 6 種類全てにおいて他の細胞株と比較して発現が少ないが、RalA の活性は他の細胞株より高い傾向を認めていた(図 4a, c)。また、BxPC-3 や SUIT-2 については、複数の RalGEF が他の細胞株に比較して高発現だが、RalA の活性は低い傾向を認めていた(図 4a, c)。この傾向は、Ras の直接の下流である RGL1、RGL2、RGL3、RalGDS のみで検討しても

同様であり、必ずしも RalGEF の発現量と Ral の活性は平行な挙動を示してはいなかった。

以上のことから、Ral 活性と RalGAP 発現量には負の相関性のあることが示唆された。

2. RalGAP β knockout 細胞株の作成

膵癌細胞株 6 種類において、siRNA を用いて RalGAP $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 β の knockdown を行い、Ral の活性がどのように変化するの解析した。全ての細胞株において、RalGAP $\alpha 1$ や $\alpha 2$ の knockdown では、Ral の活性上昇はあまりみられなかったが、RalGAP β の knockdown では Ral の活性上昇を確認できた(図 5a-c)。その傾向は PANC-1 と MIA PaCa-2 において顕著であった(図 5a-c)。

そこで、膵癌細胞株において、RalGAP β の発現抑制株を作成し、Ral の活性が上昇した状態での phenotype の解析や *in vivo* での解析を行う方針とした。発現抑制株は、knockdown の結果を考慮して PANC-1、MIA PaCa-2 を用いることとし、CRISPR/Cas9 法により RalGAP β の knockout を行い樹立した(図 6a)。*RALGAPB* ゲノム配列の exon2 内にある、プロトスペーサー隣接モチーフ(proto-spacer adjacent motif: PAM)の直前に位置する 20 塩基の配列を、guide RNA のターゲット配列とした(図 6a)。

作成した RalGAP β の knockout 細胞株は、ガイド RNA の標的領域に目的とする indel mutation が入っていることをシーケンス解析にて確認した(図 6b)。PANC-1 および MIA PaCa-2 にて、多数の RalGAP β knockout 細胞株を樹立できたが、その中で indel mutation の異なる 3 種類ずつを選択した(図 6b)。また、Western blotting 法にて、RalGAP β のタンパク質の発現消失を確認した(図 7a, 9a)。

3. RalGAP β 発現抑制が Ral の活性や遊走能、浸潤能、増殖能へ与える影響

RalGAP β の knockout MIA PaCa-2 細胞株に対して、Western blotting を行うと、RalGAP β の発現低下に伴い、RalGAP $\alpha 1$ 、RalGAP $\alpha 2$ の発現も低下していた(図 7a)。また、pull-down assay にて Ral の活性を解析すると、Control と比較して、RalA、RalB の活性は著明に上昇していた(図 7a)。

Ral の活性上昇は遊走能や浸潤能を促進し得ることが報告されている^{8, 13, 15, 17}。そこで膵癌細胞株においても、scratch assay で遊走能を確認した。その結果、RalGAP β knockout MIA PaCa-2 細胞株では、コントロールと比べ有意に遊走能が上昇した(図 7b-c)。さらにポイデンチャンバー法を用いて、遊走能および浸潤能を確認したところ、RalGAP β knockout MIA PaCa-2 細胞株において有意に遊走能、浸潤能の上昇を認めた(図 7d-g)。以上より、膵癌細胞において RalGAP の発現低下は、Ral の活性上昇を介して遊走能、浸潤能を亢進させることが示唆された。また、増殖能を確認するため、Z1 Coulter Counter を用いた cell

counting にて、MIA PaCa-2 細胞を用いて proliferation assay を行った。Control と RalGAP β knockout 細胞株間で、増殖能には有意な差を認めなかった(図 8a-b)。

RalGAP β knockout 細胞株で見られた現象が、knockout に伴うオフターゲット効果ではないことを確認する為、RalGAP β knockout MIA PaCa-2 細胞株に RalGAP β を発現させる Rescue 実験を行った。RalGAP β の発現量は Western blotting にて、Control と同程度まで回復していることを確認した(図 8c)。RalGAP β の発現の回復に伴い、RalGAP α 1、RalGAP α 2 の発現は Control と同程度まで回復し、Ral の活性も減少した(図 8c)。scratch assay で遊走能を確認すると、RalGAP β の knockout により上昇した遊走能は、Rescue により低下を認めた(図 8d-e)。

また、PANC-1 を用いて同様の実験を行ったが、MIA PaCa-2 細胞と同様の結果が得られた(図 9, 10)。

4. RalGAP β 発現抑制が細胞形態や Rho ファミリーGTPase に与える影響

RalGAP β の knockout が細胞の形態学的な変化に及ぼす影響について、Rhodamine Phalloidin 染色を行い評価した。Control 細胞や Rescue 細胞では、細胞は円形な形を示したのに対し、RalGAP β を knockout した細胞株では、細胞の辺縁に filopodia や lamellipodia 様の構造が出現した(図 11a)。Small GTPase の Rho ファミリーは細胞の形態や遊走能に影響

響を及ぼし、一般的に Rac1 は lamellipodia、Cdc42 は filopodia に関与しているとの報告がある^{20, 21, 22)}。lamellipodia や filopodia などの細胞の形態学的な変化は、細胞の遊走能や浸潤能に影響することが言われている²³⁾。そこで、Ral の活性が他の small GTPase の活性に影響を及ぼしているのかどうかを pull down assay にて評価すると、Rac1 や Cdc42 の活性が RalGAP β を knockout した細胞株にて上昇していた(図 11b, c)。一方、Ras と RhoA の活性は上昇していなかった(図 11b, c)。以上より、Ral の活性上昇を介して、Rac1 や Cdc42 の活性が上昇したことが、細胞の形態学的な変化や遊走能上昇などの phenotype を示した原因の一つであることが示唆された。

5. RalGAP β の腫瘍形成、転移能への影響

RalGAP の knockout が *in vivo* ではどのような影響を及ぼすのか、ヌードマウスの皮下組織および脾臓組織へ、RalGAP β knockout MIA PaCa-2 とその Control 細胞の癌細胞移植を行い検証した。

細胞株の皮下注実験では、1 週間毎にサイズを計測し、9 週間後に腫瘍を摘出して重量を計測した。*in vitro* では細胞増殖能に有意な差は認めなかったが、*in vivo* においては RalGAP β knockout 細胞において腫瘍の大きさは有意に増大していた($P < 0.05$ 、図 12 a-c)。生体内における腫瘍の成長を、Ral が制御している可能性が示唆された。

脾臓注入実験では、1週間毎にルシフェリンを腹腔内投与し、IVIS を用いて脾臓注入部および肝転移巣のシグナルの変化を観察した。Control に比較して RalGAP β knockout 細胞株を投与したマウスでは、脾臓および肝臓でのシグナルが上昇していた(図 13 a)。

6週間後に開腹して、脾臓のサイズおよび重量、肝転移巣の個数を目視にて確認した。

RalGAP β knockout 細胞を投与した群では、脾臓のサイズおよび重量は、Control に比較し有意に増大していた(図 13 b, c)。摘出した脾臓についてヘマトキシリン-エオジン染色を行い観察すると、RalGAP β knockout 細胞を投与した脾臓では、一部中心部に壊死組織も伴うような所見を認め、移植巣の細胞増殖がより速いことが示唆された(図 14b)。一方 Control では、腫瘍の局在がはっきりしないものも多く、生着能や増殖能が低い可能性が示唆された(図 14a)。

表面から目視で観察された肝転移個数についても、RalGAP β knockout 細胞を投与した群において、有意に増加していた(図 13 d, e)。腹膜播種については、Control では認めなかったのに対し、RalGAP β knockout では半数の症例に認められた(図 13 f, g)。以上より、脾臓細胞において RalGAP の発現が低下すると、移植巣および転移巣の腫瘍形成能、および転移能が高まる可能性が示唆された。

6. 臨床検体での RalGAP の発現量、および Ral の活性化の解析

これまで細胞株を使用して実験を行ってきたが、実際の臨床検体では RalGAP の発現や Ral の活性化はどのようになっているのか、解析を行った(図 15a, b)。定量 PCR にて mRNA レベルでの発現量を比較すると、隣正常部に比較して腫瘍部において RalGAP の発現量は $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 β 全てにおいて低下する傾向を認めた(図 15a)。一方、臨床検体において pull-down assay および Western blotting を行うと、Ral の活性については、既報の通り腫瘍部においてより上昇する傾向を認めていた(図 15b)¹⁴⁾。しかし、RalGAP の発現量については、必ずしも腫瘍部において発現が低下しているという傾向は認められなかった(図 15b)。

VI. 考察

膵癌では *KRAS* 活性型変異を有しているものがほとんどであるが、*Ral* はその *Ras* の下流で活性化される (図 1)^{1, 2, 5)}。今回使用した 6 つの膵癌細胞株のうち、5 種類では *KRAS* 遺伝子の変異を認めていた (図 3)。BxPC-3 での *Ral* の活性は他に比べるとやや低かったが、これは *KRAS* 遺伝子変異が存在していないことが影響している可能性がある (図 4a)。しかし、*KRAS* 遺伝子変異が存在していたとしても、*Ral* の活性があまり上昇していない細胞株もあり、これらの結果は *KRAS* 変異が *Ral* の活性を決定する唯一の要因ではない可能性を示唆している (図 4a)。一方、*Ral* の活性は、*RalGAP* の発現レベルが低いもので上昇する傾向を示したが、*RalGEF* については一定の相関を認めなかった (図 4a, c)。

RalGAP $\alpha 1$ および *RalGAP* $\alpha 2$ の発現レベルは、細胞および組織において様々である。例えば、*RalGAP* $\alpha 1$ は脳で、*RalGAP* $\alpha 2$ は肝臓や膀胱、肺で優位に発現している^{7, 8)}。6 つの膵癌細胞株の中では、PANC-1、MIA PaCa-2、SUIT-2、SW-1990 は *RalGAP* $\alpha 1$ が、AsPC-1 と BxPC-3 細胞は *RalGAP* $\alpha 2$ が優位に発現しており (図 4b)、膵癌における触媒サブユニットの発現の優位性は様々であることが示唆された。

本研究では siRNA にて *RalGAP* $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 β の knockdown を行ったところ、*RalGAP* β の knockdown にて最も *Ral* の活性上昇が見られたことから (図 5)、*RalGAP* β を knockout した細胞株を作成し、各種実験に使用した (図 6)。*RalGAP* の共通サブユニットである *RalGAP*

β を knockout すると、触媒サブユニットである RalGAP α 1 と RalGAP α 2 の両方の発現も大幅に低下した(図 7a, 9a)。一方、既報では、RalGAP α の発現を低下させると、RalGAP β の発現も低下したという報告があり⁸⁾、RalGAP は α サブユニットと β サブユニットの両方が、細胞内での安定した存在のために、相互に必要であると考えられた。

RalGAP β を knockout した細胞の Ral の活性は、Control と比較して PANC-1 は 5.37~7.08 倍、MIA PaCa-2 は 2.54~3.13 倍上昇していた(図 7a, 9a)。活性型の *RAL* 遺伝子変異はほとんど無く²⁴⁾、Ral の活性は RalGEF や RalGAP などの調節タンパク質の発現レベルによって強く調節されている可能性がある。

膵癌細胞では、RalGAP β を knockout することで Ral の活性が上昇すると、膀胱癌細胞⁸⁾ や口腔癌細胞¹⁷⁾ で以前に観察されたように、*in vitro* での遊走能や浸潤能が上昇した(図 7b-g, 図 9b-g)。また、Ral の活性が上昇することで、細胞の辺縁に filopodia や lamellipodia 様の構造が出現した(図 11a)。Ral の活性が低下すると、細胞は丸みを帯び、逆に上昇すると突起様の構造を形成するとの報告もある⁸⁾。今回の実験では Ral の活性上昇に伴い、それとは逆の現象が生じたと考えられた。RalGAP β knockout 細胞では、Rac1 や Cdc42 の活性が Control と比較して上昇していたが、Ras と RhoA の活性は上昇していなかった(図 11b, c)。Ras は Ral の上流、RhoA は異なるシグナル伝達経路に存在しており、Ral の活性の直接的な影響は受けなかったものと思われた。一般的に Rac1 は lamellipodia、Cdc42 は

filopodia に関与し、細胞の形態学的な変化は遊走や浸潤に関与するとの報告があり^{22, 23)}、
Ral 活性上昇に伴う Rac1 と Cdc42 の活性上昇は、細胞の運動性と浸潤能力の向上に寄与
した可能性がある。Ral のエフェクターである RalBP1 は、Rac1 および Cdc42 に対して GAP
活性を有することが示されている^{21, 25)}。活性化した Ral の RalBP1 への結合は、*in vitro* で
は RalBP1 の Rac および Cdc42 に対する GAP 活性に影響を及ぼさないが、RalBP1 の局在
が変化することで Rac1 および Cdc42 の GAP としての影響を低下させ、Rac1 および Cdc42
の活性を増強することができるとの報告がある²⁶⁾。RalBP1 関与の可能性がある一方、Ral
はエフェクターである Exocyst 複合体を介して小胞輸送を亢進し、遊走先端に膜の供給を
促進することで、遊走能を亢進するとの報告もある²²⁾。また、RalBP1 や Exocyst 複合体以
外の Ral のエフェクターとしては、Filamin A が filopodia 形成に、ZO-1-associated nucleic
acid binding (ZONAB) が増殖能に関与するとの報告もある¹²⁾。

