

機関番号：13301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790312
 研究課題名（和文） Met 受容体天然型アイソフォームを介した再生・病態・発癌制御の研究
 研究課題名（英文） Regulation of tissue regeneration, disease and oncogenesis through the natural isoform of the Met/HGF receptor
 研究代表者
 中村 隆弘 (NAKAMURA TAKAHIRO)
 金沢大学・がん研究所・助教
 研究者番号：70414018

研究成果の概要（和文）：再生・病態・発癌制御における JM ドメインを欠失する Met (Δ JM-Met) の役割を明らかにするため、 Δ JM-Met 安定強制発現 MDCK 細胞を用いた *in vitro* の解析および Δ JM-Met ノックインマウスを用いた *in vivo* の解析を行った。その結果、 Δ JM-Met および WT を安定発現する MDCK 細胞はともに HGF-Met シグナル特有の生物活性であるスキャッター活性および管腔形成が認められ、また Δ JM-Met ノックインホモマウスは胎生致死となることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To address the function of the natural isoform of the Met/HGF receptor during tissue regeneration, disease and oncogenesis, I prepared the MDCK cells that stably express the Δ JM-Met or WT-Met gene and Δ JM-Met knockin mice. As a result, I could not find the any difference between Δ JM-Met and WT-Met expressed MDCK cells in the ability of motility and morphogenesis. Δ JM-Met knockin mice were resulted in embryonic lethal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：HGF, Met, 組織再生, シグナル伝達, 細胞増殖因子

1. 研究開始当初の背景

HGF は Met 受容体を介して細胞の増殖・遊走促進、形態形成誘導といったダイナミックな組織構築を支える活性を有し、肝臓をはじめ複数の組織・臓器の発生や再生を支えている (Matsumoto, *BBRC* 239: 639, 1997; Birchmeier, *Trends Cell Biol.* 8:404,

1998; Matsumoto, *Kid Int* 59:2023, 2001). 一方、HGF-Met 系の活性化は多くの癌細胞の浸潤・転移を強力に促す他、抗癌剤耐性の獲得など、癌の悪性化や再発に深く関与している (Matsumoto, *Int. J. Cancer* 119: 477, 2006; Trusolino, *Nat. Rev. Cancer.* 2:289 2002). 発生や再生を支える様々な増殖因子

の関与や幹細胞のダイナミックな動態と細胞分化の理解が深まったが、なぜそれぞれの臓器は一定の大きさに成長した時点で発生を停止するか、傷害を受けた組織・臓器は元通りの形（組織構築）・大きさに達した時点で過剰な増殖に至ることなく再生を終えるのか、素朴な疑問の解明が残されている。HGF-Met 系を研究の入口として、形態形成や再生の停止機構、停止破綻としての発癌や癌悪性化の理解につながるものと考えられる。

Met 受容体は細胞外領域、膜貫通領域、Juxtamembrane (JM) ドメイン、チロシンキナーゼドメインから構成される。HGF が細胞外ドメインと結合することで Met 受容体のチロシンリン酸化が誘導されるが、Met 受容体の抑制機能を担っているのが JM ドメインである。JM ドメイン内の Ser985 がリン酸化されると HGF 依存的 Met 活性化は抑制される他 (*JBC* 279:26445, 2004)、Tyr1003 は Cbl を介した Met 分解に関与する (*Mol Cell* 8:995, 2001)。また、染色体転座によって形成される Tpr と Met キナーゼドメインの融合遺伝子 (Tpr-Met) は発癌遺伝子として見出されたが、この発癌遺伝子に JM ドメインを挿入すると細胞癌化能が消失する (*Oncogene* 18:4275, 1999)。さらに、JM ドメインを欠失する Met (Δ JM-Met) は splice variant として天然に存在することに加え (*Oncogene* 19:4947, 2000)、複数のヒト癌において JM ドメインに遺伝子変異が見つかることなどから (*Cancer Res.* 65:1479, 2005)、JM ドメインは Met 抑制ドメインとして重要な生理的役割を担っていると考えられる。したがって JM ドメインを介した Met 抑制の分子機作と生理機能の解明は、増殖因子受容体の自己抑制を介した発生・再生・細胞癌化の制御機能を理解することにつながる。

2. 研究の目的

JM 領域を介した Met 活性化制御は発生や再生、癌の発生や悪性化に深く関与すると推定されるが、その詳しいメカニズムや生理的意義は不明である。本研究は、JM ドメインを介した Met 依存的形態形成やキナーゼ制御の解析、 Δ JM-Met のみを発現する遺伝子

改変動物における形態形成・再生異常や病態・発癌の解析を行い、増殖因子受容体に備わっている自己抑制機能のメカニズムと意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

