

機関番号：12601

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17014030

研究課題名（和文）蛋白質リン酸化シグナルとがん細胞の異常増殖

研究課題名（英文）Protein kinase signaling and malignant cell proliferation

研究代表者

山梨 裕司 (YAMANASHI YUJI)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：40202387

研究成果の概要（和文）：

本研究においては、がんの発生や悪性化と密接に関連する蛋白質リン酸化シグナルに関する研究を、独自に単離したシグナル制御因子である Dok ファミリー分子を中心として推進した。その結果、シグナル抑制性の Dok ファミリー分子 (Dok-1、Dok-2、Dok-3) が造血細胞の増殖を協調的に抑制し、悪性度の高いがんである組織球肉腫の発症を防いでいることを解明した。また、受容体型チロシンキナーゼの全く新しい制御機構として、細胞内からの直接の活性化機構の存在を発見し、新たな発がん制御機構の可能性を呈示した。

研究成果の概要（英文）：

To understand protein kinase signaling involved in malignant transformation of cells, we focused on the Dok-family of adaptor proteins. Our findings together revealed that Dok-1, Dok-2, and Dok-3 negatively regulate proliferation of hematopoietic cells and suppress aggressive histiocytic sarcoma. In addition, we found that Dok-7 is an essential cytoplasmic activator of the receptor protein-tyrosine kinase MuSK, proposing a novel mechanism of receptor kinase activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	14,300,000	0	14,300,000
2006年度	14,500,000	0	14,500,000
2007年度	14,500,000	0	14,500,000
2008年度	14,400,000	0	14,400,000
2009年度	14,400,000	0	14,400,000
総計	72,100,000	0	72,100,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：

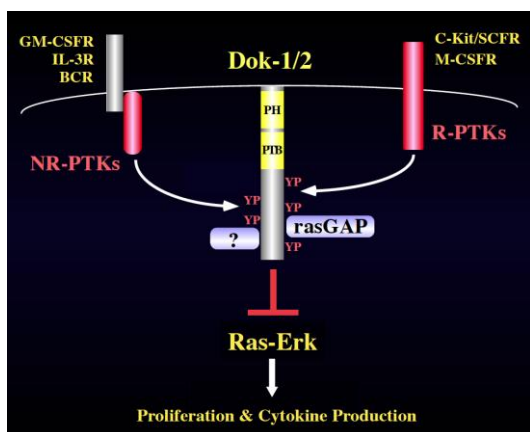
キーワード：シグナル伝達、蛋白質、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

がん遺伝子として初めてその実体が明らかにされた src が蛋白質のチロシンリン酸化酵素（チロシンキナーゼ）をコードする遺伝子であることが報告されてから30年以上が経過し、チロシンキナーゼシグナルなどの蛋白質リン酸化シグナルの異常が、がんの発生や悪性化と密接な関係にあることは周知

の事実となっていた。しかしながら、蛋白質のリン酸化シグナルの実体、特にチロシンキナーゼ下流のシグナル分子の機能と、がん細胞の異常増殖におけるその破綻に関する知見は不十分であり、その詳細な解析が必要とされていた。本研究代表者は、チロシンキナーゼ活性をもつがん蛋白質や増殖因子受容体の主要な共通基質として着目されていた

正体不明の蛋白質 p62 の精製に成功し、それが主要ながん蛋白質として知られる Ras の抑制因子 p120 rasGAP と会合するアダプター分子 (Dok-1 と命名) であることを発見した。そのアミノ酸配列から、Dok-1 はアミノ末端側に Pleckstrin Homology (PH) ドメインと Phospho Tyrosine Binding (PTB) ドメインをもち、カルボキシル末端側に Src Homology 2 (SH2) ドメインの結合配列をもつ IRS (Insulin Receptor Substrate) ファミリー分子に類縁のアダプター蛋白質であることが明らかになった。さらに、我々は Dok-1 がチロシンリン酸化依存的な p120 rasGAP との会合によってチロシンキナーゼ下流の増殖シグナルを負に制御することを明らかにした。さらに我々は Dok-1 が B 細胞受容体シグナルの下流で非受容体型チロシンキナーゼ Lyn 依存的にチロシンリン酸化を受け、Ras-MAP キナーゼ経路を抑制し、B 細胞の増殖応答を負に制御していることも Dok-1 欠損マウスの解析を通じて明らかにしていた。この際、Dok-1 欠損マウスにおいては細胞の明らかな増殖異常は認められなかったが、Dok-1 と最も近縁なファミリー分子である Dok-2 との二重欠損マウスにおいては慢性骨髄性白血病に類似の骨髄球系細胞の増殖異常を発見している。また、Dok-1 と Dok-2 が共にサイトカインによる骨髄球系細胞の Ras-MAP キナーゼシグナルの誘導と増殖・生存応答を負に制御することを発見し、両者による協調的な細胞増殖抑制機構を明らかにした。



