

平成 21 年 4 月 30 日 現 在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790287

研究課題名 (和文) RET チロシン 1062 下流のシグナルの個体発生に果たす役割の検討

研究課題名 (英文) Investigation for the role of intracellular signaling via tyrosine 1062 in RET in mammalian development

研究代表者

時々輪 真由美 (JIJIWA MAYUMI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・COE 特任講師

研究者番号：50378006

研究成果の概要：

甲状腺癌やヒルシュスプルング病の原因遺伝子である RET は臓器の正常な発生にも不可欠である。我々は遺伝子組換えマウスを用いた研究の結果、RET タンパクの中のあるアミノ酸が精子のもととなる幹細胞の増殖や分化の制御に重要であることを示した。また腎臓の発生においては Sprouty2 という遺伝子が RET の働きに関与するが、腸管神経の発生においては RET の影響は Sprouty2 より強いかもしれないということがわかり、ヒルシュスプルング病のような腸管神経の発生異常を呈する疾患の基礎データを示すことができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：RET、GDNF、細胞内シグナル伝達、精子幹細胞、Sprouty2、個体発生

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) GDNF/RET シグナル伝達系について

RET 癌原遺伝子は多発性内分泌腫瘍症 2A 型・2B 型、家族性甲状腺乳頭癌、Hirschsprung 病などの遺伝性、非遺伝性疾患の原因遺伝子である。受容体型チロシンキナーゼをコードしており、co-receptor である GFR $\alpha$ 1 を介して、神経栄養因子の 1 つである GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) と結合し、細胞内へシグナルを伝達する。RET ノックアウトマウスでは腸管神経節の欠損、

および腎臓の無形成、もしくは著しい低形成を示すことが報告され、RET が腸管神経節、腎臓の発生、分化に重要な役割を果たしていることが判明した。同様に GDNF のノックアウトマウスでも腸管神経節の欠損、腎臓の低形成が認められ、GDNF/RET シグナル伝達系がこれらの臓器の発生に不可欠な要素であることが明らかとなった。

## (2) RET チロシン 1062 を介するシグナルの果たす役割について

RET のコドン 1062 のチロシン (Y1062) は SHC

をはじめとする多くのアダプタータンパクの結合部位であり、RET 下流のシグナル伝達経路の活性化には Y1062 を介するシグナルの果たす役割が極めて大きいと考えられる。我々はこれまでに RET の Y1062 をフェニルアラニンに置換したノックインマウス (RET KI マウス) を作製し、Y1062 を介するシグナルの欠如が個体発生にもたらす変化を検討した。RET KI マウスは小腸から大腸の間で腸管神経の遊走が停止しており、神経細胞の数も著しく減少していた。腎臓も低形成で、胎生期において尿管芽の分岐の数が減少していた。生化学的検討によって Y1062 の下流に存在する ERK、AKT のリン酸化が低下していることが確認され、RET の Y1062 を介するシグナルが腸管神経、腎臓の発生に大きく関わっていることが明らかとなった。

#### (3) GDNF/RET シグナル伝達系と精子幹細胞の機能発現

RET は精子形成にも関わることが報告されている。RET と GFR $\alpha$ 1 が精細胞系列の幹細胞である type A 精祖細胞に、GDNF は精細胞の支持組織であるセルトリ細胞に発現している。RET ノックアウトマウスの精巣を用いた移植実験では type A 精祖細胞の減少、消失が確認され、RET が精子幹細胞の自己複製にかかわることが示唆された。また GDNF が精子幹細胞の増殖因子であること、GDNF 刺激が精子幹細胞の未分化状態を維持することなどが判明し、GDNF/RET シグナル伝達系が精子幹細胞の機能の発現に極めて重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。これを受けて我々も RET KI マウスにおける精子形成を観察したところ、生後 7 日目以降から精細胞の減少がみられ、28 日目にはほとんどの精細胞が消失していた。RET 陽性の type A 精祖細胞も消失していたことから、精細胞の減少は精子幹細胞の枯渇に基づくものと思われ、精子幹細胞の自己複製、未分化状態の維持 (分化抑制) にも RET の Y1062 を介するシグナルがかかわる可能性が推測された。