RalA はヒト癌細胞株の *in vivo* での増殖には重要だが、*in vitro* では細胞の生存と増殖に
ほとんど影響を与えないとの報告がある⁴⁾。実際、本研究でも RalGAP β を knockout して
RalA の活性を上昇させても、*in vitro* (培養 dish 上) では増殖能の上昇は認めなかった(図
8a, b, 図 10a, b)。一方、RalGAP β knockout 細胞株を、ヌードマウスの皮下および脾臓に
移植した場合、Control と比較して腫瘍の大きさは著しく大きかった(図 12a-c, 図 13a-c)。
RalGAP $\alpha 2$ knockout マウスで化学発癌により形成された膀胱腫瘍のサイズは、野生型マ

ウスのサイズよりも有意に増大したとの報告もあり⁸⁾、RalGAP の発現低下は *in vivo* における腫瘍形成を促進する可能性がある。正確なメカニズムはまだ分かっていないが、Ral エフェクターの 1 つである RalBP1 欠損マウスは、腫瘍血管新生が阻害されるとの報告もあり、RalGAP の発現低下により Ral の活性が上昇することで、腫瘍血管新生が促進されている可能性がある²⁷⁾。

RalGAP β knockout 膵癌細胞を脾臓に移植した場合、Control と比較して肝転移数が有意に増加し、腹膜播種も半数で認められた(図 13d-g)。Ral の活性上昇が前立腺癌の骨転移を促進することや²⁸⁾、RalGAP $\alpha 2$ が過剰発現した膀胱癌細胞をマウスに静脈内注射すると、肺転移が有意に少なくなるとの報告もあり⁸⁾、Ral は様々な癌の転移に関与していることが示唆される。

臨床検体における解析の結果では、mRNA レベルでは RalGAP の発現量が膵正常部に比較して腫瘍部において低下する傾向を認めていた(図 15a)。また、腫瘍部においては Ral の活性が、RalA、RalB 共に膵正常部と比較して高くなる傾向を認めていた(図 15b)。

RalGAP の蛋白レベルでの発現量は様々であり、Ral の活性は RalGAP だけでなく、RalGEF や Ras の活性などが総合的に影響している可能性が示唆された(図 15b)。

最近、Ral 阻害剤が膵癌の抗腫瘍薬として開発が進んでいるとの報告もある²⁹⁾。今回作成した RalGAP β knockout 膵癌細胞移植モデルは、Ral 依存性の腫瘍形成や転移に影響す

る薬剤を評価するための良いモデルになる可能性がある。膵癌は最も予後が悪い癌の一つと言われているが、Ral 阻害剤を含めた新規治療薬の開発が進むことで、予後の改善に繋がるのではないかと考える。

VII. 結論

RalGAP β knockout によって、Ral の活性は RalA、RalB 共に上昇し、膵癌細胞の *in vitro* における遊走能・浸潤能、*iv vivo* における腫瘍形成能および転移能を促進した。

VIII. 謝辞

研究を遂行するにあたり、堀内久徳教授（東北大学 基礎加齢研究分野 堀内研究室）、白川龍太郎助教(東北大学 基礎加齢研究分野 堀内研究室)に多大なる御指導、御教授をいただきましたことに深甚なる感謝の意を申し上げます。また、様々なご指導、ご教授をいただいた堀内研究室の皆様感謝申し上げます。海野倫明教授（東北大学大学院医学系研究科・消化器外科学分野）にご指導をいただき、また、基礎加齢研究分野で研究を行う機会を与えていただいたことに、厚く御礼申し上げます。

IX. 文献

1. Hansel DE, Kern SE, Hruban RH. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2003;4:237-56.
2. Lu L, Zeng J. Evaluation of Kras and p53 expression in pancreatic adenocarcinoma using the cancer genome atlas. *PLoS One.* 2017; doi:10.1371/journal.pone.0181532.
3. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, et al. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature.* 1999;400:464-8.
4. Lim KH, Baines AT, Fiordalisi JJ, et al. Activation of RalA is critical for Ras-induced tumorigenesis of human cells. *Cancer Cell.* 2005;7:533-45.
5. Shirakawa R, Horiuchi H. Ral GTPases: crucial mediators of exocytosis and tumourigenesis. *J Biochem.* 2015;157:285-99.
6. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell.* 2007;129:865-77.
7. Shirakawa R, Fukai S, Kawato M, et al. Tuberous sclerosis tumor suppressor complex-like complexes act as GTPase-activating proteins for Ral GTPases. *J Biol Chem.* 2009;284:21580-8.
8. Saito R, Shirakawa R, Nishiyama H, et al. Downregulation of Ral GTPase-activating protein promotes tumor invasion and metastasis of bladder cancer. *Oncogene.* 2013;32:894-902.
9. Synek L, Sekeres J, Zarsky V. The exocyst at the interface between cytoskeleton and membranes in eukaryotic cells. *Front Plant Sci.* 2014; doi:10.3389/fpls.2013.00543.
10. Balasubramanian N, Meier JA, Scott DW, et al. RalA-exocyst complex regulates integrin-dependent membrane raft exocytosis and growth signaling. *Curr Biol.* 2010;20:75-9.

11. Yan C, Theodorescu D. RAL GTPases: biology and potential as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Rev.* 2018;70:1-11
12. Guin S, Theodorescu D. The RAS-RAL axis in cancer: evidence for mutation-specific selectivity in non-small cell lung cancer. *Acta Pharmacol Sin.* 2015;36:291-7.
13. Yang Q, Lang C, Wu Z, et al. MAZ promotes prostate cancer bone metastasis through transcriptionally activating the KRas-dependent RalGEFs pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019; doi:10.1186/s13046-019-1374-x.
14. Lim KH, O'Hayer K, Adam SJ, et al. Divergent roles for RalA and RalB in malignant growth of human pancreatic carcinoma cells. *Curr Biol.* 2006;16:2385-94.
15. Vigil D, Martin TD, Williams F, et al. Aberrant overexpression of the Rgl2 Ral small GTPase-specific guanine nucleotide exchange factor promotes pancreatic cancer growth through Ral-dependent and Ral-independent mechanisms. *J Biol Chem.* 2010;285:34729-40.
16. Yaoita N, Shirakawa R, Fukumoto Y, et al. Platelets are highly activated in patients of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:2486-94.
17. Gao P, Liu S, Yoshida R, et al. Ral GTPase activation by downregulation of RalGAP enhances oral squamous cell carcinoma progression. *J Dent Res.* 2019;98:1011-19.
18. Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8:2281-308.
19. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989;49:4682-9.
20. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998;279:509-14.
21. Jullien-Flores V, Dorseuil O, Romero F, et al. Bridging Ral GTPase to Rho pathways. RLIP76, a Ral effector with CDC42/Rac GTPase-activating protein activity. *J Biol Chem.* 1995;270:22473-7.

22. Zuo X, Zhang J, Zhang Y, et al. Exo70 interacts with the Arp2/3 complex and regulates cell migration. *Nat Cell Biol.* 2006;8:1383-8.
23. Alblazi KM, Siar CH. Cellular protrusions--lamellipodia, filopodia, invadopodia and podosomes--and their roles in progression of orofacial tumours: current understanding. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16:2187-91.
24. Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, Der CJ. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer.* 2010;10:842-57.
25. Cantor SB, Urano T, Feig LA. Identification and characterization of Ral-binding protein 1, a potential downstream target of Ral GTPases. *Mol Cell Biol.* 1995;15:4578-84.
26. Matsubara K, Hinoi T, Koyama S, Kikuchi A. The post-translational modifications of Ral and Rac1 are important for the action of Ral-binding protein 1, a putative effector protein of Ral. *FEBS Lett.* 1997;410:169-74.
27. Lee S, Wurtzel JG, Singhal SS, et al. RALBP1/RLIP76 depletion in mice suppresses tumor growth by inhibiting tumor neovascularization. *Cancer Res.* 2012;72:5165-73.
28. Yang Q, Lang C, Wu Z, et al. MAZ promotes prostate cancer bone metastasis through transcriptionally activating the KRas-dependent RalGEFs pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019; doi:10.1186/s13046-019-1374-x.
29. Feldmann G, Mishra A, Hong SM, et al. Inhibiting the cyclin-dependent kinase CDK5 blocks pancreatic cancer formation and progression through the suppression of Ras-Ral signaling. *Cancer Res.* 2010;70:4460-9.

X. 図説

図 1. Ral signaling pathway についての模式図⁵⁾

図 2. Ral、RalGEF、RalGAP の種類と構造について⁵⁾

(a) RalA、RalB

(b) RalGDS、RGL1、RGL2、RGL3、RalGPS1、RalGPS2

RalGDS: Ral guanine nucleotide dissociation stimulator

RGL: RalGDS-like

RalGPS: Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif

RA: Ras-association

REM: Ras exchange motif

PH: pleckstrin homology

Cdc: cell division cycle

(c) RalGAP α 1、RalGAP α 2、RalGAP β

図 3. 膵癌細胞株における *HRAS*、*NRAS*、*KRAS* 変異の評価

HRAS、*NRAS*、*KRAS* 遺伝子について、G12、G13、A59、Q61、K117、A146 などの hot spot を含めた変異の有無について、シーケンスにて解析した結果を示す。

図 4. 膵癌細胞株における RalGAP および RalGEF 発現量、Ral 活性化の解析

(a) 膵癌細胞株 6 種類における RalGAP の発現量、内部標準として GAPDH、および pull-down assay による RalA、RalB 活性化の Western blotting 像を示す。

(b) 膵癌細胞株 6 種類における RalGAP α 1 抗体、RalGAP α 2 抗体、control IgG を用いた共免疫沈降の Western blotting 像を示す。RalGAP α 1 と RalGAP α 2 の存在比率を数値化して示した。

(c) 定量 PCR 法により検出した RalGAP (α 1、 α 2、 β) および RalGEF (RGL1、RGL2、RGL3、RalGPS1、RalGPS2、RalGDS) の発現量を示す。同様の実験を独立して 3 回繰り返し、カラム図には標準誤差をバーとして示した。

図 5. RalGAP β の knockdown は Ral の活性を上昇させる

(a) PANC-1 の RalGAP α 1、 α 2、 β の knockdown 細胞株、およびその対象細胞 (blank もしくは siRNA control) における、RalGAP の発現量、内部標準として GAPDH、および pull-down assay による RalA、RalB 活性化の Western blotting 像を示す。

(b) MIA PaCa-2 の RalGAP $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 β の knockdown 細胞株、およびその対象細胞 (blank もしくは siRNA control) における、RalGAP の発現量、内部標準として GAPDH、および pull-down assay による RalA、RalB 活性化の Western blotting 像を示す。

(c) SUIT-2 の RalGAP $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 β の knockdown 細胞株、およびその対象細胞 (blank もしくは siRNA control) における、RalGAP の発現量、内部標準として GAPDH、および pull-down assay による RalA、RalB 活性化の Western blotting 像を示す。

図 6. PANC-1、MIA PaCa-2 RalGAP β knockout 細胞株の作成

(a) RalGAP β 遺伝子の Exon2 に含まれる開始コドン、および guide RNA のターゲット配列、proto-spacer adjacent motif (PAM)配列を示す。

(b) PANC-1、MIA PaCa-2 の RalGAP β knockout 細胞株について、allele の indel mutation の情報を示す。

図 7. RalGAP β の knockout は Ral 活性化および遊走能・浸潤能を上昇させる (MIA

PaCa-2)

(a) MIA PaCa-2 の RalGAP β knockout (KO) 細胞株、およびその Control 細胞における、RalGAP の発現量、内部標準として GAPDH、および pull-down assay による RalA、RalB 活

性化の Western blotting 像を示す。数値は Total-RalA、RalB に対する、GTP-RalA、RalB のそれぞれの存在比率を、Control 細胞を 1 とした時の比率で示した。

(b-c) MIA PaCa-2 の RalGAP β knockout 細胞株、およびその Control 細胞における、Scratch assay の代表的な顕微鏡像を示す(b)。スケールは 100 μ m を示す。計測した細胞の移動度をカラム図で表し、標準誤差をバーとして示した(c)。(** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$)。

(d-g) MIA PaCa-2 の RalGAP β knockout 細胞株、およびその Control 細胞における、Transwell migration assay (d)と invasion assay (f)の代表的な顕微鏡像を示す。遊走もしくは浸潤した細胞数をカラム図で表し、標準誤差をバーとして示した(e, g)。スケールは 100 μ m を示す。(* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$)。同様の実験を独立して 3 回繰り返した。

図 8. Ral 活性化が *in vitro* での増殖能に及ぼす影響、および RalGAP β の rescue 実験の

結果 (MIA PaCa-2)

(a, b) MIA PaCa-2 の RalGAP β knockout (KO) 細胞株、およびその Control 細胞の細胞数を、1、3、5、7 日目に経時的に計測することで、細胞増殖の変化を折れ線グラフとして示

す(a)。また、7日目の細胞数をカラム図で表した(b)。標準誤差をバーとして示す (n.s. : not significant)。

(c) MIA PaCa-2 の RalGAP β knockout 細胞株、RalGAP β Rescue 細胞およびその Control 細胞における、RalGAP の発現量、内部標準として GAPDH、および pull-down assay による RalA、RalB 活性化の Western blotting 像を示す。数値は Total-RalA、RalB に対する、GTP-RalA、RalB のそれぞれの存在比率を、Control 細胞を 1 とした時の比率で示した。