しかしながら、Dok ファミリー分子には、少なくとも *in vitro* の系においてチロシンキナーゼシグナルに抑制的に機能する Dok-3 が知られており、Dok ファミリー分子による協調的な増殖抑制機構の全容の解明にはさらなる実験が必要とされていた。また、これら以外の Dok ファミリー分子の機能を含め、蛋白質リン酸化シグナルの破綻によるがん細胞の異常増殖機構の解明も不十分であった。

2. 研究の目的

上述の背景を踏まえ、本研究の申請時には予定される研究期間内に造血系細胞に高発現するシグナル抑制性の Dok ファミリー分子、すなわち、Dok-1、Dok-2、Dok-3 による造血細胞の増殖抑制機構とその破綻による発がん機構について、具体的ながんと関連も含めて、分子及び個体レベルで解明することを第 1 の目的として計画した。さらに、蛋白質リン酸化シグナルの未知の分子機構の解明とそれに基づくがん細胞の異常増殖に関する新たな知見を求め、蛋白質リン酸化シグナル系の新たな機能分子の同定とそれらの作用機構の細胞、組織、個体レベルでの解明を第 2 の目的として計画した。

3. 研究の方法

本研究の開始時点における研究代表者の所属は東京医科歯科大学難治疾患研究所であり、所属分野の教員、大学院生からなる研究グループを組織し以下の方法による研究を始動した。また、平成 20 年度以降は現所属にて同様の研究グループとして研究を推進した。

(1) シグナル抑制性の Dok ファミリー分子による増殖抑制機構とその破綻

本研究課題については Dok-1、Dok-2、Dok-3 の細胞レベルでの作用機構について培養細胞を用いたシグナル伝達、及び、増殖応答に関する解析を進めた。また、関連するシグナル分子や制御因子の同定を意図し、これらの Dok ファミリー分子と相互作用する蛋白質の探索を行った。さらに、個体レベルでの機能解析として既に作成済みの Dok-1/2 欠損マウスに加え、Massachusetts General Hospital の Brian Seed 博士らが作出した Dok-3 欠損マウスを利用した多重欠損マウスの解析を進めた。

(2) 蛋白質リン酸化シグナルの未知の分子機構とその破綻

本研究課題については、新たな Dok ファミリー分子を含む蛋白質リン酸化シグナル関連分子の同定と培養細胞レベルでの機能解析を進めた。その過程で、受容体型チロシンキナーゼを細胞内から活性化する分子の発見に成功したため、その生理機能と分子機構の解明を培養細胞ならびに遺伝子改変マウスの解析を通じて推進した。

4. 研究成果

上述の通り、本研究ではシグナル抑制性の Dok ファミリー分子全体の生理機能や作用機構、また、その破綻による細胞の増殖異常について詳細な解析を進めた。同時に、新規の蛋白質リン酸化シグナル関連分子に関する

研究についても、主に、Dok ファミリー分子を含むアダプター蛋白質を中心に解析を進めた。これらの課題について、以下の成果を得た。

(1) シグナル抑制性の Dok ファミリー分子による増殖抑制とその破綻

①Dok-3 の作用機構

Dok ファミリー分子の中で Dok-1、Dok-2、Dok-3 は他のファミリー分子とは異なるサブファミリーを形成し、全て、造血系細胞に高発現し、Ras-MAP キナーゼシグナル系を抑制する。しかしながら、チロシンリン酸化された Dok-1、Dok-2 に会合し、それらのシグナル抑制機能に重要と考えられている p120 rasGAP は Dok-3 とは会合しない。そこで、チロシンリン酸化された Dok-3 に会合する分子を網羅的に探索したところ、Grb2 が同定された。さらに、Src の下流では、Shc に結合することで Ras を活性化している Grb2/Sos 複合体が、Dok-3 と Grb2 の会合によって Shc に結合できなくなることを解明した。これは、Dok-1、Dok-2 と共に血球に高発現する Dok-3 が、両分子とは異なる作用機序で Ras-MAP キナーゼシグナルを負に調節できることを示している。

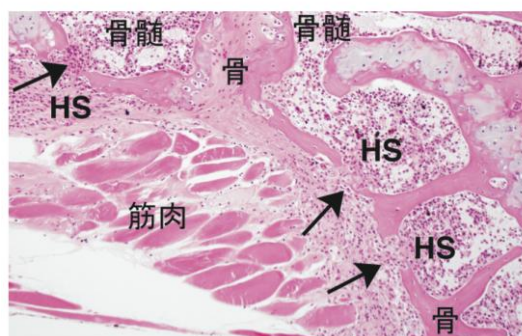
②Dok-1/2 による T 細胞の増殖抑制

本研究では、これまで Dok ファミリー分子の機能が知られていなかった造血系細胞として T 細胞に注目し、Dok-1 及び Dok-2 の T 細胞受容体 (TCR) シグナルでの役割について検討した。その結果、両者が協調的に TCR シグナルによる細胞の増殖とサイトカインの分泌を抑制していることが判明した。興味深いことに、サイトカインシグナルの場合とは異なり、TCR シグナルに対する抑制機能には両分子の C 末端側の SH2 結合配列は不要であった。このことから、既知のアダプター分子としての作用機序とは異なる Dok-1/2 の作用機構の存在が示された。

③Dok-1/2/3 による組織球肉腫の抑制

上述の通り、シグナル抑制性の Dok ファミリー分子 (Dok-1、-2、-3) は造血細胞に高発現し、様々なシグナル伝達経路において細胞増殖を負に制御している。しかしながら、確かに Dok-1/2 二重欠損マウスにおいては慢性骨髓性白血病様の造血異常は認められるものの、Dok-1/2 二重欠損マウスにも Dok-3 欠損マウスにも悪性度の高い腫瘍は認められない。そこで、本研究では Dok-1、-2、-3 の協調的なシグナル抑制機構の存在を予想し、それらの三重欠損マウスを樹立した。その結果、Dok-1/2/3 三重欠損マウスには組織球肉腫 (HS : Histiocytic Sarcoma) が他の悪性腫瘍や顕著な疾病を伴わずに発症した。

さらに、これらの HS は高い致死性を伴うと共に多臓器への高い浸潤性と可移植性を示した。HS は原因不明の稀少疾患であり、また、その良いモデル動物が確立されていないことを考えると、本研究にて樹立された Dok-1/2/3 三重欠損マウスには当該疾患研究に適したモデルマウスとしての役割が大いに期待される。既に、Dok-1/2/3 三重欠損マウス由来のマクロファージの解析から、これらの Dok 分子が協調的にマクロファージの増殖を抑制していることが明らかになっている。HS がマクロファージ様の腫瘍であることを考えると、シグナル抑制性の Dok ファミリー分子はマクロファージの増殖を抑制することで HS の発症を抑制していることが予想される。



Dok-1/2/3 欠損マウスに認められた骨破壊 (矢印)を伴う骨髓から骨格筋へのHSの浸潤

他方、Pandolphi らのグループから 129 系統の Dok-1/2/3 三重欠損マウスは高頻度に肺の腺癌を発症することが既に報告されている。この知見と我々の Dok-1/2/3 三重欠損マウスが 129 系統と B6 系統の交雑系であることを考え合わせると B6 系統に特異的な遺伝的背景が肺癌の発症を抑制し、HS の発症を促進していることが予想された。

