

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23112007

研究課題名（和文）平面細胞極性シグナルの異常と繊毛関連症候群及び癌の浸潤転移

研究課題名（英文）Dysfunction of planar cell polarity signaling and its relationship with ciliopathies and cancer invasion and metastasis

研究代表者

南 康博（MINAMI, YASUHIRO）

神戸大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：70229772

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 142,100,000円

研究成果の概要（和文）：上皮管腔組織は、多細胞生物における基本的かつ重要な構造であり、その形成・破綻の分子機構を解明することは、医学・生物学上の重要課題の1つである。我々は、細胞極性制御を司る平面細胞極性シグナルに焦点を当てて、このシグナルの異常と上皮管腔組織の形成異常（奇形）、繊毛関連症候群やがんの進展との関連を解析し、その結果、平面細胞極性シグナルの異常が腎尿管先天性奇形などをもたらすと同時に、その恒常的活性化が繊毛形成に関わる分子の発現などを介してがんの進展に関わることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The epithelial tubular tissues are fundamental and functionally important structures in multicellular organisms, and it is one of the most important issues to clarify the molecular mechanisms underlying the formation and disruption of these epithelial tubular structures. In this research project, we have focused on the planar cell polarity (PCP) signaling, and have tried to elucidate possible relationships between abnormalities of this signaling and anomalies of epithelial tubular tissues (including the kidney), ciliopathies, and cancer progression. As a result, we have shown that dysfunction of PCP signaling results in various anomalies, including congenital anomalies of kidney and urinary tract (CAKUT), and that aberrant activation of this signaling in various types of cancer cells contributes to their progression through expression of proteins, required for the formation of the primary cilia.

研究分野：分子細胞生物学・腫瘍生物学

キーワード：上皮管腔組織破綻 平面細胞極性シグナル 繊毛シグナル 非古典的Wntシグナル アダプター分子 癌の浸潤・進展 上皮管腔組織形成 組織炎症

1. 研究開始当初の背景

上皮管腔組織は、多細胞生物における様々な器官の重要かつ基盤となる構造であるが、この構造の形成過程やその破綻の分子機構についてはいまだ不明な点が多い。上皮管腔組織の形成においては、時空間的に緻密に制御された極性シグナルが重要な役割を担っている。

Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼである Ror1 および Ror2 は、発生過程において液性因子である Wnt5a の受容体として機能し、平面細胞極性 (PCP: planar cell polarity) シグナルを活性化して PCP や収斂伸長運動 (CE movements: convergent extension movements) を制御することにより、形態形成や組織・器官構築において重要な役割を担うことが知られていた。また、PCP シグナルの恒常的活性化が、上皮管腔組織の炎症や癌の浸潤などの病態と密接に関連することが明らかになっていた。このような研究状況の中、本研究では PCP シグナルと繊毛シグナルに焦点を当て、これらのシグナルの異常と上皮管腔組織の先天奇形、繊毛関連症候群やがんの進展・増悪化などの病態との関連を明らかにしようという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究においては、主に平面細胞極性シグナル (PCP シグナル) に焦点を当て、このシグナルの異常と上皮管腔組織の形成異常 (先天奇形等) や形成された上皮管腔組織の破綻 (炎症、がんの浸潤等) との関連を個体・組織/器官・細胞・分子レベルでのシームレスな解析を行うことにより解明することを目的とする。また、本研究においては、本新学術領域研究の他の計画研究や公募研究と緊密に連携した上で共同研究を行い、多様な視点から問題解決に向けて研究を推進し、新たな学問領域である「管腔生物学」の確立に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、まず平面細胞極性シグナル (PCP シグナル) において重要な役割を担う *Wnt5a*, *Ror2*, *Ror1* 遺伝子欠失マウスを用いて、個体・組織/器官・細胞レベルでの病態解析を行う (*Wnt5a*, *Ror2* 遺伝子欠失マウスは新生児致死に至るため、主に PCP シグナルの異常 (欠失) と先天奇形の関連解析を行う)。次に、形成された上皮管腔組織の破綻の病態解析としては、腎線維症モデル (片側尿管結紮実験) や DSS 誘導性腸炎モデルを用いて、個体・組織/器官レベルでの病態解析を行う (前述の変異マウスを用いた解析では、成体での解析は不可能であるため、ヘテロ変異マウスまたは細胞種・組織特異的遺伝子欠失マウス (cKO マウス) を用いて解析を行った)。また、野生型・変異マウス (胎児) 由来の上皮管腔組織の器官培養系を用いた解析を行う。