発生・再生制御や発癌における Met 抑制のメカニズムと生理的意義を明らかにする上で有効な手段の一つは、Met 遺伝子を Δ JM-Met 遺伝子に置き換えるノックインマウスを作製し、本マウスにおける形態形成や再生制御の異常、本マウスに由来する細胞での細胞応答異常を詳しく解析すること、ならびに Δ JM-Met 発現細胞を用いた生化学的・分子細胞生物学的アプローチである。もう一つは、JM ドメインとチロシンキナーゼドメインとの相互作用を詳細な構造レベルで解明することである。JM ドメインを含めたチロシンキナーゼドメインの結晶構造解析を行うことで分子機作を明らかにできると考えられる。

① Δ JM-Met ノックインマウスを用いた発生過程における形態形成の異常、肝臓など臓器傷害モデルでの再生制御の異常、病態・発癌の解析

Δ JM-Met ノックインマウスの作製完了と器官発生・組織病理の解析

(1) Met 遺伝子完全欠損マウスや HGF 遺伝子欠損マウスでは、胎盤・横隔膜・前肢骨格筋・肝臓の形成に異常がみられることから、これら器官の発生に HGF-Met シグナルは重要である。そこで、 Δ JM-Met を発現するノックインマウスを作成し、発生過程における異常がないか詳細に調べる。とりわけ、Met 遺伝子欠損マウスで異常の認められた組織（胎盤、肝臓、骨格筋、横隔膜など）での異常の有無についても注意深く解析する。

(2) 成体各組織での病理組織を詳細に調べ、異常の有無を注意深く解析する。

② JM ドメイン欠損変異 Met 発現細胞を用いたシグナル活性化制御の生化学的とコーラゲンゲル内形態形成（管腔形成）を指標とする細胞生物学的解析

Trk-Met/Trk- Δ JM-Met 安定発現 MDCK 細胞

の作成

(1) HGF は MDCK 細胞のコラーゲンゲル内培養において管腔形態形成を誘導することから、HGF-Met 系を介した形態形成の制御の研究に有用である。そこで、内在の Met 受容体の影響を除外するため、細胞外領域を

Trk/NGF 受容体、細胞質領域を wild type-Met または Δ JM-Met にするキメラ Met 受容体の cDNA を構築するとともに、Tet-OFF システムにより遺伝子発現レベルの調節可能なベクターを作製する。

(2) 上記ベクターを MDCK 細胞に導入し、Tet-OFF システムによって制御される安定発現 MDCK 細胞を樹立する。

③ JM ドメインとキナーゼドメインを含む Met 細胞質領域の発現・調製、結晶構造解析

(1) 発現用ベクター構築と発現。Bac to Bac バキュロウイルス発現システムを用いて Met 細胞質領域を Sf9 細胞で発現させる。

(2) Met 細胞質領域の精製と結晶化。ニックルカラム、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどを組み合わせて高純度に精製する。Met 受容体チロシンキナーゼドメインの結晶化条件 (*JBC*. 283: 2675-2683, 2008 他) を中心に結晶化条件を絞り込む。微結晶が得られる条件が検索できれば、レーザーならびに攪拌技術を用いた結晶サイズの大型化及高品質化を行う。

4. 研究成果

① Δ JM-Met ノックインマウスは、ホモ欠損の場合、臓器形成不全により胎生致死あるいは生後まもなく死亡することが分かった。一方、ヘテロ欠損の場合、正常に生まれ、WT マウスと観察した限りにおいて違いは認められなかった。詳細な解析の結果、 Δ JM-Met ノックインマウスは Exon-13 を欠損することにより、c-Met 遺伝子のプロモーター機能の低下が起これ、Met 蛋白質の著しい発現低下が引き起こされることが明らかとなった。このことにより HGF-Met シグナルの重要な役割の一つである胎盤形成がうまく行われず、発育不全による胎生致死となることが明らかとなった。

② WT Met あるいは JM ドメイン欠損変異 Met の細胞内領域と Trk/NGF 受容体の細胞外領域

とを融合させたキメラ蛋白質 (Trk-Met) を永久発現する MDCK 細胞をそれぞれ得た。これらはともに NGF を添加すると、スキッターする現象が確認され、この時、Trk-Met のチロシン残基がリン酸化されることが確認された。そこで、コラーゲン包埋された上記細胞に NGF を添加したところ、ともに HGF-Met シグナル特有の生物活性である管腔形成が認められた。以上の解析結果において何れも WT と JM ドメイン欠損変異の間に際立った違いは認められなかった。

