

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17024026
 研究課題名（和文）神経細胞の運命決定および動態制御における細胞外マトリックス・リモデリングの役割
 研究課題名（英文）Elucidating the role of extracellular matrix remodeling on the fate and behavior of neuron
 研究代表者 野田 亮（NODA MAKOTO）
 京都大学・医学研究科・教授

研究成果の概要（和文）：悪性転換抑制遺伝子として発見された *RECK* がマウス胎児では神経前駆細胞（NPC）に高発現しており、その欠損によって NPC の分裂低下と早期分化が起こることを見出した。この現象の解析から、*Reck* が ADAM10 による Notch リガンドの shedding を抑制することが分かった。また、神経筋投射が起こる胎生後期の横隔膜において、神経筋接合部（筋細胞側の二次襞）に急速な *Reck* の蓄積が起こることを見出した。

研究成果の概要（英文）：*RECK*, first identified as a transformation suppressor gene, is expressed at relatively high levels in neural precursor cells (NPCs) in mouse embryos; in *Reck*-deficient mice, NPCs show reduced proliferation and precocious differentiation. Our study to understand the mechanism of this phenomenon revealed that *Reck* inhibits ADAM10-mediated Notch-ligand shedding. We also found that in the diaphragm of late-stage embryos, *Reck* rapidly accumulates in the neuromuscular junctions, mainly in the secondary folds of the post-synaptic muscle membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	3,600,000	0	3,600,000
2006年度	3,600,000	0	3,600,000
2007年度	3,600,000	0	3,600,000
2008年度	3,600,000	0	3,600,000
2009年度	3,600,000	0	3,600,000
総計	18,000,000	0	18,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：がん 発生 マウス遺伝学 MMP ADAM Notch シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の移動や突起伸長などの挙動を支える重要な要素として細胞外マトリックス（ECM）があるが、従来の研究は、インテグリン等の ECM 受容体やそのシグナル伝達機構など、細胞内の事象に重点が置かれていた。我々は、神経分化を含む多くの生命現象に関わることが知られている RAS シ

グナル伝達系の機能的標的遺伝子として *RECK* を発見し、それが ECM リモデリングの主要な推進役であるマトリックス・メタロプロテアーゼ（MMP）の膜結合（GPI-アンカー）型制御因子（分子量 125 kDa の糖タンパク質）をコードすることを見出した。胎生中期のマウス胚において、*Reck* は神経管内で長い突起を伸ばした radial glia 様細胞

に高く発現されている。また、*Reck* 欠損マウスは胎生 10.5 日 (E10.5) あたりに神経管形成異常を伴う胎生致死形質を示す。多くの ECM 成分やそれらを分解する MMP、また MMP を阻害する分泌性タンパク質 tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) が遺伝子ファミリーにコードされているのに対し、*RECK* はショウジョウバエからヒトまで単一遺伝子として強く保存されている。このため、*Reck* 欠損マウスの解析は、*Reck* 自体の機能に加え、ECM や MMP の機能についても新たな洞察をもたらすものと期待された。

2. 研究の目的

Reck 欠損マウスに見られる中枢神経系の異常とそのメカニズム解明を通して、神経回路構築における ECM および ECM リモデリングの役割に洞察を加える。

3. 研究の方法

様々な発生段階にある正常マウスにおける *Reck* の発現を免疫染色法を用いて解析した。また、*Reck* 欠損の効果も、組織および培養細胞レベルで解析した。

4. 研究成果

1) *Reck* は Notch シグナルを制御する

RECK は、その一次構造から、GPI アンカーを介して細胞表面に局在すると予測された (図 1 A)。E10.5、E14.5、P1 (出生直後) の正常マウス組織切片において、神経前駆細胞マーカー Nestin と *Reck* との 2 重免疫染色像がほぼ完全に一致することを見出した。また、*Reck* 欠損マウス E10.5 胚では、Nestin 陽性細胞が著しく少なく、成熟神経 (TuJ1 陽性) 細胞の増加と広範囲の分布がみられ、この領域での BrdU 取り込みが減弱していることから、神経前駆細胞の分裂が低下し、神経分化が加速されている可能性が示唆された。この表現型は、本研究領域班員である影山龍一郎博士らが発表した *Hes1/Hes5* 欠損マウスの表現型と酷似している。そこで Notch シグナルの状態を検討したところ、*Reck* 欠損マウスでは、活性化型 Notch、*Hes1*、*Hes5* の量が低下し、*Neurog1*、*Neurod1* の量が増加していることが判明した。

次に、E10.5 胚頭部細胞 (NPC) の分散浮遊培養 (neurosphere assay) を試みると、*Reck* 欠損マウス由来 NPC の neurosphere 形成能は顕著に低下しており、この欠陥は、*Reck* や活性化型 Notch (Ca-Notch1) の発現ベクターを導入することで部分的に抑制された。また、正常マウス由来 NPC に *Reck* 阻害 RNA (shRNA) 発現ベクターを導入すると、Nestin 陽性 NPC の増殖が低下し (すなわち *Reck* 欠損マウス NPC の表現型が再現され)、この効果は活性化型 Ca-Notch1 の発現によっ

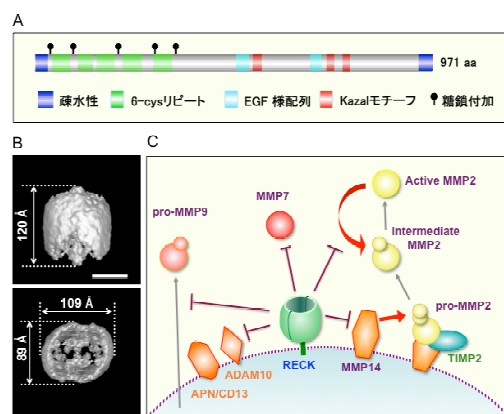


図 1 *RECK* タンパク質の性質
A. *RECK* タンパク質の一次構造
B. *RECK* タンパク質 2 量体の形態
C. *RECK* タンパク質の活性

て抑制された。

細胞表面受容体である Notch の活性化には 2 つのプロテアーゼ (ADAM17、 α -secretase) の関与が知られている。また、隣接細胞表面にある Notch リガンド (Delta, Jagged など) の shedding には ADAM10 の関与が知られている。ADAM は MMP と近縁のプロテアーゼ・ファミリーであることから、*Reck* が ADAM10 および ADAM17 の活性に影響を与えている可能性を検討するために、これらのプロテアーゼに特異的な阻害剤や shRNA の効果を、NPC 培養系や *in vivo* 遺伝子導入法を用いて調べた。その結果、特に ADAM10 の阻害が *Reck* 欠損の表現型を抑制することが判明した。ADAM10 は、Delta1 の shedding に関与することが以前に報告されているが、*Reck* がこの反応を阻害することも精製タンパク質を用いた実験系において示された。

以上の研究により、少なくとも神経発生において *Reck* が Notch シグナルの重要な正の制御因子として働くこと (図 2)、

Reck の標的となるプロテアーゼが MMP

ファミリーに限定されないこと (図 1 C)、*Reck* によって保護される分子が ECM 成分に限られず細胞表面タンパク質をも含むこと、などが明らかとなった。

2) *Reck* は神経筋接合部に集積する

Reck 欠損マウスは胎生致死形質を示すため、E10.5 日以降の発生における *Reck* の役割を知るためには条件的 *Reck* 欠損マウスが有用と考えられるが、この問題にアプローチする準備として、まず、正常マウスの発生後期における *Reck* の発現パターンを解析した。免疫染色法による解析では、E13.4~E14.5 胚の骨格筋 (特に筋線維の両端部) において *Reck* の高い発現が観察された。一方、

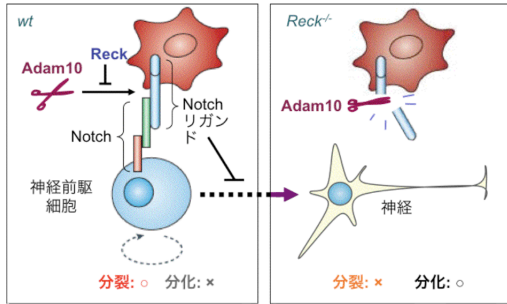


図2 Notch シグナルにおける Reck の役割

in situ hybridization 法を用いた解析では、E13.5~E16.5 胚の軟骨に *Reck* の高い発現が見られた。分化誘導のかかる培養細胞を用いた実験においては、いずれの場合にも、分化の初期には *Reck* の発現は低く抑えられており、この時期における *Reck* の強制発現は細胞融合（筋）や細胞塊形成（軟骨）を抑制すること、また、分化の後期には内在性 *Reck* の発現が高まるが、これを抑制すると ECM の蓄積を伴う組織の成熟が阻害されることが見出された。

次に出生直前のマウス胎児切片を免疫染色法により検索した結果、*Reck* 発現の顕著な場として神経筋接合部 (NMJ) が見出された。2重免疫染色によって種々のマーカーとの比較を行った結果、*Reck* はシナプス後細胞（すなわち筋肉側）に発現していることが示唆された。免疫電子顕微鏡観察では、*Reck* がシナプス直下の二次葉および細

