◆ 総 説 ◆

Rho-Rho 結合キナーゼと細胞運動

伊 藤 和 幸*

Rho, ROCK and Cellular Motility

Kazuyuki ITOH, MD, PhD.*

細胞運動は高次の生命現象の基盤となっており、がんの浸潤や、リンパ球の遊走などに重要な役割を演じている。がんの浸潤・転移は多くのステップからなる複雑な生物現象であるが、ヒトの臨床例の解析から遺伝子の変異は殆どなく、いくつかの分子の過剰発現が報告されている。その中でも、がんの進展増悪や転移と相関する低分子量 G 蛋白質 Rho は、分子スイッチとしてアクチン細胞骨格を動的に制御すると共に、Rho kinase (ROCK) を介してミオシン分子モーター活性を調節し細胞運動の速度をコントロールしている。さらに ROCK は細胞の基質への接着の制御にも深く関与している。ROCK の特異的阻害薬は、培養細胞の運動能や接着能を濃度依存性に抑制し、動物実験において浸潤や転移を効率的に抑制した。一方浸潤・転移に関係する細胞運動には、速度以外に方向性が重要で、細胞外のケモカイン濃度を特異的受容体が感知し、細胞内の phosphatidylinositol (PI) 濃度を制御する PI 3 kinase や PTEN の局在を変化させ、極性をもった細胞運動を調節することが報告されている。運動先端部では、蓄積された PI (3,4,5) P3 が、Rho family G 蛋白質である Cdc 42 や Rac の活性化因子 (GEF) を活性化し、Cdc 42 や Rac の下流で N-WASP や WAVE を介して Arp 2/3 複合体を活性化し、急峻なアクチン繊維の重合を制御するモデルが提唱されている。さらに浸潤のためには、細胞外基質を効率よく分解することが必要で、膜型のマトリクス分解酵素 (MT-MMP) が浸潤先端部に局在し、マトリクスの分解を制御している。これら細胞内の分子の位置決めや、細胞極性の形成にもアクチン骨格系が深く関与しており、その制御には Rho family G 蛋白質が重要な役割を演じている。近い将来、これら浸潤・転移に関与するいくつかの分子を標的にした治療法の開発が大いに期待される。

Key words : cell motility, invasion, Rho, ROCK (Rho kinase), actin

はじめに

生物学の進歩により、がんの浸潤や、リンパ球の遊走などに重要な役割を演じる細胞運動の制御機構に関して多くのことがわかってきた。細胞運動を制御する重要な要素は、運動先端部におけるアクチン繊維を主とする細胞骨格の再編成、駆動力である分子モーター、それらを空間的、時間的にダイナミックに制御する低分子

量 GTP 結合蛋白質によるシグナル伝達である。最近の細胞生物学の進歩は、生きたままの細胞運動をリアルタイムに観察することを可能にしている。ここでは、我々の研究の一部として、細胞の浸潤運動の制御に深く関わる分子スイッチ Rho-ROCK 系を中心に、浸潤運動の制御機構の知見と、将来の臨床応用に向けた標的治療について紹介したい。

* 大阪府立成人病センター研究所生物学部門 [〒 537-8511 大阪市東成区中道 1-3-3]
Department of Biology, Osaka medical center for cancer and cardiovascular diseases
[1-3-3 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-8511, Japan]
Tel: 06-6972-1181 Fax: 06-6971-7951 e-mail: itou-ka@mc.pref.osaka.jp

1. がんの浸潤・転移の分子機構

「がんはとても怖い病気だ。せっかく手術してもらったのに、もうあちらこちらに広がったり、他に飛んでいて、」とてもよく聞かれる言葉である。確かに、このがんが広がること（浸潤）や飛ぶこと（転移）は、外科手術や放射線治療、化学療法などが進歩した現在、がんの治療成績（生命予後）を左右する最大の難題である。では如何にして、がん細胞は浸潤・転移するのだろうか？