(d-e) MIA PaCa-2 の RalGAP β knockout 細胞株、RalGAP β Rescue 細胞およびその Control 細胞における、Scratch assay の代表的な顕微鏡像を示す。スケールは 100 μ m を示す。計測した細胞の移動度をカラム図で表し、標準誤差をバーとして示した。 (***) : $P < 0.001$)。同様の実験を独立して 3 回繰り返した。

図 9. RalGAP β の knockout は Ral 活性化および遊走能・浸潤能を上昇させる (PANC-1)

(a) PANC-1 の RalGAP β knockout (KO) 細胞株、およびその Control 細胞における、RalGAP の発現量、内部標準として GAPDH、および pull-down assay による RalA、RalB 活性化の Western blotting 像を示す。数値は Total-RalA、RalB に対する、GTP-RalA、RalB のそれぞれの存在比率を、Control 細胞を 1 とした時の比率で示した。

(b-c) PANC-1 の RalGAP β knockout 細胞株、およびその Control 細胞における、Scratch assay の代表的な顕微鏡像を示す (b)。スケールは 100 μm を示す。計測した細胞の移動度をカラム図で表し、標準誤差をバーとして示した。(c) (** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$)。

(d-g) PANC-1 の RalGAP β knockout 細胞株、およびその Control 細胞における、Transwell migration assay (d)と invasion assay (f)の代表的な顕微鏡像を示す。遊走もしくは浸潤した細胞数をカラム図で表し、標準誤差をバーとして示した (e, g)。スケールは 100 μm を示す。(* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$)。同様の実験を独立して 3 回繰り返した。

図 10. Ral 活性化が *in vitro* での増殖能に及ぼす影響、および RalGAP β の rescue 実験の

結果 (PANC-1)

(a, b) PANC-1 の RalGAP β knockout (KO) 細胞株、およびその Control 細胞の細胞数を、1、3、5、7 日目に経時的に計測することで、細胞増殖の変化を折れ線グラフとして示す (a)。

また、7 日目の細胞数をカラム図で表した (b)。標準誤差をバーとして示す (n.s. : not significant)。

(c) PANC-1 の RalGAP β knockout 細胞株、RalGAP β Rescue 細胞およびその Control 細胞における、RalGAP の発現量、内部標準として GAPDH、および pull-down assay による

RalA、RalB 活性化の Western blotting 像を示す。数値は Total-RalA、RalB に対する、GTP-RalA、RalB のそれぞれの存在比率を、Control 細胞を 1 とした時の比率で示した。

(d, e) PANC-1 の RalGAP β knockout 細胞株、RalGAP β Rescue 細胞およびその Control 細胞における、Scratch assay の代表的な顕微鏡像を示す。スケールは 100 μm を示す。計測した細胞の移動度をカラム図で表し、標準誤差をバーとして示した。(n.s. : not significant , *** : $P < 0.001$)。同様の実験を独立して 3 回繰り返した。

図 11. RalGAP β の knockout は Rac1 と Cdc42 の活性上昇および細胞の形態変化を引き起こす

(a) MIA PaCa-2 の RalGAP β knockout (KO) 細胞株、RalGAP β Rescue 細胞およびその Control 細胞における、Rhodamine Phalloidin 染色の蛍光染色像を、共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP8 で観察した結果を示す。スケールは 10 μm を示している。矢印は filopodia 形成を示唆する箇所を示す。

(b) PaCa-2 の RalGAP β knockout 細胞株、RalGAP β Rescue 細胞およびその Control 細胞における、RalGAP β の発現量、pull-down assay による Ras、Rac1、RhoA、Cdc42 の活性化の Western blotting 像を示す。数値はそれぞれの small GTPase について、Total 量に対する GTP 型の存在比率を、Control 細胞を 1 とした時の比率で示した。

(c) PANC-1 の RalGAP β knockout 細胞株、RalGAP β Rescue 細胞およびその Control 細胞における、RalGAP β の発現量、pull-down assay による Ras、Rac1、RhoA、Cdc42 の活性化の Western blotting 像を示す。数値はそれぞれの small GTPase について、Total 量に対する GTP 型の存在比率を、Control 細胞を 1 とした時の比率で示した。

図 12. Ral 活性化は *in vivo* において腫瘍形成を促進する

- (a) RalGAP β knockout (KO) MIA PaCa-2 およびその Control 細胞を、ヌードマウス (n=12)の皮下へ移植し、1 週毎に 9 週間測定した皮下腫瘍のサイズの推移をグラフで示す。標準誤差をバーとして示した (*: P < 0.05)。
- (b) 9 週後に摘出した皮下腫瘍の重量をカラム図で表し、標準誤差をバーとして示した。 (*: P < 0.05)。
- (c) 9 週後の皮下に形成された腫瘍の代表例をそれぞれ示す。スケールは 10 mm を示している。

図 13. Ral 活性化は *in vivo* において、腫瘍形成だけでなく転移も促進する

- (a) RalGAP β knockout (KO) MIA PaCa-2 およびその Control 細胞を、ヌードマウス (RalGAP β knockout (KO) 細胞:n=16、Control 細胞:n=18)の脾臓へ移植し、6週間後に撮影した IVIS の画像所見の代表例を示す。
- (b) 6週間後に開腹した際の脾臓所見の代表例を示す。スケールは 10 mm を示している。
- (c)脾臓重量をカラム図で表し、標準誤差をバーとして示した。(** : P < 0.01)。
- (d) 6週間後に開腹した際の肝臓所見の代表例を示す。スケールは 10 mm を示している。
- (e) 肝転移個数をカラム図で表し、標準誤差をバーとして示した。(** : P < 0.01)。
- (f) 6週間後に開腹した際の腹膜播種所見の代表例を示す。スケールは 10 mm を示している。
- (g) 腹膜播種の有無についてカラム図で示す。

図 14. Xenograft model における組織像の違い

- (a) Control 細胞を脾臓に注入した時の組織像を示す。
- (b) RalGAP β knockout (KO) MIA PaCa-2 細胞を脾臓に注入した時の組織像を示す。

上段のスケールは 500 μ m、下段のスケールは 200 μ m を示している。

図 15. 臨床検体解析実験の結果

(a) 臨床検体において、定量 PCR 法により検出した RalGAP ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 β) の発現量を示す。N は腭正常部、T は腫瘍部から採取した検体の結果を示す。カラム図には標準誤差をバーとして示した。

(b) 臨床検体における RalGAP の発現量、内部標準として GAPDH、および pull-down assay による RalA、RalB 活性化の Western blotting 像を示す。N は腭正常部、T は腫瘍部から採取した検体の結果を示す。

XI. 略語一覽

- GTP: guanosine triphosphate
- Ras: rat sarcoma
- Ral: Ras like
- INK4A: inhibitors of cyclin-dependent kinase 4A
- RalBP1: Ral-binding protein 1
- GDP: guanosine diphosphate
- GEF: guanine nucleotide exchange factor
- GAP: GTPase-activating protein
- RalGDS: Ral guanine nucleotide dissociation stimulator
- RGL: RalGDS-like
- RalGPS: Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif
- RA: Ras-association
- REM: Ras exchange motif
- PH: pleckstrin homology
- Cdc: cell division cycle
- siRNA: small interfering RNA

• CRISPR-Cas9: clustered regularly interspaced short palindromic repeats – CRISPR

associated proteins 9

• sgRNA: single guide RNA

• PAM: proto-spacer adjacent motif

• MAPK: mitogen-activated protein kinase

• PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

• GST: glutathione S-transferase

• PCR: polymerase chain reaction

• GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

• Rac1: Ras-related C3 botulinus toxin substrate 1

• RhoA: Ras homolog gene family, member A

• Cdc42: cell division control protein 42 homolog

• HRP: horseradish peroxidase

• RalGDS: Ral guanine nucleotide dissociation stimulator

• RGL: RalGDS-like

• RalGPS: RalGEF with PH (pleckstrin homology) domain and SH3 (Src-homology) 3 binding

