

平成 30 年 5 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04348

研究課題名(和文) Ras-ERK経路拮抗因子DA-Rafによる組織形成・再生とがん抑制の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of tissue formation, regeneration, and tumor suppression by the Ras-ERK pathway antagonist DA-Raf

研究代表者

遠藤 剛 (ENDO, Takeshi)

千葉大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：30194038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Ras-ERK経路拮抗因子DA-Rafによる組織形成とがん抑制について、次のことがらを明らかにし、これらの分子機構を解明した。(1) TGF- $\beta$ 1による2型肺胞上皮細胞から筋線維芽細胞への上皮・間葉転換に、DA-RafによるRas-ERK経路の抑制が働いていた。(2) 筋細胞分化の過程でみられるアポトーシスと筋細胞分化にDA-Rafが働いていた。(3) KRAS活性化突然変異をもつがん細胞においてDA-Rafの発現が消失していること、またDA-Rafの不活性化突然変異やSNPがK-Rasによるがん化を抑制できないことから、DA-Rafががん抑制蛋白質であるということを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed to elucidate signaling and molecular mechanisms of (1) lung alveolarization, (2) skeletal muscle cell differentiation and regeneration, and (3) tumor suppression by the Ras-ERK pathway antagonist DA-Raf. We found that (1) suppression of the Ras-ERK pathway by DA-Raf is essential for TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition from alveolar epithelial type 2 cells to myofibroblasts. (2) Suppression of the Ras-ERK pathway by DA-Raf is required for the induction of skeletal myocyte differentiation and apoptosis during myocyte differentiation. (3) The expression of DA-Raf was lost in tumor cells with constitutively active KRAS mutations. Inactivating mutations and SNP of DA-Raf did not suppress active K-Ras mutant-induced tumor phenotypes. Thus, DA-Raf represents a tumor suppressor protein against K-Ras-induced tumorigenesis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Ras-ERK経路 肺胞形成 筋細胞分化 筋再生 がん抑制 分子機構

## 1. 研究開始当初の背景

Ras によって活性化される ERK 経路 (Raf-MEK-ERK リン酸化カスケード) は、細胞増殖や細胞分化など多様な細胞機能だけでなく、形態形成などの生体機能やがん化なども制御している。ERK 経路を構成する Raf ファミリーには、これまでに A-Raf, B-Raf, C-Raf の 3 つのメンバーしか知られていなかった。私たちは、*Araf* 遺伝子から選択的スプライシングによって生ずる、Ras 結合ドメインをもっているがキナーゼドメインを欠損した蛋白質を発見し、DA-Raf (Deleted A-Raf) と命名した。DA-Raf は活性化 Ras (H-Ras, K-Ras, N-Ras) に強く結合し、Raf の内在性ドミナントネガティブ体として機能することにより、Ras-ERK 経路に拮抗作用を示した。DA-Raf は活性化突然変異 K-Ras(G12V) による細胞のがん化を抑制し、またこのがん化細胞の移植によるマウスにおける腫瘍形成も抑制した。Ras-ERK 経路は骨格筋細胞分化に抑制的に働くため、DA-Raf はさらに骨格筋細胞分化の誘導因子としても働いていた (Yokoyama et al., *J. Cell Biol.* 2007)。

私たちはさらに DA-Raf の生体機能を解明するために、*DAraf* KO マウス (A/B/C-Raf の発現は正常) を作製した。KO マウスでは MEK と ERK の活性が上昇していた。KO マウスは生後の成長が遅れ、からだが矮小であった。正常なマウスでは生後 5 日頃から、前肺胞嚢に筋線維芽細胞 (MyFb) から成る中隔が多数形成されて肺胞が形成される。しかし KO マウスでは中隔が形成されず、そのため肺胞形成が起こらなかった。これらの KO マウスを用いて解析した結果、DA-Raf は次のようにして肺胞形成を誘導することが明らかになった。肺胞形成期以前では、2 型肺胞上皮細胞 (AEC2) において Ras-ERK 経路が働き、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 阻害蛋白質 TIMP4 が発現した。TIMP4 は細胞外で MMP14-MMP2 カスケードを阻害して肺胞形成を抑制した。しかし肺胞形成期になると DA-Raf が AEC2 に高発現して、Ras-ERK 経路を抑制することにより TIMP4 の発現を阻害した。その結果、MMP14-MMP2 カスケードが働き、MyFb 前駆細胞 (preMyFb) から MyFb への分化が誘導され、中隔の形成を介して肺胞形成がもたらされた (Watanabe-Takano et al., *PNAS* 2014)。この研究により、これまで不明であった MyFb の分化機構が明らかになり、さらに Ras-ERK 経路と DA-Raf による肺胞形成の制御機構が解明された。

