

## 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 5月28日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790315

研究課題名（和文） ヒト骨肉腫細胞において Ror2 シグナルが制御するがん細胞浸潤の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of cancer cells invasiveness regulated by Ror2 signaling in human osteosarcoma cells

研究代表者

山形 薫 (YAMAGATA KAORU)

神戸大学・大学院医学研究科・グローバル COE 研究員

研究者番号：80533786

研究成果の概要（和文）：ヒト骨肉腫 SaOS-2 細胞において、Wnt5a-Ror2 (Ror2: Wnt5a 受容体) シグナルは、Dishevelled2, Rac1, JNK 等のシグナル分子及び転写因子 AP1 を活性化する。その後、がん細胞の浸潤と密接に関わる細胞外基質分解酵素をコードする *MMP-13* 遺伝子の発現が誘導される。本シグナルは、マウス胚における軟骨内骨化にも関わり、発生過程における新たな役割が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Constitutively active Wnt5a-Ror2 signaling results in activated Dishevelled2, Rac1, JNK and transcriptional factor AP1 in human osteosarcoma SaOS-2 cells, resulting in subsequent induced expression of MMP-13 that is capable of degrading extracellular matrix, involved in cancer cell invasiveness. Wnt5a-Ror2 signaling involves endochondral ossification of cartilaginous tissue in mouse embryo, indicating crucial role in developmental conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：Wnt5a, Ror2, Dvl2, AP1, MMP-13, 軟骨内骨化

## 1. 研究開始当初の背景

分泌型シグナルタンパク質である Wnt ファミリーに属する Wnt5a は多細胞生物の発生における形態形成過程やがん細胞の浸潤・転移等の病的状況下において重要な機能を担っており、その機能の分子基盤については国内外の多くの研究者の注目を集めている。Wnt5a は非古典的シグナル (Wnt5a-Ror2 シグナル) 伝達経路を作動させ、古典的経路における  $\beta$ -catenin に依存した LEF/TCF による転写機

構を抑制するとともに、 $\beta$ -catenin 非依存的に細胞極性・移動を制御する (Nomachi A et al., J Biol Chem 2008; 283: 27973-81; Nishita M et al., J Cell Biol 2006; 175: 555-62)。最近、我々は受容体チロシンキナーゼ Ror2 (Wnt5a の受容体) を介する Wnt5a による新たな細胞内シグナル伝達機構として、ヒト骨肉腫細胞株 SaOS-2 等において、Src チロシンキナーゼ活性化により、がん細胞の浸潤・転移を制御するマトリックスメタ

ロプロテアーゼ(MMP)-13 の遺伝子発現が誘導されることを見出した (Enomoto M et al., Oncogene 2009; 28: 3197-208)。また、血管内皮細胞や腎細胞癌において Wnt5a-Ror2 シグナルの活性化により他の MMP ファミリー遺伝子である *MMP-1*, *-2* 遺伝子の発現誘導が報告されており (Wright T et al., Oncogene 2009; 28: 2513-23)、Wnt5a による *MMP* 遺伝子誘導における細胞種特異性が示唆される。以上より、MMP ファミリーをはじめとする標的遺伝子の詳細な発現制御機構の解析を通し、Wnt5a による各種悪性腫瘍の病態制御機構解明が可能である。

## 2. 研究の目的

Wnt ファミリー分子は、細胞膜受容体への結合を介し、多様な細胞機能の制御を担う。これまで、細胞極性・移動を制御する Wnt シグナル伝達経路の一端が解明されているが、がん細胞の浸潤・転移を制御する分子基盤は殆ど不明である。まず、骨肉腫細胞を一例に、病態に直結する新規 Wnt5a-Ror2 シグナル伝達経路を見出し、標的遺伝子の発現制御機構を解明した後、それらの機能を生体内で評価する。次に、複数のがん細胞株を用いて、本シグナル伝達経路の一般性について検討し、がん細胞の浸潤・転移制御機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

Wnt シグナル伝達は多彩な細胞機能を制御するが、このシグナル伝達によるがん細胞の浸潤・転移制御の分子基盤については不明な点が多い。まず、ヒト骨肉腫細胞 SaOS-2 等において、Wnt5a-Ror2 シグナルの標的遺伝子 *MMP-13* に着目し、レポーターアッセイにより *MMP-13* 遺伝子の転写制御領域を決定する。また Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) 法により転写因子の同定を行う。次に、諸種のキナーゼ阻害剤および遺伝子発現を抑制する siRNA 導入法を用いて、それぞれ Wnt5a-Ror2 シグナル伝達経路で機能するタンパク質キナーゼ等の検索・同定、さらには機能解析を行う。また、各種遺伝子欠損マウスを用いて、各種分化マーカーを用いた免疫染色法による解析を行い、生体内における *MMP-13* 遺伝子の発現・機能を明らかにする。さらに、以上の成果を踏まえて、様々な細胞株について解析を行い、Wnt5a-Ror2 シグナル伝達の細胞種特異性を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) SaOS-2 細胞において Wnt5a-Ror2 シグナルが制御する *MMP-13* 遺伝子プロモーターの転写活性化領域

