

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390076
 研究課題名 (和文) Wnt5a・Ror2 受容体チロシンキナーゼによる細胞移動・細胞極性制御機構の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of regulatory mechanisms for cell migration and cell polarity by Wnt5a and Ror2 receptor tyrosine kinase
 研究代表者
 南 康博 (MINAMI YASUHIRO)
 神戸大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：70229772

研究成果の概要：ヒトをはじめとする多細胞生物の形態形成過程において、複雑かつ精緻に制御された細胞移動・細胞極性が重要な役割を担っている。我々は Ror2 受容体チロシンキナーゼが、形態形成において重要な役割を担う分泌蛋白質 Wnt5a の受容体として機能することを明らかにしていたが、本研究では Wnt5a/Ror2 による細胞移動・細胞極性を調節する細胞内情報伝達機構の解析を行うとともに、この情報伝達機構の異常とがん等の病態との関連の解析を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2008 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：Ror2 受容体キナーゼ、Wnt5a、細胞移動、細胞極性、細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトなどの多細胞生物の形態形成において、原腸陥入時の収斂伸長 (CE: convergent extension) 運動や平面内細胞極性 (PCP: planar cell polarity) が重要な役割を担っているが、これらの過程において発生過程において分泌される Wnt ファミリー蛋白質、特に Wnt5a が重要な役割を担うことが知られていた。ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析から、Wnt5a の受容体として Frizzled 蛋白質が報告されていたが、Wnt5a の受容体の実体については不明な点が多かった。

(2) 本研究開始前に、我々は新たに Ror2 受

容体チロシンキナーゼが Wnt5a の受容体として機能し、Wnt5a による CE 運動や PCP を制御することを個体レベル、細胞レベルでの解析により明らかにしていた。本研究開始当初において、我々は既に Wnt5a や Ror2 遺伝子のノックアウトマウス (以下、変異マウス) の作製やこれらの変異マウスの表現型解析を完了しており、個体レベルにおける Wnt5a, Ror2 の機能を明らかにするとともに、変異マウス由来の胚性線維芽細胞 (MEFs) や各種の培養細胞株を用いた解析から、Wnt5a による細胞移動における Ror2 の重要性を証明していた。

(3) 個体レベル、細胞レベルでの解析から、Ror2 が Wnt5a による細胞移動・細胞極性制御において中心的な役割を担うことが明らかになる一方、Wnt5a/Ror2 によってどのような細胞内シグナル伝達経路が作動し、その結果細胞移動・細胞極性が制御されるかについては不明であった。また、本研究開始当初、Wnt5a/Ror2 によるシグナル伝達の異常とがんの浸潤などの様々な病態との関連についても多くの不明な点が残されていた。

2. 研究の目的

本研究においては、Wnt5a/Ror2 による細胞内シグナル伝達に焦点を絞り、分子・細胞・個体レベルでの機能解析を有機的かつ体系的に行うことにより、Wnt5a/Ror2 による細胞移動・細胞極性制御の分子機構を明らかにするとともに、形態形成やがんの浸潤・転移における Wnt5a/Ror2 を介するシグナル伝達の異常の有無を明らかにすることを目的とした。具体的には、主に、以下の(1)~(4)を明らかにすることを目標とした。

(1) Wnt5a により Ror2 の (セリン・スレオニン) リン酸化に関与する蛋白質キナーゼの検索・同定とそのキナーゼの機能解析。

(2) Wnt5a/Ror2 による細胞移動・細胞極性制御のシグナル伝達機構の解析。

(3) Wnt5a/Ror2 を介するシグナル伝達によって発現誘導される標的遺伝子の検索・同定とその遺伝子産物の機能解析。

(4) Wnt5a/Ror2 によるシグナル伝達の異常とがんの浸潤等との関連解析。

3. 研究の方法

(1) Wnt5a により Ror2 の (セリン・スレオニン) リン酸化に関与する蛋白質キナーゼの検索・同定とそのキナーゼの機能解析。

① 本研究開始時までの我々の研究成果から、Wnt5a による Ror2 の (セリン・スレオニン) リン酸化に関与する蛋白質キナーゼの候補分子として、glycogen synthase kinase 3 (GSK3)、casein kinase 1ε (CK1ε) 等が想定されていた。そこで、まずこれらの候補蛋白質キナーゼに特異的な阻害剤を用いて、Wnt5a による Ror2 の (セリン・スレオニン) リン酸化に与える影響を検討した。

