

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790281

研究課題名（和文）ERK2の恒常的活性化変異による病態発症：細胞早期老化を中心とした解析

研究課題名（英文）Pathological features induced by constitutive active mutant of ERK2: Study focused on premature cellular senescence

研究代表者

杉村 和人（SUGIMURA KAZUTO）

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90452226

研究成果の概要（和文）：血球・血管内皮特異的 Erk2 恒常的活性化型変異マウスは野性型マウスの 1/4 の確率で生まれ生存可能であったが、低体重、低体長であった。また、NCFC 症候群で見られる身体的特徴（特徴的な顔面など）と一致し、血球・血管内皮細胞における Erk2 の恒常的活性化が NCFC 症候群の一部の病態の原因であることがわかった。また、この表現型に細胞老化制御因子 p53 が関与していることがわかり、p53 を標的分子とした NCFC 症候群の各病態に対する新たな治療法の可能性が示唆できた。

研究成果の概要（英文）：Hematopoietic and endothelial cell lineage-specific gain of function mutation of Erk2 in mice resulted in lower rate of birth, lower body weight, and lower body length. The mice had NCFC syndrome-like physical characteristics such as unique facial abnormalities, indicating that constitutive activation of Erk2 was the cause for the part of pathological features in NCFC syndrome. Moreover, p53 was likely to be involved in the phenotype, suggesting that p53-targeted treatment might be effective to the NCFC syndrome-linked pathologies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：Erk2、NCFC 症候群、p53、血球・血管内皮、細胞老化

## 1. 研究開始当初の背景

RAS-MAPK 経路は増殖因子やサイトカイン刺激により活性化されるリン酸化シグナル伝達経路の一種であり、細胞の増殖や分化、生存に深く関わっている。一方、Noonan 症候

群、LEOPARD 症候群、cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群といった一連の病態は、生殖細胞系列における RAS や RAS 制御因子の活性化型変異が原因であるが近年明らかになった。これらの症候群は胎児期の発生異常、顔面奇

形、心臓欠陥、低身長などを共通の特徴としている(これらの症候群をまとめてNCFC症候群と呼ぶ, Bentires-Aji M et al. Nature Med. 2006)。またそれらの症候群では若年性骨髄単球性白血病などのある種のがんを併発する事も報告されており、NCFC症候群で見られるRAS経路の活性化型変異は発生異常だけでなく、がん化とも関連性があることが示唆されている。

RAS やRAS 制御因子の活性化型変異は、最終的にRAS-MAPK 経路の末端キナーゼであるERK1/2の活性化亢進を誘導する。その理由から最終的にはERK1/2の活性化亢進がNCFC症候群で見られる表現型の発現に寄与していると考えられている。しかし、RAS から下流の経路はMAPK 経路だけではなく、PI3K-AKT経路など他のシグナル経路が下流に複数存在する。この理由から、NCFC症候群の発症にERK1/2の活性化亢進が本質的に関与しているかどうかは不明である。

## 2. 研究の目的

(1) Ras-MAPK経路の各因子の変異マウスを用いた表現型解析から、最終的にERKの活性化亢進がNCFC症候群に関連する病態の原因であると結論づけられているが、その詳細は不明である。本研究では、活性亢進型ERK2発現マウスを用い、RAS-MAPK経路の活性化亢進型変異による各病態がERK2の活性化を通して起こる事を遺伝子改変マウスを用いて証明する。さらに、ERK活性化亢進により誘導される細胞機能の変化を解析し、心臓、骨、血球を含む器官の形成不全を呈するまでの分子メカニズムを明らかにする。第一に、ERK2 恒常的活性化型変異が胎児発生に与える影響を以下の点に絞って明らかにする。

① ERK2 semノックインマウス(全身ならびに組織特異的ノックイン)の表現型。特に心臓、

骨、血球系での器官形成異常

(2) 次いで、ERK2の恒常的活性化が細胞機能に与える影響を以下の点にしぼって解析し、明らかにする。

① ERK2活性化亢進の細胞早期老化への関与とDNA複製制御への影響

② ERK2活性化亢進により発現またはリン酸化レベルが変動する遺伝子群の同定とそれらの機能

## 3. 研究の方法

(1) 血球・血管内皮特異的 Erk2 sem ノックインマウスの作成、表現型解析

申請者らが作製したERK2 semノックインマウスは、大腸菌由来組換え酵素であるCre酵素の発現下で内在性ERK2の代わりに恒常的活性化型変異ERK2を発現する。したがって、組織特異的プロモーター下でCreを発現させる事により、特定の組織でERK2を恒常的活性化状態に誘導する事が可能である。そこで、血球・血管内皮で特異的に恒常的活性化型ERK2を発現させるために、Tie2-Creトランスジェニックマウスと掛け合わせたマウスを作製する。ERK2 semノックインマウスの出生率、体重、体長など基本的な表現型を解析する。