SaOS-2 細胞において Wnt5a-Ror2 シグナルが制御する *MMP-13* 遺伝子プロモーターの転

写活性化領域は不明である。そこで、そのプロモーター(-253 to -1)をルシフェラーゼ遺伝子上流にクローニング後、activator protein (AP)1 および osteoblast stimulating element (OSE)2 結合部位に変異をいれたプラスミドを作成した。その後、p253-luc および p253(OSE2m)-luc を導入した SaOS-2 細胞において Ror2 発現の抑制に伴い、転写活性が低下した。それに対し、p253(AP1m)-luc 導入 SaOS-2 細胞は Ror2 非依存的に転写活性が低下した(図 1)。

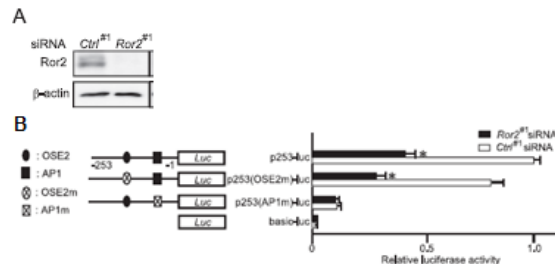


図 1. SaOS-2 細胞において AP1 は Ror2 シグナルによる *MMP-13* 遺伝子プロモーターの転写活性化に必要である。

### (2) SaOS-2 細胞において *MMP-13* 遺伝子プロモーターにリクルートされる AP1 構成因子の同定

SaOS-2 細胞において Wnt5a-Ror2 シグナルの作動後、*MMP-13* 遺伝子プロモーターにリクルートされる AP1 の構成因子は不明である。そこで、Wnt5a (400 ng/ml) 存在下または非存在下において、SaOS-2 細胞を超音波処理した上清に対し、各 AP1 抗体を使用して、ChIP アッセイを行った。その結果、*Wnt5a* 遺伝子発現を抑制後、*MMP-13* 遺伝子プロモーターに c-Jun と ATF2 がリクルートされないことが明らかになった(図 2)。

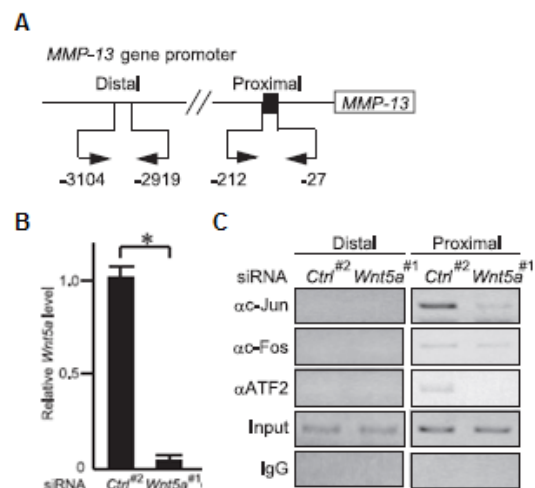


図 2. SaOS-2 細胞のクロマチン画分を用いて ChIP アッセイ後、*MMP-13* 遺伝子プロモーターにリクルートされる因子の決定

(3) SaOS-2 細胞において *MMP-13* 遺伝子発現を誘導する *Wnt5a-Ror2* シグナル分子の同定

SaOS-2 細胞において、*MMP-13* 遺伝子の発現誘導に関わる *Wnt5a-Ror2* シグナル分子はほとんど明らかにされていない。そこで、SaOS-2 細胞に Dishevelled (*Dvl*)2、*Dvl*3 および small GTPase *Rac1* 発現を抑制後、*MMP-13* mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法により定量した。その結果、*Dvl*2 および *Rac1* 発現の抑制により *MMP-13* 発現は優位に低下した。*Dvl*3 は *MMP-13* 遺伝子発現に影響を与えなかった(図 3)。また特異的阻害剤を使用した系により、c-Jun N-terminal kinase (*JNK*) は *MMP-13* 遺伝子の転写活性およびその発現に関わることが明らかになった(図 3)。