また、細胞レベルでの解析では、PCP シグナルが恒常的に活性化したがん細胞株や上皮-間葉転換 (EMT: epithelial-mesenchymal transition) を誘導した上皮様がん細胞株等を用いて、マトリゲル浸潤解析、semi-3D 培養系、共培養系等を用いた分子細胞生物学的解析により PCP シグナルの異常 (恒常的活性化) とがん細胞の増悪・進展との関連を解析する。

4. 研究成果

(1) *Wnt5a*, *Ror2*, *Ror1* 遺伝子欠失マウス等を用いた解析から、平面細胞極性シグナル (PCP シグナル) の異常により、腸管短縮化 (PCP と CE movements の異常と考えられる)、内耳 (蝸牛) の形態異常 (PCP と CE movements の異常と考えられる) および重複腎・尿管奇形 (CAKUT: congenital anomalies of kidney and urinary tract) などの先天奇形が見られることが明らかになった。内耳の異常については、ヒト劣性遺伝性難聴家系の全エクソーム解析から *Ror1* 遺伝子変異が見出され、この変異体 *Ror1* が Wnt5a 刺激に伴う NF- κ B の活性化を誘導出来ないこと、等が見出されている。また、腎臓の発生過程における尿管芽 (上皮組織) の形成についての解析から、*Wnt5a*, *Ror1*, *Ror2* を介するシグナルにより間葉組織の配置が制御され、その結果、尿管芽 (上皮組織) と後腎間葉 (間葉組織) が適切に相互作用することが尿管芽形成に必須であることが明らかになった。特に腎発生解析から、*Ror2* が後腎間葉に発現し、*Wnt5a*-*Ror2* シグナルが GDNF-Ret シグナルを制御することが重要であることが見出された。

(2) 腎線維症モデル (片側尿管結紮実験) の解析から、尿管結紮に伴う炎症により TGF- β を介したシグナルが活性化され、EMT が誘導されることにより *Wnt5a*-*Ror2* シグナルが活性化され、その結果、MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) の誘導とそれに伴う尿管上皮基底膜破壊や線維化の亢進がもたらされることが見出された。また、*Ror2* cKO マウスを用いた DSS 誘導性腸炎モデルの解析から、*Wnt5a*-*Ror2* シグナルにより IL-12、IFN- γ を介する免疫シグナルが亢進し、腸炎の増悪に寄与することが示された。

(3) 骨肉腫細胞などにおいて *Wnt5a*-*Ror2* シグナルが恒常的に活性化される結果、MMP-13 や繊毛形成に関わる IFT20 (intraflagellar transport 20) などが発現誘導され、がん細胞の浸潤能が亢進することが明らかとなった。また、低分化胃癌細胞株 [CXCR6 (CXCL16 の受容体) 陽性] の細胞増殖能が、がん微小環境の構成因子の 1 つである、間葉系幹細胞における自律的な *Wnt5a*-*Ror2* シグナルの活性化によるケモカ