がんは、体の中の自分自身の細胞が変化してできる（発がん）。この変化とは、周りのいろいろな原因、即ち環境や食品やたばこや両親から受けついでた遺伝情報などが引き金となり、細胞内の遺伝子変異（塩基配列の変化や、染色体の変化）が生じ、その結果、細胞の機能異常が蓄積され、細胞が無制限に増え続けるようになる。やがて大きくなったがんの塊は、周りの正常細胞とぶつかる。そこで、がん細胞と正常細胞のせめぎ合いが始まる。がん細胞は heterogeneous で一見一つの塊のように見えてもたくさんの種類の細胞が入り交じっている。このうち周りのがん細胞から離れて、正常細胞の隙間を通過して他の場所へ移動を始めるものがでてくる。これがいわゆる浸潤である（図1）。がん細胞が浸潤するためにはいくつかの能力が必要である。まず原発巣の仲間のがん細胞から離れないといけない。移動していくためには運動能力が、周りの組織の繊維を分解していくためには、細胞外の基質であるコラーゲンなどを溶かす酵素を分泌しなくてはならない。運動の方向性も重要で、よく転移するがん細胞には血管やリンパ管に向かって進む能力があることが報告されている。こうして血管壁にたどり着いたがん細胞は、血管のバリアである基底膜を破壊し、内皮細胞の隙間から血管内に入る。血液の流れに身を任せ、遠くに運ばれたがん細胞は、今度は内皮細胞の隙間を這って血管外へ出て、行き先の組織内で住みかを作る。やがて大きく

図1 がんの浸潤、転移と関連分子

なり経約3 mm以上になってくると、酸素や栄養分を運ぶために血管が必要となり、新しい血管を自身のために作る（腫瘍血管新生）。このようにして転移巣が成立する（図1）。実際、転移が成立する確率はものすごく小さく、例えばネズミの血管内に1,000,000個のがん細胞を注射しても、肺に転移が起こるのは極めてまれである。即ち転移の成立は、がん細胞の方に獲得されたスーパーマンのような強靱な性質と、私たち（宿主）の体のあちこちで転移を起こりにくくしている要素とのバランスによっている。逆にいうと、このような多段階の転移のステップのどの段階を止めてもがんの転移の治療に結びつくわけで、元々体に備わった抗転移能力を高める事でも抗転移治療になると考えられる。

2. がんの浸潤・転移と分子スイッチ Rho-ROCK

前述したようにがんができる時（発がん）には、遺伝子の変異が重要である。実際のヒトのがんの手術材料などを用いた研究から、多くの異なる種類のがんで、いくつかの共通の遺伝子の異常が高頻度で見つかるからである。これらの遺伝子はがん遺伝子（oncogene）と呼ばれ、代表的なものには細胞の増殖分裂速度を調節している分子スイッチ Ras 遺伝子がある。Ras の変異はヒトの悪性腫瘍の数十パーセントで認められ、またその割合はがんの種類で異なっている。

では、浸潤・転移の場合はどうだろうか？実際にヒトのがんの転移巣と原発巣の遺伝子の比

較をした研究が数多くあるが、意外なことに共通した遺伝子変異の報告は殆ど見あたらない。それよりもむしろ mRNA や蛋白質の量の変化が数多く報告されている。ゲノムプロジェクトがほぼ終了し、ヒトの遺伝子は約 30,000-40,000 種類と概算されている。Gene chip や protein array が開発され、一度に数千から数万の mRNA や protein の変化の解析ができるようになり、原発巣と転移巣の比較からいくつかの遺伝子の量的変化が転移やがんの予後と関係することがわかってきた。このうちの代表的

なものの一つが細胞の運動を制御している分子スイッチ Rho 遺伝子である。ヒトのがんで Rho には遺伝子変異はなく¹⁾、発現量のがんの進展や転移²⁾、さらに予後と相関する (図 2)。我々の研究室ではこの Rho に注目し、6-7 年前から浸潤、転移との関連について研究を行ってきた。