(2) p53欠損Erk2 semノックイン(血球・血管内皮特異的)マウスの作成

Erk2の恒常的活性化は、早期細胞老化を誘導することにより細胞機能異常を惹起すると推測している。細胞早期老化には様々な因子が関与するが、p53は細胞早期老化に関与する因子のひとつである。そこで、血球・血管内皮特異的Erk2 semノックインマウスの表現型にp53が関与するかを検討するために、p53欠損Erk2 semノックイン(血球・血管内皮特異的)マウスを作製する。

## 4. 研究成果

(1) 血球・血管内皮特異的 Erk2 sem ノック

クインマウスの作成、表現型解析

①血球・血管内皮特異的 Erk2 sem ノックインマウスの出生率

Erk2 floxSem/+マウスと Tie2-Cre マウスの交配により、Erk2 Sem/+ Tie2-Cre マウス（血球・血管内皮特異的 Erk2 sem ノックインマウス）を作製したところ、コントロールである Erk2 floxSem/+マウスの約 30%の確率でしか産まれてこなかった。以前の検討で、全身性の Erk2 sem ノックインマウスは胎生致死であったため、それよりはマイルドな表現型であった。

②血球・血管内皮特異的 Erk2 sem ノックインマウスの体長、体重（図 1、図 2）

Erk2 Sem/+ Tie2-Cre マウスはコントロールである Erk2 floxSem/+マウスより体重、体長共に有意に低かった。2 週齢での平均体重は、

Erk2 Sem/+ Tie2-Cre マウス : 6.55 g

Erk2 floxSem/+マウス : 7.93 g

であり、Erk2 floxSem/+マウスより 20%程軽かった。また 2 週齢での平均体長は

Erk2 Sem/+ Tie2-Cre マウス : 5.56 cm

Erk2 floxSem/+マウス : 6.15 cm

であり、Erk2 floxSem/+マウスより 10%程小さかった。以上の結果から、血球・血管内皮細胞における Erk2 の恒常的活性化が個体の発育に影響を及ぼすことがわかった。ヒトの NCFC 症候群においても発育不全が見られることから、その原因組織として血球または血管内皮系であることが示唆された。

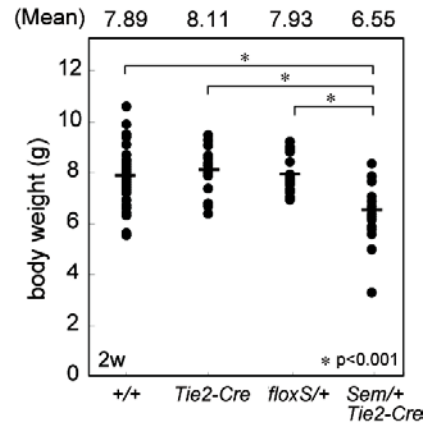


図 1 Erk2 sem ノックインマウスの体重（2 週齢）

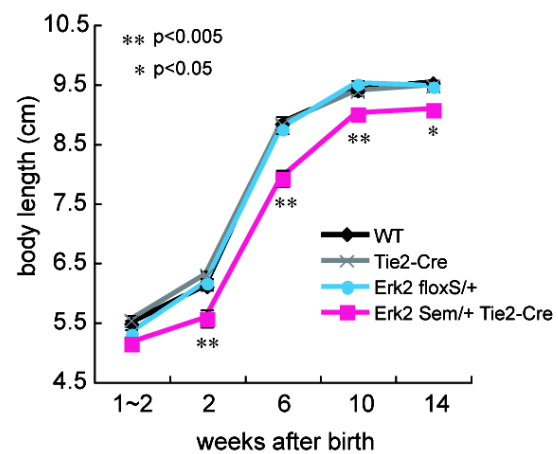


図 2 Erk2 sem ノックインマウスの体長

③血球・血管内皮特異的 Erk2 sem ノックインマウスのその他の表現型

出生後に死亡した Erk2 Sem/+ Tie2-Cre マウスは、全身に浮腫を伴っている場合があった（図 3）。成獣の顔面の風貌は特徴的であり、平坦な鼻梁、鼻梁の歪曲、広い眼隔、などを高頻度に伴っていた（図 4）。これらの特徴はヒトの NCFC 症候群でも見られることから、NCFC 症候群で見られる特徴的な顔面の風貌の原因が、血球または血管内皮細胞における Erk の恒常的活性化である可能性が示唆された。また、尾が曲がった個体も高頻度で見られた（図 5）。これらのことから、骨形成の異常が示唆された。骨格標本作製して

詳細に解析した結果、Erk2 Sem/+ Tie2-Cre マウスは頭蓋骨の形成が異常であり、泉門なども不鮮明であった。長官骨は Erk2 floxSem/+マウスよりも短かった。出生直後の Erk2 Sem/+ Tie2-Cre マウスは、四肢の指、尾、頭蓋骨の骨化に遅延が見られ、Erk2 floxSem/+マウスより軟骨部分が多かった。また、背骨の形態も不完全であった。以上の結果から、血球・血管内皮細胞における Erk2 の恒常的活性化が骨形成不全、骨形成遅延を招くことがわかった。

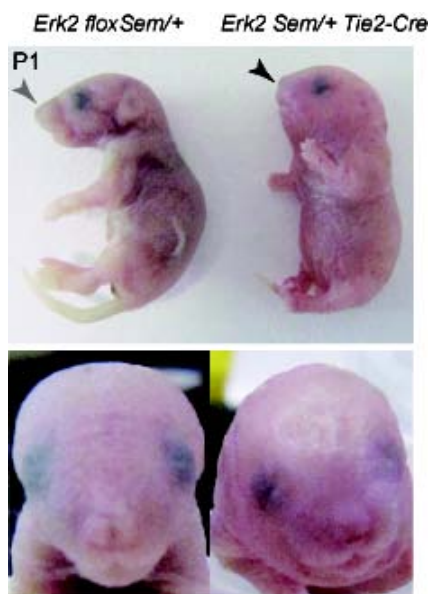


図 3 Erk2 sem ノックインマウスで見られた浮腫

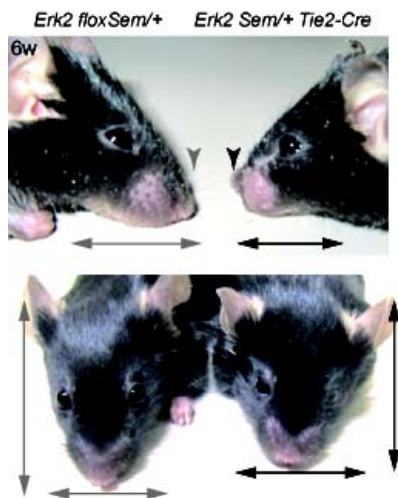


図 4 Erk2 sem ノックインマウスの特徴的な

顔面



図 5 Erk2 sem ノックインマウスで見られた尻尾の歪曲

④p53 ノックアウト血球・血管内皮特異的 Erk2 sem ノックインマウスの出生率

p53 欠損 Erk2 sem ノックイン (血球・血管内皮特異的) マウスを作製するために、p53 +/- マウスと Erk2 Sem/+ Tie2-Cre マウスを交配した。結果、p53 +/- Erk2 Sem/+ Tie2-Cre マウスは、Erk2 Sem/+ Tie2-Cre マウスの 1/5 の確率でしか産まれてこなかった。この結果から、Erk2 Sem/+ Tie2-Cre マウスの生存に p53 が関与しており、p53 を標的分子とした NCFC 症候群の各病態に対する新たな治療法の可能性が示唆できた。

## 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 1 件)

① Takuya Abe, Kazuto Sugimura, Yoshifumi Hosono, Yasunari Takami, Motomu Akita,

Akari Yoshimura, Shunsuke Tada, Tatsuo Nakayama, Hiromu Murofushi, Katsuzumi Okumura, Shunichi Takeda, Masami Horikoshi, Masayuki Seki, and Takemi Enomoto, The Histone Chaperone Facilitates Chromatin Transcription (FACT) Protein Maintains Normal Replication Fork Rates, The Journal of Biological Chemistry, Col. 286, 2011, 30504-30512, 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 吉村 健、杉村和人、緒方 正人、奥村 克純、DNA メチル化レベル低下により DNA 損傷が誘導されるゲノム領域の同定、日本農芸化学会大会 2012 年度大会、2012 年 3 月 25 日
- ② 杉村 和人、来馬 啓介、杉浦 健太、緒方 正人、奥村 克純、UHRF1 は受動的 DNA 脱メチル化後の DNA 損傷誘導に関与する、日本農芸化学会大会 2012 年度大会、2012 年 3 月 23 日
- ③ Kenta Sugiura, Kazuto Sugimura, Masato Ogata and Katsuzumi Okumura, A mechanism of DNA damage-induction after passive DNA demethylation 第 3 4 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日
- ④ Keisuke Kuruma, Kazuto Sugimura, Masato Ogata and Katsuzumi Okumura, Impact of reduced DNA methylation on DNA replication fork progression, 第 3 4 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日
- ⑤ 来馬啓介、杉浦健太、杉村和人、緒方 正人、奥村 克純、DNA メチル化レベルの減少が複製フォーク進行に与える影響、日本農芸化学会平成 23 年度関西・中部支部合同大会、2011 年 7 月 4 日
- ⑥ Kazuto Sugimura, Kenta Sugiura,

Hiroataka Nakabayashi, Keisuke Kuruma, Masato Ogata and Katsuzumi Okumura, UHRF1 is involved in DNA damage-induction after passive DNA demethylation、第 63 回 日本細胞生物学会大会、2011 年 6 月 28 日

- ⑦ 杉村 和人、杉浦 健太、中林 裕貴、来馬 啓介、緒方 正人、奥村 克純、受動的 DNA 脱メチル化後の DNA 損傷誘導には UHRF1 が関与する、第五回日本エピジェネティクス研究会年会、2011 年 5 月 19 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/organization/course/biochem/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉村 和人 (SUGIMURA KAZUTO)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90452226