② ①における阻害剤を用いた解析から、関与が予想される蛋白質キナーゼについて、siRNA を用いて各蛋白質キナーゼの発現を抑制し、Wnt5a による Ror2 の (セリン・スレオニン) リン酸化に与える影響を検討した。

③ ①、②において候補蛋白質キナーゼの同定に成功したキナーゼ阻害剤や SiRNA を用いて、*in vitro* wound healing アッセイを行い、Wnt5a/Ror2 による創傷治癒 (wound closure) への影響を検討した。

(2) Wnt5a/Ror2 による細胞移動・細胞極性制

御のシグナル伝達機構の解析。

① *in vitro* wound healing アッセイを用いて、細胞の極性化を wound 面におけるアクチン繊維の集積 (lamellipodial protrusion)、安定化チューブリンの局在化、微小管形成中心 (MTOC: microtubule organizing center) の配向を指標に、また細胞移動を創傷修復 (wound closure) を指標にして、Wnt5a/Ror2 シグナルの影響を検討した。

② ①と同様に *in vitro* wound healing アッセイを用いて、Wnt5a/Ror2 により活性化される MAP キナーゼファミリー分子 (ERK, JNK, p38 MAPK) の同定を行った。同定に成功した MAP キナーゼ分子については、特異的阻害剤による影響を検討した。

③ 本研究開始前の我々の研究から、アクチン結合蛋白質であるフィラミン A が Wnt5a/Ror2 による細胞移動に関与することが知られていた。また、フィラミン A はシグナル伝達における足場蛋白質 (scaffold) として機能することが知られているので、上記の *in vitro* wound healing アッセイを用いて、Wnt5a/Ror2 による MAP キナーゼファミリー分子の活性化や極性を持った細胞移動におけるフィラミン A の関与を siRNA を用いた発現抑制実験やフィラミン A の発現を欠失した培養細胞を用いて検討した。

(3) Wnt5a/Ror2 を介するシグナル伝達によって発現誘導される標的遺伝子の検索・同定とその遺伝子産物の機能解析。

① コントロール siRNA または Ror2 siRNA で処理した培養細胞 (骨肉腫細胞) を用いて、DNA マイクロアレイ解析を行い、Ror2 の発現の有無によって変動する遺伝子の発現プロファイリングを行った。

② ①と同様の手法を用いて、Wnt5a の発現抑制により変動する遺伝子のプロファイリングを行った。

③ 上記①、②の解析により、Wnt5a/Ror2 シグナルにより発現が変動することが同定できた遺伝子について、その発現抑制実験等を行い、Wnt5a/Ror2 による細胞応答への影響を検討した (下記 (4) の研究方法を参照)。

(4) Wnt5a/Ror2 によるシグナル伝達の異常とがんの浸潤等との関連解析。

① 上記 (3) の研究内容と関連するが、骨肉腫細胞 SaOS-2 や U2OS において Wnt5a と Ror2 が構成的に発現しており、Wnt5a/Ror2 シグナルの恒常的活性化が示唆されたので、Wnt5a または Ror2 の発現抑制実験を行い、各分子の発現抑制の骨肉腫細胞の浸潤能へ与える影響を matrigel invasion アッセイ等を用いて詳細に検討した。

② 上記 (3) の研究方法により同定した Wnt5a/Ror2 シグナルの標的遺伝子について、その遺伝子産物の発現を siRNA により抑制し、骨肉腫細胞の *in vitro* における浸潤能へ

与える影響を検討した。

③ 生化学的手法、分子細胞生物学的手法を用いて、上記①、②において同定した Wnt5a/Ror2 シグナルの標的遺伝子について、その発現制御の分子機構解析を行った。