③ 初代培養肝細胞系で Ser985 がリン酸化された状態では HGF に依存した Met 受容体のチロシンリン酸化が抑制されることを見出した。無傷の肝臓では Ser985 がリン酸化されている一方、CC14 による肝傷害を引き金に Ser985 の脱リン酸化が引き起こされ、それと相反的に Met チロシンリン酸化が引き起こされた。再生のピークを過ぎると再び Ser985 はリン酸化されることから、Met チロシンリン酸化 (活性化) と Ser985 リン酸化が概ね相反的な制御を受けることが明らかになった。初代培養肝細胞において、Met-Ser985 のリン酸化を誘導した状態では、HGF による Met 活性化が抑制され、HGF による増殖促進作用は抑制された。このとき、Ser985 がリン酸化された Met はエンドサイトーシスによって細胞表面から消失することを明らかにした。JM 領域 Ser985 リン酸化は Met 受容体の局在を制御することによって HGF 依存的 Met 活性化の制御に関与すると考えられた。

これらの結果から、Met-JM 領域の Ser985 リン酸化は、Met 受容体の細胞表面から細胞内への動態制御を調節することによって、HGF 依存的な Met 活性化を OFF に制御するメカニズムであり、組織の傷害や再生の完了 (組織化の再構築・無傷性) が何らかの機構で Met-Ser985 のリン酸化を制御することによって、Met 受容体の過剰な活性化の抑制、ひいては再生の完了に関与することが示唆された。

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 7 件)

① Nakamura, T., Sakai, K., Nakamura, T., and Matsumoto, K. Hepatocyte growth factor twenty years on: much more than a growth factor. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, Suppl 1: 188-202, 2011. 査読無

② Sakai, K., Nakamura, T., Kinoshita, T., Nakamura, T., and Matsumoto, K. HGF-Antagonists: Structure, Activities, and Anti-cancer Approach. *Current Signal Transduction Therapy*, 6 (2) :191-199, 2011. 査読有

③ Suzuki, Y., Sakai, K., Ueki, J., Xu, Q., Nakamura, T., Shimada, H., Nakamura, T., and Matsumoto, K. Inhibition of Met/HGF receptor and angiogenesis by NK4 leads to suppression of tumor growth and migration in malignant pleural mesothelioma. *Int. J. Cancer*, 127: 1948-1957, 2010. 査読有

④ Nakamura, T., Sakai, K., Nakamura, T., and Matsumoto, K. Anti-cancer approach with NK4: Bivalent action and mechanisms. *Anti-Cancer Agent Med. Chem.*, 10 (1): 36-46, 2010. 査読有

⑤ Sakai, K., Nakamura, T., Matsumoto, K., and Nakamura, T. Angioinhibitory Action of NK4 involves impaired extracellular assembly of fibronectin mediated by perlecan-NK4 association. *J. Biol. Chem.*, 284: 22491-22499, 2009. 査読有

⑥ Kishi, Y., Kuba, K., Nakamura, T., Wen, J., Suzuki, Y., Mizuno, S, Nukiwa, T., Matsumoto, K, and Nakamura, T. Systemic NK4 gene therapy inhibits tumor growth and metastasis of melanoma and lung carcinoma in syngeneic mouse tumor models. *Cancer Sci.*, 100: 1351-1358, 2009. 査読有

⑦ Kadoyama, K., Funakoshi, H., Ohya-Shimada, W., Nakamura, T., Matsumoto, K., Matsuyama, S., Nakamura, T. Disease-dependent reciprocal phosphorylation of serine and tyrosine residues of

c-Met/HGF receptor contributes disease retardation of a transgenic mouse model of ALS. *Neurosci. Res.*, 65: 194-200, 2009. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

① 徐慶, Functional Analyses of the Kremen in Lewis Lung Carcinoma Cells through Wnt/ β -catenin Signaling Pathway, 第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月9日, 神戸ポートアイランド (兵庫県)

② 中山瑞穂, 肝細胞におけるMet/HGF受容体Ser985リン酸化と受容体活性化の制御, 第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月8日, 神戸ポートアイランド (兵庫県)

③ 酒井克也, Perlecanによるp27の発現ならびに細胞内細胞内局在の制御を介した血管内皮細胞の増殖制御, 第69回日本癌学会総会, 2010年9月22日, 大阪国際会議場(大阪府)

④ 鈴木芳典, HGF-Met系を介したヒト悪性中皮腫細胞の遊走制御とMet細胞外領域遺伝子変異, 第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月3日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

[図書] (計 1 件)

① 中村隆弘, メディカルレビュー社, がん分子標的治療 Vol. 7 No. 2, 2009年, 26頁~35頁

[その他]

ホームページ等

<http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/shuyoudoutaiseigyo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 隆弘 (NAKAMURA TAKAHIRO)
金沢大学・がん研究所・助教
研究者番号: 70414018

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし