

機関番号：33910
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590412
 研究課題名(和文) RET チロシンキナーゼの下流シグナルを調節する因子の探索と発癌制御への応用
 研究課題名(英文) Identification of downstream regulatory factor in RET signaling pathway and its application to cancer treatment
 研究代表者
 市原 正智 (ICHIHARA MASATOSHI)
 中部大学・生命健康科学部・教授
 研究者番号：00314013

研究成果の概要(和文)：

RET チロシンキナーゼ(以下 RET)は個体発生、腫瘍形成と関連の深い分子である。RET には主に2つのアイソフォーム (RET51、RET9)が発現しており生体内ではRET9の役割が重要であるとされる。RET 発現誘導細胞株をもちいた検討では、RET9 発現後に細胞内のチロシンリン酸化レベルの著しい上昇が見いだされた。下流の発現遺伝子の比較より2つの isoform 間で発現が変化した遺伝子として 261 個を同定した。これらには多数の転写因子が含まれた。次に GST pull-down 法により RET51 および RET9 間での共沈タンパク質の差を検討したが、両者の差を示す分子の同定には至らなかった。今後さらにスケールアップしての検討を加える。

研究成果の概要(英文)：

Ret tyrosine kinase (RET) plays critical roles in embryonic development as well as oncogenesis. RET is mainly expressed as two isoforms, RET51 and RET9, which have different C-terminal ends generated through alternative splicing, whereas previous studies show that RET9 is indispensable for nephrogenesis and enteric neurogenesis. We found remarkable increase of tyrosine-phosphorylated proteins in the cells after inducible expression of RET9 in MEF3T3 cells. We demonstrated that 261 genes were differentially expressed under inducible expression of either RET51 or RET9 by gene expression profiling. Ingenuity pathway analysis revealed that gene expression-related genes, including transcription factors, were enriched in these differentially expressed genes. Next we tried to identify differentially binding protein to RET between RET51 and RET9 using LC/MS, but we failed to find such candidate proteins, accounting for different function between RET51 and RET9.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、チロシンキナーゼ、アイソフォーム、DNA マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

RET チロシンキナーゼは遺伝子再構成および

点突然変異によりリガンド非依存性の持続的活性化を生じ、甲状腺乳頭癌、多発性内分

泌腫瘍症(MEN) 2型といった腫瘍性疾患を引き起こす。一方 RET チロシンキナーゼは生理的には腸管神経、腎臓の発生に重要な役割を果たす。RET チロシンキナーゼは alternative splicing により、3つの isoform を生じる。これらは 1062 番目のチロシン残基より C 末端に至るアミノ酸残基数により RET51 (long isoform)、RET9 (short isoform)、RET43 と呼ばれ、生体内では RET51 および RET9 が機能していると考えられている。遺伝子改変動物を用いた報告では、RET9 の発現が生理的な腸管神経、腎臓の発生に必要なかつ十分であることが示されその分子メカニズム検討がこれまでに行われている。一方発癌との関連では RET51 の形質転換能が強いとの報告もあり、alternative splicing により生じる 2 つの isoform の下流で引き起こされるシグナル差の分子メカニズムの理解は十分に進んでいない。

2. 研究の目的

(1) 変異 RET51 および RET9 誘導細胞株を用いて二つの isoform 間のシグナル伝達機構の差を明らかにする。

(2) 変異 RET51 および RET9 の下流で発現される遺伝子の比較より二つの isoform の機能的差異を明らかにする。

(3) 変異 RET51 または RET9 と特異的に結合する蛋白質を分離・同定し RET51 および RET9 の生体内での機能的差異を生じるメカニズムを明らかにして、発癌過程との関連を検討し発癌過程を制御する技術の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) テトラサイクリン誘導系をもちいて、変異型 RET51 または RET9 を細胞株に発現させる。その後の経時的な下流シグナルの変化を解析する。

(2) テトラサイクリン誘導系をもちいて、変異型 RET51 または RET9 を発現させた後、RNA を抽出する。その後東レ 3D Gene を用いた受託研究にてそれぞれの細胞株間で発現に差を示す遺伝子を同定し発現遺伝子のプロファイリングを行う。更に同定された遺伝子は Ingenuity Pathway Analysis (IPA) で検討し差を示す遺伝子群の特徴を明らかにし、生体内における機能的差異との関連を検討する。

(3) 変異型 RET51 または RET9 を免疫沈降して共沈する蛋白質を比較検討し変異型 RET51 または RET9 と特異的結合をする蛋白質を分離する。分離した蛋白質はマスマスプロトメトリーを用いて同定する。さらに GST と変異型 RET51 または RET9 の融合蛋白質を作成する。GST pull down を行い、変異型 RET51 または

