

機関番号：82606

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19390092

研究課題名 (和文) ネットリンによる細胞死抑制のメカニズムとヒト疾患における意義

研究課題名 (英文) The mechanism for netrin-1 regulated anti-cell death activity and its role in human diseases

研究代表者

荒川 博文 (ARAKAWA HIROFUMI)

国立がんセンター (研究所及び東病院臨床開発センター)・生物物理部・部長

研究者番号：70313088

研究成果の概要 (和文)：

ネットリン1による強力な細胞死抑制活性の主要な介在分子として、新規ネットリンレセプターXを単離同定した。ネットリン1とレセプターXの結合により、p53誘導性細胞死が強力に抑制されるだけでなく、血管内皮細胞やがん細胞の遊走能が亢進した。このとき AKT 及び Src キナーゼの活性化が誘導された。ネットリン1とレセプターXは、正常大腸上皮細胞の基底膜上において共局在を示した。大腸がんでは、ネットリン1の発現が高頻度に消失し、がん間質において強い発現を認めた。3次元培養系において、ネットリン1とレセプターXの結合は、大腸がん細胞の極性回復と増殖抑制を誘導した。これらの結果から、ネットリン1とレセプターXのシグナル経路は、正常上皮細胞の極性維持に重要な働きを有し、大腸がんに対してがん抑制的に機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

In the present study, we identified a novel netrin-1 receptor X that mediates netrin-1 regulated anti-cell death activity. The interaction of netrin-1 with receptor X not only blocked p53-dependent apoptosis but also induced chemotaxis of both vascular endothelial cells and cancer cells. The interaction led to activation of AKT and Src. In vivo, netrin-1 was colocalized with receptor X at the basement membrane of colorectal epithelial cells. Netrin-1 expression was frequently lost in human colorectal cancer tissues whereas the expression was elevated in cancer stromal region. In 3D culture experiment, the interaction of netrin-1 with receptor X induced cell polarization and growth suppression of colorectal cancer cells. These results suggest that the signaling pathway via netrin-1 and receptor X plays a critical role in cell polarity to suppress tumor initiation and progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	8,700,000	2,610,000	11,310,000

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：分子腫瘍学

1. 研究開始当初の背景
ネットリン1とそのレセプターは神経軸索誘導

関連物質で、神経細胞の発生・分化の過程において、神経軸索の伸長反応に重要な役割を

果たす。一方で、我々は、非神経細胞においては、ネトリン1とそのレセプターのシグナルが、細胞死を正と負に制御し、細胞の異常増殖やがん化に対して抑制的に働いている可能性を提唱し、これらの分子がヒトがんで高頻度に不活性化されている事実や、ネトリン1がp53依存性細胞死を強力に抑制する事実を見いだした (Arakawa H. *Nat Rev Cancer* 4, 978-987, 2004)。ネトリンによる細胞死抑制のメカニズムは、がんの発生・進展や、抗がん剤に対する抵抗性の獲得、さらには神経変性疾患における神経細胞死に関与している可能性が高い。

2. 研究の目的

この研究においては、ネトリンによる細胞死抑制作用がどのようなレセプター及び会合分子によって伝達されているのかを明らかにする。また、それらの結合によってどのようなシグナル経路が活性化しているのかを明らかにする。ヒトがんにおけるこれら分子の異常の有無についても解析を進める。これらの成果から、ネトリンの関与する疾患発症のメカニズムの解明と、ネトリンによる細胞死抑制シグナル経路の制御を応用した新しい疾患予防治療戦略開発の基盤を作り、もって人類の健康福祉に貢献することを目的としている。

3. 研究の方法

我々が独自に開発したヒト生理的ネトリン1の大量調整法により、ヒト生理的ネトリンの大量調整を行う。このネトリンにはFLAG融合蛋白質と生理的蛋白質の2種類を用意する。これらの精製ネトリン蛋白質を用いて、細胞死抑制に関与する新規ネトリンレセプターをスクリーニングする。用いる細胞は、ネトリンによって細胞死抑制が生じるH1299肺癌細胞株、U373MGグリオーマ細胞株と、ネトリンによる細胞死抑制が生じないSH-SY5Y神経芽腫細胞株とする。これら細胞株にFLAG融合ネトリン蛋白質を添加し、一定時間培養を行った上で、細胞を回収し、蛋白質を抽出する。これら蛋白質抽出液に対して、抗FLAG抗体を用いて免疫沈降を行う。FLAG融合ネトリン蛋白質と共沈殿してきた蛋白質群に対して、SDS-PAGEによる電気泳動を行い、蛋白質群をゲルより切り出し、質量分析によってそれらの詳細を解析する。解析が可能であった蛋白質に関しては、候補蛋白質とネトリンの結合を確認する。これらのスクリーニングを進める一方で、ネトリンと結合する可能性のあるレセプター群については候補分子アプローチによって、ネトリンとの結合の有無を確認する。この際、先に用いたネトリンによる細胞死抑制に対して異なる反応性を示す細胞株を用いて、そ