Rho は先に述べた Ras の類縁の遺伝子として、1985 年にフランスの遺伝学者 Pascal Madaule により報告された³⁾が、1990 年に入るまではあまり研究が盛んにならなかった。1980 年代-1990 年代前半には、細胞のがん、増殖の研究が一気に進み、細胞内の情報伝達経路で多くの発見があり、がんの増殖を抑制する薬剤 (制がん剤) も多数開発された。1990 年代に入ると研究の方向は、細胞の形態や分化といった機能面を重視したものに移ってきた。Rho は分子スイッチとして細胞骨格の調節を行い、細胞の形を制御すると共に、細胞の運動、接着、分裂などを調節しており、血管の収縮や、がん細胞の浸潤、転移、細胞の分化や運命の決定などにも関与している事が次々と明らかとなった。これらの機能の多くは、Rho の

図 2 Rho の発現レベルと大腸がんの手術後予後

コントロールの **Mock** は移植部位 (白矢印) に結節形成のみ認められるが、野性型 **wtRho**、活性型 **VRho** 発現細胞では玉すだれ状の腹膜播種結節 (黒矢印) を多数認める。

図 3 Rho 過剰発現細胞の *in vivo* 浸潤能の亢進

下流の Rho kinase (ROCK) という酵素により制御されている。我々は、臨床例の解析からヒトのがんではステージが進むにつれて Rho の発現が亢進すること、ヒトのがんの転移巣で認められるのと同様に Rho が高発現 (約3倍) した細胞をネズミの肝臓がん細胞に遺伝子導入することで作製し、*in vitro*, *in vivo* (図3) で運動能や浸潤能の亢進が起こること⁴⁾、それが先に述べた ROCK → アクトミオシン分子モーター活性の亢進によること⁵⁾、ROCK の作用を阻害する合成薬物が、強力に転移を抑制する作用を示すこと⁶⁾などを報告してきた。この薬物は、動物実験では数多くの種類のがんの浸潤、転移を抑制し、毒性も低いことから、製薬企業と共同でヒトへの臨床応用をめざしている。

ここで興味深いことは、Rho の発現量と浸潤運動、転移との関連である。多くの培養細胞を用いた実験から、Rho を遺伝子導入し過剰発現すると、細胞外基質の間に接着斑が形成され、それに橋を架けるようにアクチンを主体とするストレスファイバーが形成され、細胞の接着が強くなり運動能は低下する。しかしながら、多くの種類のがんで Rho は過剰発現しており、浸潤運動能は亢進している。よく調べてみると臨床例でも培養細胞株の検討からも、がん細胞が最も効率よく浸潤するためには、至適な Rho の発現レベルがあるようで、約3倍の Rho の発現が転移巣/原発巣や、高転移性/低転移性のがんで認められる (投稿中)。それ以上の Rho を強制発現させると、前述したように細胞は強く接着し動かなくなる。即ち浸潤、転移は宿主の体内で起こる生物学的な selection の結果なのである。

また、ROCK は細胞接着斑の形成にも深く関与しており、ROCK 阻害薬で種々の培養細胞を処理すると、vinculin で染色される接着斑の密度、大きさが減少し、細胞外基質への接着が減弱し、細胞は細長い突起を出したような形態になる。接着斑の形成にはアクチン細胞骨格の動的な再編成が重要で、ROCK はその下流

図4 Rho-ROCK シグナルと細胞の浸潤運動

の LIM kinase (LIMK) を介して、アクチンの重合-脱重合の調節を司る事で、接着斑形成の制御に関与していると考えられる (投稿中)。以上浸潤運動に関与する Rho-ROCK 系のシグナルを図4にまとめた。