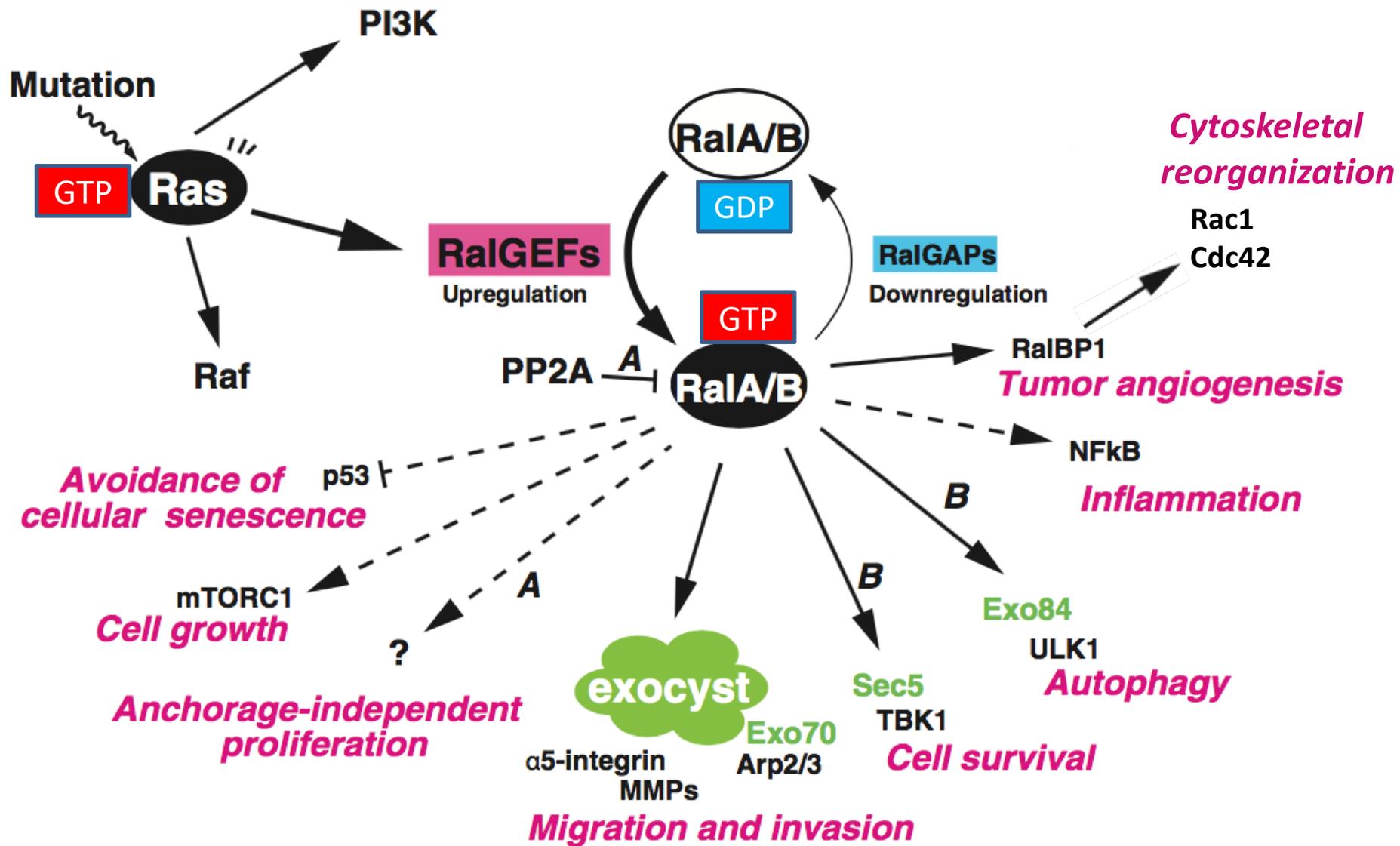
motif

•ZONAB :ZO-1-associated nucleic acid binding

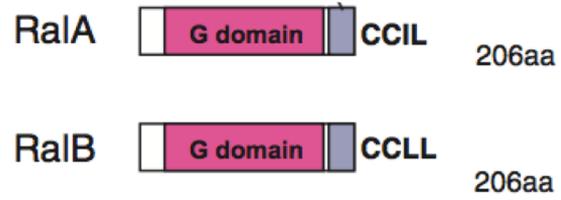
•IVIS : *in vivo* imaging system

•KO : knockout

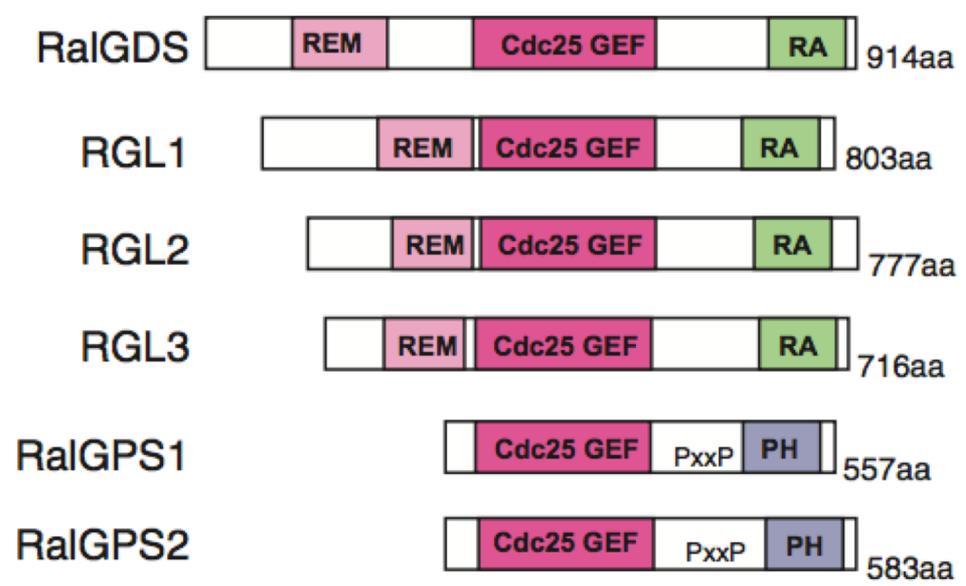
•n.s. : not significant



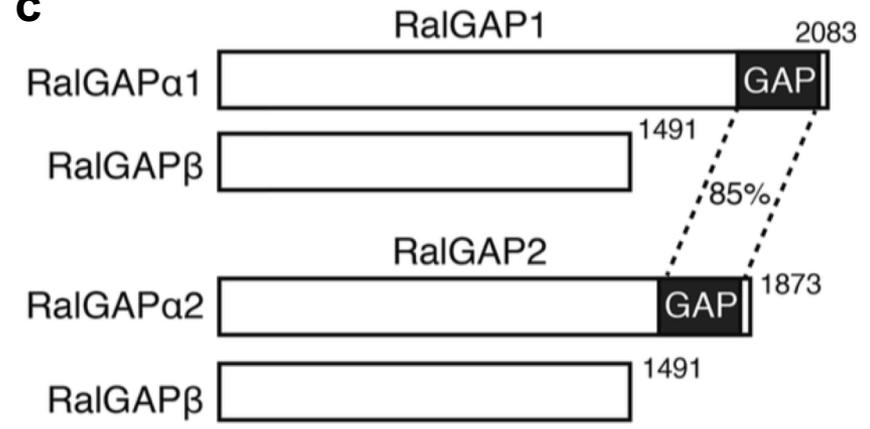
a



b



c

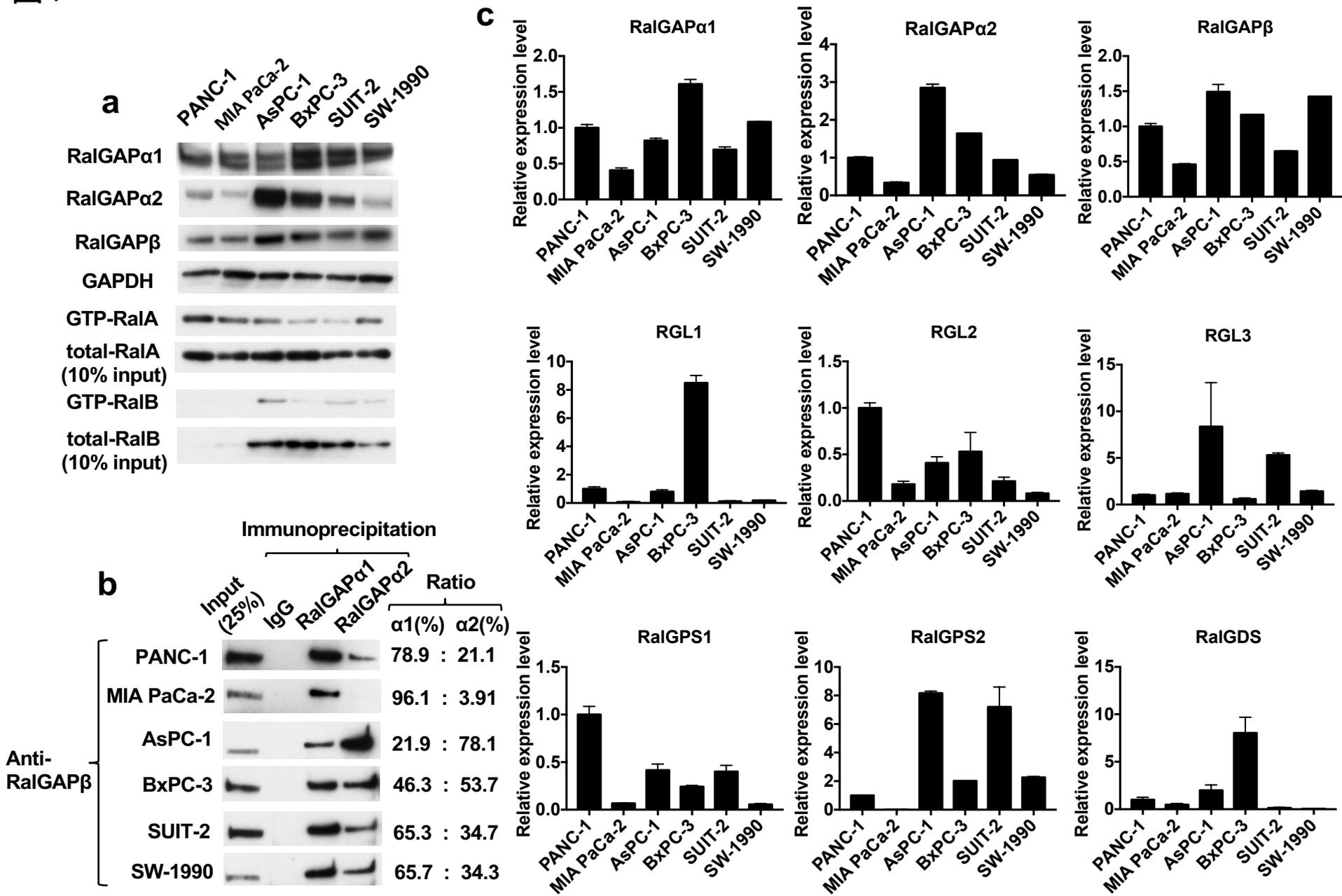


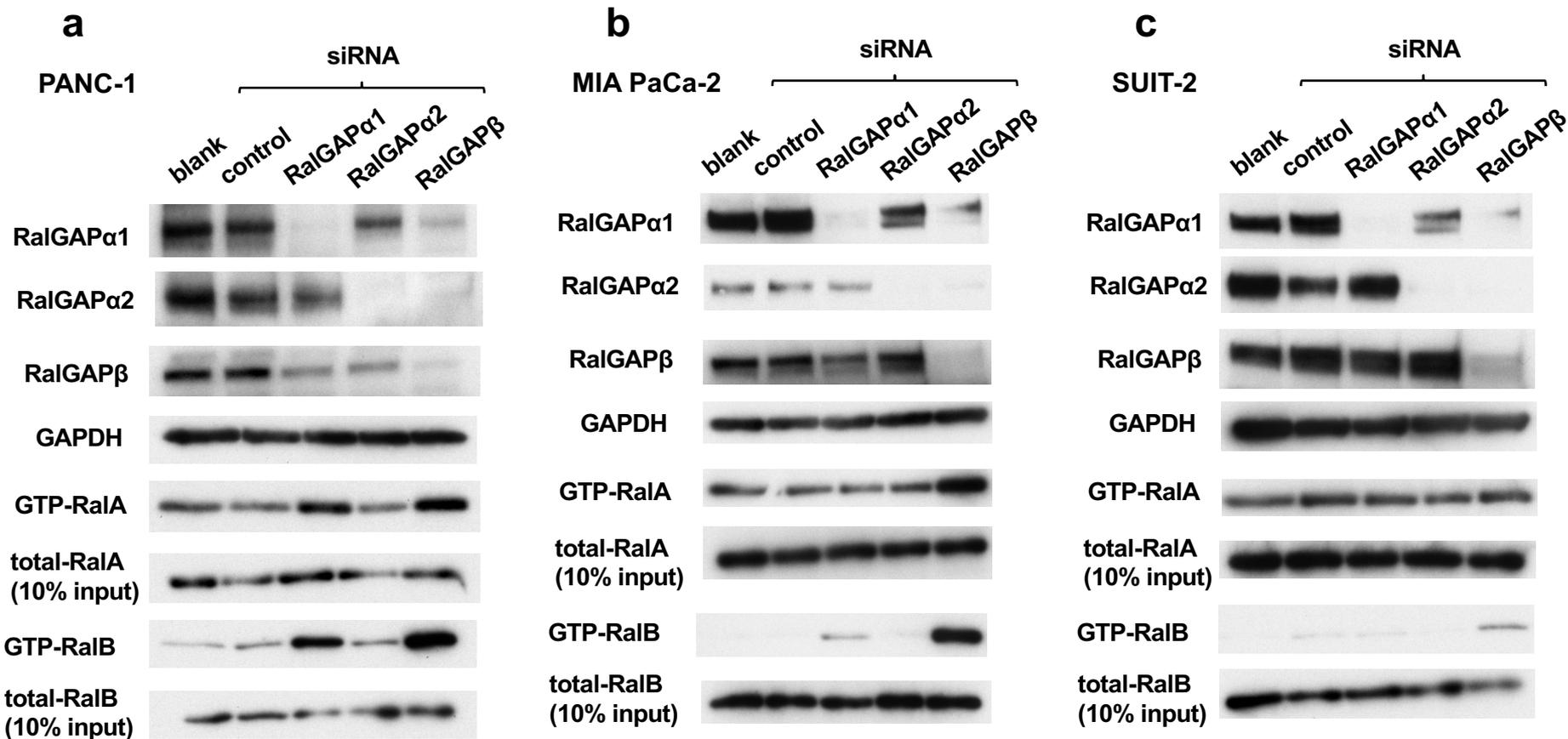
Cell lines	<i>HRAS</i>		<i>NRAS</i>		<i>KRAS</i>	
	SNP	AA mutation	SNP	AA mutation	SNP	AA mutation
PANC-1	H27H homo CAT→CAC	wild	wild	wild	G12D hetero GGT→GAT	G12D hetero
MIA PaCa-2	H27H hetero CAT→CAC	wild	wild	wild	G12C homo GGT→TGT	G12C homo
AsPC-1	wild	wild	wild	wild	G12D homo GGT→GAT	G12D homo
BxPC-3	H27H homo CAT→CAC	wild	wild	wild	wild	wild
SUIT-2	H27H homo CAT→CAC	wild	wild	wild	G12D hetero GGT→GAT	G12D hetero
SW-1990	wild	wild	wild	wild	G12D homo GGT→GAT	G12D homo

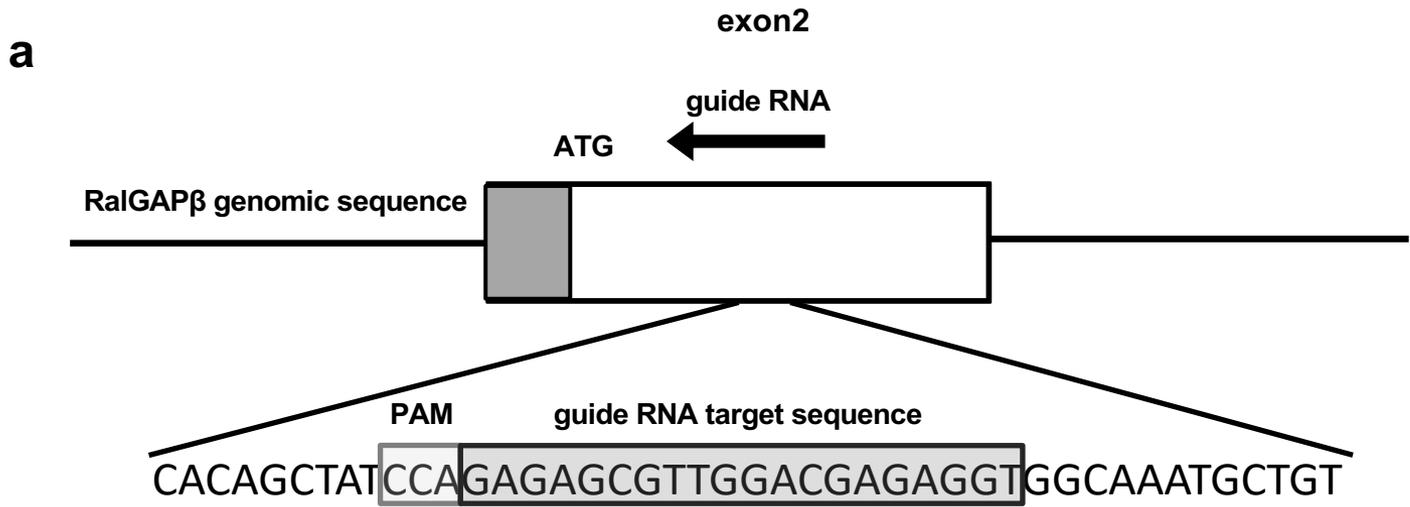
Amino acid mutations in hot spots, including G12, G13, A59, Q61, K117, A146 in HRAS, NRAS, and KRAS were evaluated.