RET9 と結合する蛋白質をより効率よく分離し同定する。

4. 研究成果

(1) 変異型 RET51 または RET9 間の経時的な下流シグナルの差の検討

テトラサイクリンの除去により変異型 RET51 および RET9 を MEF3T3 細胞中で誘導し、経時的な下流シグナルの変化を検討した。変異型 RET の発現誘導後 1 日程度で RET9 型を誘導した細胞株において細胞内のチロシンリン酸化レベルの上昇が見られ、両者の間で異なった分子のチロシンリン酸化が観察された。PTP1D/SHP2, PTP1C/SHP1, MKP2, KAP などの tyrosine phosphatase には発現量の差は観察されず、未知の調節機構があることが示唆された。

(2) 変異型 RET51 または RET9 間の発現遺伝子の差の検討

テトラサイクリンの除去により変異型 RET51 および RET9 を MEF3T3 細胞中で誘導した後、RNA を抽出し 2 つのアイソフォーム間の遺伝子発現の差を DNA マイクロアレイにより検討した。今回用いた 3D-Gene をプラットフォームとした DNA マイクロアレイでは発現量の低い遺伝子では real time PCR による検証では極めて再現性が乏しいことが示された。そこでシグナル値が低い遺伝子は破棄して検討した結果 real time PCR で得られる実際の RNA 量間で高い相関がえら得られた。他の実験系では 73% に real time PCR で再現性が確認出来る結果を得ている。再検証の結果 2 倍以上の差を示す遺伝子を対象とすると、261 個の遺伝子がアイソフォーム間で発現が異なる遺伝子として規定した。これらを IPA 解析したところ、遺伝子発現に関与すると規定される遺伝子群が有意に影響を受けることが明らかとなり NFkB と関連して PML, CREBBP, TFF1 等の発現が亢進している一方で FOXN3, PBX1, KLF13 などの転写因子の発現が低下し 2 つのアイソフォームの違いにより機能的差異を示す機構の一端が明らかとなった。

(3) 変異型 RET51 または RET9 と特異的結合を示す蛋白質の同定

変異型 RET51 および RET9 を MEF3T3 細胞中で発現誘導させた後に、RET を免疫沈降し共沈するタンパク質をマスマスプロトメトリーで同定することを予定したが、入手しうる抗 RET 抗体を用いた条件では銀染色レベルでの RET51 および RET9 間で十分な量の共沈タンパク質は確認できなかった。そこで RET の 2 つのアイソフォームのエクソン 12 以降と H4 遺伝子の融合遺伝子である PTC1/RET を新たに作成し、GST を 5' 末端または 3' 末端に導入しグルタチオンビーズを用いた pull-down

法により RET51 および RET9 間での共沈タンパク質の差を検討することとした。PTC1/RET の強制発現系では GST 蛋白を N 末端に付加した場合には 9 type の PTC1/RET で 2-3 倍のチロシンリン酸化の増多が観察された。続いて 293FT にトランスフェクションシライゼットを作成し pull-down 法を行い銀染色で検討し共沈されるタンパク質を多数観察した。両者間では GST の 5' 末端または 3' 末端への導入位置に関わらず 4G10 抗リン酸化チロシン抗体での検討ではリン酸化タンパク質の分布に再現性のある差が観察された。さらに 51 type のチロシン 1062 以降の 1062, 1096 のチロシンをフェニールアラニンに置換して検討したが沈降物、PTC1/RET のリン酸化レベルは野生型と比較して大きな差は認められなかった。また銀染色レベルでは両者間での差が観察されなかった。更にスケールアップしての検討を続けている。

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 18 件)

- ① Suzawa N, Ito M, Qiao S, Uchida K, Takao M, Yamada T, Takeda K, Murashima S. Assessment of factors influencing FDG uptake in non-small cell lung cancer on PET/CT by investigating histological differences in expression of glucose transporters 1 and 3 and tumour size. *Lung Cancer*. 2011;72:191-198. 査読有り.
- ② Ouchi Y, Baba Y, Koso H, Taketo MM, Iwamoto T, Aburatani H, Watanabe S. beta-Catenin signaling regulates the timing of cell differentiation in mouse retinal progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*. 2011;46:770-780. 査読有り.
- ③ Sekimoto T, Oda T, Pozo FM, Murakumo Y, Masutani C, Hanaoka F, Yamashita T. The molecular chaperone Hsp90 regulates accumulation of DNA polymerase eta at replication stalling sites in UV-irradiated cells. *Mol Cell*. 2010;37:79-89. 査読有り.
- ④ Murakami M, Ito H, Hagiwara K, Yoshida K, Sobue S, Ichihara M, Takagi A, Kojima T, Tanaka K, Tamiya-Koizumi K, Kyogashima M, Suzuki M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T. ATRA inhibits ceramide kinase transcription in a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y cells: the role of COUP-TFI. *J Neurochem*. 2010;112:511-520. 査読有り.
- ⑤ Liu J, Yu G, Zhao Y, Zhao D, Wang Y, Wang L, Li L, Zeng Y, Dang Y, Wang C, Gao G, Long W, Lonard DM, Qiao S, Tsai MJ, Zhang B, Luo H, Li X. REGgamma modulates p53 activity by regulating its cellular localization. *J Cell Sci*. 2010;123:4076-4084. 査読有り.
- ⑥ Kurotsuchi A, Murakumo Y, Jijiwa M, Kurokawa K, Itoh Y, Kodama Y, Kato T, Enomoto A, Asai N, Terasaki H, Takahashi M. Analysis of DOK-6 function in downstream signaling of RET in human neuroblastoma cells. *Cancer Sci*. 2010;101:1147-1155. 査読有り.
- ⑦ Hagiwara S, Murakumo Y, Mii S, Shigetomi T, Yamamoto N, Furue H, Ueda M, Takahashi M. Processing of CD109 by furin and its role in the regulation of TGF-beta signaling. *Oncogene*. 2010;29:2181-2191. 査読有り.
- ⑧ Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*. 2009;460:529-533. 査読有り.
- ⑨ Qiao S, Iwashita T, Ichihara M, Murakumo Y, Yamaguchi A, Isogai M, Sakata K, Takahashi M. Increased expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin in a case of colon adenocarcinoma associated with diffuse ganglioneuromatosis. *Clin Neuropathol*. 2009;28:105-112. 査読有り.
- ⑩ Mirza R, Qiao S, Murata Y, Seo H. Requirement of DHCR24 for postnatal development of epidermis and hair follicles in mice. *Am J Dermatopathol*. 2009;31:446-452. 査読有り.
- ⑪ Kato T, Shimono Y, Hasegawa M, Jijiwa M, Enomoto A, Asai N, Murakumo Y, Takahashi M. Characterization of the HDAC1 complex that regulates the sensitivity of cancer cells to oxidative stress. *Cancer Res*. 2009;69:3597-3604. 査読有り.
- ⑫ Itoh T, Fujita Y, Ito M, Masuda A, Ohno K, Ichihara M, Kojima T, Nozawa Y. Molecular hydrogen suppresses FcepsilonRI-mediated signal transduction and prevents