3. 浸潤運動の方向性の制御

細胞運動に関しては、上記の運動速度を調節する分子モーターに相当する部分の制御以外にその方向性が重要である。方向性を決定づける大きな因子としてケモカインの濃度勾配とその受容体が重要な役割をしている。がんの転移に関しては、転移先のリンパ節や骨髄などに高濃度存在するケモカインががん細胞側の受容体に作用し運動方向性を決定しているという仮説⁷⁾が注目されている。例えば乳がん細胞に発現する CXCR 4 とリンパ節に多く分泌するアゴニスト SDF 1 α の組み合わせが、以前よりいわれている seed and soil theory (がんの種類によって転移しやすい臓器とそうでない臓器があり原発巣と転移巣の組み合わせが解剖学的な位置関係以外の要因で決定される) を説明するのに有力である (表1)。

ケモカインから受容体を介して細胞内に入ったシグナルは Rho-ROCK 系を活性化し細胞運動の駆動力を発揮すると共に、細胞内でのいくつかの分子の位置決めに関与しており、それに基づき運動方向が決定される。この候補として

表 1 ケモカインと受容体の組み合わせによる細胞運動の方向性の制御

細胞	ケモカイン受容体	ケモカイン (ligand)	ケモカインの由来
ヒト乳がん	CXCR 4	CXCL 12/SDF-1 α	リンパ節
ヒト乳がん	CCR 7	CCL 21/6 Ckine	リンパ節
ヒトメラノーマ	CCR 10	CCL 27/CTACK	皮膚
末梢血リンパ球	CXCR 4	SDF-1 α	リンパ節

図 5 細胞の運動を制御する機構のモデル

はごく最近 PI 3 kinase とその phosphatase の一種である PTEN が注目されている。即ち進行方向に近い方に PI 3 kinase が、逆に後方に PTEN が局在することが単細胞生物である *Dictyostelium discoideum* amoeba に GFP でタグした蛋白質を発現させ詳しく運動を解析することで報告されている⁸⁾⁹⁾。細胞内ではこれらの酵素から生じた phosphatidylinositol lipid である PI(4,5)P₂ や PI(3,4,5)P₃ の濃度勾配が生じ、それが細胞極性と運動方向性を制御しているのではないかと考えられている。細胞運動はがん細胞でもリンパ球でもアメーバでも、同様に制御されていることが想像されるが、この機構ががん細胞の浸潤、転移にどの程度関与しているか、今後の研究結果が期待される。運動先端部では、蓄積された PI(3,4,5)P₃ が、Rho family G 蛋白質である Cdc 42 や Rac の活性化因子 (GEF) を活性化し、

Cdc 42 や Rac の下流で N-WASP や WAVE を介して Arp 2/3 複合体を活性化し、急峻なアクチン繊維の重合を制御するモデルが提唱されている¹⁰⁾

さらに浸潤先端部では、細胞外基質である collagen などの barrier を効率よく分解するために、膜型のマトリクス分解酵素である (MT 1-MMP) が局在しており、MT 1-MMP が TIMP 2-MMP 2 と複合体を形成し MMP 2 を活性化するモデルが提唱されている。また、その部分にはヒアルロン酸の receptor である CD 44 も集積しており、CD 44 が shedding を受け一部が切り取られることが signal となり、浸潤運動が亢進する。これら細胞外から内部へのシグナル (outside-in signal) は、強い接着を示す integrin からの研究が先行していたが、浸潤先端部で認められるような ruffling や lamellipodia (葉状突起), filopodia (糸状突

起)を形成するような弱い接着部からも細胞内に入ってくることが考えられている。ここで最も重要なのは細胞の極性で、如何にしてこれら多くの蛋白質の位置を浸潤運動に適したようにリアルタイムで動的に制御しているか、現在ホットな研究が行われており、その制御の中心には Rho family protein が機能していることが想定されている。これら細胞の浸潤運動を制御する機構のモデルを図 5 に示す。