SNP: single nucleotide polymorphism

AA: amino acid







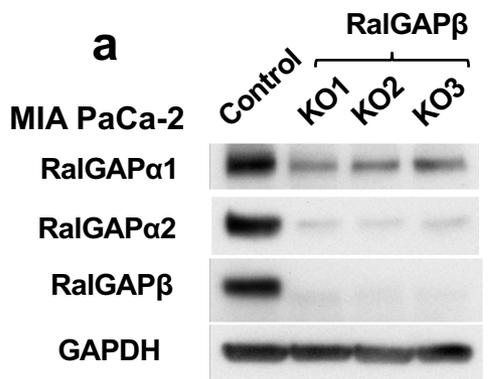
b

<PANC-1 RalGAPβ KO>

No	Allele1	Allele2
1	2 base deletion	1 base insertion
2	4 base deletion	1 base insertion
3	2 base deletion	1 base deletion

<MIA PaCa-2 RalGAPβ KO>

No	Allele1	Allele2
1	1 base insertion	1 base insertion
2	1 base deletion	1 base insertion
3	2 base insertion	2 base insertion

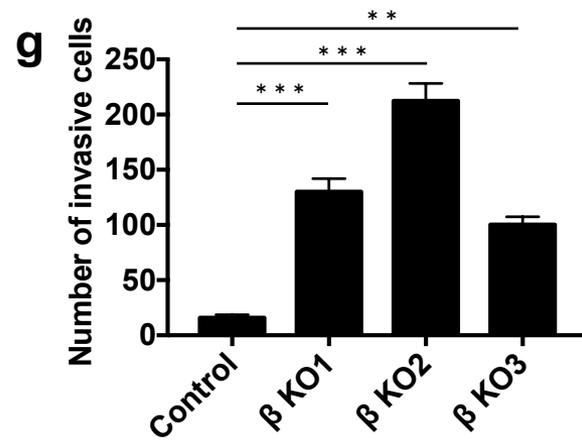
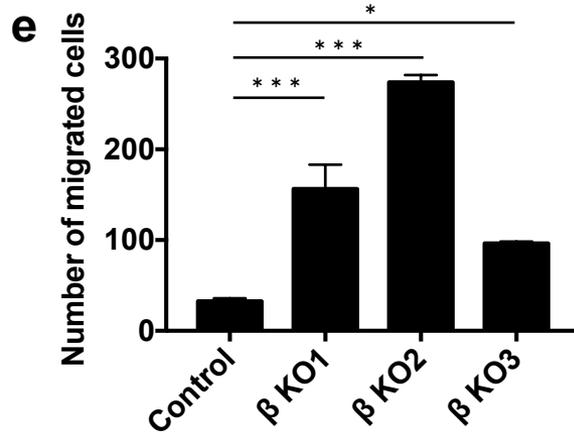
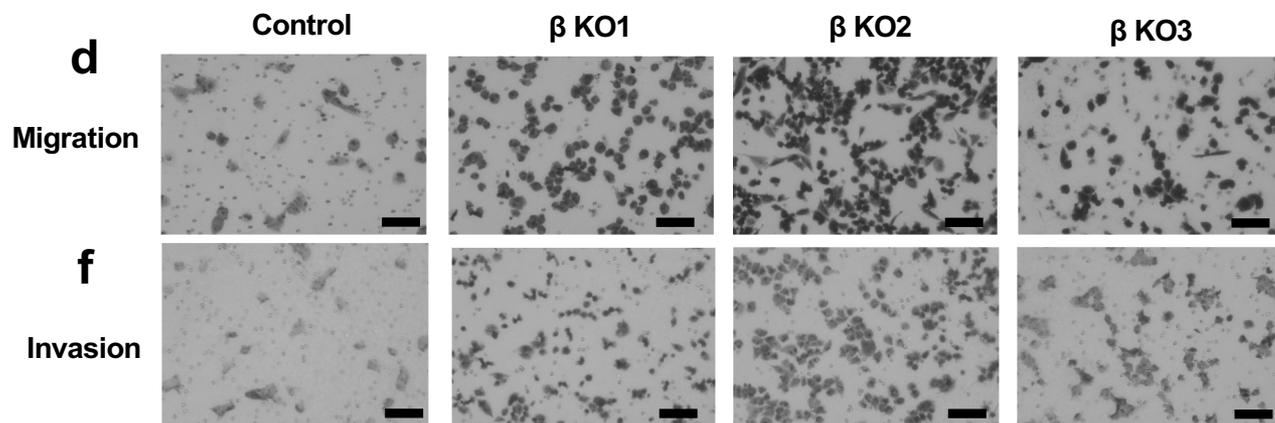
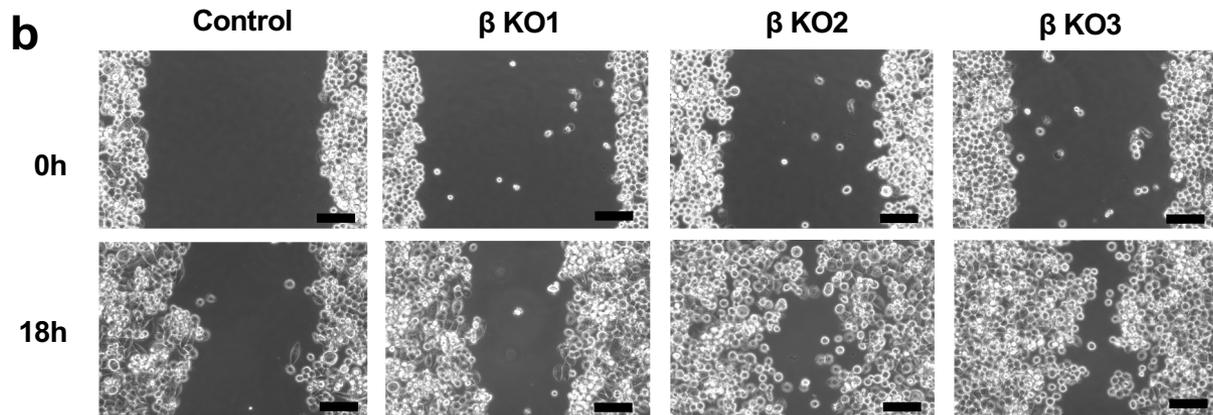
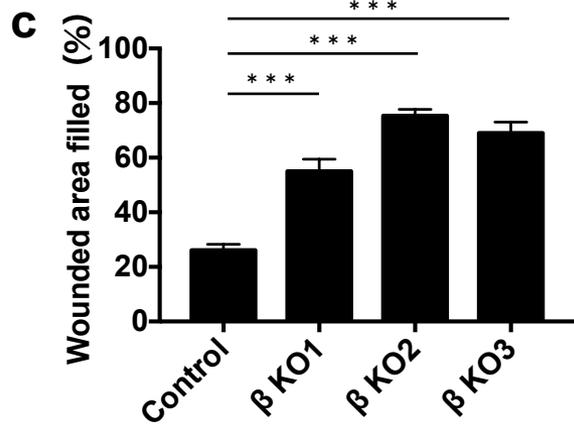


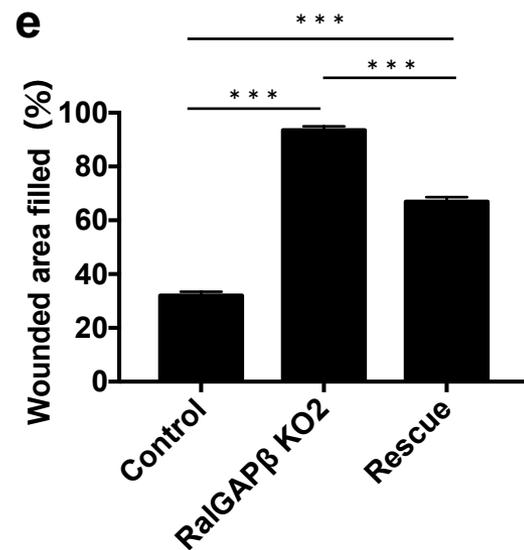
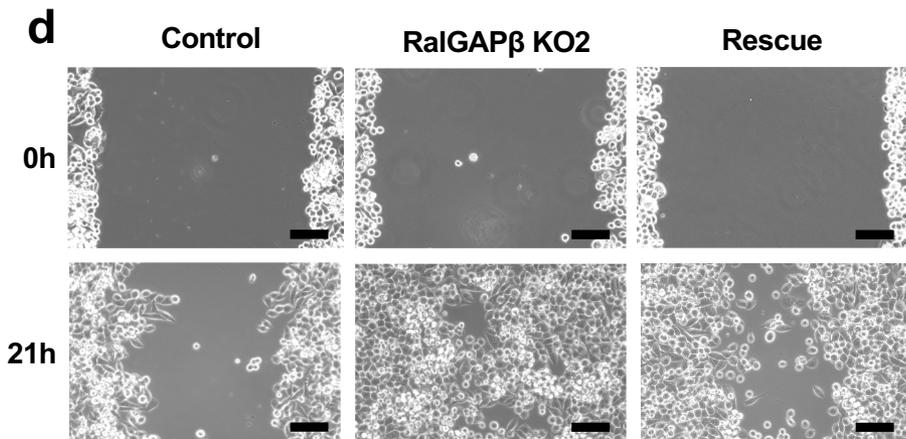
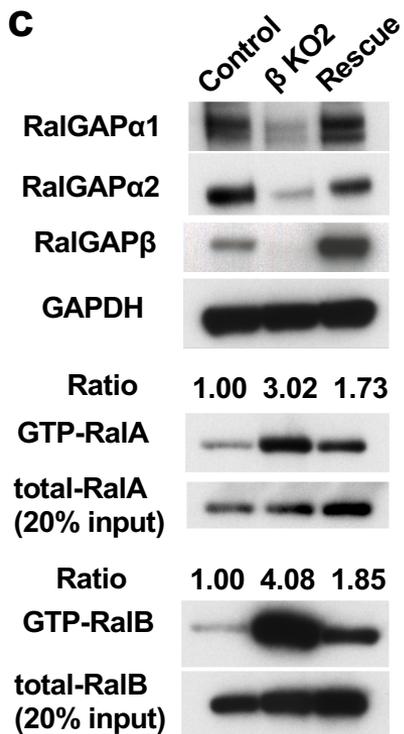
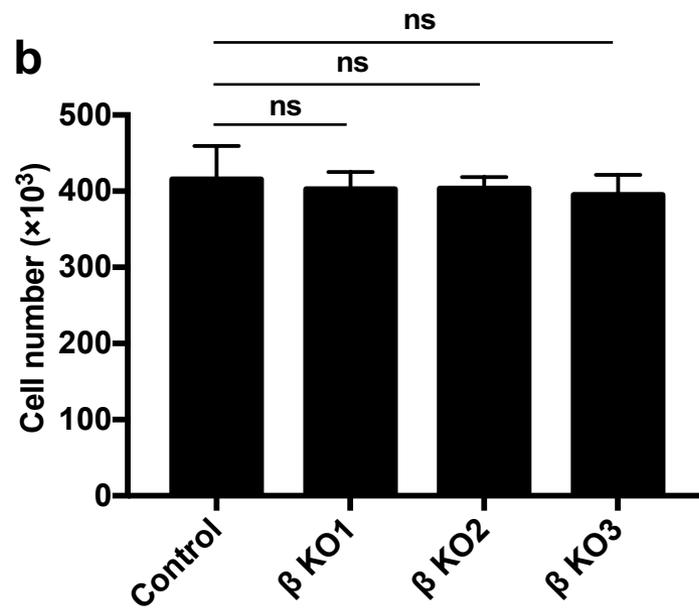
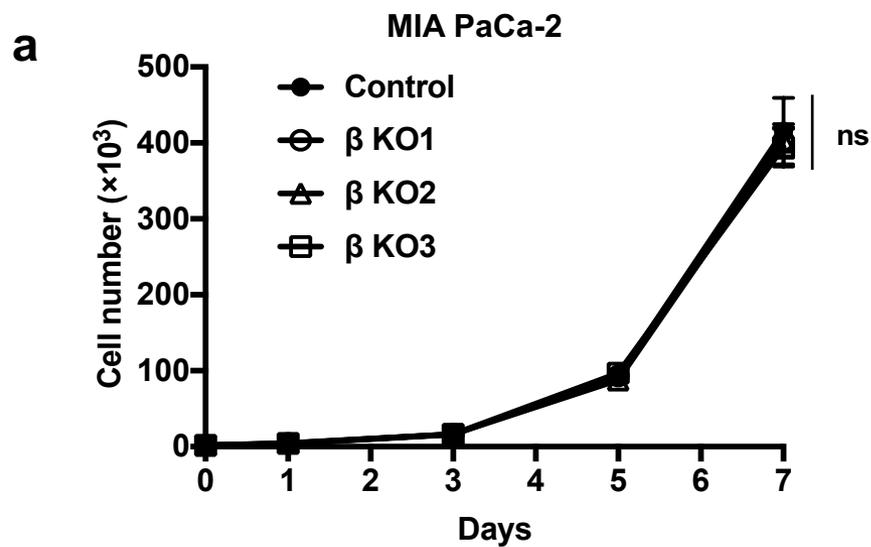
Ratio 1.00 2.82 3.04 2.54

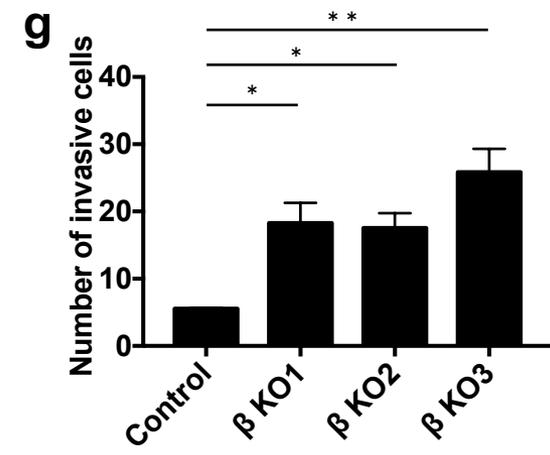
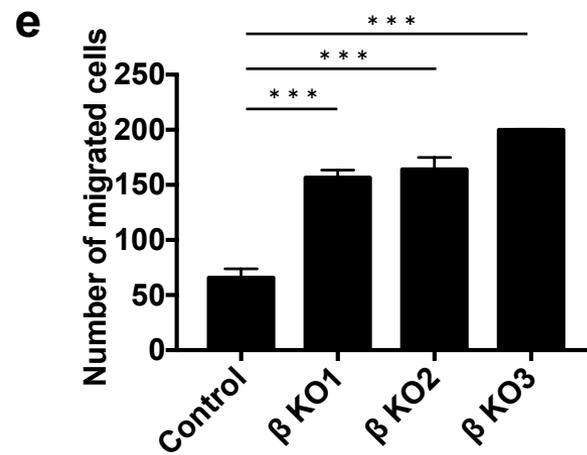
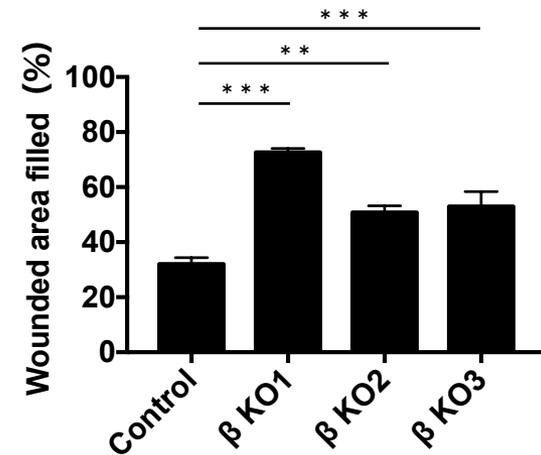
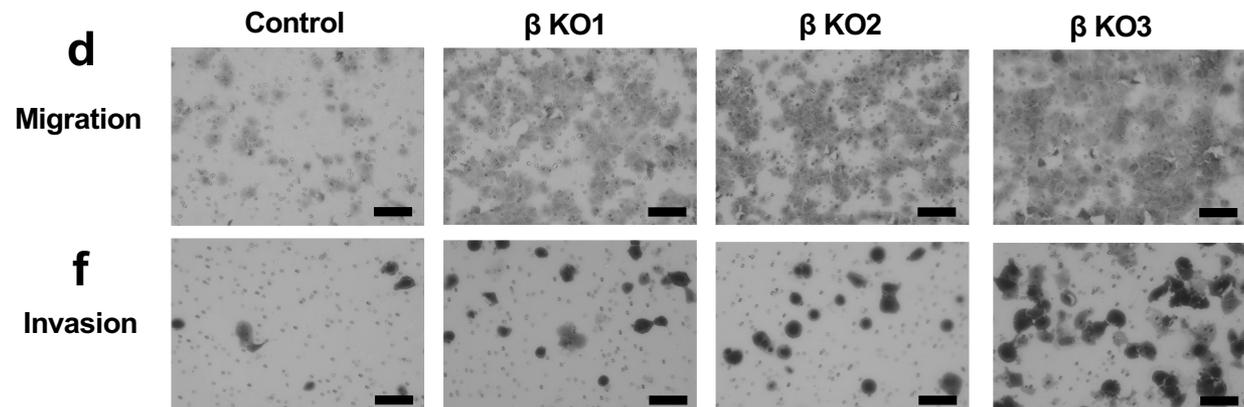
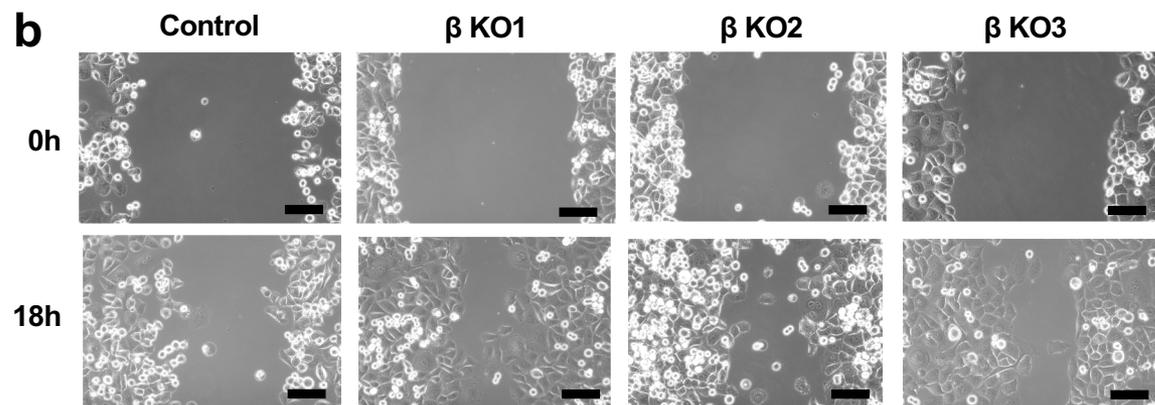
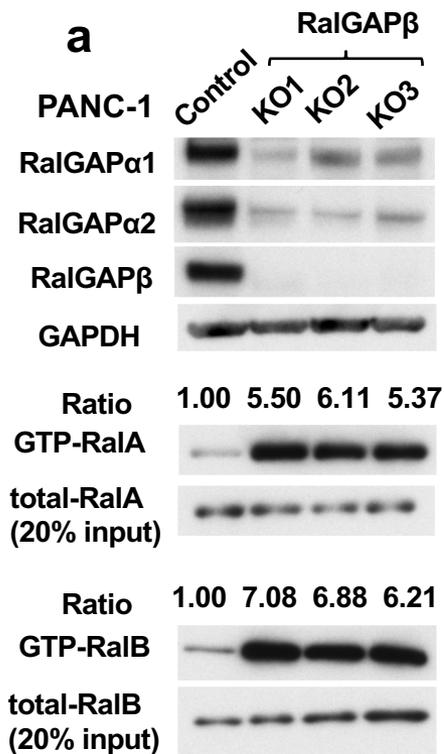
GTP-RalA
total-RalA
(20% input)

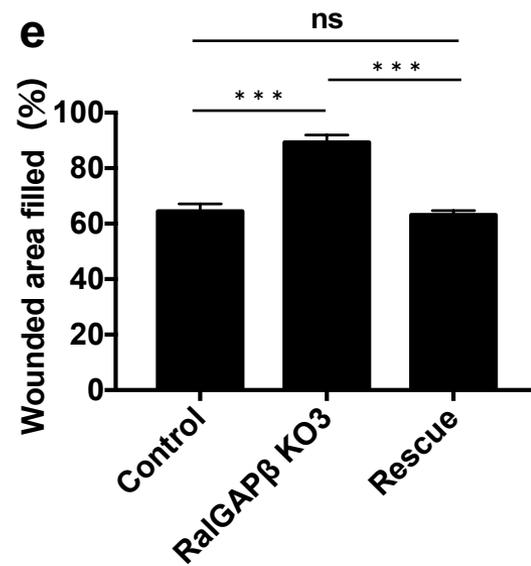
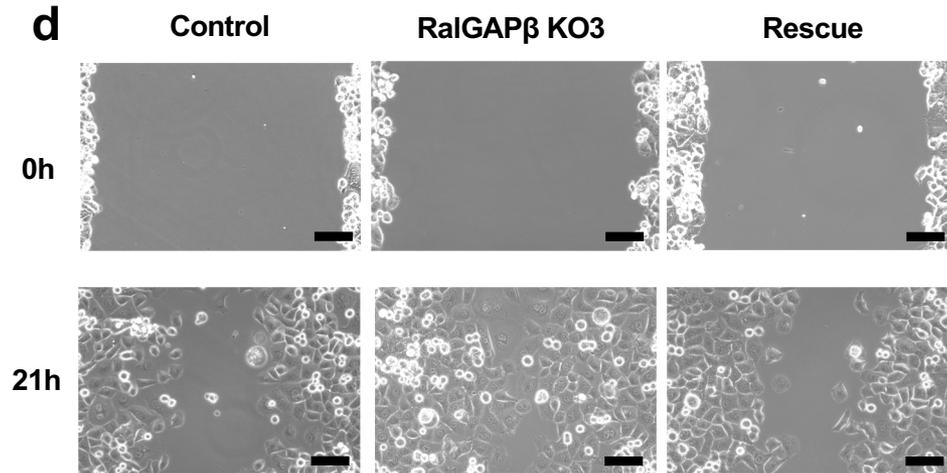
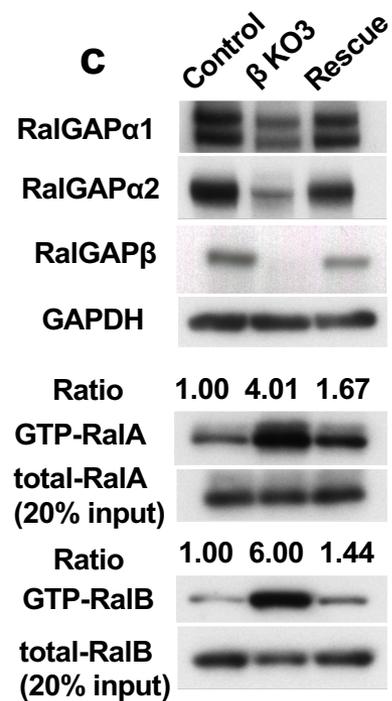
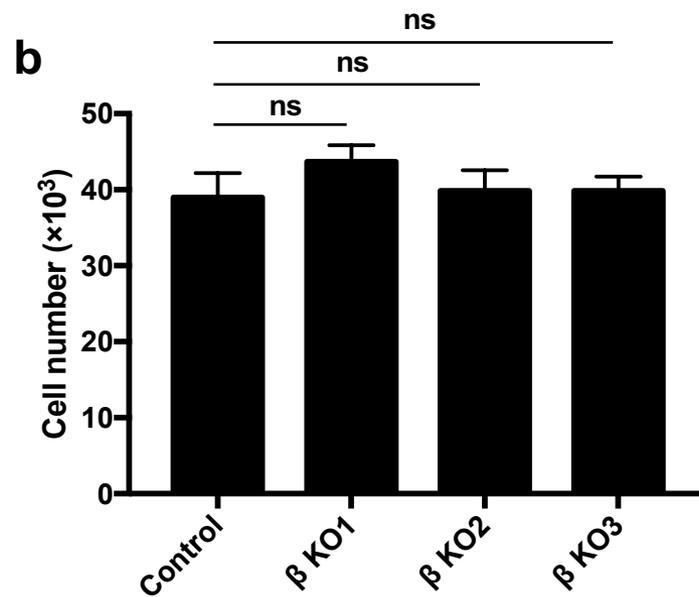
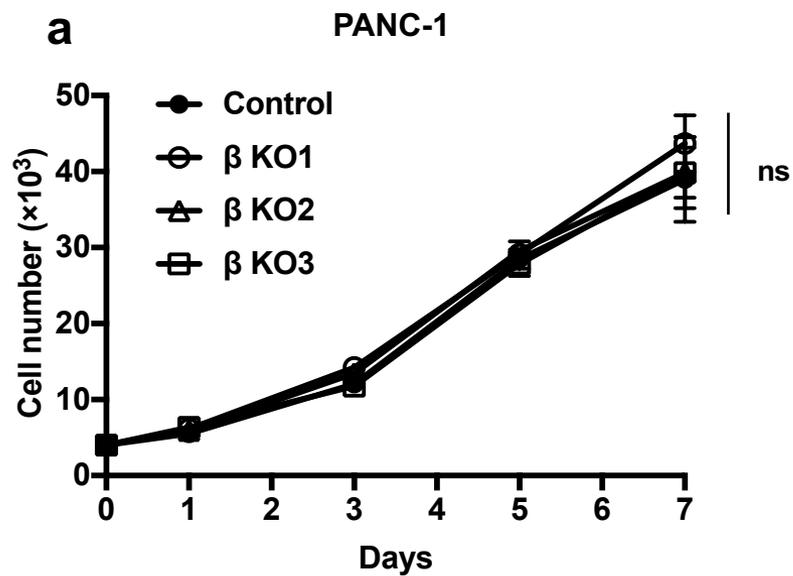
Ratio 1.00 3.13 3.11 2.78

GTP-RalB
total-RalB
(20% input)







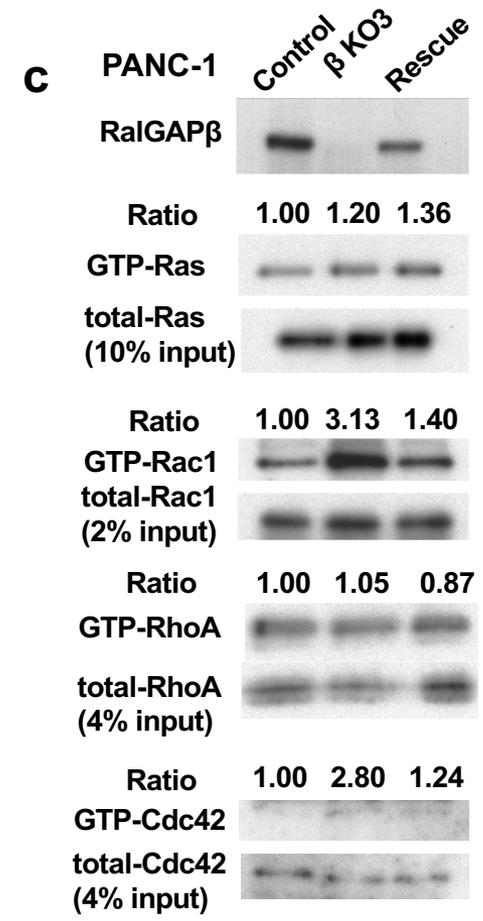
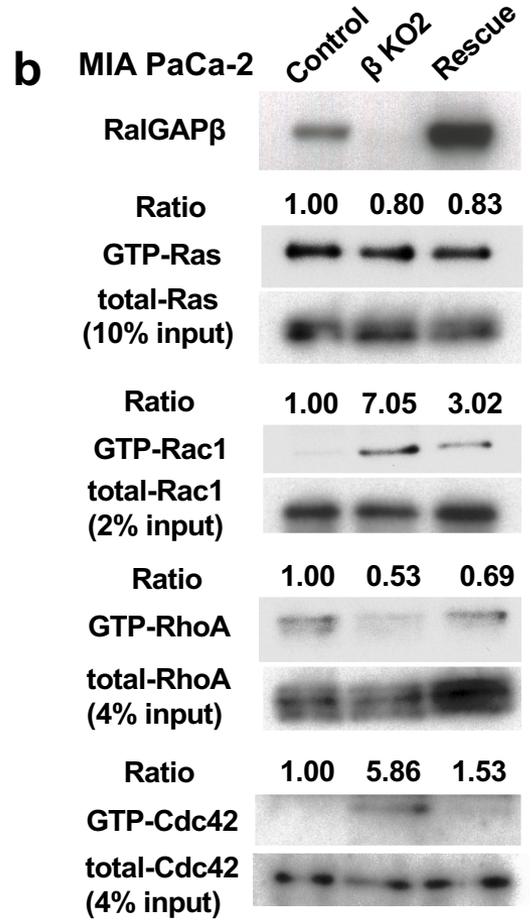
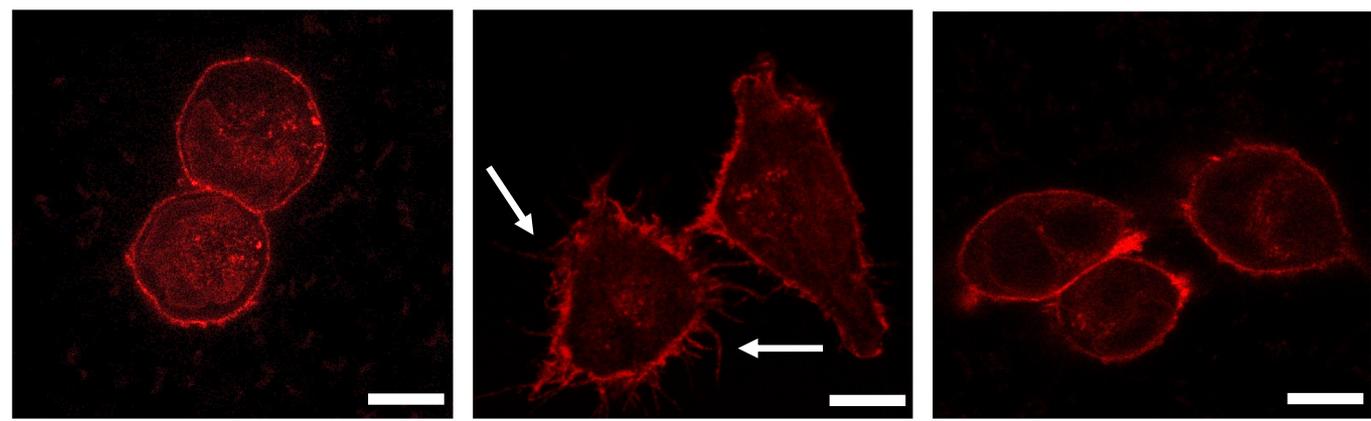


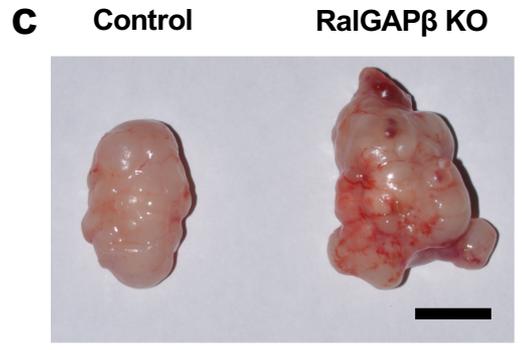
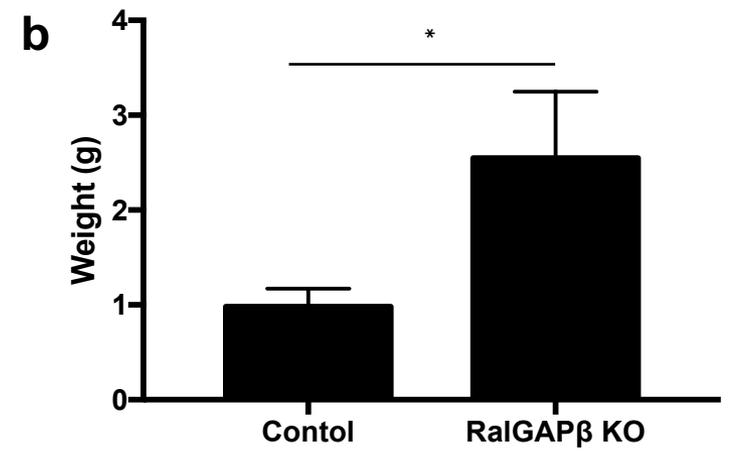
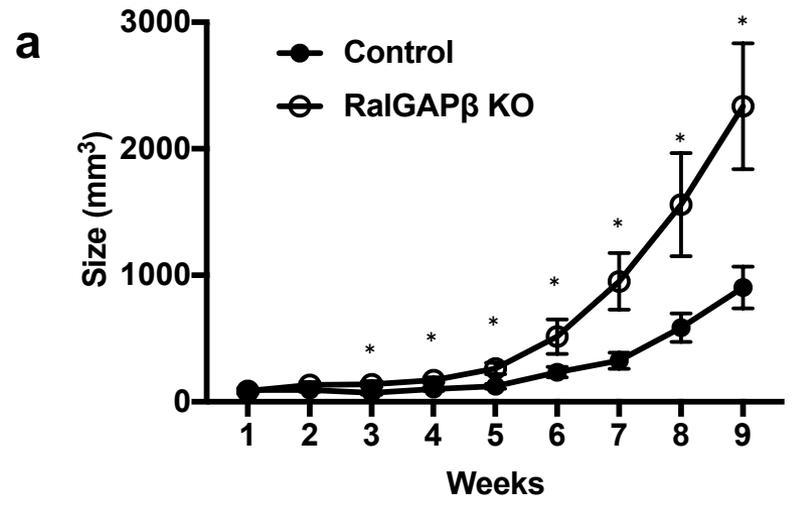
Control

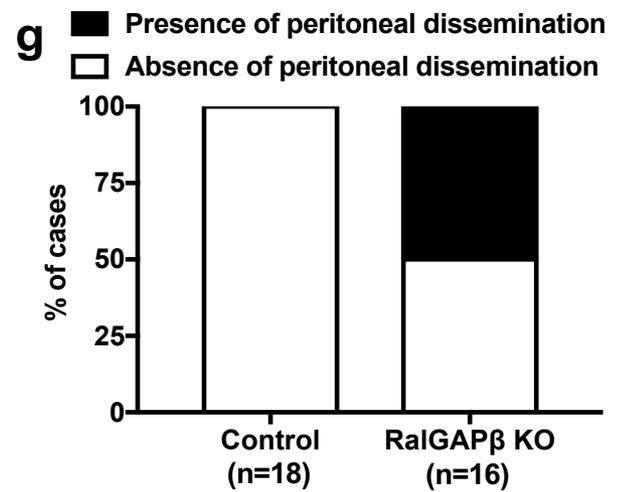
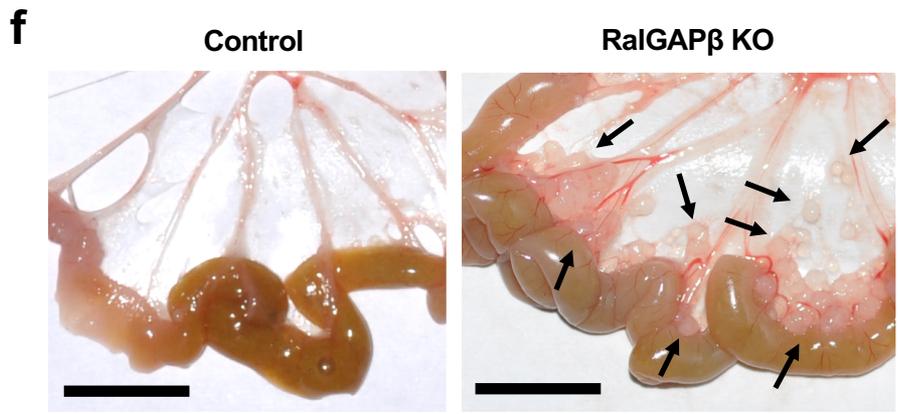
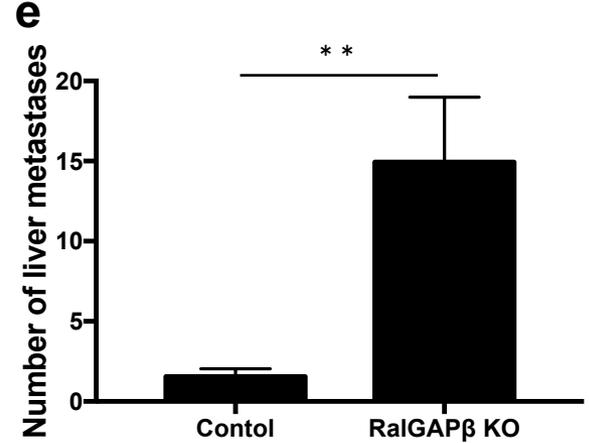
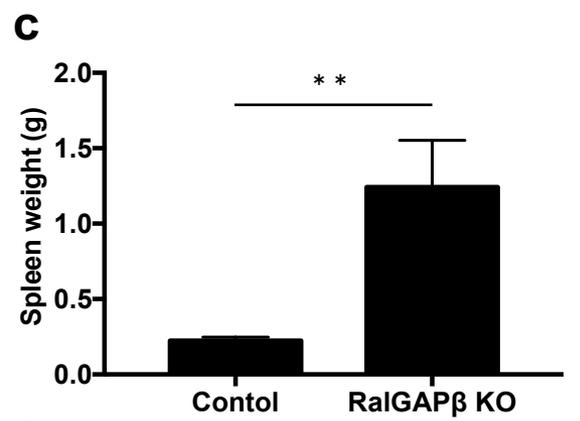
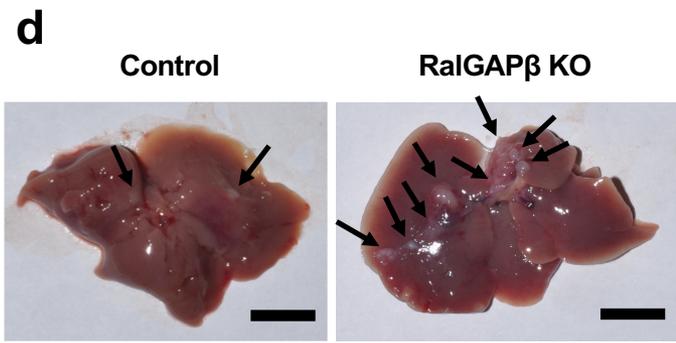
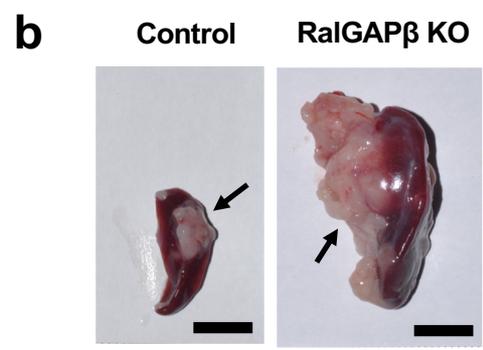
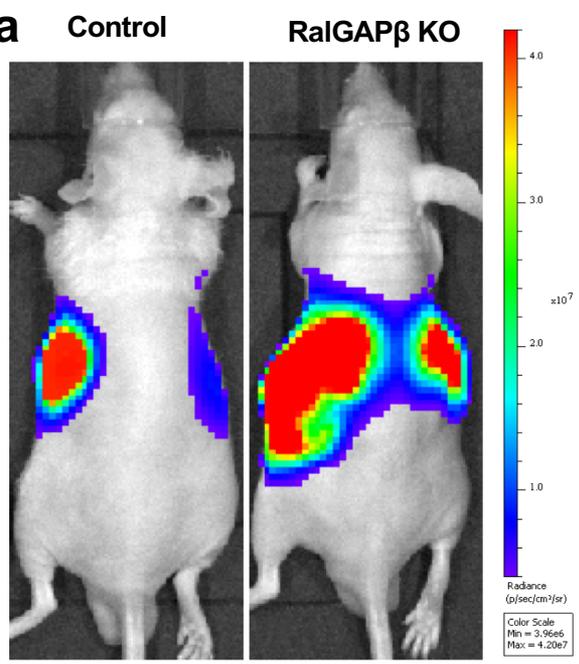
RalGAP β KO2

