

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460390

研究課題名(和文)血管新生におけるがん抑制タンパク質RECKの役割

研究課題名(英文)The roles of RECK tumor suppressor protein in angiogenesis

研究代表者

野田 亮(NODA, MAKOTO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30146708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：RECKタンパク質は、多くの腫瘍で発現低下しており、がん転移・再発を抑制すると考えられている。一方、RECK欠損マウスは、血管発生の停止をきたし、胎生中期頃に死亡する。このため、RECKの生理機能解明は、血管障害と共になん悪性化の機序解明にもつながるものと期待される。今回、我々は、血管を形成する2種の細胞(内皮と壁)におけるRECKの役割を、遺伝子改変マウスおよび組織片培養系を用いて解析した。その結果、壁細胞RECKは胎生中期の心血管発生、内皮細胞RECKは胎生後期の脳血管発生に必須であること、また、RECKは、これら2種類の細胞の緊密な相互作用を助け血管安定化をもたらす可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：RECK has been characterized as a protein suppressing cancer metastasis/recurrence and downregulated in a wide variety of tumors. Reck-deficient mice, on the other hand, die at mid-gestation stage with arrested vascular development. Hence, studies on the physiological functions of RECK may yield important insights into the mechanisms of both vascular disorders and cancer progression. In this project, we attempted, by using genetically engineered mice and organ culture techniques, to elucidate the functions of RECK in two types of cells constituting blood vessels: vascular endothelial cells and mural cells. Our results indicate that mural RECK is required for mid-gestation cardiovascular development while endothelial RECK is essential for brain angiogenesis at a later developmental stage. Our data also indicate that RECK promotes the proper interactions between endothelial and mural cells essential for vascular stability.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：組織細胞 循環器・高血圧 生体分子 癌 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

胎児の血管発生は、アンジオプラスト由来の血管内皮細胞による脈管形成、発芽、非発芽型血管新生、壁細胞の動員などを経て安定な樹状形態の形成に至ることが知られているが、これらの過程における細胞動態の詳細や関与する分子については不明の点も多い。

RECK は、活性化 KRAS 遺伝子によって悪性転換したマウス線維芽細胞株に正常復帰を誘導する遺伝子として申請者らによって発見された(高橋ら PNAS 1998)。RECK は多くのがんにおいて発現低下しており、強制発現により種々の悪性形質(腫瘍血管新生、浸潤、転移、腫瘍増殖等)の抑制が観察される(呉ら Cell 2001; 野田 Cancer Metastasis Rev 2003; 野田、高橋 Cancer Sci 2007)。

一方、RECK は、ショウジョウバエからヒトまで単一遺伝子として良く保存されており、*Reck* 欠損マウスは胎生中期に致死形質を示すことから、哺乳動物の胎児発生にとっても必須の機能を担うものと考えられる。この時期の正常マウスでは、神経上皮、血管、体節の一部などで強い *Reck* 発現が見られ、*Reck* 欠損マウスでは血管と神経管に特に強い表現型が見られる(呉ら Cell 2001; 村口ら Nature Neurosci 2007)。胎生後期の正常マウスにおいては、筋線維、軟骨、神経筋接合部などに強い *Reck* 発現が見られ(越前谷ら Oncogene 2005; 近藤ら J Cell Sci 2007; 川嶋ら J Neurochem 2007)。これらの組織構築においても RECK が何らかの役割を担っているものと考えられる。*Reck* 発現低下マウスでは、前肢、右側優位な肢芽パターン形成の異常(小指側の低形成)や四肢背側の過角化症(hyperkeratosis)が見られ(山本ら Biol Open 2012)。発生(形態形成)および腫瘍抑制における *Reck* の重要性が、この系においても示唆されている。

RECK タンパク質は、システインに富み、プロテアーゼ阻害モチーフ(Kazal motif)を

有する分子量 125 kDa の GPI アンカー型糖タンパク質で、釣鐘型 2 量体を形成する(大村ら J Biol Chem 2009)。RECK は細胞レベルで proMMP2 の活性化と proMMP9 の発現を抑制し、試験管内でも種々の MMP に対して拮抗阻害活性を示す(高橋ら PNAS 1998; 三木ら J Biol Chem 2007)。*Reck* 欠損マウス胎児の組織内ではゼラチン分解酵素活性が亢進しており、組織構築の乱れが観察される(呉ら Cell 2001)。これらの知見を考え合わせると、RECK はマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)ファミリー等の制御を介して細胞外マトリックス(ECM)や細胞表面タンパク質を保護し、組織構築を安定化させる働きを持つものと考えられる。また、こうした作用を介して、細胞移動や細胞周期の制御に関わっている可能性も示唆されている(森岡ら Oncogene 2009; 吉田ら Oncogene 2012)。

