

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 25 日現在

機関番号：17401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22790323
 研究課題名（和文）増殖因子シグナルクロストークによる上皮間葉転換の統合制御プログラムの解明
 研究課題名（英文）Analysis for the signal crosstalk of growth factor during epithelial-mesenchymal transition (EMT)
 研究代表者
 鈴木 堅太郎（SUZUKI KENTARO）
 熊本大学・発生医学研究所・助教
 研究者番号：20404345

研究成果の概要（和文）：

上皮間葉転換：Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)における Wnt/ β -catenin シグナルの機能を解析するため、Wnt/ β -catenin シグナルを胎児皮膚で特異的に活性化させることができるコンディショナル遺伝子改変マウス（K5-Cre Catnb^{(ex3)fl/+}マウス）を作成し、解析を行った。その結果、EMT 促進因子である Snail 遺伝子以外に EMT 制御因子の 1 つである Bmp シグナルが活性化されていることがわかった。さらに Bmp レセプターとのマウス遺伝学的解析から、Wnt/ β -catenin シグナルは、EMT 促進因子としてだけでなく、Bmp シグナルを介することで抑制因子としても機能しうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To understand the molecular mechanisms of the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) by Wnt/ β -catenin signaling pathway, we analyzed the embryonic skin of K5-Cre Catnb^{(ex3)fl/+} mice. Expression of Snail, one of the EMT induce factors, was increased in K5-Cre Catnb^{(ex3)fl/+} mice. In addition to the snail, Bone morphogenetic protein (Bmp) signaling was activated in the mutant mice. Interestingly, double compound mutant mice with Bmpr1A, K5-Cre Catnb^{(ex3)fl/+}Bmpr1A^{fl/fl}DKO mice, showed the accelerated EMT. These results suggest that Wnt/ β -catenin signaling may act not only as the EMT-activator but also as the EMT-repressor through the Bmp signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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・病態医化学

キーワード：上皮間葉転換、Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)、Wnt/b-catenin、Bmp (Bone morphogenetic protein)

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は、どのような分子メカニズムで転移を起こすのか？そのキーとなるイベントが、上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) である。EMT が起こると上皮細胞間の接着能の低下 (E-Cadherin の転写抑制)、上皮細胞直下の基底膜層 (ラミニン) の崩壊が起こり、上皮細胞は運動能を獲得すると考えられている。この EMT が起こる初期過程の分子メカニズムの解明は、癌転移の謎を解く上で不可欠であるがその分子メカニズムほとんどわかっていない。これまで行なわれてきた EMT に関する研究は、主に癌細胞株を用いた培養細胞系の実験がメインであった。EMT の本質を調べるためには In vitro に加え、In vivo の実験系があることが望ましいが、その初期過程から EMT を解析できる有効な In vivo モデル系はこれまで存在しなかった。

2. 研究の目的

Wnt/b-catenin シグナルは、EMT 促進因子の 1 つと考えられているが、EMT におけるその役割はほとんどわかっていない。マウス遺伝学的手法により、マウス胎児皮膚において Wnt/b-catenin シグナルを恒常的に活性化できる遺伝子改変マウスを作成し、EMT における Wnt/b-catenin シグナルの機能を解析するための In vivo モデル実験系を確立する。マイクロアレーにより、Wnt/b-catenin シグナルの下流で機能しうる遺伝子群を同定し、EMT の初期過程における分子制御メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

①コンディショナル遺伝子改変マウスを用いた EMT の In vivo 実験系の確立

近年、Wnt/b-catenin シグナルによる EMT 制御の重要性が示唆されている。EMT の初期過程から見られる有効な In vivo モデル系を確立するため、コンディショナルに遺伝子の機能を破壊することができる cre-loxp システムを用い、Wnt/b-catenin シグナルを胎児表皮細胞特異的に活性化させることができるマウス

(K5-Cre Catnb^{(ex3)F1/+}マウス) を作成し解析を行った。

② EMT の初期過程で機能する候補遺伝子の同定

Wnt/b-catenin シグナルの破綻により引き起こされる EMT において、どのような遺伝子群が関与しているのか？上皮で正確にこの候補遺伝子を同定するため、コンディショナル遺伝子改変マウスと Cre の発現依存的に YFP で蛍光発色させることができる

Gt (ROSA) 26Sor^{tm1 (EYFP) Cos}マウスを交配し、表皮細胞特異的に YFP が発光する K5-Cre

Catnb^{(ex3)F1/+}ROSA-YFP マウスを作成した。同遺伝子改変マウスの皮膚から表皮細胞を分離し、マイクロアレーにより Wnt/b-catenin シグナルが恒常的に活性化された時に発現変化が起こる遺伝子群を網羅的に調べた。マイクロアレーにより絞られた候補遺伝子に関して、実際にその発現が変化していることを RT-PCR 法および切片 in situ ハイブリダイゼーション法により確認した。さらに上記実験により Wnt/b-catenin の下流で機能しうる因子に関して、マウス遺伝学的解析によりその機能解析を行った。