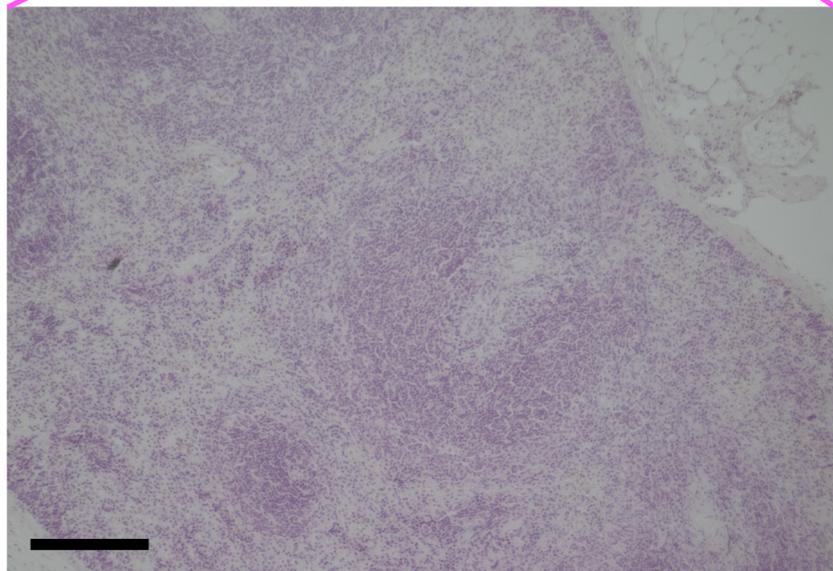
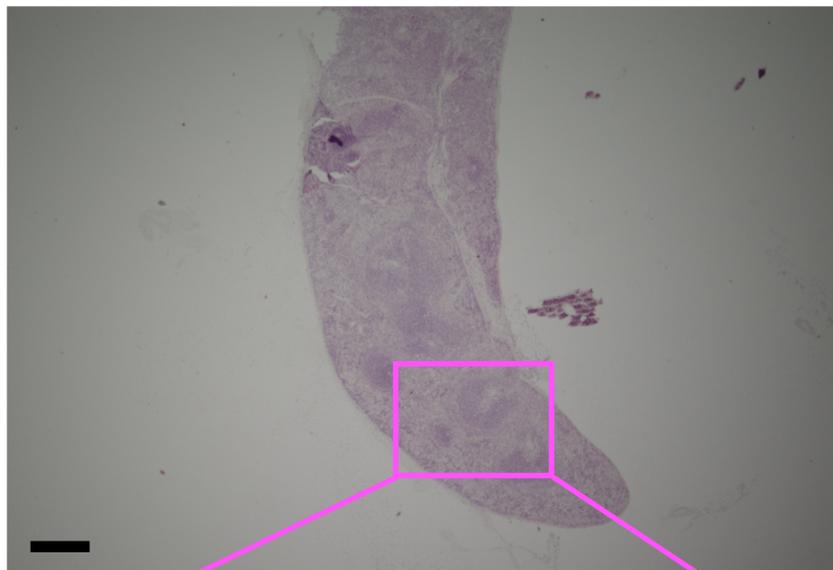
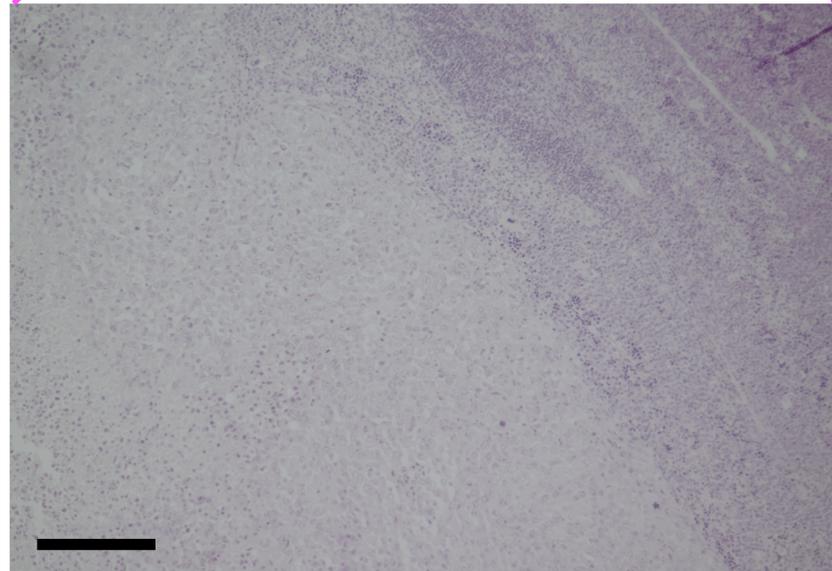
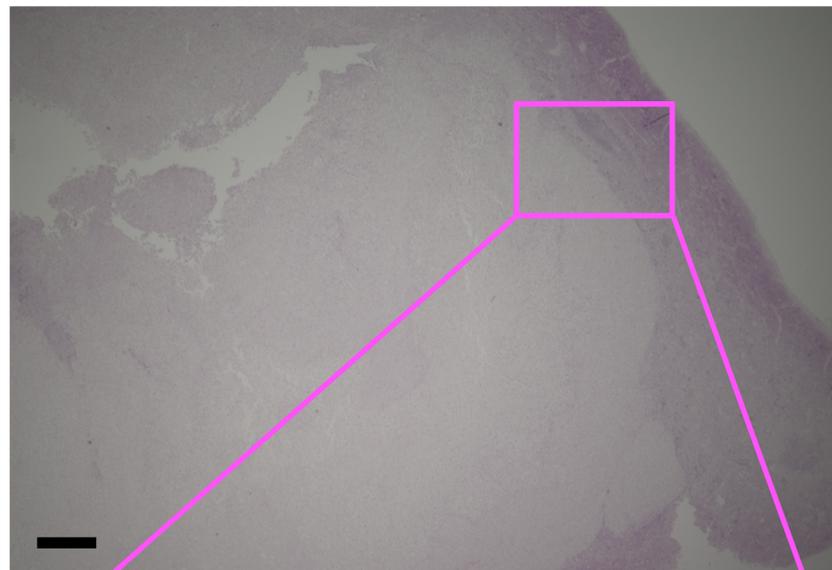
Rescue

a
MIA PaCa-2

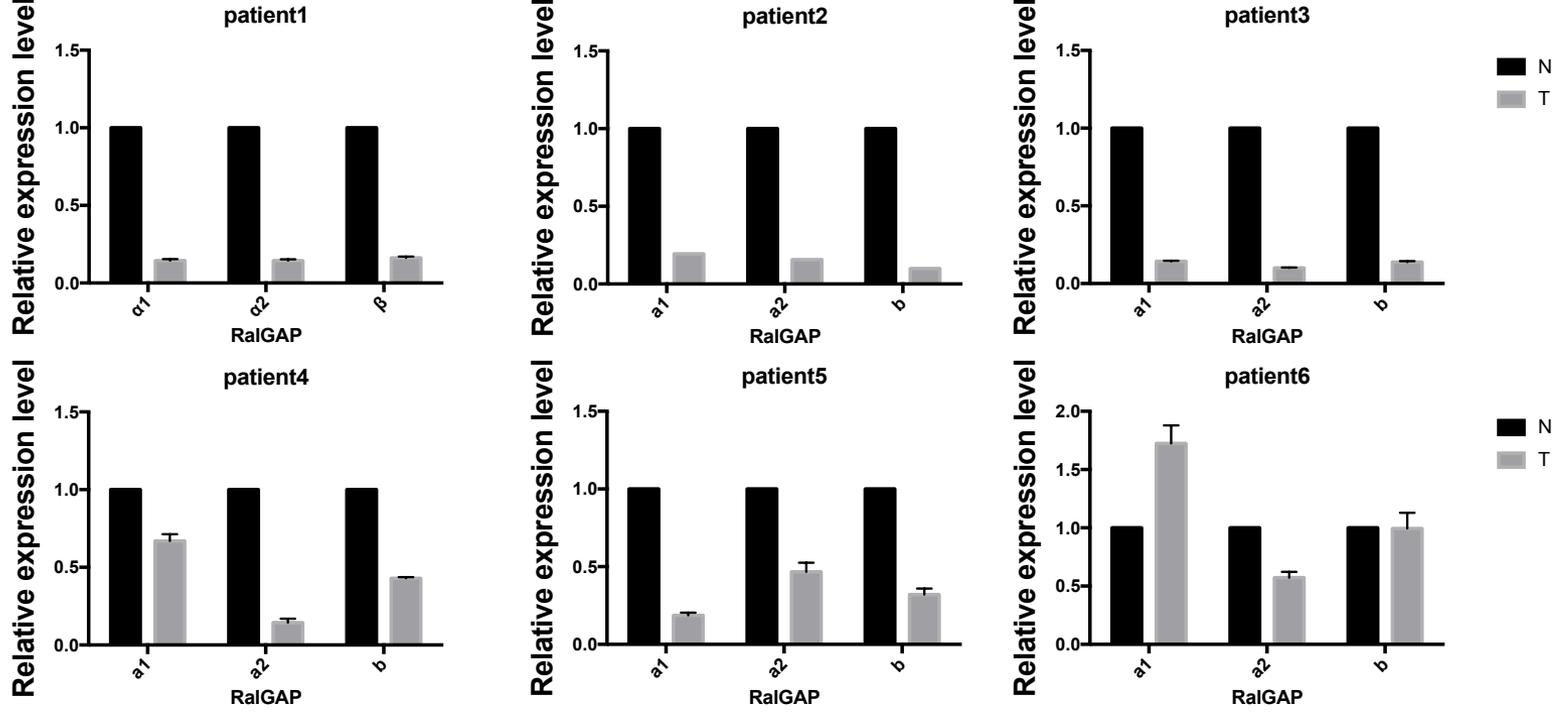




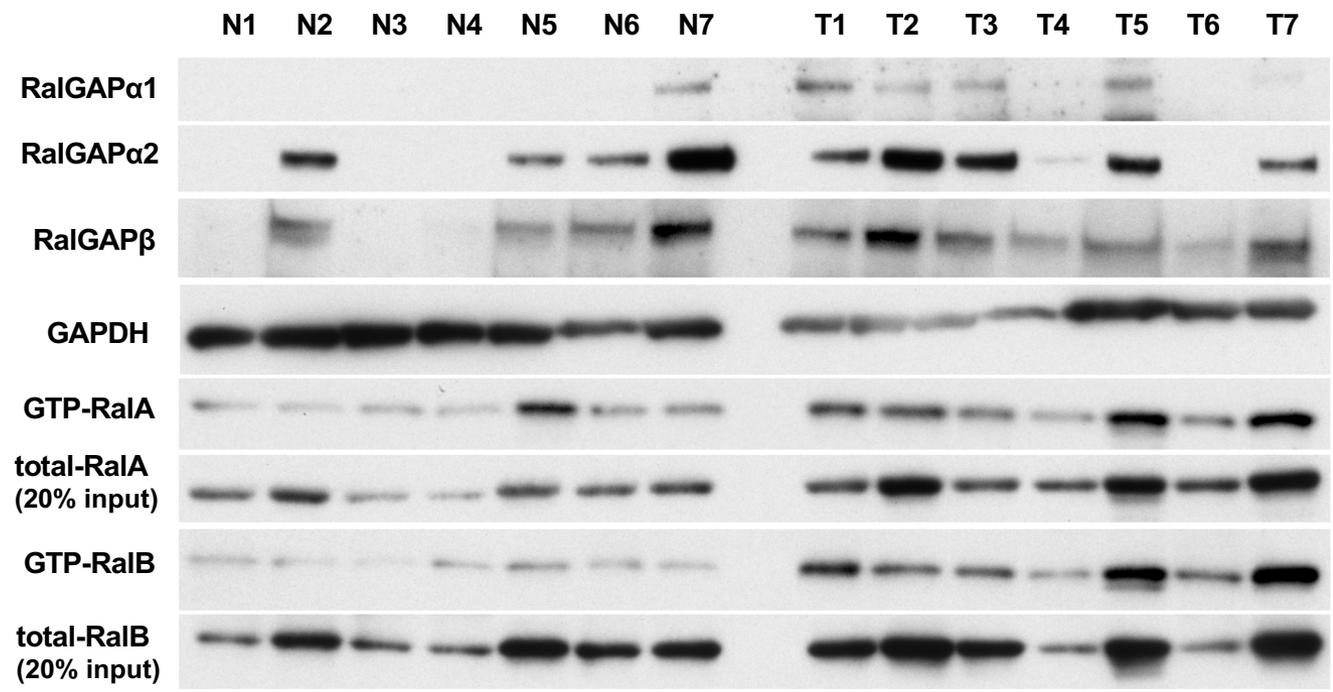


a**MIA PaCa-2
control****b****MIA PaCa-2
RalGAP β KO**

a



b



N: Normal pancreatic tissue
 T: Pancreatic tumor