## 2. 研究の目的

上述の研究成果に基づき、本研究では次の 3 つのことがらについて明らかにし、これらの分子機構を解明することを目的とした。

(1) 肺胞形成と肺胞再生における DA-Raf の機能： 中隔形成による肺胞形成には、preMyFb から MyFb への分化が働いている。

一方、成体における中隔の崩壊による肺胞崩壊に対しては、中隔形成による肺胞の再生が有用であると考えられる。そこで上皮・間葉転換 (EMT) による AEC2 から MyFb の形成が肺胞再生に働く可能性を検討するとともに、DA-Raf がこの MyFb の形成にも必須の役割を担っていることを明らかにする。またこの分子機構を解明する。

(2) 骨格筋細胞分化と筋再生における DA-Raf の機能： DA-Raf は培養骨格筋細胞の分化誘導因子として働いている。そこで成体における筋再生においても、DA-Raf の発現が上昇し、筋細胞分化の誘導を介して筋再生に必須の役割を果たしていることを明らかにする。一方、筋細胞分化の過程において高頻度でアポトーシスが誘導される。このアポトーシスにおいても DA-Raf が働いていることを明らかにし、その分子機構を解明する。

(3) 肺がんに対する DA-Raf のがん抑制機能： DA-Raf は肺胞形成期の AEC2 に高発現しているが、*KRAS* の活性化突然変異がみられる肺腺がんは AEC2 に由来している。そこで DA-Raf の発現低下や不活性化が、活性化突然変異 K-Ras による肺腺がんにつながることを明らかにする。これにより DA-Raf ががん抑制蛋白質であることを実証する。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞と細胞培養： ラット AEC2 細胞株 RLE-6TN に EMT を起こす場合には、0.5 ng/ml TGF- $\beta$ 1 を作用させた。マウス衛星細胞由来の C2C12 細胞は 10% FBS を含む増殖培地中で維持し、分化させる場合には 5% 馬血清を含む分化培地に移して培養した。C2C12 細胞に pSilencer vector により DA-Raf の shRNA を安定発現させた細胞株 C2/DRi を複数樹立した。*KRAS* 活性化突然変異をもつヒト肺腺がん細胞株として A549, A427, LU65 を、ヒト大腸がん細胞株として HCT116 を用いた。

(2) EMT の解析： EMT は  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) の発現誘導および E-cadherin の発現低下を免疫蛍光顕微鏡法とイムノブロッキング (IB) により検出して解析した。また MEK と ERK の活性はリン酸化抗体を用いた IB により解析した。

(3) アポトーシスの解析： アポトーシスを起こしている細胞は FITC-annexin V の結合により検出した。また caspase-3 の活性化と Bad のリン酸化による活性抑制は IB により解析した。

(4) 点突然変異の導入： DA-Raf への点突然変異の導入は、pBluescript に挿入した野生型 DA-Raf の cDNA に PCR により行った。PCR 産物を self-ligation により環状化させ、適切な制限酵素で切断し、発現ベクターに挿入した。

(5) Pull-down アッセイと免疫共沈アッセイ： Baculovirus の系で発現させた GST-K-Ras に GTP $\gamma$ S または GDP を結合させた。HeLa 細胞に Myc-DA-Raf をトランスフェクションにより発現させた。これらの GST-K-Ras と

Myc-DA-Raf との結合を pull-down アッセイにより解析した。COS-1 細胞に Myc-K-Ras (G12V)/(S17N) と HA-DA-Raf をトランスフェクションにより共発現させた。Anti-Myc 抗体を用いて免疫沈降を行い、共沈した HA-DA-Raf を anti-HA-tag 抗体を用いて IB により検出した。