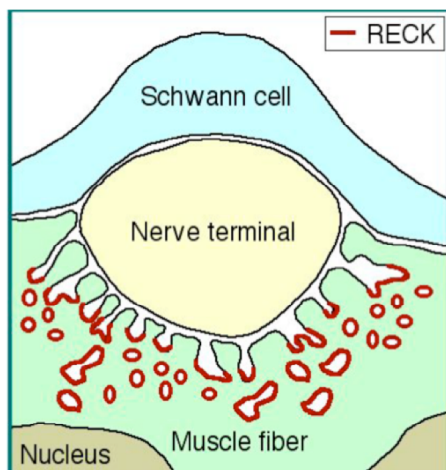


図3 神経筋接合部における *Reck* の局在

胞内小胞に局在することが見出された (図3)。興味深いことに、横隔膜では、それまで筋肉表面に拡散していた *Reck* が、神経シナプスの形成が起こる E18.5 の辺りで急速に NMJ に集積するようになることも分かった。

3) その他の成果

Reck の発現は細胞環境に応じて変化する。ヒトでは種々の臓器の腫瘍において *RECK* の発現低下が見られる。マウス線維芽細胞では、種々のがん遺伝子が *Reck* の発現を抑制する。一方、*RECK* を強制発現させたがん細胞をヌードマウスに移植した場合、元の細胞に比べ腫瘍血管新生、浸潤、転移の低下が見られる。このため、*RECK* の発現制御機構には癌治療という観点からも興味を持たれる。上述の骨格筋分化における *Reck* の発現制御には、*MyoD* (負の制御) と *MRF4* (正の制御) の関与が示唆された。線維芽細胞では、*Reck* の発現が細胞密度と血清によって大きく変動し、これらの制御には *Src*、*Fak*、*PI3-kinase* が関与することが見出された。さらに、ヒト大腸がん由来細胞株においては、マイクロ RNA による *RECK* 発現制御が見出された。すなわち、*RAS/ERK* 経路によって発現誘導される *miR-21*、低酸素によって発現誘導される *miR-372/373*、構成的に発現される *miR-15/16* という 3 群のマイクロ RNA が *RECK* タンパク質の発現量を負に制御する。

Reck タンパク質は釣り鐘型の 2 量体を形成し *MMP* による *fibronectin* 分解を抑制する

Reck/Mmp1/Mmp14 三重変異マウス線維芽細胞を宿主として、C 末端 GPI アンカーシグナルを欠損させた組換え体 *RECK* タンパク質を発現させ、単一バンドにまで精製する方法を確立した。このタンパク質を用いた電子顕微鏡観察および酵素学的解析により、*RECK* が釣り鐘型の 2 量体を形成すること (図 1 B)、高濃度の *MMP* によって切断されること、*MMP7* による *fibronectin* 切断を拮抗阻害し、特定の長さの断片の量を増やす作用を持つことなどを見出した。

Reck は安定な細胞接着と移動に必要であ

単一細胞レベルでの *Reck* の役割は何か、という問題にアプローチするために、緑色蛍光タンパク質 (GFP) の配列をシグナル・ペプチド配列の直下に in frame で挿入し、GFP-*RECK* 融合タンパク質を発現するベクターを構築した。このベクターを線維芽細胞に導入して *RECK* タンパク質の細胞内局在を time-lapse 共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、*RECK* が細胞底面、核周囲、および膜ラッフルに多く局在することが見出された。この結果は、免疫蛍光染色の結果とも一致した。次に、*Reck* 欠損マウスから樹立した線維芽細胞 (MEF) に *RECK* 発現ベクターあるいは空ベクターを導入し、両者の行動を time-lapse 顕微鏡によって比較

した。その結果、Reck 欠損 MEF においては、細胞伸展が弱く、接着斑が安定化せず、安定した突起も形成できないことが分かった。細胞移動に際しては、移動速度は速いが保針性が低いことが分かった。また、これらの欠陥の多くが fibronectin でコートした基質上では抑制されることを見出された。これは、前項で述べた酵素学的知見とも一致し、fibronectin の保護が Reck の重要な役割の一つであるというモデルを支持する。