イン CXCL16 の発現・産生の亢進によって増強されることが見出された。

上記の一連の研究成果から、PCP シグナルが単に上皮細胞における極性制御にとどまらず、上皮-間葉相互作用においても重要な役割を担うことが明らかとなった。また、PCP シグナルの異常が、上皮管腔組織の形成異常（先天奇形など）や形成された上皮管腔組織の破綻（慢性炎症、がんの進展など）と密接に関わることが見出された。本研究による成果を踏まえて、今後慢性炎症やがんの進展を制御するために、PCP シグナルを標的とした新たな治療法が開発されることが期待される。

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18件)

1 Diaz-Horta, O., Abad, C., Sennaroglu, L., Foster II, J., DeSmidt, A., Bademci, G., Tokgoz-Yilmaz, S., Duman, D., Cengiz, F. B., Grati, M., Fitoz, S., Liu, X-Z., Farooq, A., Imtiaz, F., Currall, B. B., Morton, C. C., Nishita, M., Minami, Y., Lu, Z., Walz, K., Tekin, M. ROR1 is essential for proper innervation of auditory hair cells and hearing in humans and mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 査読有、印刷中、2016 (doi: 10.1073/pnas.1522512113).

2 Qi, X., Okinaka, Y., Nishita, M., Minami, Y. Essential role of Wnt5a-Ror1/Ror2 signaling in metanephric mesenchyme and ureteric bud formation. **Genes Cells**, 査読有、21、2016、pp. 325-334 (doi: 10.1111/gtc.12342)

3 Takiguchi, G., Nishita, M., Kurita, K., Kakeji, Y., Minami, Y. Wnt5a-Ror2 signaling in mesenchymal stem cells promotes proliferation of gastric cancer cells by activating CXCL16-CXCR6 axis. **Cancer Sci.**, 査読有、107、2016、pp. 290-297 (doi: 10.1111/cas.128711)

4 Sato, A., Kayama, H., Shojima, K., Matsumoto, S., Koyama, H., Minami, Y., Nojima, S., Morii, E., Honda, H., Takeda, K., Kikuchi, A. The Wnt5a-Ror2 axis

promotes the signaling circuit between interleukin-12 and interferon- γ in colitis. **Scientific Rep.**, 査読有、5、2015、10536 (doi: 10.1038/srep10536)

5 Endo, M., Nishita, M., Fujii, M., Minami, Y. Insight into the role of Wnt5a-induced signaling in normal and cancer cells. **Int. Rev. Cell Mol. Biol.**, 査読無、314、2015、pp. 117-148 (doi: 10.1016/bs.ircmb)

6 Nishita, M., Qiao, S., Miyamoto, M., Okinaka, Y., M., Yamada, M., Hashimoto, R., Iijima, K., Otani, H., Hartmann, C., Nishinakamura, R., Minami, Y. Role of Wnt5a-Ror2 signaling in morphogenesis of the metanephric mesenchyme during ureteric budding. **Mol. Cell. Biol.**, 査読有、34、2014、pp. 3096-3105 (doi: 10.1128/MCB.00491-14)

7 Fukuyo, S., Yamaoka, K., Sonomoto, K., Oshita, K., Okada, Y., Saito, K., Yoshida, Y., Kanazawa, T., Minami, Y., Tanaka, Y. IL-6-accelerated calcification by induction of Ror2 in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells is STAT3-dependent. **Rheumatology**, 査読有、53、2014、pp. 1282-1290 (doi: 10.1093/rheumatology/ket496)

8 Li, X., Yamagata, K., Nishita, M., Endo, M., Arfian, N., Rikitake, Y., Emoto, N., Hirata, K., Tanaka, Y., Minami, Y. Activation of Wnt5a-Ror2 signaling associated with epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of tubular epithelial cells during renal fibrosis. **Genes Cells**, 査読有、18、2013、pp. 608-619 (doi: 10.1111/gtc.12064)

9 Maeda, K., Kobayashi, Y., Udagawa, N., Uehara, S., Ishihara, A., Mizoguchi, T., Kikuchi, Y., Takada, I., Kato, S., Kani, S., Nishita, M., Marumo, K., Martin, T. J., Minami, Y., Takahashi, N. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblasts and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. **Nat. Med.**, 査読有、