(2) 蛋白質リン酸化シグナルの未知の分子機構とその破綻

①受容体型チロシンキナーゼの細胞内からの活性化

受容体型チロシンキナーゼは細胞外の情報を個々のリガンドとの結合として認識し、その細胞内領域に内包するチロシンキナーゼドメインの活性化を起点とする細胞内シグナルに変換すると言う極めて重要な役割を担っている。また、EGF 受容体や ErbB2/HER2 などの例からも知られているように、受容体型チロシンキナーゼの異常な活性化はがんの主要な原因のひとつである。しかしながら、本研究において、我々は新規に単離した Dok ファミリー分子 (Dok-7) が受容体型チロシンキナーゼ (MuSK) を細胞内から活性化することを発見した。その根拠としては、1) in vivo での MuSK 活性化に Dok-7 が必要とされ

る、2) *in vivo* での Dok-7 の過剰発現によって MuSK の過剰な活性化が誘導される、3) 培養細胞での Dok-7 による MuSK の活性化に MuSK の細胞外領域と膜貫通領域は必要ではない、4) 大腸菌で産生し、高度に精製した Dok-7 は同様に精製した MuSK の細胞内領域を直接、活性化する、ことが挙げられる。最近、我々の知見に続き、EGF 受容体の細胞内の活性化因子として Cytohesin が報告されたが、これらの知見は、受容体型チロシンキナーゼを発現する細胞が、単なる受け手としてではなく、細胞外のリガンド(活性化因子)と協調しつつ、細胞内からも受容体型チロシンキナーゼの機能を制御し得ると言う新たな概念を生み出した。また、一部のがん細胞では Cytohesin の高発現が認められ、受容体型チロシンキナーゼの細胞内からの異常な活性化と発がんとの関連が提示されている。

②新規アダプター分子の機能解析

本研究においては、新規の蛋白質リン酸化シグナルの同定を意図し、線虫の新規アダプター分子として ROG-1 を同定した。ROG-1 は線虫で唯一 IRS と Dok に類縁の PTB ドメインをもつアダプター様蛋白質であり、その遺伝子欠損は卵形成における pachytene 期から diakinesis 期への移行を阻害した。さらなる遺伝学的な解析から、ROG-1 が卵形成における Ras-MAP キナーゼ経路に重要な正の制御因子であることが判明した。この知見は、Ras-MAP キナーゼ経路の新たな制御機構の存在を示している。

以上の通り、代表者らが発見したシグナル抑制性の Dok ファミリー分子が造血系細胞の増殖抑制を通じてそのがん化を負に制御していることが明らかとなった。さらに、悪性度の高い HS の研究に必要とされていた良いマウスモデルの作出にも成功した。他方、新たな蛋白質リン酸化シグナルとして、これまで全く知られていなかった受容体型チロシンキナーゼの細胞内活性化因子を発見し、全く新しい活性制御機構を明らかにしたことは、受容体型チロシンキナーゼの異常な活性化を伴う発がん機構の理解に新たな視座を与える重要な知見と言える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Ryuichi Mashima, Honda Kazuho, Yi Yang, Yohei Morita, Akane Inoue, Sumimasa Arimura, Hiroshi Nishina, Hideo Ema, Hiromitsu Nakauchi, Brian Seed, Hideaki Oda, and Yuji Yamanashi. Mice lacking

Dok-1, Dok-2, and Dok-3 succumb to aggressive histocytic sarcoma., *Lab. Investigation*, 90: 1357-1364, 2010 (査読有)