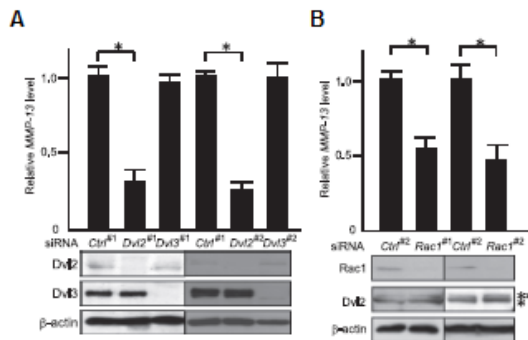


図 3. SaOS-2 細胞において *Dvl*2 は *MMP-13* 遺伝子発現に必要である。

(4) 遺伝子欠損マウスを用いた生体内における *MMP-13* 遺伝子の発現・機能解析

*MMP-13* 遺伝子欠損マウスは発生段階において軟骨内骨化が遅延することが報告されているが、*Wnt5a-Ror2* シグナルとの関わりについては不明である。そこで、胎生 15.5 日の *Ror2*<sup>+/+</sup> および *Ror2*<sup>-/-</sup> の雄胚の四肢のパラフィン切片を使用して抗 *Ror2* 抗体および抗 *MMP-13* 抗体を用いて免疫組織化学解析を行った。その結果、*Ror2*<sup>+/+</sup> 胚の上腕骨において軟骨内骨化がみられ、*Ror2* と *MMP-13* 発現が陽性であった。一方、*Ror2*<sup>-/-</sup> 胚の上腕骨では軟骨内骨化が形成されず、*Ror2* と *MMP-13* 発現が陰性であった(図 4)。

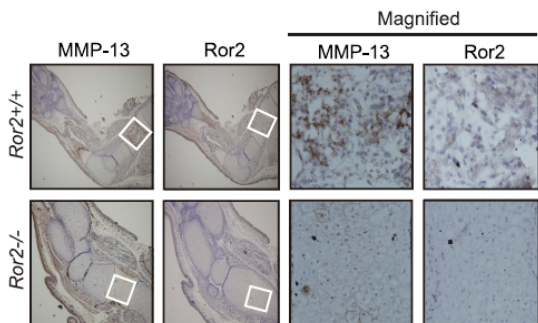


図 4. マウス胚の軟骨において *Wnt5a-Ror2* シグナルは *MMP-13* 発現を制御する

(5) *Wnt5a-Ror2* シグナル伝達経路の細胞

種・組織特異性

本課題で明らかにされた、*MMP-13* 遺伝子発現に関わる *Wnt5a-Ror2* シグナル伝達経路は SaOS-2 細胞特異的であるのか細胞種一般性があるのか否か不明である。そこで、別のヒト骨肉腫 U2OS 細胞を使用して、*MMP-13* 遺伝子発現に関わるシグナル分子の同定を試みた。U2OS 細胞において *Dvl*2、*Dvl*3 および *Rac1* 発現を抑制後、*MMP-13* mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法にて定量した。その結果、*Dvl*3 発現の抑制により *MMP-13* 発現は優位に低下した(図 5)。*Dvl*2 および *Rac1* は *MMP-13* 遺伝子発現に影響を与えなかった(図 5)。よって、*MMP-13* 遺伝子発現を制御する *Wnt5a-Ror2* シグナル分子の細胞種特異性の一端が明らかになった。

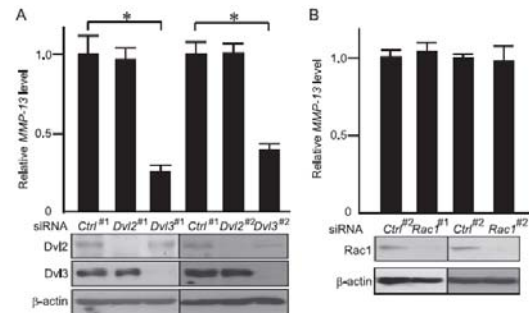


図 5. U2OS 細胞において *Dvl*3 は *MMP-13* 遺伝子発現に必要である。

(6) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

*Wnt5a-Ror2* シグナルは骨肉腫細胞において *MMP-13* 発現を制御する。一方、*Wnt5a* および *Ror2* シグナルは前立腺がん細胞および腎細胞がん細胞と snail 発現扁平上皮がん細胞において、それぞれ *MMP-1* および *MMP-2* の発現の制御に関わることが明らかにされている。しかしながら、それぞれの発現に関わるシグナル分子および転写因子等について不明な点が残されている。今回、本課題を実行により、SaOS-2 細胞において *MMP-13* 発現に関わる *Wnt5a-Ror2* シグナル分子、転写因子を見出し(図 6)、得られた成果は各 *MMP* ファミリー分子の発現制御機構の解析にもたらず波及効果が高いと考えられる。

*Wnt5a* は発生段階の組織形態形成、病的状況下におけるがん細胞の浸潤等に関わるが、*Wnt5a* シグナルが制御する標的遺伝子は殆ど明らかにされていない。そのため、本課題の成果が関連分野にもたらずインパクトは大きいと考えられる。

軟骨内骨化における *Wnt5a-Ror2* シグナルの新たな関与が明らかになり、本シグナルが骨形成過程において果たす役割を解明することはますます重要になると考えられる。

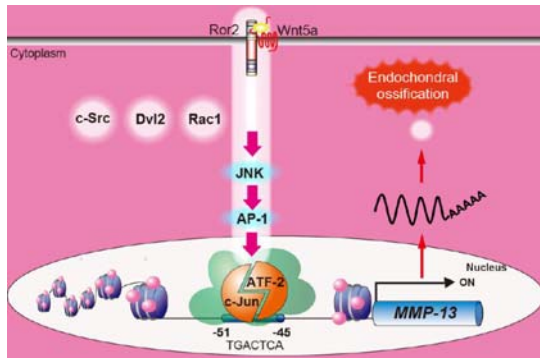


図 6. SaOS-2 細胞において、*MMP-13* 遺伝子の発現制御を担う Wnt5a-Ror2 シグナルのモデル図

#### (7) 今後の展望

Wnt5a と同様に、Ror2 に結合し細胞内シグナル伝達を作動させる Wnt5b は骨肉腫細胞において発現が確認されている。しかしながら、骨肉腫細胞における Wnt5a と Wnt5b の発現量および機能について明確に比較した報告例はない。そのため、*MMP-13* 遺伝子発現における Wnt5b の機能および役割を明らかにすることが重要であると考えられる。

本課題において骨肉腫 SaOS-2 細胞と U2OS 細胞において *MMP-13* 発現に関わる Wnt5a-Ror2 シグナル分子が異なることが明らかにされた。細胞種一般性と特異性の観点から興味深い結果といえる。また、前立腺がん細胞において Wnt5a シグナルを介した *MMP-13* 発現制御がその病態と関わるということが明らかにされており、さらなる Wnt5a-Ror2 シグナル分子の同定および機能解明は重要な課題であると考えられる。

本課題で実施されたレポーターアッセイの結果から、骨肉腫細胞において Wnt5a-Ror2 シグナルが Runx2 活性を制御する可能性は示唆されなかった。しかしながら、Runx2 も骨形成過程において極めて重要な役割を果たすことが明らかにされている。そのため Wnt5a-Ror2 シグナルと Runx2 がどのように統合されて骨形成を制御するのか明確にすることは今後の重要な課題である。

#### 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 K. Yamagata, X. Li, S. Ikegaki, C. Oneyama, M. Okada, M. Nishita, Y. Minami. Dissection of Wnt5a-Ror2 signaling leading to matrix metalloproteinase (MMP)-13 expression. *J. Biol. Chem.* 287(2); 1588-99; 2012. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 山形薫、池垣俊吉、李欣、南康博； Dissection of Wnt5a-Ror2 signaling leading to matrix metalloproteinase (MMP)-13 expression; 第 34 回日本分子生物学会年会; 2011 年 12 月 16 日 (横浜)
- ② 山形薫、池垣俊吉、李欣、南康博； Dissection of Wnt5a-Ror2 signaling leading to matrix metalloproteinase (MMP)-13 expression ; University of Washington-Kobe University Joint Symposium on Integrative Membrane Biology and Signal Transduction Medicine; 2011 年 12 月 13 日 (神戸)
- ③ 山形薫、池垣俊吉、李欣、南康博； Molecular analysis of MMP13 gene expression by Wnt5a-Ror2 signaling in human osteosarcoma cells; 第 3 回次世代シグナル伝達医学グローバル COE 研究討論会; 2011 年 7 月 11 日 (淡路)
- ④ 山形薫、南康博； がんの進展における Wnt5a-Ror シグナルの機能解析; 第 3 回シグナルネットワーク研究会; 2011 年 5 月 27 日 (東京)。
- ⑤ 山形薫、李欣、渡邊康秀、南康博; Analysis of MMP13 gene expression induced by Wnt5a-Ror2 signaling in human osteosarcoma cell line; 第 2 回次世代シグナル伝達医学グローバル COE 研究討論会; 2010 年 7 月 5 日 (淡路)
- ⑥ 南康博、山形薫、西田満; Wnt5a-Ror2 シグナルによる細胞極性・移動制御とがんの浸潤; 第 62 回日本細胞生物学会大会; 2010 年 5 月 20 日 (大阪)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/medzoo/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山形 薫 (YAMAGATA KAORU)

神戸大学・大学院医学研究科・グローバル COE 研究員

研究者番号：80533786

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者