(6) がん化形質の解析： マウス NIH3T3 細胞を v-K-Ras でがん化させた NRT9 細胞に、野生型 DA-Raf を安定発現させた細胞株 NRT/DR と、不活性化突然変異 DA-Raf(R52Q), DA-Raf(R52W) をそれぞれ安定発現させた細胞株 NRT/DR(Q), NRT/DR(W) を複数樹立した。これらについて、以下のがん化細胞の形質を解析した。1) ストレスファイバーの消失と細胞形態の変化, 2) 血清飢餓条件下での細胞増殖, 3) 増殖の接触阻害の消失, 4) 足場非依存的増殖, 5) ノードマウスへの移植による腫瘍形成。

#### 4. 研究成果

##### (1) 肺胞形成と肺再生における DA-Raf の機能

DA-Raf は生後早期の肺胞形成期になると AEC2 に高発現し, preMyFb から MyFb への分化を誘導することにより, 中隔形成を通して肺胞形成を引き起こす。一方, AEC2 は EMT により MyFb に転換することも知られている。そこで DA-Raf がこの EMT にも働いているかどうかを調べ, さらにその分子機構の解明に取り組んだ。AEC2 細胞株 RLE-6TN (RLE) に TGF- $\beta$ 1 を作用させたところ, MEK と ERK の弱い一過的な活性化がみられ, E-cadherin の発現低下と  $\alpha$ SMA の発現誘導を伴う EMT が誘導された。一方, TGF- $\beta$ 1 に加えて FGF2 を作用させたところ, MEK と ERK の強い持続的な活性化がみられ, EMT は起こらなかった。しかし MEK 阻害剤を作用させると EMT は回復したことから, FGF2 による EMT の阻害は ERK 経路を介して起こっていることが示された。また TGF- $\beta$ 1 による EMT は, 恒常的活性化型 H-Ras, B-Raf, MEK1 の発現により阻害された。これらのことから ERK 経路が EMT の阻害に働いていることが明らかになった。さらに TGF- $\beta$ 1 による EMT は, siRNA による DA-Raf のノックダウンにより抑制された。またこの抑制は MEK 阻害剤により解除された。したがって TGF- $\beta$ 1 による EMT には, DA-Raf による non-Smad シグナリングの Ras-ERK 経路の抑制が必要であることが明らかになった。TGF- $\beta$ 1 を作用させると Smad2 は核内に移行したが, DA-Raf のノックダウンによりこの核内移行は抑制された。以上の結果から, TGF- $\beta$ 1 による AEC2 から MyFb への EMT は, DA-Raf により次のようにして誘導されると考えられる (図 1)。AEC2 に TGF- $\beta$ 1 を作用させると, Smad シグナリングと non-Smad シグナリングの Ras-ERK 経路が活性化される。Ras-ERK 経路は Smad2/3 を阻害するが, DA-Raf は Ras-ERK 経路を阻害す

ることにより, Smad2/3 の活性化に働く。そのため Smad2/3 が働いて  $\alpha$ SMA などの転写を介して EMT を起こし, MyFb への転換が起こる (図 1A)。しかし FGF2 が作用すると, Ras の活性が増大するため, DA-Raf によって ERK 経路を抑制しきれなくなる。そのため Smad2/3 が阻害され, MyFb への EMT が起こらなくなる (図 1B)。

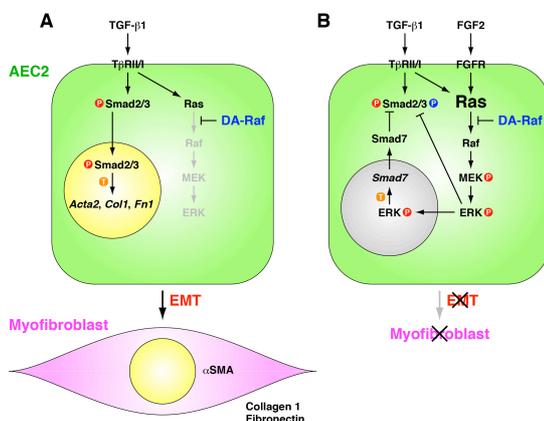


図 1 TGF- $\beta$ 1 による AEC2 から MyFb への EMT における DA-Raf の役割

肺気腫を伴う慢性閉塞性肺疾患 (COPD) においては, 中隔の崩壊による肺胞崩壊が起こる。この治療のためには肺胞の再生が有用であると考えられる。そこで成体の肺胞において, AEC2 に TGF- $\beta$ 1 を作用させ MyFb への EMT を起こし, 中隔の形成をもたらす。これにより肺胞の再生につながる可能性が考えられる。