- degranulation of mast cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;389:651-656. 査読有り.
- ⑬ Hasegawa H, Senga T, Ito S, Iwamoto T, Hamaguchi M. A role for AP-1 in matrix metalloproteinase production and invadopodia formation of v-Crk-transformed cells. *Exp Cell Res.* 2009;315:1384-1392. 査読有り.
- ⑭ Fu Y, Ito M, Fujita Y, Ichihara M, Masuda A, Suzuki Y, Maesawa S, Kajita Y, Hirayama M, Ohsawa I, Ohta S, Ohno K. Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2009;453:81-85. 査読有り.
- ⑮ Enomoto A, Asai N, Namba T, Wang Y, Kato T, Tanaka M, Tatsumi H, Taya S, Tsuboi D, Kuroda K, Kaneko N, Sawamoto K, Miyamoto R, Jijiwa M, Murakumo Y, Sokabe M, Seki T, Kaibuchi K, Takahashi M. Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron.* 2009;63:774-787. 査読有り.
- ⑯ Tsutsui M, Hasegawa H, Adachi K, Miyata M, Huang P, Ishiguro N, Hamaguchi M, Iwamoto T. Establishment of cells to monitor Microprocessor through fusion genes of microRNA and GFP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;372:856-861. 査読有り.
- ⑰ Suzuki C, Murakumo Y, Kawase Y, Sato T, Morinaga T, Fukuda N, Enomoto A, Ichihara M, Takahashi M. A novel GDNF-inducible gene, BMZF3, encodes a transcriptional repressor associated with KAP-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;366:226-232. 査読有り.
- ⑱ Hasegawa T, Enomoto A, Kato T, Kawai K, Miyamoto R, Jijiwa M, Ichihara M, Ishida M, Asai N, Murakumo Y, Ohara K, Niwa Y, Goto H, Takahashi M. Roles of induced expression of MAPK phosphatase-2 in tumor development in RET-MEN2A transgenic mice. *Oncogene.* 2008;27:5684-5695. 査読有り.
- 桑哲男: 水素水投与後の血中・臓器濃度と肝臓内酸化ストレス軽減効果の検討. BMB2010、2010年12月7-10日、神戸.
- ② 祖父江沙矢加、岡本陽、安形則雄、市原正智: Cereulide毒素による肝障害に対する分子状水素の肝保護効果の検討. BMB2010、2010年12月7-10日、神戸.
- ③ 山本純矢、大内靖夫、岩本隆司: Zebrafishを用いたRNA結合タンパク質Lin28の機能解析. BMB2010、2010年12月7-10日、神戸.
- ④ 大内靖夫、朝枝祐太、水野麻衣、高岡祐司、岩本隆司: 腸管上皮細胞におけるRNA結合分子Lin28の機能解析. BMB2010、2010年12月7-10日、神戸.
- ⑤ Yoshiki Murakumo, Sumitaka Hagiwara, Shinji Mii, Minako Hagikura, Masahide Takahashi: Role of CD109 in the regulation of TGF-beta signaling. BMB2010、2010年12月7-10日、神戸.
- ⑥ 三井伸二、村雲芳樹、浅井直也、高橋雅英: CD109-LacZノックインマウスにおける皮膚表現型の解析. 第69回日本癌学会総会. 2010年9月22-24日、大阪.
- ⑦ 村雲芳樹、高橋雅英: 転写因子TFII-IとhREV7との相互作用とその生理学的意義の解析. 第69回日本癌学会総会. 2010年9月22-24日、大阪.
- ⑧ 伊藤智広、藤田泰典、伊藤美佳子、増田章男、市原正智、小島俊男、野澤義則、大野欽司、伊藤雅史: 分子状水素によるI型アレルギー抑制機構の解明. 日本基礎老化学会第33回大会. 2010年6月17, 18日、名古屋.
- ⑨ 村雲芳樹、高橋雅英: ヒト神経膠芽腫細胞におけるCD109発現の生物学的意義の検討. 第99回日本病理学会総会. 2010年4月27-29日、東京.
- ⑩ Murakumo Y, Zhang JM, Takahashi M. CD109 expression promotes cell activity and enhances EGF signaling in human glioblastoma cells. 101th Annual Meeting, American association for Cancer Research. Apr. 17-21, 2010, Washington D. C., USA.
- ⑪ 伊藤智広、藤田泰典、伊藤美佳子、増田章男、市原正智、小島俊男、野澤義則、大野欽司、伊藤雅史: 分子状水素によるI型アレルギー抑制の分子機構. 第130回日本薬学会. 2010年3月28-30日、岡山.
- ⑫ 山井一晃、祖父江沙矢加、大桑哲男、市原正智: 水素水投与後の血中水素濃度動態の検討. 第2回水素研究会学術集会. 2010年2月12日、東京.
- ⑬ 村雲芳樹、萩原純孝、高橋雅英: ヒト神経膠芽腫細胞におけるCD109発現の生物学的意義の検討. 第68回日本癌学会総

[学会発表] (計 15 件)

- ① 市原正智、祖父江沙矢加、山井一晃、大

- 会. 2009年10月1-3日、横浜.
- ⑭ 祖父江沙矢加、村上真史、坂野喜子、伊藤裕美、高四強、古畑彩子、高木明、小嶋哲人、野澤義則、村手隆、市原正智: v-SrcによるSPHK1 mRNA安定化と発現増強. BMB 2008. 2008年12月9-12日、神戸.
- ⑮ 萩原純孝、村雲芳樹、重富俊雄、光藤健司、藤内祝、上田実、高橋雅英: 口腔癌におけるCD109の発現. 第67回日本癌学会総会. 2008年10月28-30日、名古屋.
- ⑯ 長谷川正規、森谷鈴子、三井伸二、佐藤朋子、時々輪真由美、村雲芳樹、市原周、高橋雅英: 基底細胞型乳癌の新しいマーカーとしてのCD109. 第97回日本病理学会総会. 2008年5月15-17日、金沢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市原 正智 (ICHIHARA MASATOSHI)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号: 00314013

(2) 研究分担者

岩本 隆司 (IWAMOTO TAKASHI)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号: 60223426

喬 善楼 (QIAO SHANLOU)
中部大学・生命健康科学部・准教授
研究者番号: 00343658

村雲 芳樹 (MURAKUMO YOSHIKI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 40324438

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし