

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08399

研究課題名(和文) 神経前駆細胞・がん細胞の血管に沿った移動におけるアクチン結合蛋白ガーディンの役割

研究課題名(英文) Roles of Girdin in neural and cancer cell migration along vessels

研究代表者

浅井 直也 (Asai, Naoya)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80273233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Girdinは海馬、嗅球・RMS、前交連、皮質のGABA作動性神経の脳構造形成に重要である。Girdinはチロシンリン酸化修飾を受けるとともに、GEF活性を有するが、これらの生体内での役割は不明である。Girdinのチロシンリン酸化修飾の意義を調べるため、リン酸化部位に変異を導入したGirdin Y1764, 1798F変異マウスを作製・解析したところ、変異マウスには脳構造に異常は生じなかった。一方、GEF活性を失活する変異を導入したGirdin F1696A変位マウスには海馬と嗅球/RMSに異常が生じたが、前交連、GABA作動性神経の異常は軽微であり、GEF活性が細胞運動に重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Girdin play important roles for brain development at hippocampus, olfactory bulb/RMS, anterior commissure and GABAergic neurons of cortex. Girdin has two tyrosine phosphorylation sites and GEF domain, but these functions in vivo have not been clear. To study the function of Girdin tyrosine phosphorylation at Y1764 and Y1798, we generated Girdin Y1764, 1798F mutant mice. Mutant mice show no obvious phenotype at hippocampus and olfactory bulb/RMS, which may indicate the less important roles of Girdin tyrosine phosphorylation for cell motility at developing brain. In addition, we generate Girdin F1696A mutant mice, which would lack GEF activity of Girdin. Mutant mice show abnormal brain structure at hippocampus and olfactory bulb/RMS resembling Girdin knockout mice. Mutant mice also show milder phenotypes at anterior commissure and distribution of GABAergic neurons in cortex. These data suggest importance of Girdin GEF activity for cell motility.

研究分野：実験病理

キーワード：脳神経発生 チロシンリン酸化 GEF活性 遺伝子改変動物 細胞移動

1. 研究開始当初の背景

細胞運動は発生過程における形態形成、生後の組織修復、免疫反応、血管新生、がんの浸潤・転移といった様々な現象に重要な役割を果たしている。我々はセリン・スレオニンキナーゼ Akt の新規基質として Girdin (girders of actin filaments) と名付けたアクチン結合蛋白を同定し、培養細胞およびノックアウトマウスを用いて機能解析を進め、嗅球への神経前駆細胞の移動における役割、様々ながん細胞の浸潤・転移への関与などを明らかにしてきた。

Girdin は Akt によるセリン 1416 のリン酸化に加え、チロシン 1764 と 1798 がリン酸化され、PI3K/Akt シグナルを調節する (図 1)。

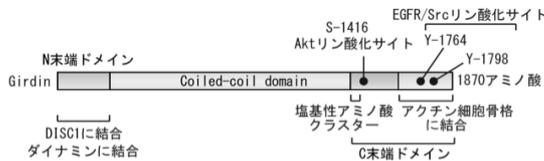


図1 Girdinの構造

pY1798 Girdin 抗体にて免疫染色を行ったところ、脳での生後の神経新生において脳質下帯から嗅球へと血管に沿って移動する神経前駆細胞に強いリン酸化が観察された (図 2)。これらは、Girdin のチロシンリン酸化が細胞の運動制御に関わっている可能性を示唆するものであり、特に“血管に沿った細胞運動”は興味ある所見と考えられた。



図2 血管に沿って移動する神経前駆細胞における Girdinリン酸化 (抗pY1798 Girdin抗体による免疫染色)

“血管に沿った細胞運動”は、上記に挙げた脳室下帯から嗅球への移動以外にも、虚血による脳損傷部に向かって脳室下帯から神経前駆細胞が移動する際に観察される。また、“血管に沿ったがん細胞の浸潤”は angiotropism もしくは extravascular migratory metastasis (EVMM) と呼ばれ、メラノーマもしくはグリオーマにおいてしばしば観察される事象であり、卵巣がん、前立腺がんにおいても同様の事象が起こるとされる。しかしながら、これらの“血管に沿った細胞運動”の分子メカニズムはほとんど分かっておらず、がんの浸潤様式としても広くは認知されていない。

2. 研究の目的

“血管に沿った細胞運動”に注目して、Girdin の機能解析を行うことを研究の目的と

した。チロシン 1764 および 1798 のリン酸化の生理的な意義を解析するため、Girdin チロシンリン酸化部位の変異マウス Girdin Y1764,1798F (以下 Girdin YY) を使用して、個体レベルでの機能解析を行った。更に、以前に作製した Girdin の Akt リン酸化部位変異マウス Girdin S1416A (以下 Girdin SA)、および Girdin の GEF 活性を喪失する変異マウス Girdin F1696A (以下 Girdin FA) を用いることにより、細胞運動における Girdin のリン酸化修飾による機能制御と GEF 活性の重要性について研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) Girdin 変異マウスの作製と解析

チロシンリン酸化部位 Y1764 と Y1798 に変異を導入した Girdin YY 変異マウス、Girdin の GEF 活性を喪失する F1696A 変異を導入した Girdin FA 変異マウスの作製と組織学的解析を行った。また、既存の Girdin ノックアウトマウス (以下 Girdin KO マウス)、Girdin の Akt リン酸化に変異を導入した Girdin SA 変異マウスとの比較を行った。

(2) Girdin の機能におけるチロシンリン酸化制御と GEF 活性の役割に関する解析

発育各段階の各種臓器および病的負荷を与えた各種組織における Girdin リン酸化状態を調べるとともに、下流シグナルの活性化を評価して、Girdin の機能におけるリン酸化制御と GEF 活性の役割について検討を行った。

4. 研究成果

(1) Girdin チロシンリン酸化部位の変異マウスの作製と解析

Girdin のチロシンリン酸化部位 Y1764 と Y1798 の両者をフェニルアラニンに置換した変異マウス (Girdin Y1764,1798F: Girdin YY) の作製を試み、変異マウスの樹立に成功した。Girdin KO マウスのホモは、生後 1~3 週間うちに生育不良となり、離乳前には全匹が死亡するが、Girdin YY 変異マウスのホモは外見上、正常に発育して生き続けた。また、Girdin KO マウスには、脳室下帯で新生された神経前駆細胞の嗅球への移動に障害が起きることによる移動経路である RMS の拡張、海馬の歯状回で新生された神経細胞が過剰に移動することによる歯状回の神経層の肥厚という異常が生じるが、Girdin YY 変異マウスの RMS と海馬は正常の構造が保たれていた (図 3)。

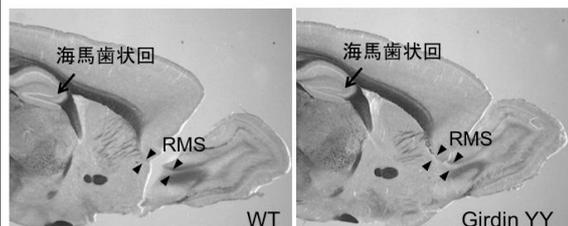


図3 Girdin YY変異マウスでは、海馬・RMSに異常が生じない (脳スライス・透過光、P60)

従って、RMS および海馬における神経前駆細胞の移動には Girdin Y1764 および Y1798 のリン酸化は必ずしも必要でないと考えられる。Akt によるリン酸化制御についても、Girdin SA 変異マウスで RMS と海馬は正常の構造が保たれていたため、Girdin のリン酸化制御の脳発生における神経前駆細胞の移動に果たす役割は限局的ではないかと考えられた。

(2) 生体における Girdin Y1798 リン酸化

発生過程の脳における Girdin Y1798 リン酸化の経時的変化を調べた。生後 7 日目の脳ではリン酸化は観察されないが、生後 10 日目以降の脳室下帯と RMS において、神経前駆細胞での Girdin リン酸化が起きている。また、海馬では生後 10 日目に一過性の Girdin リン酸化が観察されるものの、その後はリン酸化シグナルは減弱していた (図 4)。

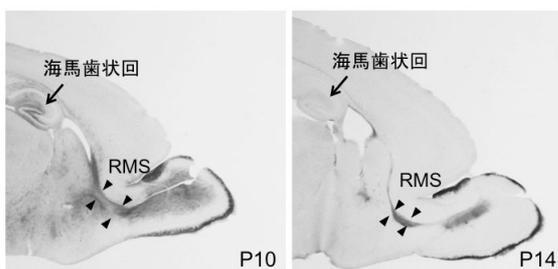


図4 发育中の海馬・RMSにおけるGirdinチロシンリン酸化状態 (抗pY1798 Girdin抗体による免疫染色)

RMS の形成過程においてリン酸化は維持されており、リン酸化部位の変異によって何かしらの異常が生じるものと予想したが、意外なことに構造の異常は見出されなかった。

海馬では Girdin のリン酸化は形成初期に一過性に亢進した後、形成後は低いレベルに維持されている。海馬神経の機能におけるリン酸化の働きを調べる目的で、pentylentetrazole 投与によって、てんかん発作を誘導することで神経の過剰刺激状態を作り出して、Girdin リン酸化を調べたところ、海馬歯状回においてリン酸化が亢進することが確認された。同様の条件でのリン酸化亢進は Akt リン酸化部位である S1416 にも起こる。Girdin SA 変異マウスでは Girdin YY 変異マウスと同様に海馬構造には異常は生じないものの、NMDA 受容体の機能制御の障害によって海馬記憶能の異常が起こるので、Girdin YY 変異マウスでも同様の海馬機能異常が起きている可能性が考えられ、将来の研究課題として興味深いと思われる。

(3) GirdinのGEF活性を喪失する変異マウスの作製と解析

GirdinはC末端部にGEF活性をもつドメインを有し、F1696Aの変異によりGEF活性は喪失する。他の研究グループより、GEF活性とチロシンリン酸化によるシグナル制御との密接な関わりが報告されている。今回、GEF活性喪失変異であるF1696A変異マウス(Girdin FA)を

作製し解析を行った。Girdin FA変異マウスのホモはGirdin KOマウスと同様、生後1~3週間のうちに生育不良となり、離乳前に全匹が死亡し、RMSの拡張と海馬歯状回の肥厚が生じていた。特にRMSにおいては、神経前駆細胞が一列に並んで移動するchain migration (図2の現象)が見られなくなることから、“血管に沿った細胞運動”にはGEF活性が重要であると考えられた (図5,6)。

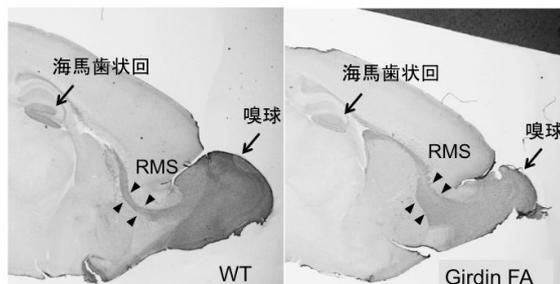


図5 Girdin FA変異マウスにおける海馬・RMS・嗅球の異常 (抗Doublecortin抗体による免疫染色)

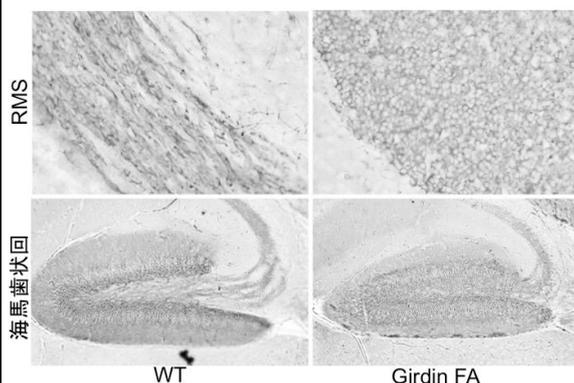


図6 変異マウスでの、RMSにおけるchain migrationの障害と海馬歯状回の肥厚 (抗Doublecortin抗体による免疫染色)

また、Girdin KOマウスと同等の表現型に加えて、左右の脳半球を繋ぐ前交連がGirdin KOマウスでは欠損するのに対し、Girdin FA変異マウスでは前交連が保たれていること、Girdin KOマウスでは大脳皮質のGABA作用性神経の分布異常が起こるが、Girdin FA変異マウスでは弱い異常しか示さないことなど、異なる表現型が見られた。従って、GirdinのGEF活性はGirdinの機能の全てを担っているのではなく、部分的であると考えられた。

(4) Girdin 変異マウスにおける繊維芽細胞の移動の異常

以前の研究により、癌周囲の線維化や創傷治癒の過程で、病巣に移動する線維芽細胞において Girdin が Akt によるセリン残基リン酸化制御を受けることが分かっている。今回、線維化の際の Girdin のチロシン残基リン酸化を調べたところ、線維芽細胞でリン酸化が起こることが分かった。In vivo での機能を調べるため、Girdin SA 変異マウスと Girdin YY 変異マウスを用いて、四塩化炭素の腹腔内投与による肝臓線維化の実験を行ったところ、Girdin SA 変異マウスでは線維化が抑制され

たのに対し、Girdin YY 変異マウスでは線維化に変化がなかった。従って、肝線維化のモデルにおいては線維芽細胞の移動には Girdin Y1764 および Y1798 のリン酸化は重要ではないと考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

Negative regulation of amino acid signaling by MAPK-regulated 4F2hc/Girdin complex. Weng L, Han YP, Enomoto A, Kitaura Y, Nagamori S, Kanai Y, Asai N, An J, Takagishi M, Asai M, Mii S, Masuko T, Shimomura Y, Takahashi M. PLoS Biol. 2018 Mar 14;16(3):e2005090.

doi: 10.1371/journal.pbio.2005090. (査読あり)

Significance of low mTORC1 activity in defining the characteristics of brain tumor stem cells. Han YP, Enomoto A, Shiraki Y, Wang SQ, Wang X, Toyokuni S, Asai N, Ushida K, Ara H, Ohka F, Wakabayashi T, Ma J, Natsume A, Takahashi M.

Neuro Oncol. 2017 May 1;19(5):636-647.

doi: 10.1093/neuonc/now237. (査読あり)

Tyrosine Phosphorylation of an Actin-Binding Protein Girdin Specifically Marks Tuft Cells in Human and Mouse Gut. Kuga D, Ushida K, Mii S, Enomoto A, Asai N, Nagino M, Takahashi M, Asai M.

J Histochem Cytochem. 2017 Jun;65(6):347-366.

doi: 10.1369/0022155417702586. (査読あり)

CCDC88A mutations cause PEHO-like syndrome in humans and mouse. Nahorski MS, Asai M, Wakeling E, Parker A, Asai N, Canham N, Holder SE, Chen YC, Dyer J, Brady AF, Takahashi M, Woods CG.

Brain. 2016 Apr;139(Pt 4):1036-44.

doi: 10.1093/brain/aww014. (査読あり)

Collective invasion of cancer: Perspectives from pathology and development. Wang X, Enomoto A, Asai N, Kato T, Takahashi M. Pathol Int. 2016 Apr;66(4):183-92.

doi: 10.1111/pin.12391. (査読あり)

Akt-dependent Girdin phosphorylation regulates repair processes after acute myocardial infarction.

Hayano S, Takefuji M, Maeda K, Noda T, Ichimiya H, Kobayashi K, Enomoto A, Asai N, Takahashi M, Murohara T.

J Mol Cell Cardiol. 2015 Nov;88:55-63.

doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.09.012. (査読あり)

Potential involvement of kinesin-1 in the regulation of subcellular localization of Girdin. Muramatsu A, Enomoto A, Kato T, Weng L, Kuroda K, Asai N, Asai M, Mii S, Takahashi M. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Aug 7;463(4):999-1005.

doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.049. (査読あり)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：ノックアウトマウス、内側側頭葉てんかんを抑制する物質のスクリーニング方法、及び内側側頭葉てんかんを抑制する手法の選択方法

発明者：浅井真人、高橋雅英、浅井直也、榎本篤、内山孝蔵

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：PCT/JP2015/78891

出願年月日：2015 年 10 月 13 日

国内外の別：国外

取得状況 (計 1 件)

名称：ノックアウトマウス、内側側頭葉てんかんを抑制する物質のスクリーニング方法、及び内側側頭葉てんかんを抑制する手法の選択方法

発明者：浅井真人、高橋雅英、浅井直也、榎本篤、内山孝蔵

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：特許 5765720 号

出願年月日：2014 年 10 月 14 日

取得年月日：2015 年 6 月 26 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/patho2/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

浅井 直也 (ASAI Naoya)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80273233