18、2012、pp. 405-412 (doi: 10.1038/nm.2653)

¹⁰ Endo, M., Doi, R., Nishita, M., Minami, Y. Ror-family receptor tyrosine kinases regulate maintenance of neural progenitor cells in the developing neocortex. **J. Cell Sci.**、査読有、125、2012、pp. 2017-2029 (doi: 10.1242/jcs.097782)

¹¹ Yamagata, K., Li, X., Ikegaki, S., Oneyama, C., Okada, M., Nishita, M., Minami, Y. Dissection of Wnt5a-Ror2 signaling leading to *matrix metalloproteinase (MMP)-13* expression. **J. Biol. Chem.**、査読有、287、2012、pp. 1588-1599 (doi: 10.1074/jbc.M111.315127)

¹² Ren, D., Minami, Y., Nishita, M. Critical role of Wnt5a-Ror2 signaling in motility and invasiveness of epidermoid carcinoma cells following Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition. **Genes Cells**、査読有、16、2011、pp. 304-315 (doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01487.x)

¹³ Gao, B., Song, H., Bishop, K., Elliott, G., Garrett, L., English, M. A., Andre, P., Robinson, J., Sood, R., Minami, Y., Economedes, A. N., Yang, Y. Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. **Dev. Cell**、査読有、20、2011、pp. 163-176 (doi: 10.1016/j.devcel.2011.01.001)

〔学会発表〕(計4件)

¹ 西田 満、西尾 忠、紙崎 孝基、王 志超、榎本 真宏、玉田 紘太、内匠 透、Victor W. Hsu, Gregory J. Pazour、南 康博、Wnt5a-Ror2 シグナルは繊毛タンパク質IFT20 の発現誘導を介してがん細胞の浸潤を制御する、第38回日本分子生物学会年会、2015.12.4、神戸国際会議場(兵庫県)

² Michiru Nishita, Yasuhiro Minami、Novel role for Wnt5a-Ror2 signaling in regulating polarity and structure of the Golgi apparatus in osteosarcoma cells、University Washington-Kobe University Joint Symposium on Cell Signaling、2015.9.10、ワシントン大学(シアトル、米国)

³ Michiru Nishita, Sen Qiao, Xiaoyuan Qi, Mari Miyamoto, Yuka Okinaka, Makiko Yamada,

Ryuju Hashimoto, Kazumoto Iijima, Hiroki Otani, Christine Hartmann, Ryuichi Nishinakamura, Yasuhiro Minami、Role of Wnt5a-Ror signaling in morphogenesis of the metanephric mesenchyme during ureteric budding、新学術領域研究「上皮管腔組織形成」第2回国際シンポジウム、2015.8.23、北海道大学(北海道)

⁴ Yasuhiro Minami, Kaoru Yamagata, Mitsuharu Endo, Hiroki Otani, Ryuichi Nishinakamura, Michiru Nishita、Roles of Wnt/PCP signaling in pathological conditions of epithelial tubular tissues、新学術領域研究「上皮管腔組織形成」第1回国際シンポジウム、2013.6.23、北海道大学(北海道)

〔図書〕(計2件)

¹ Endo, M., Nishita, M., Doi, R., Hayashi, M., Minami, Y.、**Springer**、Receptor Tyrosine Kinases: Family and Subfamilies、2015、pp. 593-640

² Endo, M., Minami, Y.、**Nova Science Publishers, Inc.**、Progenitor Cells: Biology, Characterization and Potential Clinical Applications、2013、pp. 71-86.

〔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.kobe-u.ac.jp/medzoo/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

真嶋 隆一 (MASHIMA, Ryuichi)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号： 00401365
変更後 (真嶋 隆一の異動による)
手塚 徹 (TEZUKA, Toru)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号： 50312319

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：