2. Akane Inoue, Kiyoko Setoguchi, Yosuke Matsubara, Kumiko Okada, Nozomi Sato, Yoichiro Iwakura, Osamu Higuchi, and Yuji Yamanashi. Dok-7 activates the muscle receptor kinase MuSK and shapes synapse formation. *Science Signaling*, 2: ra7, 2009 (査読有)
3. Ryuichi Mashima, Yukihiro Hishida, Tohru Tezuka, and Yuji Yamanashi. The roles of Dok family adaptors in immunoreceptor signaling. *Immunological Reviews*, 232: 273-285 (2009) (査読有)
4. Johko Hamuro, Osamu Higuchi, Kumiko Okada, Makiko Ueno, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Hayley Spearman, David Beeson, and Yuji Yamanashi. Mutations causing *DOK7* congenital myasthenia ablate functional motifs in Dok-7. *J. Biol. Chem.*, **283**, 5518-5524 (2008) (査読有)
5. Tetsuya Hosooka, Tetsuya Noguchi, Ko Kotani, Takehiro Nakamura, Hiroshi Sakaue, Hiroshi Inoue, Wataru Ogawa, Kazutoshi Tobimatsu, Kazuo Takazawa, Mashito Sakai, Yasushi Matsuki, Ryuji Hiramatsu, Tomoharu Yasuda, Mitchell A. Lazar, Yuji Yamanashi, and Masato Kasuga. Dok-1 mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and obesity through modulation of PPAR γ phosphorylation. *Nature Med.*, **14**, 188-193 (2008) (査読有)
6. Yuji Yamanashi, Osamu Higuchi, and David Beeson. Dok-7/MuSK signaling and a congenital myasthenic syndrome. *Acta Myologica*, 27, 25-29 (2008) (査読有)
7. Akane Inoue, Tomoharu Yasuda, Tadashi Yamamoto, and Yuji Yamanashi. Dok-1 is a positive regulator of IL-4 signaling and IgE response. *J. Biochemistry*, **142**, 257-263 (2007) (査読有)
8. Jacqueline Palace, Daniel Lashley, John Newsom-Davis, Judy Cossins, Susan Maxwell, Robin Kennett, Sandeep Jayawant, Yuji Yamanashi, and David Beeson. Clinical features of the *DOK7* neuromuscular junction synaptopathy. *Brain*, **130**, 1507-1515 (2007) (査読有)
9. Tomoharu Yasuda, Kenji Bundo, Ayako Hino, Kazuho Honda, Akane Inoue, Masaki Shirakata, Mitsujiro Osawa, Toshiki

- Tamura, Hideo Nariuchi, Hideaki Oda, Tadashi Yamamoto, and Yuji Yamanashi. Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of T cell receptor signaling. *Int. Immunology*, **19**, 487-495 (2007) (査読有)
10. Yosuke Matsubara, Ichiro Kawasaki, Seiichi Urushiyama, Tomoharu Yasuda, Masaki Shirakata, Yuichi Iino, Hiroshi Shibuya, and Yuji Yamanashi. The adaptor-like protein ROG-1 is required for activation of the Ras-MAP kinase pathway and meiotic cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells*, **12**, 407-420 (2007) (査読有)
11. David Beeson, Osamu Higuchi, Jackie Palace, Judy Cossins, Hayley Spearman, Susan Maxwell, John Newsom-Davis, Georgina Burke, Peter Fawcett, Masakatsu Motomura, Juliane S. Muller, Hanns Lochmuller, Clarke Slater, Angela Vincent, and Yuji Yamanashi. Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy. *Science*, **313**, 1975-1978 (2006) (査読有)
12. Kumiko Okada, Akane Inoue, Momoko Okada, Yoji Murata, Shigeru Kakuta, Takafumi Jigami, Sachiko Kubo, Hirokazu Shiraishi, Katsumi Eguchi, Masakatsu Motomura, Tetsu Akiyama, Yoichiro Iwakura, Osamu Higuchi, and Yuji Yamanashi. The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science*, **312**, 1802-1805 (2006) (査読有)
13. Miyuki Honma, Osamu Higuchi, Masaki Shirakata, Tomoharu Yasuda, Hiroshi Shibuya, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, and Yuji Yamanashi. Dok-3 sequesters Grb2 and inhibits the Ras-Erk pathway downstream of protein-tyrosine kinases. *Genes Cells*, **11**, 143-151 (2006) (査読有)
14. Ryuichi Mashima, Kazuko Saeki, Daisuke Aki, Yasumasa Minoda, Hiromi Takaki, Takahito Sanada, Takshi Kobayashi, Hiroyuki Aburatani, Yuji Yamanashi, and Akihiko Yoshimura. FLN29, a novel interferon- and LPS-inducible gene acting as a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *J. Biol. Chem.*, **280**, 41289-41297 (2005) (査読有)
15. Hisaaki Shinohara, Akane Inoue, Noriko Toyama-Sorimachi, Yoshinori Nagai, Tomoharu Yasuda, Hiromi Suzuki, Reiko Horai, Yoichiro Iwakura, Tadashi Yamamoto, Hajime Karasuyama, Kensuke Miyake, and Yuji Yamanashi. Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of lipopolysaccharide-induced signaling. *J. Exp. Med.*, **201**, 333-339 (2005) (査読有)
- [学会発表] (計 27 件)
1. Yuji Yamanashi: Dok-7, MuSK, and the development of the neuromuscular junction. In International Conference on Myasthenia Gravis, December 1, 2009, Paris, France. (Plenary Lecture)
 2. Yuji Yamanashi: Activation of a receptor kinase by an adaptor-like protein upon neuromuscular synaptogenesis. In The 9th Korea-Japan Symposium on Cancer and Aging Research, March 11, 2009, Damyang, Korea. (Plenary Lecture)
 3. Yuji Yamanashi: Dok-7/MuSK signaling and *DOK7* myasthenia. In Symposium 4S2 of The 31st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan and The 81st Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, December 12, 2008, Kobe, Japan. (Invited)
 4. Yuji Yamanashi: Dok-7/MuSK signaling and *DOK7* myasthenia. In Symposium 1 of the 20th meeting of the Japanese Society for Neuroimmunology, April 17, 2008, Niigata, Japan. (Invited)
 5. Yuji Yamanashi: Dok-7 signaling and its defects in *DOK7* myasthenia. In The 15th East Asia Joint Conference on Biomedical Research, July 22, 2008, Seoul, Korea. (Invited)
 6. Yuji Yamanashi: Dok-7/MuSK signaling and a congenital myasthenic syndrome. In The 8th Japan-Korea Symposium on Cancer and Aging Research, August 11, 2007, Gifu, Japan. (Invited)
 7. Yuji Yamanashi: Activation of the receptor tyrosine kinase MuSK by Dok-7 and myasthenia. In Workshop 4W19 of The 30th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan and The 80th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, December 14, 2007, Yokohama, Japan. (Invited)
 8. Yuji Yamanashi: Dok-7/MuSK signaling and a congenital myasthenic syndrome. In 7th Japanese-French Workshop on "Development of Molecular Therapy toward Muscular Dystrophy", June 8, 2007, Hayama, Japan. (Invited)
 9. Yuji Yamanashi: Dok-mediated signaling in Cancer and other disorders. In Symposium 1 of 2006 Korean Society of

Medical Biochemistry and Molecular Biology Meeting, October 26, 2006, Seoul, Korea. (Invited)

10. Yuji Yamanashi: Regulation of cellular signaling by the Dok-family adaptors. In 15th Endotoxin and LPS Meeting. June 24, Tokyo, Japan (Invited)
11. Yuji Yamanashi: Roles of Dok-1 and Dok-2 in negative regulation of immune signaling. In Symposium 9 of 2005 General Meeting of The Japanese Society for Immunology, December 14, 2005, Yokohama, Japan. (Invited)
12. Yuji Yamanashi: Roles of the Dok-family adaptors in hematopoietic cells. In The 7th Korea-Japan Symposium on Cancer and Aging Research, November 4, 2005, Muju, Korea. (Invited)

[図書] (計10件)

1. 井上茜、瀬戸口喜代子、樋口理、山梨裕司: 受容体型キナーゼの細胞内からの活性、実験医学、羊土社、27巻(6月号)、2009、p1384-1387
2. 山梨裕司: Dok-7 シグナルと筋無力症、実験医学、羊土社、26巻(増刊)、2008、p103-110
3. 山梨裕司: 免疫機構と Dok-1/2 を介した抑制シグナル、Annual Review 免疫 2007、中外医学社、2006、p85-92
4. 山梨裕司: チロシンキナーゼのシグナル伝達、実験医学、羊土社、23巻(増刊)、2005、p1657-1665

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 筋特異的チロシンキナーゼの活性化を制御するポリペプチドをコードするDNA

発明者: 山梨裕司、他

権利者: 東京医科歯科大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2007/059050

出願年月日: 2007年4月26日

国内外の別: 国外

名称: 筋特異的チロシンキナーゼの活性化を制御するポリペプチドをコードするDNA

発明者: 山梨裕司、他

権利者: 東京医科歯科大学

種類: 特許

番号: 特願 2006-158987

出願年月日: 2006年6月7日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/genetics/html/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山梨 裕司 (YAMANASHI YUJI)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号: 40202387

(2) 研究分担者

樋口 理 (HIGUCHI OSAMU)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号: 50361720

真嶋 隆一 (MASHIMA RYUICHI)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号: 00401365