れら細胞株での候補レセプターの発現レベルを調べる。ネトリンによる作用が認められないSH-SY5Yで発現が低レベルまたは消失し、ネトリンによる作用が認められるH1299、U373MGで発現が高レベルの候補分子は優先的に結合確認実験へ進める。以上の方法によってネトリンとの特異的な結合が証明された候補レセプターについては、siRNA等を用いた機能阻害実験へと進め、それら候補分子が真の細胞死抑制に関与する新規ネトリンレセプターであることを証明して行く。我々が開発した生理的ネトリンの大量調整法によって精製したネトリン蛋白質を抗原として、マウスあるいはウサギを用いた免疫によって、抗ヒトネトリン抗体の作製を行う。この研究によって明らかとなった候補ネトリンレセプターに関する機能解析を進める。様々な細胞株を用いて、候補ネトリンレセプターのノックダウン細胞株を樹立し、ネトリン1の細胞死抑制作用が、候補レセプターのノックダウンで消失するかを確認する。ネトリン1と候補ネトリンレセプターの結合によって、レセプターへ会合する分子を同定する。これら細胞株を用いて、ネトリン1とレセプターの結合によって活性化されるシグナル伝達経路の詳細を明らかにする。また、我々が独自に作製した抗ネトリン1抗体と、候補ネトリン1レセプター抗体を用いて、この経路が、生体内のどのような場所で、どのような生理的機能を発揮しているのかを、組織化学的免疫染色を行うことによって明らかにする。また、独自に収集した、ヒト大腸がんサンプルを用いて、大腸がん及びそれに対応した正常大腸組織におけるネトリン1と候補レセプターの発現を、リアルタイムPCRや、特異抗体を用いた免疫組織学的解析によって解析する。

4. 研究成果

候補分子アプローチによって、ネトリン1に結合する新規ネトリンレセプターXを単離同定した。レセプターXは、H1299やU373MGなどの、ネトリン1による細胞死抑制活性を認める非神経細胞に強く発現していたが、SH-SY5Yなどの神経細胞には発現を認めなかった。免疫沈降実験で、ネトリン1との特異的な結合を認めた。レセプターXを発現しているH1299やU373MG細胞から、siRNAによってレセプターXをノックダウンするとネトリン1による細胞死抑制活性は消失した。また、レセプターXを発現していないSH-SY5Y細胞にレセプターXを発現させると、ネトリン1による細胞死抑制活性が獲得された。ネトリン1とレセプターXの結合は、血管内皮細胞のHUVECや、肺がん細胞株H1299の遊走能を亢進させた。ネトリン1とレセプターXの結合は、AKTやSrcの活性化を引き起こし、こ

れらキナーゼの阻害剤で、細胞死抑制活性が失われたことより、ネトリン1とレセプターXのシグナル伝達は、これら分子が関与することが推測された。生体内において、ネトリン1とレセプターXは、ヒト大腸正常上皮細胞の基底膜において共局在を示した。また、ヒト大腸がん組織においては、ネトリン1の発現は消失し、逆にがん間質領域において強い発現を認めた。一方レセプターXは、ヒト大腸がん細胞にも強い発現を認めた。3次元培養系において、ネトリン1を発現していない大腸がん細胞株に、ネトリン1を導入し、安定的に発現させたところ、細胞極性が回復し、細胞増殖の停止と細胞死抑制による細胞生存亢進が認められた。以上の結果から、ネトリン1とその新規レセプターXは、上皮細胞の基底膜上で結合することで、細胞極性維持のシグナルと細胞生存亢進に作用するシグナルを制御する可能性があり、それによって、少なくとも大腸がんにおいては、がん抑制機能を有している可能性が示唆された。さらに、大腸がん組織においては、ネトリン1の発現を失った大腸がん細胞の極性喪失が生じ、がん間質に発現したネトリン1へ、レセプターXを発現した大腸がん細胞が遊走浸潤していく可能性が考えられる。さらには、がん間質のネトリン1は、腫瘍血管新生を促進している可能性が示唆された。

我々の研究によって、ネトリンの非神経細胞における全く新しい機能があきらかとなり、それをメディエートする新規レセプターの発見につながった。さらに、これらの機能が正常細胞の機能維持に重要な働きを有し、その破綻がヒトがんの発生進展につながる可能性が示された。さらには、ヒトがん組織においては、ネトリン1とレセプターXの結合及びシグナル伝達を阻害することで、がんの浸潤転移を予防できる可能性が示された。具体的には、ヒトがん治療において、抗ネトリン1抗体によるネトリン1とレセプターXの結合を阻害することで、転移抑制を標的とした全く新しいがん治療法開発の実現化が期待される。

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 8 件)

英文原著 (査読有り)