#### (4) GDNF/RET シグナル伝達系と Sprouty2 による ERK シグナルの制御との関係

Sprouty2 は FGF によって活性化され、ERK のシグナルを負に制御する分子である。胎生期の脳皮質や肺芽、内耳コルチ器に発現が見られる。他施設の報告によると、Sprouty2 ノックアウトマウス (sp2 KO マウス) では ERK のシグナルが過剰となることで腸管神経系が過形成となる。このマウスの腸管断片を GDNF 刺激すると ERK、AKT の過リン酸化が起き、また腹腔内に抗 GDNF 抗体を注入すると腸管神経系の過形成が改善した。これらのこ

とから GDNF/RET シグナル伝達系と Sprouty2 の関連性が示唆された。

## 2. 研究の目的

(1) 精子幹細胞の機能発現において RET Y1062 を介するシグナルが果たす役割を明らかにする:

RET KI マウスを用いて、RET Y1062 を介するシグナルが精子幹細胞の自己複製能、未分化状態の維持にどのように関与するかを明らかにする。

(2) GDNF/RET シグナル伝達系と Sprouty2 の制御するシグナル伝達系との関係を明らかにする:

RET KI マウスと sp2 KO マウスとの交配から二重変異マウスを作成し、その表現型をもとに Sprouty2 と GDNF/RET シグナル伝達系との関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 精子幹細胞の機能発現において RET Y1062 を介するシグナルが果たす役割を明らかにする:

### ① 精巣の組織学的検討

生後 0、7、14、21、28 日の RET KI マウスの精巣を採取し、重量を測定した後、ホルマリン固定パラフィン包埋し、組織切片を作製する。この切片を HE 染色し、日齢ごとに組織学的異常について比較検討する。

### ② 精子幹細胞の同定

前述の切片に対して抗 RET 抗体、抗 PLZF 抗体 (幹細胞のマーカー) で免疫染色を施し、RET 陽性の精子幹細胞の数を定量して同細胞の減少を確認する。

### ③ 幹細胞の減少におけるアポトーシスの関与についての検討

前述の切片で TUNEL 法によってアポトーシスに陥った細胞を検出し、定量的に比較検討する。

(2) GDNF/RET シグナル伝達系と Sprouty2 の制御するシグナル伝達系との関係を明らかにする:

### ① Sprouty2 KO/RET Y1062F KI 二重変異マウス (sp2/KI マウス) を作出する

RET KI マウスのヘテロ変異マウス (W/He) と sp2 KO マウスのヘテロ変異マウス (He/W) を交配して二重変異を有するヘテロ変異マウス (He/He) を産出させる。さらに産出された二重変異ヘテロマウスどうしを交配し、二重変異を有するホモ変異マウス (Ho/Ho) を産出させる。

② 変異マウスの生存状況、外表所見の検討  
最終的に得られる 16 種類の遺伝子型のマウ

スについて寿命、外表所見について観察する。

#### ③変異マウスの臓器所見の検討

16種類の遺伝子型のマウスについて腎臓、腸管をはじめとする主要臓器の重量測定、肉眼所見を検討する。その後ホルマリン固定パラフィン包埋し、組織切片を作製する。この切片をHE染色し、日齢ごとに組織学的異常について比較検討する。腸管についてはwhole mountでNADPH染色を行い、腸管神経の発生状況をin situで観察する。

#### ④organ cultureによるシグナル伝達の検討 (後根神経節細胞)

W/W、Ho/W、W/Ho、Ho/Hoの生後0日のマウスから後根神経節細胞を採取し、初代培養する。これらをGDNF刺激した後タンパクの組織ライセートを作製し、Western blottingによってAKT、ERKのリン酸化を検討する。

#### ⑤organ cultureによるシグナル伝達の検討 (胎児腎臓、消化管)

sp2/KIマウスのHe/Heどうしで交配し、妊娠させた雌マウスから胎生15.5日で胎児を採取する。これらの胎児から腸管と腎臓を採取、培養し、GDNF刺激した後タンパクの組織ライセートを作製し、Western blottingによってAKT、ERKのリン酸化を検討する。

## 4. 研究成果

(1)精子幹細胞の機能発現においてRET Y1062を介するシグナルが果たす役割を明らかにする:

生後0、7、14、21、28日のRET KIマウスの精巣の重量測定の結果、RET KI (Ho)マウスでは14日目以降精巣が萎縮することがわかった。組織学的に検討したところ、精細管の数は同等であったが、RET KI (Ho)マウスでは14日目以降精細胞数が徐々に減少し、28日目にはほぼ消失していた。精細胞の減少が精子幹細胞の何らかの異常に起因するのではないかと考え、これらの精巣を抗RET抗体で免疫染色し、RET陽性細胞の数を定量した。その結果、生下時においてはRET陽性のgonocyte(精子幹細胞のもととなる細胞)の数は差はなかったが、RET KI (Ho)マウスでは生後7日目にはRET陽性細胞が減少し始め、生後14日ではごくわずかに残存するのみであった。さらにW、Heマウスではその後もRET陽性細胞が維持され、精子を産生し続けるのに対し、RET KI (Ho)マウスでは生後28日で完全にRET陽性細胞が消失し、精子は確認されなかった。RET陽性細胞の中に精子幹細胞が含まれていることから精子幹細胞が減少

していることが予想され、抗PLZF抗体(幹細胞のマーカー)で免疫染色し、精子幹細胞の数を定量したところ、RET陽性細胞と同じ動向を示した。TUNEL法による検討でアポトーシスは精細胞の減少への関与は少ないと考えられた。これらのことからRET KIマウスではRET陽性の精子幹細胞が自己複製することなしに分化してしまい、消失するものと考えられ、RET Y1062を介するシグナルは精子幹細胞の自己複製と分化の抑制に関係することが明らかとなった。本結果から、他の幹細胞においても自己複製と分化の抑制にGDNF/RETシグナル伝達系が関与する可能性、およびY1062を介するシグナルがそのキーとなる可能性が示唆された。今後の幹細胞研究において、GDNF/RETシグナル伝達系が癌幹細胞を含む様々な幹細胞を制御する因子の候補として、また幹細胞を用いた疾患治療戦略のターゲットとして推挙される。

(2)GDNF/RETシグナル伝達系とSprouty2の制御するシグナル伝達系との関係を明らかにする:

sp2/KIのHo/Hoマウスの腎臓はW/Wマウスより小さかったが、W/Hoマウスよりは大きかった。組織学的にW/Hoマウスの腎臓の低形成の原因である発生時における尿管芽のbranchingの減少が改善されていることが確認された。この結果から腎臓の発生においてはSprouty2の制御するERKシグナルとRET Y1062の下流のERKシグナルが強く関連していることが示唆された。腸管神経においては、胃ではW/Hoに見られる神経細胞の減少が不完全ながら改善されていたが、小腸、大腸においては改善は見られなかった。このことから、腸管神経の発生においては、RET Y1062下流のERKシグナルはSprouty2に制御されるERKシグナルより強い影響力を持っている可能性が示唆された。organ cultureサンプルを用いたWestern blottingによる生化学的なシグナル伝達の検証については、腎臓に関してはRET KI (Ho)マウスで低下していたERKシグナルがやや増加しており、組織学的な変化を裏付けるものと考えられた。またSprouty2をノックアウトすることでERKシグナルの抑制がとれるという仮説にも合致した。しかし、後根神経節や消化管に関しては、一定の結果が得られず、これらの臓器では発生の時期によって主体となるシグナル伝達経路が異なる可能性や、1つの臓器でも(特に消化管では)部位によってシグナルの活性化の状態が異なる可能性が考えられた。今回我々はsp2/KIマウスの大腸における腸管神経の発生を近位、中間、遠位の3点で詳細に

検討し、これまでに報告されていない事を見出した。この研究を通して Hirschsprung 病などの腸管神経の発生異常に基づく疾患の治療に貢献する有用な成果を得ることができたと考える。

#### 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 1 件)

1. Jijiwa M, Kawai K, Fukihara J, Nakamura A, Hasegawa H, Suzuki C, Sato T, Enomoto A, Asai N, Murakumo Y, Takahashi M. GDNF-mediated Signaling via RET Tyrosine 1062 is Essential for Maintenance of Spermatogonial Stem Cells. Genes Cells. 2008 Apr;13(4):365-74. 査読あり

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/patho2/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

時々輪 真由美 ( JIJIWA MAYUMI )  
名古屋大学・大学院医学系研究科・COE 特任講師  
研究者番号 : 50378006