共同研究

高橋智聡グループとの共同研究： がん抑制遺伝子 *Rb* を欠損したマウスで見られる甲状腺神経内分泌腫瘍において、プロトがん遺伝子 *Nras* ががん抑制遺伝子として機能するという予想外の現象を見出した。さらに、この現象の分子メカニズムを解析する中で、*Rb* が E2F の阻害を介して *Nras* の脂質修飾（活性に必須）を抑制するという機構を見出した。*Rb* 欠損マウスでは、*Nras* の過剰な活性化がおり、これが細胞老化、DNA 損傷修復応答などを惹起するものと考えられる。

木下専グループとの共同研究： 我々は以前に、脳発生の進行に伴って発現が低下する遺伝子群を探索し、その内の一つ *Nedd5* が現在はセプチンと呼ばれている新たな細胞骨格系タンパク質ファミリーのメンバーをコードすることを見出した（木下ら *Genes Dev* 1997）。脳で発現の高い *Sept4* がパーキンソン病などの α -シヌクレイン病で見られる Lewy 小体にも集積することも報告した。今回は、*Sept4* 欠損マウスを用い、この分子が α -シヌクレイン病の病態を緩和させる作用を持つことを示した。

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 17 件)

1. Loayza-Puch F, Yoshida Y, Matsuzaki T, Takahashi C, Kitayama H, Noda M. Hypoxia and RAS-signaling pathways converge on, and cooperatively downregulate, the RECK tumor-suppressor protein through microRNAs. *Oncogene* 29, 2638-2648 (2010). (査読有)
2. Miki T, Shamma A, Kitajima S, Takegami Y, Noda M, Nakashima Y, Watanabe K, Takahashi C. The beta1-integrin-dependent function of RECK in physiologic and tumor angiogenesis. *Mol Cancer Res* 8, 665-676 (2010). (査読有)
3. Kimura T, Okada A, Yatabe T, Okubo M, Toyama Y, Noda M, Okada Y. RECK Is Up-Regulated and Involved in Chondrocyte Cloning in Human Osteoarthritic Cartilage. *Am J Pathol* (2010) [Epub ahead of print]. (査読有)
4. Shamma A, Takegami Y, Miki T, Kitajima S, Noda M, Obara T, Okamoto T, Takahashi C. Rb Regulates DNA damage response and cellular senescence through E2F-dependent suppression of N-ras isoprenylation. *Cancer Cell* 15, 255-269 (2009). (査読有)
5. Omura A, Matsuzaki T, Mio K, Ogura T, Yamamoto M, Fujita A, Okawa K, Kitayama H, Takahashi C, Sato C, Noda M. RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits matrix metalloproteinase-catalyzed cleavage of fibronectin. *J Biol Chem* 284, 3461-3469 (2009). (査読有)
6. Morioka Y, Monypenny J, Matsuzaki T, Shi S, Alexander DB, Kitayama H, Noda M. The membrane-anchored metalloproteinase regulator RECK stabilizes focal adhesions and anterior-posterior polarity in fibroblasts. *Oncogene* 28, 1454-1464 (2009). (査読有)
7. Hatta M, Matsuzaki T, Morioka Y, Yoshida Y, Noda M. Density- and serum-dependent regulation of the Reck tumor suppressor in mouse embryo fibroblasts. *Cell Signal* 21, 1885-1893 (2009). (査読有)
8. Ohne Y, Takahara T, Hatakeyama R, Matsuzaki T, Noda M, Mizushima N, Maeda T. Isolation of hyperactive mutants of mammalian target of rapamycin. *J Biol*