1. Futamura M, Kamino H, Miyamoto Y, Kitamura N, Nakamura Y, Ohnishi S, Masuda Y, Arakawa H. Possible role of semaphorin 3F, a candidate tumor suppressor gene at 3p21.3, in p53-regulated tumor angiogenesis suppression. *Cancer Res* 67, 1451-1460, 2007

2. Bourdon A, Minai L, Serre V, Jais JP, Sarzi E, Aubert S, Chretien D, de Lonlay P, Paquis-Flucklinger V, Arakawa H, Nakamura Y, Munnich A, Rotig A. Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet* 39, 776-780, 2007

3. Kamino H, Futamura M, Nakamura Y, Kitamura N, Kabu K, Arakawa H. B-cell linker protein prevents aneuploidy by inhibiting cytokinesis. *Cancer Sci* 99, 2444-2454, 2008

4. Tanikawa C, Furukawa Y, Yoshida N, Arakawa H, Nakamura Y, Matsuda K. XEDAR as a putative colorectal tumor suppressor that mediates p53-regulated anoikis pathway. *Oncogene* 28, 3081-3092, 2009

5. Miyamoto Y, Futamura M, Kitamura N, Nakamura Y, Baba H, Arakawa H. Identification of UNC5A as a novel transcriptional target of tumor suppressor p53 and a regulator of apoptosis. *Int J Oncol* 36, 1253-1260, 2010

6. Cui H, Kamino H, Nakamura Y, Kitamura N, Miyamoto T, Shinogi D, Goda O, Arakawa H, Futamura M. Regulation of apoptosis by p53-inducible transmembrane protein containing sushi domain. *Oncol Rep* (in press)

7. Ohnishi S, Futamura M, Kamino H, Nakamura Y, Kitamura N, Miyamoto Y, Miyamoto T, Shinogi D, Goda O, Arakawa H. Identification of NEEP21, encoding neuron-enriched endosomal protein of 21 kDa, as a transcriptional target of tumor suppressor p53. *Int J Oncol* (in press)

和文総説 (査読なし)

1. 荒川博文 「p53によるオートファジーの制御」 *実験医学* 28, 397-403, 2010

[学会発表] (計 11 件)

1. 荒川博文 「p53 and dependence receptors」 第66回日本癌学会総会 2007年10月3日 パシフィコ横浜 (横浜)

2. 二村学, 荒川博文他 「Identification of UNC5A as a novel p53-target gene and its involvement in caspase-dependent apoptosis」 第66回日本癌学会総会 2007

年 10 月 3 日 パシフィコ横浜 (横浜)

3. 宮本裕士、荒川博文他 「p53 のがん抑制機能に關与する新規オートファジー關連タンパク質の同定」 第 67 回日本癌学会総会 2008 年 10 月 28 日 名古屋国際会議場 (名古屋)

4. 喜多村憲章、荒川博文他 「細胞死抑制、細胞極性及び細胞運動を制御するシグナル伝達に關与する新規ネトリンレセプターの同定」 第 67 回日本癌学会総会 2008 年 10 月 28 日 名古屋国際会議場 (名古屋)

5. 中村康之、荒川博文他 「BLNK は細胞質分裂を阻害することにより染色体異数性を防ぐ」 第 67 回日本癌学会総会 2008 年 10 月 28 日 名古屋国際会議場 (名古屋)

6. 二村学、荒川博文他 「大腸がんにおけるネトリン 1 の癌抑制機能について」 第 67 回日本癌学会総会 2008 年 10 月 28 日 名古屋国際会議場 (名古屋)

7. 加峰弘毅、荒川博文他 「p53 制御性の新規オートファジーがん抑制経路解析」 第 67 回日本癌学会総会 2008 年 10 月 28 日 名古屋国際会議場 (名古屋)

8. 朱育炎、荒川博文他 「神経芽腫の生存と死を制御する新規依存性受容体 UNC5D の機能的役割」 第 67 回日本癌学会総会 2008 年 10 月 30 日 名古屋国際会議場 (名古屋)

9. 二村学、荒川博文他 「Mieap のヒトがんにおける不活性化」 第 68 回日本癌学会総会 2009 年 10 月 1 日 パシフィコ横浜(横浜)

7. 宮本崇史、荒川博文他 「IP-2DICAL を用いた Mieap 結合タンパク質の探索」 第 68 回日本癌学会総会 2009 年 10 月 1 日 パシフィコ横浜 (横浜)

10. 李元元、荒川博文他 「神経芽腫のプログラム細胞死における依存性受容体 UNC5D の機能的役割」 第 68 回日本癌学会総会 2009 年 10 月 1 日 パシフィコ横浜 (横浜)

11. 荒川博文 「ミトコンドリアの品質管理とがん」 第 68 回日本癌学会総会 2009 年 10 月 3 日 パシフィコ横浜 (横浜)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions>

/06biop/06biop.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 博文 (ARAKAWA HIROFUMI)

研究者番号 : 70313088