2. 研究の目的

当グループによる先行研究において、妊娠マウスの子宮や胎児など、血管リモデリングが活発な組織では、血管内皮細胞と壁細胞(血管平滑筋およびペリサイト)の両方で *Reck* が強く発現されており、非発芽型血管新生(intussusception、pruning など)の起きている部位では特に発現が強いこと、また、子宮での *Reck* ノックダウンおよび胎児での *Reck* 欠損誘導は、内腔が不定形で拡張した異常な血管を生ずることが見出され(Chandanaら BMC Dev Biol 2010)。胎児のみならず成体においても *Reck* が血管新生に必須の役割を担う事が示された。しかし、(1)内皮細胞 *Reck* と壁細胞 *Reck* との役割の違い、(2) *Reck* はどのようなメカニズムによって血管新生に寄与するのか、という2つの問題については、未解決のままであった。そこで、本研究では、組織特異的 *Reck* ノックアウトおよび器官培養系という新たなアプローチにより、これら2つの問題に洞

察を加えることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞と壁細胞における Reck の役割について

血管内皮選択的ドライバー・マウス (Tie2-Cre) および壁細胞選択的ドライバー・マウス (Sm22-Cre) を用いて Reck-flox 遺伝子座のヘミ接合体 (*Reck^{flox}*) に組織特異的な欠損を誘導し、表現型を調べた。これにより、胎生致死形質の原因、E10.5 以降の血管発生における Reck の役割、他臓器の発達に対する血管の役割などに洞察を加えた。

(2) Reck の血管新生における作用機構について

タモキシフェンによって Reck 欠損を誘導できるマウス (*Reck^{flox}/CreERT2*) およびコントロールマウスを材料とし、大動脈器官培養 Aorta Ring Assay (ARA) を行い、微小血管形成における Reck 発現細胞の挙動、Reck の発現低下や欠損が微小血管形成に与える影響などを調べた。これにより、発芽型血管新生 (sprouting angiogenesis) における Reck の役割に洞察を加えた。

4. 研究成果

(1) 血管細胞における Reck 発現部位

Reck^{CreERT2}、*Sm22-Cre*、*Tie2-Cre* の三種の Cre ドライバー・マウスと 2 色蛍光リポーター・マウス mTmG をそれぞれ交配し、緑色蛍光陽性細胞の局在や形態を比較した。その結果、Reck 陽性細胞中には、壁細胞、内皮細胞それぞれと似た局在および形態を示すものが含まれることが観察された。

(2) 壁細胞 Reck の欠損

次に、血管壁細胞選択的 Reck ノックアウト・マウス (*Reck^{flox};Sm22-Cre*) を作成したところ、全身性 Reck ノックアウトと似た、心臓および血管の発生異常を伴う胎生中期致死形質を示すことが分かった。すなわち、全身性 Reck ノックアウト・マウスの死は、

壁細胞 Reck の欠乏によるところが大きいものと考えられる。

(3) 内皮細胞 Reck の欠損

一方、血管内皮細胞選択的 Reck ノックアウト・マウス (*Reck^{flox};Tie2-Cre*) は、より長く生きるが、胎生末期から出生前後にかけて脳出血と脳発達障害を伴う致死形質を示すことが分かった。すなわち、内皮細胞 Reck も血管発生、特に脳血管および脳の発生に必須であることが見出された。

(4) 器官培養における Reck 機能の解析

幼弱マウスから採取した大動脈を 1 mm 程度の厚さにスライスし、コラーゲン・ゲル中で培養すると、微小血管の発芽が見られる。*Reck* 欠損を誘導したマウスから採取した試料では、多数の不安定な微小血管が生じ、それらの側方融合が見られた。この現象は、*in vivo* で見られた「内腔が不定形で拡張した異常な血管」の出現機序を考える上で興味深い。また、内皮細胞、壁細胞の数、形態、局在、接着、周囲の ECM などに異常がみられた。*Reck* 欠損マウス胎児の組織においても、大動脈周辺における壁細胞分布の顕著な偏りが観察された。これらの結果は、Reck が壁細胞と内皮細胞の相互作用とそれに続く基底膜形成や血管安定化にとって重要な役割を演ずることを示唆している (Almeida ら Sci Rep 2015)。

(5) Wnt7 シグナルにおける Reck の役割

Vanhollebeke ら (eLife 2015) は、ゼブラフィッシュを用いた実験から、脳血管新生に必須の G タンパク質共役型受容体 Gpr124 (Kuhnert ら Science 2010) と Reck との機能的関連性を示唆した。血管内皮細胞 (特に tip cells) において、Gpr124 と Reck が Wnt7 受容体 (あるいは、その成分) として、Wnt7 シグナルの増強に関わる可能性を示したのである。この知見は、内皮細胞における Reck 欠損が脳血管異常をもたらすことに明快な説明を与える (野田ら Cancer Sci 2016) し

かし、これらの分子が具体的にどう相互作用するのかについては、未だ解明に至っていない。

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)

(1) Wang Z*, Murakami R, Yuki K, Yoshida Y, Noda M*. Bioinformatic studies to predict microRNAs with the potential of uncoupling RECK expression from epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Cancer Inform* **15**, 91-102 (2016). 査読あり DOI: [10.4137/CIN.S34141](https://doi.org/10.4137/CIN.S34141)

(2) Somanna NK, Valente AJ, Krenz M, McDonald KS, Higashi Y, Noda M, Chandrasekar B. Histone deacetyltransferase inhibitors Trichostatin A and Mocetinostat differentially regulate MMP9, IL-18 and RECK expression, and attenuate Angiotensin II-induced cardiac fibroblast migration and proliferation. *Hypertens Res* **39**, 709-716 (2016). 査読あり DOI: [10.1038/hr.2016.54](https://doi.org/10.1038/hr.2016.54)

(3) Shi G, Yoshida Y, Yuki K, Nishimura T, Kawata Y, Kawashima M, Iwaisako K, Yoshikawa K, Kurebayashi J, Toi M, Noda M*. Pattern of RECK CpG methylation as a potential marker for predicting breast cancer prognosis and drug-sensitivity. *Oncotarget* **7**, 8620 (2016). 査読あり DOI: [10.18632/oncotarget.8620](https://doi.org/10.18632/oncotarget.8620)

(4) Noda M*, Vallon M, Kuo CJ. The Wnt7's Tale: A story of an orphan who finds her tie to a famous family. *Cancer Sci* **107**, 576-582 (2016). [総説]査読あり

DOI: [10.1111/cas.12924](https://doi.org/10.1111/cas.12924)

(5) Almeida GM, Yamamoto M, Morioka Y, Ogawa S, Matsuzaki T, Noda M*. Critical roles for murine Reck in the regulation of vascular patterning and stabilization. *Sci Rep* **5**, 17860 (2015). 査読あり DOI: [10.1038/srep17860](https://doi.org/10.1038/srep17860)

(6) Yuki K, Yoshida Y, Inagaki R, Hiai H, Noda M*. E-cadherin-downregulation and RECK-upregulation are coupled in the non-malignant epithelial cell line MCF10A but not in multiple carcinoma-derived cell lines. *Sci Rep* **4**, 4568 (2014) 査読あり DOI: [10.1038/srep04568](https://doi.org/10.1038/srep04568)

(7) Siddesha JM, Valente AJ, Yoshida T, Sakamuri SS, Delafontaine P, Iba H, Noda M, Chandrasekar B. Docosahexaenoic acid reverses angiotensin II-induced RECK suppression and cardiac fibroblast migration. *Cell Signal* **26**, 933-941 (2014) 査読あり DOI: [10.1016/j.cellsig.2014.01.005](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.01.005)

(8) Siddesha JM, Valente AJ, Sakamuri SS, Gardner JD, Delafontaine P, Noda M, Chandrasekar B. Acetylsalicylic acid inhibits IL-18-induced cardiac fibroblast migration through the induction of RECK. *J Cell Physiol* **229**, 845-855 (2014) 査読あり DOI: [10.1002/jcp.24511](https://doi.org/10.1002/jcp.24511)

[学会発表](計2件)

(1) 小川秀一郎、マウス下垂体細胞における Reck の役割、BMB2015、2015年12月01日～2015年12月04日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

(2) 松崎朋子、RECK と ADAMTS10 の相互作用と Fabrilin 繊維形成、BMB2015、2015年12月01日～2015年12月04日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：
http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral_course/r-014/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 亮 (NODA, Makoto)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30146708

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

松崎 朋子 (MATSUZAKI, Tomoko)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：50402855

(4) 研究協力者

なし