##### (2) 骨格筋細胞分化と筋再生における DA-Raf の機能

DA-Raf は骨格筋細胞分化の過程で発現が顕著に誘導され, MyoD ファミリー転写因子の発現と活性を阻害する Ras-ERK 経路に拮抗することにより, 骨格筋細胞分化誘導因子として働いている。そこで衛星細胞由来の C2C12 細胞を用いて, 筋再生過程における骨格筋細胞分化においても DA-Raf が働いている可能性を調べた。DA-Raf を shRNA により安定にノックダウンした C2C12 細胞株を複数樹立した。これらの細胞株ではいずれも myogenin と筋特異的蛋白質の発現が抑制され, また筋細胞融合が起こらなかった。したがって DA-Raf は筋再生過程における骨格筋細胞分化にも必須の役割を果たしていると考えられる。

また C2C12 細胞の分化の過程では 20-30% の細胞にアポトーシスが誘導される。これらのアポトーシス細胞においても, DA-Raf の発現が誘導された。そこで DA-Raf がアポトーシスの誘導に働いているかどうかを調べ, さらにその分子機構の解明に取り組んだ。ERK は RSK をリン酸化して活性化する。アポトーシスの誘導に働く Bad は, 活性化 RSK により S112 がリン酸化されて不活性化する。

アポトーシスの過程では、この Bad S112 のリン酸化のレベルが低下し、caspase-3 が活性化した。上記の DA-Raf ノックダウン細胞株では、筋細胞分化の過程でみられるアポトーシスが抑制されていた。また Bad S112 のリン酸化がみられ、caspase-3 の活性化が抑制されていた。これらの結果から、DA-Raf は Ras-ERK 経路に拮抗することにより、Bad S112 のリン酸化を抑制して Bad を活性化状態に保ち、その結果 caspase-3 の活性化を引き起こして、アポトーシスを誘導すると考えられる。

以上のように、DA-Raf は骨格筋細胞分化とその過程でみられるアポトーシスの両者に働いている。インスリン様増殖因子-1 (IGF-1) は Ras-ERK 経路と PI3K-Akt シグナリングの両者を活性化する。Ras-ERK 経路は筋芽細胞に増殖を引き起こすのに対し、PI3K-Akt シグナリングは myogenin や MEF2 などの筋特異的転写因子の発現を介して筋細胞分化に働いている。また Akt は Bad S136 をリン酸化して不活性化することにより、アポトーシスを阻害する。したがって分化する細胞では DA-Raf と PI3K-Akt シグナリングの両者が働いており、アポトーシスを起こす細胞では DA-Raf のみが働いている可能性が考えられる。

アポトーシス細胞は phosphatidylserine (PS) 受容体の BAI1 を介して筋細胞融合を誘導し、筋形成や筋再生に働いているという報告がある。しかしアポトーシス細胞を濃縮して加えても、筋細胞融合は促進されなかった。また caspase 阻害剤を加えても筋細胞融合には影響はみられなかった。したがってアポトーシス細胞は筋細胞融合の誘導には働いていないと考えられる。

### (3) 肺がんに対する DA-Raf のがん抑制機能

v-K-Ras によってがん化させたマウス NIH3T3 細胞 (NRT9 細胞) に DA-Raf を安定発現させた細胞株では、がん化の形質はいずれも抑制されていた。そこで DA-Raf はがん抑制蛋白質である可能性が考えられる。しかし DA-Raf ががん抑制蛋白質であることを実証するためには、ヒトのがんにおいて DA-Raf の発現の消失や不活性化突然変異が起こっており、その結果がんになることを示さなければならない。そこでがんにおいて DA-Raf の発現の消失や不活性化突然変異が起こっているかどうかを調べた。ヒトの膵臓がん、大腸がん、肺腺がんにおいては、KRAS 活性化突然変異が高頻度でみられる。DA-Raf は肺胞形成期の AEC2 に高発現しているが、KRAS 活性化突然変異がみられる肺腺がんは AEC2 に由来している。KRAS 活性化突然変異がみられる複数の肺腺がん細胞と大腸がん細胞においてはいずれも、A/B/C-Raf の発現はみられたが、DA-Raf の発現は消失していた。また DA-Raf の Ras 結合部位にある R52 は Ras との結合に重要なアミノ酸である。ヒトの SNP の一つである R52Q や肺がんでみら