- Chem* 283, 31861-31870 (2008). (査読有)
10. Kawashima S, Imamura Y, Chandana EP, Noda T, Takahashi R, Adachi E, Takahashi C, Noda M.. Localization of the membrane-anchored MMP-regulator RECK at the neuromuscular junctions. *J Neurochem* 104, 376-385 (2008). (査読有)
 11. Xu J, Shi S, Matsumoto N, Noda M., Kitayama H.. Identification of Rgl3 as a potential binding partner for Rap-family small G-proteins and profilin II. *Cell Signal* 19, 1575-1582 (2007). (査読有)
 12. Noda M., Takahashi C. Recklessness as a hallmark of aggressive cancer. *Cancer Sci* 98, 1659-1665 (2007). 総説 (査読有)
 13. Muraguchi T, Takegami Y, Ohtsuka T, Kitajima S, Chandana EP, Omura A, Miki T, Takahashi R, Matsumoto N, Ludwig A, Noda M., Takahashi C. RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. *Nat Neurosci* 10, 838-845 (2007). (査読有)
 14. Miki T, Takegami Y, Okawa K, Muraguchi T, Noda M., Takahashi C. The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. *J Biol Chem* 282, 12341-12352 (2007). (査読有)
 15. Kondo S, Shukunami C, Morioka Y, Matsumoto N, Takahashi R, Oh J, Atsumi T, Umezawa A, Kudo A, Kitayama H., Hiraki Y, Noda M.. Dual effects of the membrane-anchored MMP regulator RECK on chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *J Cell Sci* 120, 849-857 (2007). (査読有)
 16. Ihara M, Yamasaki N, Hagiwara A, Tanigaki A, Kitano A, Hikawa R, Tomimoto H, Noda M., Takanashi M, Mori H, Hattori N, Miyakawa T, Kinoshita M. Sept4, a Component of Presynaptic Scaffold and Lewy Bodies, Is Required for the Suppression of alpha-Synuclein Neurotoxicity. *Neuron* 53, 519-533 (2007). (査読有)
 17. Takahashi C, Contreras B, Iwanaga T, Takegami Y, Bakker A, Bronson RT, Noda M., Loda M, Hunt JL, Ewen ME. Nras loss induces metastatic conversion of Rb1-deficient neuroendocrine thyroid tumor. *Nat Genet* 38, 118-123 (2006). (査読有)
 18. Oh J, Diaz T, Wei B, Chang H, Noda M., Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 upregulates RECK expression via dephosphorylation of paxillin tyrosine residues 31 and 118. *Oncogene* 25, 4230-4234 (2006). (査読有)
 19. Nakaji K, Ihara M, Takahashi C, Itohara S, Noda M., Takahashi R, Tomimoto H. Matrix metalloproteinase-2 plays a critical role in the pathogenesis of white matter lesions after chronic cerebral hypoperfusion in rodents. *Stroke* 37, 2816-2823 (2006). (査読有)
 20. Chang H, Lee J, Poo H, Noda M., Diaz T, Wei B, Stetler-Stevenson WG, Oh J. TIMP-2 promotes cell spreading and adhesion via upregulation of Rap1 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 1201-1206 (2006). (査読有)
 21. Takenaka K, Ishikawa S, Yanagihara K,

Miyahara R, Hasegawa S, Otake Y,
Morioka Y, Takahashi C, Noda M., Ito H,
Wada H, Tanaka F. Prognostic significance
of reversion-inducing cysteine-rich protein
with Kazal motifs expression in resected
pathologic stage IIIA N2 non-small-cell
lung cancer. *Ann Surg Oncol* 12, 817-824
(2005). (査読有)

22. Ihara M, Kinoshita A, Yamada S, Tanaka H,
Tanigaki A, Kitano A, Goto M, Okubo K,
Nishiyama H, Ogawa O, Takahashi C,
Itoharu S, Nishimune Y, Noda M.,
Kinoshita M. Cortical organization by the
septin cytoskeleton is essential for
structural and mechanical integrity of
mammalian spermatozoa. *Dev Cell* 8, 343-
352 (2005). (査読有)
23. Echizenya M, Kondo S, Takahashi R, Oh J,
Kawashima S, Kitayama H., Takahashi C,
Noda M.. The membrane-anchored MMP-
regulator RECK is a target of myogenic
regulatory factors. *Oncogene* 24, 5850-
5857 (2005). (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

(1) 今村行雄

神経筋接合部における細胞外マトリックス
制御因子の研究

第 32 回日本神経科学学会

2009 年 9 月 16 日～9 月 18 日

名古屋国際会議場

(2) 今村行雄

一過性脳虚血後のマウス脳における膜結合
型マトリックスメタロプロテアーゼを制御
する RECK タンパク質の役割

2008 年 7 月 9 日

第 31 回神経科学学会

東京国際フォーラム

(3) 今村行雄

cAMP 依存性イオンチャネル制御における
Rap1 と Ras の役割

2005 年 5 月 19 日

第 82 回日本生理学会大会

仙台国際センター

[その他]

ホームページ等

<http://www.users.iimc.kyoto-u.ac.jp/~z59192/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 亮 (NODA MAKOTO)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：30146708

(2) 研究分担者

松崎朋子 (MATSUZAKI TOMOKO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：50402855
(H17 年-H19 年)

吉田陽子 (YOSHIDA YOKO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：60130324
(H18 年-H19 年)

今村行雄 (IMAMURA YUKIO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：90447954
(H19 年)

(3) 連携研究者

松崎朋子 (MATSUZAKI TOMOKO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：50402855
(H20 年-H21 年)

吉田陽子 (YOSHIDA YOKO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：60130324
(H20 年-H21 年)

今村行雄 (IMAMURA YUKIO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：90447954
(H20 年-H21 年)