4. 臨床応用-がんの分子標的治療

前節で述べたように、細胞の運動を制御する機構はかなり明らかとなって来た。次のステップは、この細胞生物学の成果を如何に医学に役立てるかである。がんの治療が最近変わりつつあるということが報道されている。ここでは、新しいスタイルのがんの治療として、分子標的治療について述べてみたい。分子標的治療は、あるがんで比較的特異的に発現や機能が亢進している蛋白質や細胞表面に多くみられる蛋白質などに注目し、それらの分子を標的としてねらいをさだめ、攻撃しようとするものである。具体的な攻撃方法としては、酵素などの機能分子の場合は低分子阻害薬などの薬物、細胞表面に出でている蛋白質の場合は抗体などが用いられる。10 年くらい前にはこのような治療法が成立するかどうか疑問視する声もあった。しかしながらここ 2-3 年、いくつかの分子を標的とした治療薬が発売され、実際に臨床に使われ大きな効果をあげている。例えば乳がん細胞の表面に発現している Her という蛋白質に対する抗体であるハーセプチン (Herceptin) や、白血病や胃の粘膜下腫瘍で使われている Abl/c-kit Tyr-kinase 阻害薬グリベック (Glivec) や、日本でも世界に先駆けて肺がん治療に承認された EGF-R Tyr-kinase 阻害薬イレッサ (Iressa) などである。これらの薬剤の特徴は、いくつかの特異的ながんにしか効かない、がん細胞をすべて殺すだけの作用を持っていないことで

ある。従って他の治療、例えば手術、放射線、化学療法などとの併用治療となる。但し、正常細胞には殆ど作用しないことから副作用が比較的少ないのが特徴で、現在多くの製薬企業がしのぎを削ってこれら分子標的治療薬、抗体の開発を行っている。もちろんこの中にはがんの転移や浸潤を標的としたものもたくさん含まれる。特に先行している薬物はがんが宿主のバリアを越えて浸潤する際、又新生血管を作るときに必要な繊維を溶かす酵素 (Matrix metalloproteinase, MMP) を標的にしたもの、血管新生を標的にしたものがある。先に述べた運動能や方向性を制御する分子も標的としてとらえられている。近い将来がんの浸潤、転移を標的とした画期的な薬剤が世に出てくることが期待される。

おわりに

細胞運動制御の分子機構が明らかになるに伴い、臨床応用への展望が開けてきた。即ち近い将来、種々の分子を標的として細胞の接着や運動を制御することで、炎症やがんの浸潤などに対する新規治療法が開発されることが大いに期待される。

謝辞：稿を終えるに当たり、執筆の機会を与えて下さった富山佳昭編集委員に深謝致します。

文 献

- 1) Moscow JA, He R, Gnarr JR, Knutsen T, Weng Y, Zhao WP, Whang-Peng J, Linehan WM, Cowan KH: Examination of human tumors for rhoA mutations. *Oncogene* 9: 189-194, 1994.
- 2) Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO: Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 406: 532-536, 2000.
- 3) Madaule P, Axel R: A novel ras-related gene family. *Cell* 41: 31-40, 1985.
- 4) Yoshioka K, Nakamori S, Itoh K: Overexpression of small GTP-binding protein RhoA promotes invasion of tumor cells. *Cancer Res* 59: 2004-2010, 1999.

-
- 5) Yoshioka K, Matsumura F, Akedo H, Itoh K : Small GTP-binding protein Rho stimulates the actomyosin system, leading to invasion of tumor cells. *J Biol Chem* **273** : 5146-5154, 1998.
  - 6) Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, Uehata M, Ishizaki T, Narumiya S : An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nature Med* **5** : 221-225, 1999.
  - 7) Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan M, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner S, Barrera J, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A : Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410** : 50-56, 2001.
  - 8) Iijima M, Devreotes P : Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell* **109** : 599-610, 2002.
  - 9) Funamoto S, Meili R, Lee S, Parry L, Firtel R : Spatial and Temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell* **109** : 611-623, 2002.
  - 10) Takenawa T, Miki H : WASP and WAVE family proteins : key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movements. *J Cell Sci* **114** : 1801-1809, 2001.