4. 研究成果

① EMT 研究のための In vivo 実験系の確立

Wnt/b-cateninシグナルを恒常的に活性化させたK5-Cre Catnb^{(ex3)fl/+}マウスの胎児皮膚は、EMTの初期段階であることを示す

E-cadherin(接着因子)の発現低下および基底膜崩壊を意味するLamininの発現低下が起きていることがわかった(図1、2)。

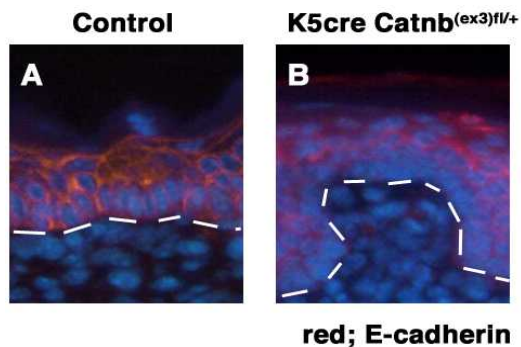


図1 胎児皮膚表皮で Wnt/b-catenin シグナルを恒常的に活性化すると基底層の E-cadherin の発現が消失する(B)。白線：表皮と真皮の境界線

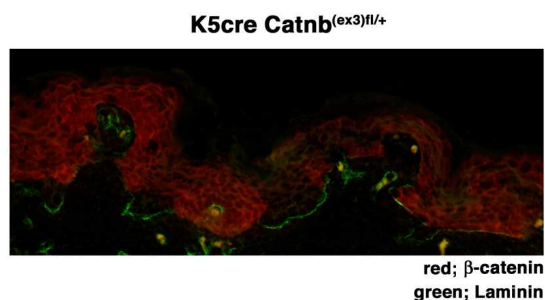


図2 K5-Cre Catnb^{(ex3) fl/+}マウス表皮における β -catenin と Laminin の蛍光 2 重染色。 β -catenin(red)の発現が亢進している上皮付近の Laminin(green)の発現は低下している。

このように本研究により、In vivo で EMT の初期過程を解析することができる有効な実験モデルマウスを確立することができた。

② EMTの初期過程で機能する候補遺伝子の同定

マイクロアレー解析により EMT 制御因子である Bmp および Wnt/ β -catenin のアンタゴニ

ストの1つである Dkk1 の発現が K5-Cre Catnb^{(ex3) fl/+}マウスの皮膚において亢進していることがわかった。そこで Wnt/ β -catenin シグナル亢進時におけるこの Bmp および Dkk1 の機能を調べるため、K5-Cre Catnb^{(ex3) fl/+}にさらに Bmp レセプターを欠損させたマウス (K5-Cre Catnb^{(ex3) fl/+}BmprIA^{fl/fl}DKO マウス)、また、Dkk1 遺伝子を欠損させたダブル遺伝子欠損マウス (K5-Cre Catnb^{(ex3) fl/+}Dkk1DKO マウス) をそれぞれ作成し、解析を行った。

その結果、K5-Cre Catnb^{(ex3) fl/+} Dkk1DKO マウスでは、形態および遺伝子発現に大きな変化は見られなかった。しかし、K5-Cre Catnb^{(ex3) fl/+}BmprIA^{fl/fl}DKO マウスでは組織学的解析から K5-Cre Catnb^{(ex3) fl/+}マウスに比べ、EMT が顕著におこっている可能性が示唆された。さらに、EMT の促進因子の1つであるメタロプロテアーゼの1種、Mmp2 の発現が顕著

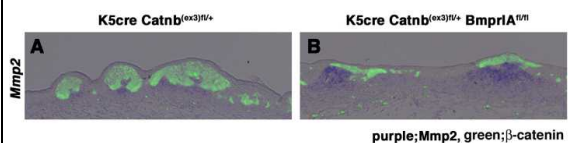


図3 両コンディショナル遺伝子改変マウスにおける β -catenin と Mmp2 の 2 重染色像。K5-Cre Catnb^{(ex3) fl/+} マウスにおいて β -catenin(green)の発現が亢進している表皮付近の間葉で Mmp2(purple)の発現も亢進している (A)。この傾向は K5-Cre Catnb^{(ex3) fl/+}BmprIA^{fl/fl} マウスではさらに顕著になる (B)。

に亢進していた(図3)。以上の結果は、Bmp シグナルが EMT 抑制因子として機能すること、さらに Wnt/ β -catenin シグナルは、Bmp シグナルを介することにより EMT 促進因子としてだけではなく、抑制因子としても機能しうる可能性を示唆していると考えられる。これらの結果は、Wnt/b-catenin を中心とした増殖因子シグナルクロストークの破綻が EMT の開始およびその促進に関与していることを想起させるものである。

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)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：20404345

[雑誌論文] (計3件)

① Liu L., Suzuki K., Nakagata N., Mihara K., Matsumaru D., Ogino Y., Yashiro K., Hamada H., Liu Z., Evans S., Mendelsohn M., Yamada G.

Retinoic acid signaling regulates Sonic hedgehog and Bone morphogenetic protein signalings during genital tubercle development.

Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology. 95(1) : 79-88, 2012. 査読有

② Omori A., Harada M., Ohta S., Villacorte M., Sugimura Y., Shiraishi T., Suzuki K., Nakagata N., Ito T., Yamada G. Epithelial Bmp (Bone morphogenetic protein) signaling for bulbourethral gland development: a mouse model for congenital cystic dilation.

Congenit Anom (Kyoto). 51(3):102-109, 2011. 査読有

③ Ohta S., Yukiko O., Suzuki K., Kamimura M., Tachibana K., Yamada G. Sonoporation for gene transfer into embryos.

Cold Spring Harb Protoc.:prot5581. Cold Spring Harbor, New York. 2011. 査読無

[学会発表] (計1件)

①鈴木堅太郎、胎児皮膚分化決定過程におけるマスターレギュレーターとしての Wnt/beta-cateninシグナリング、第50回日本先天異常学会学術集会、2010.7.8.、淡路夢舞台国際会議場

[図書] (計1件)

①鈴木堅太郎、山田源、羊土社、完全版マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック、2011, 15

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 堅太郎 (SUZUKI KENTARO)