4. 研究成果

(1) Wnt5a により Ror2 の (セリン・スレオニン) リン酸化に関与する蛋白質キナーゼの検索・同定とそのキナーゼの機能解析。

Wnt5a による Ror2 のセリン・スレオニンリン酸化は、LiCl や SB216763 といった glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) 特異的阻害剤により抑制された。また、*in vitro* リン酸化反応において、精製した GSK-3 α 及び GSK-3 β が、免疫沈降法により精製した Ror2 をセリン・スレオニンリン酸化すること、及び培養細胞に GSK-3 (主に GSK-3 α) と Ror2 を構成的に発現させると、Wnt5a 刺激に関係なく Ror2 がセリン・スレオニンリン酸化されることが見出された。さらに、*in vitro* wound healing アッセイにおいて、Wnt5a による創傷治癒 (wound closure) の亢進が、SB216763 あるいは GSK-3 α または GSK-3 β の発現抑制により顕著に抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、Wnt5a 刺激に伴い GSK-3 (GSK-3 α 、GSK-3 β) を介して Ror2 がセリン・スレオニンリン酸化され、Wnt5a/Ror2 による極性を持った細胞移動に GSK-3 が関与することが示された。

(2) Wnt5a/Ror2 による細胞移動・細胞極性制御のシグナル伝達機構の解析。

Wnt5a/Ror2 による細胞移動・細胞極性制御機構を解析する目的で Ror2 を内在性に発現する NIH3T3 細胞を用いて *in vitro* wound healing アッセイを行ったところ、Wnt5a 刺激依存的に wound 面においてアクチンの集積による lamellipodium (糸状突起) の形成、安定化チューブリンの局在化、微小管形成中心の配向化といった細胞の極性化、ならびに細胞移動の亢進が認められた。このような Wnt5a による細胞移動・細胞極性の制御 (亢進) は、siRNA を用いた Ror2 の発現抑制により顕著に阻害された。また、*in vitro* wound healing アッセイにおいて、Wnt5a 依存的、Ror2 依存的、及び wound 刺激依存的に MAP キナーゼファミリーの中で JNK (c-Jun N-terminal kinase) が活性化されることが見出された。Wnt5a/Ror2 による JNK の活性化においては、アクチン結合タンパク質フィラミン A が重要な役割を担っており、フィラミン A を欠失した細胞や siRNA によりフィラミン A の発現を抑制した細胞においては、Wnt5a/Ror2 による JNK の活性化が認められなかった。Wnt5a/Ror2 シグナルによる JNK の活性化は細胞移動・細胞極性制御に必須であり、実際 Wnt5a/Ror2 による極性を持

った細胞移動は、JNK 阻害剤である SP600125 や JNK inhibitor 1 により阻害された。また、Par/aPKC (atypical protein kinase C) 経路が創傷治癒において Wnt5a による微小管の極性化した再編成に関与することが報告されていたので (Schlessinger et al., J. Cell. Biol. 178, 355-361, 2007)、Wnt5a/Ror2 シグナルによる JNK の活性化における aPKC (PKC ζ) の関与を検討したところ、PKC ζ に対する阻害剤 (PS- ζ) によって Wnt5a/Ror2 シグナルによる微小管形成中心の再配向ならびに JNK の活性化が阻害されることが見出された。これらの結果から、Wnt5a/Ror2 シグナルはフィラミン A や PKC ζ を介して JNK を活性化し、アクチンや微小管細胞骨格の再編成を誘導することにより細胞移動・細胞極性を制御することが明らかとなった。

(3) Wnt5a/Ror2 を介するシグナル伝達によって発現誘導される標的遺伝子の検索・同定とその遺伝子産物の機能解析。

Wnt5a/Ror2 シグナルにより制御される標的遺伝子を検索する目的で、Wnt5a, Ror2 ともに高いレベルで発現している骨肉腫細胞 SaOS-2 を用いて、まず siRNA を用いて Ror2 遺伝子のノックダウンを行い、それにより発現が減少する遺伝子群、増加する遺伝子群を DNA マイクロアレイ解析により検討した。Ror2 の発現抑制に伴いその発現が減少する遺伝子群の中に、マトリックスメタロプロテアーゼ 13 (MMP-13) 遺伝子が見出された。そこで、MMP-13 遺伝子が Wnt5a/Ror2 シグナルの標的遺伝子であるかどうかを検討する目的で、SaOS-2 細胞において siRNA を用いて Wnt5a 遺伝子のノックダウンを行い、MMP-13 遺伝子の発現に与える影響を RT-PCR 法により解析したところ、MMP-13 遺伝子の発現が抑制されることが示され、MMP-13 遺伝子が Wnt5a/Ror2 シグナルの標的遺伝子であることが明らかとなった。また、Wnt5a または Ror2 遺伝子のノックダウンにより、MMP-13 タンパク質の発現が減弱していることも ELISA 法によって確認された。MMP-13 は骨形成やがん細胞の浸潤に関与することが考えられたので、次に Wnt5a/Ror2 シグナルの異常とがんの浸潤との関連解析を行った (下記(4)参照)。

(4) Wnt5a/Ror2 によるシグナル伝達の異常とがんの浸潤等との関連解析。

一連の培養細胞における Wnt5a 及び Ror2 の発現を解析したところ、浸潤能の高い骨肉腫細胞株である SaOS-2 細胞や U2OS 細胞において両遺伝子 (遺伝子産物) が内在性に高いレベルで発現していることが見出されたので、SaOS-2 細胞、U2OS 細胞では Wnt5a, Ror2 の構成的な高発現により Wnt5a/Ror2 シグナルが恒常的に活性化されていること

が示唆された。そこで、これらの骨肉腫細胞において *Wnt5a* または *Ror2* 遺伝子の発現を siRNA を用いてノックダウンし、*Wnt5a/Ror2* シグナルへの影響を検討した。これらの骨肉腫細胞では構成的に

Wnt5a/Ror2 による non-canonical Wnt シグナル伝達が活性化されており、JNK の活性化によるその標的分子 (基質) である c-Jun のリン酸化が亢進するとともに、canonical Wnt シグナル伝達が抑制されていることが Tcf/Lef レポーター解析により示された。それに対して、これらの細胞において *Wnt5a* または *Ror2* の発現を siRNA を用いて抑制すると、c-Jun のリン酸化が減弱するとともに、Tcf/Lef レポーター遺伝子の活性化が観察された。また、*in vitro* matrigel アッセイにおいて SaOS-2 細胞 (または U2OS 細胞) は明らかな浸潤能の亢進を示すが、これらの細胞の浸潤能は *Wnt5a* または *Ror2* の発現抑制により顕著に減弱することが見出された。

上記(3)において記載した *MMP-13* 遺伝子は、これらの骨肉腫細胞において *Wnt5a/Ror2* シグナルの恒常的活性化の結果、高いレベルでの発現が検出されたが、この *MMP-13* 遺伝子の発現誘導も *Wnt5a* または *Ror2* の発現抑制により著しく阻害された。次に、骨肉腫細胞の浸潤能と *MMP-13* の関連について検討を加えた。まず骨肉腫細胞において *Ror2* と *MMP-13* が浸潤突起 (invadopodia) に共局在することが見出された。また、*Wnt5a* または *Ror2* 遺伝子のノックダウンにより *MMP-13* の発現が減少するとともに、浸潤突起の形成も阻害され、浸潤能は減弱した。骨肉腫細胞での *MMP-13* 遺伝子の発現を siRNA を用いて抑制した場合や *MMP-13* 阻害剤で処理した場合にも、これらの細胞の浸潤突起形成が阻害されるとともに、*in vitro* での浸潤能が減弱することが明らかとなった。さらに、*Wnt5a/Ror2* シグナルによる *MMP-13* の発現誘導には Src チロシンキナーゼの活性化が必須であることが明らかとなった。これらの結果から、骨肉腫細胞では、*Wnt5a* と *Ror2* の構成的高発現により *Wnt5a/Ror2* シグナルが恒常的に活性化されており、Src の活性化を介した *MMP-13* の発現誘導の結果、これらの細胞の浸潤能が亢進していると考えられる。本研究結果の国内外における位置付け、インパクトと今後の展望：本研究により、*Wnt5a/Ror2* シグナルによる細胞移動・細胞極性制御の分子機構について新しい展開を得ることが出来、その成果は国内外の non-canonical Wnt シグナル伝達研究において新規かつ重要なものと考えている。特に、*Wnt5a/Ror2* シグナルとがんの浸潤の明らかにした点は、今後骨肉腫をはじめとするがんの診断、予後判定、さらには *Wnt5a/Ror2* シ