れる突然変異 R52W をもつ DA-Raf は、活性化 K-Ras に結合できず、したがって ERK 経路を阻害できなかった。NRT9 細胞にこれらの不活性化突然変異をもつ DA-Raf を安定発現させた細胞株では、がん化の形質 (ストレスファイバーの消失と丸い形態、血清飢餓条件下での細胞増殖、増殖の接触阻害の消失、足場非依存的増殖、移植した免疫不全マウスにおける腫瘍形成) はいずれも抑制されなかった。これらの結果から、DA-Raf は活性化突然変異 K-Ras によるがん化に対してがん抑制蛋白質として機能していると考えられる。

次に、DA-Raf ががん抑制蛋白質として作用するために、Ras-ERK 経路のドミナントネガティブ拮抗因子として機能する分子機構を調べた。Ras が不活性化状態の場合には、A/B/C-Raf は細胞質中で 14-3-3 の結合により閉鎖構造をとり不活性化状態である。しかし Ras が活性化すると A/B/C-Raf は開放構造をとり細胞膜に局在化して、活性化 Ras に結合することにより活性化する。一方、DA-Raf は 14-3-3 結合部位を欠損しているため常に開放構造をとっており、Ras の活性化・不活性化の状態にかかわらず細胞膜に局在していた。そのため DA-Raf は活性化 Ras に結合しやすい状態であり、A/B/C-Raf に優先して活性化 Ras に結合した。また DA-Raf は B-Raf と C-Raf の二量体形成を抑制した。こうして DA-Raf は Raf に対してドミナントネガティブ作用を現し、ERK 経路を抑制することが明らかになった。

## 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 4 件)

- (1) Kanno, E., Kawasaki, O., Takahashi, K., Takano, K., Endo, T.: DA-Raf, a dominant-negative antagonist of the Ras-ERK pathway, is a putative tumor suppressor. *Exp. Cell Res.* 362: 111-120 (2018). (査読有)  
DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.11.008
- (2) Maeda, R., Tamashiro, H., Takano, K., Takahashi, H., Suzuki, H., Saito, S., Kojima, W., Adachi, N., Ura, K., Endo, T., Tamura, T.: TBP-like protein (TLP) disrupts the p53-MDM2 interaction and induces long-lasting p53 activation. *J. Biol. Chem.* 292: 3201-3212 (2017). (査読有)  
DOI: 10.1074/jbc.M116.763318
- (3) Endo, T.: Molecular mechanisms of skeletal muscle development, regeneration, and osteogenic conversion. *Bone* 80: 2-13 (2015). (査読有)  
DOI: 10.1016/j.bone.2015.02.028
- (4) Watanabe-Takano, H., Takano, K., Hatano, M., Tokuhisa, T., Endo, T.: DA-Raf-mediated suppression of the Ras-ERK pathway is essential for TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-

mesenchymal transition in alveolar epithelial type 2 cells. *PLoS One* 10: e0127888 (2015).  
(査読有)  
DOI: 10.1371/journal.pone.0127888

〔学会発表〕 (計 15 件)

うち招待講演

- (1) Endo, T., Takano, K.: Molecular mechanisms of myofibrillogenesis in skeletal and cardiac muscles. **Symposium of the 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan** “The Frontiers of Muscle Physiology: Molecular Mechanisms of Muscle Formation and Diseases”. (2017.3.28). Hamamatsu, Japan.
- (2) 遠藤 剛:筋原線維形成の分子機構とその不全による筋疾患. 第2回日本筋学会学術集会シンポジウム3「筋オルガネラバイオロジー」. (2016.8.6). 国立精神・神経医療研究センター (小平市) .

〔図書〕 (計 1 件)

- (1) Endo, T., Takano, K.: Actin filament formation in myofibrils and cell protrusions regulated by signal transduction. In **Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling** (Inoue, J. and Takekawa, M., eds.) Springer, Tokyo. pp. 287–307 (2015).

〔その他〕

ホームページ

<http://life.s.chiba-u.jp/telab/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

遠藤 剛 (ENDO, Takeshi)  
千葉大学・大学院理学研究院・教授  
研究者番号：30194038

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者

高野 和儀 (TAKANO, Kazunori)  
千葉大学・大学院理学研究院・助教  
研究者番号：60466860