グナルを標的とした新しい分子標的治療への重要な足掛かりになるものと予想される。*Wnt5a/Ror2* シグナルの異常は、がん細胞の *in vitro* での浸潤能の亢進と関連するのみならず、*in vivo* での浸潤や転移と関連することが想定されるため、今後ヌードマウス等を用いたがんの浸潤・転移モデルでの解析を行うことが必要であると考えている。

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 6 件)

1. Li, C., Chen, H., Hu, L., Xing, Y., Sasaki, T., Villosis, M. F., Li, J., Nishita, M., Minami, Y., and Minoo, P.: Ror2 modulates the canonical Wnt signaling in lung epithelial cells through cooperation with Fzd2. **BMC Mol. Biol.** 9: 11-21, 2008. 査読有
2. Yamamoto, S., Nishimura, O., Misaki, K., Nishita, M., Minami, Y., Yonemura, S., Tarui, H., and Sasaki, H.: Cthrc1 selectively activates planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing Wnt-receptor complex. **Dev. Cell** 15: 23-36, 2008. 査読有
3. Nomachi, A., Nishita, M., Inaba, D., Enomoto, M., Hamasaki, M., and Minami, Y.: Receptor tyrosine kinase Ror2 mediates Wnt5a-induced polarized cell migration by activating c-Jun N-terminal kinase via actin-binding protein filamin A. **J. Biol. Chem.** 283: 27973-27981, 2008. 査読有
4. He, F., Xiong, W., Yu, X., Espinoza, R., Liu, C., Nishita, M., Yamada, G., Minami, Y., and Chen, Y.: Wnt5a regulates directional cell migration and cell proliferation via the Ror2-mediated noncanonical pathway in mammalian palate development. **Development** 135: 3871-3879, 2008. 査読有
5. Yamamoto, H., Yoo S-K., Nishita, M., Kikuchi, A., and Minami, Y.: Wnt5a modulates glycogen synthase kinase 3 to induce phosphorylation of receptor tyrosine kinase Ror2. **Genes Cells** 12: 1215-1223, 2007. 査読有
6. Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Ohtake, F., Kobayashi, S., Igarashi, M., Youn, M-Y., Takeyama, K., Nakamura, T., Mezaki, Y., Takezawa, S., Yogiashi, Y., Kitagawa, H., Yamada, G., Takada, S., Minami, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., and Kato, S.: A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR- γ transactivation. **Nat. Cell Biol.**, 9: 1273-1285, 2007. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

①西田 満、南 康博：Wnt5a/Ror2 シグナルによる細胞運動制御。日本分子生物学会年会・日本生化学学会大会合同大会、2008 年 12 月 9～12 日 (神戸国際会議場)

②西田 満、南 康博：Ror2 regulates cytoskeletal rearrangements to mediate Wnt5a-induced polarized cell migration. 日本分子生物学会年会・日本生化学学会大会合同大会、2007 年 12 月 11～15 日 (パシフィコ横浜)

他 2 件。

〔図書〕(計 2 件)

①西田 満、南 康博：受容体型チロシンキナーゼRor2によるWntシグナルの制御:実験医学、26 巻 15 号 (増刊)、68-72、2008

②西田 満、依田 成玄、南 康博：イラストレイテッド生化学 原著 4 版 "Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry 4th ed. (石崎 泰樹、丸山 敬監訳)、丸善 (株) 出版 (2008) (翻訳)、619 頁

〔その他〕

ホームページ情報：

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 康博

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70229772

(2) 研究分担者

依田 成玄

神戸大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70335454

西田 満

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30379359

寒川 延子

神戸大学・大学院医学系研究科・COE 研究員

研究者番号：30432579

(3) 連携研究者

該当なし