

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14378

研究課題名(和文) 新規な X 染色体がん抑制遺伝子 Nrk 欠損マウスによる細胞増殖抑制機構の解明

研究課題名(英文) A novel X-linked tumor suppressor gene Nrk is involved in the regulation of the proliferation and development of mammary epithelial cells

研究代表者

傳田 公紀 (Denda, Kimitoshi)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：50212064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要(和文)：日本人女性の乳がんの罹患率は極めて高く、死亡率も上昇傾向にある。遺伝性乳がん卵巣がん研究は単一遺伝子の変異が発がん要因になることを明示し、遺伝子診断や分子標的治療を飛躍的に進歩させた。我々は新規なプロテインキナーゼNRK(Nik-related protein kinase)の変異マウスを作製し、Nrk(NRK遺伝子)欠損経産マウスが高頻度に乳がんを発症する現象を解析した(Am. J. Pathol.; 朝日新聞掲載)。Nrkを乳腺の正常な細胞増殖制御を支えるがん抑制遺伝子と捉え解析した本研究は、未知の細胞がん化メカニズムを理解する上で端緒となり乳がん治療薬開発に資する知見を齎しうるものである。

研究成果の概要(英文)：Breast cancer is the most common malignant tumor among Japanese women. However, its pathogenesis is still unclear, and the prevalence of breast cancer has a major impact on health worldwide. We have searched for the physiological roles of NRK, a novel X chromosome-linked Ser/Thr protein kinase which belongs to the germinal center kinase family. In this research, we demonstrated one of the female-specific critical role for NRK through generation and phenotypic analysis of mice deficient for the protein kinase gene. The mammary gland is a branched ductal tree that completes the majority of its development in the postnatal mammalian following puberty, and continues to undergo constant remodeling during reproductive cycles and functional differentiation during pregnancy. We provide evidence that NRK is involved in suppressing the pathological development of breast tumor associated with the mammary gland hyperplasia during pregnancy by phenotype analysis of the Nrk-knockout mutant mice.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：プロテインキナーゼ 胎盤 乳腺 がん 周産期 遺伝子欠損マウス 細胞増殖制御

1. 研究開始当初の背景

X 染色体上にコードされるセリン/スレオニンキナーゼ NRK (Nik-related protein kinase) は、GC キナーゼ (germinal center kinase) ファミリーに属し、JNK 経路の活性化やアクチン細胞骨格制御に関与することが *Nrk* を過剰発現させた哺乳動物培養細胞の解析を用いた実験より報告されてきた。しかしながら、その生理的役割はよくわかっていなかった。申請者らは *Nrk* (NRK 遺伝子、ヒトホモログの表記は NRK) 欠損マウスを作製し、その表現型解析を行った結果、*Nrk* 欠損マウスにおいて、体組織内の細胞増殖制御の亢進を主兆とする以下の症例を見出した。

1) 胎盤が肥大化する (placentomegaly)

胎児における *Nrk* 欠損により、胎盤の海綿状栄養膜細胞 (スポンジオトロホプラスト、胎盤臓器内の胎児由来組織層) が過増殖し、胎盤過形成を引き起こす (図 1)。我々の解析において、*Nrk* は受精後 12 日目以降に胎盤の海綿状栄養膜細胞で高発現していた。従って、海綿状栄養膜細胞で通常存在する NRK が機能できないため、胎盤組織の細胞増殖が適切に制御されず過増殖に至るものと考えられる。

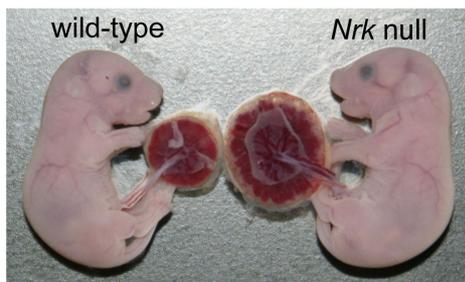


図 1. *Nrk* 欠損マウス胎児の胎盤の過形成

2) 妊娠時に母子の安全な出産が脅かされる (dystocia)

Nrk 欠損マウスの繁殖ケージ内では、妊娠後期に正常分娩ができず死産になる現象がよく認められた。*Nrk* を欠損した♀マウスは、*Nrk* 欠損♂と交配させて妊娠した場合、その胎児*の遺伝子型も *Nrk* ノックアウトとなる。その後、偽妊娠の野生型♀に *Nrk* 欠損胚(胚盤胞)を移植した核移植実験を行った結果、分娩不全になった。したがって、胎児由来の NRK が正常分娩に重要な役割を果たすことが示された。すなわち、胎児が母体に向けて何らかの分娩発来シグナルを発しており、NRK がこのシグナル発信に不可欠な役割を担っているものと考えられる (図 2)。胎児と母体をつなぐ胎盤に *Nrk* 欠損による組織形態の異常が認められることは、この誘発シグナルが胎児胎盤から発令される可能性を提起するものである。

* 厳密には、マウス母胎胎内の幼生の呼称は「胎仔」であるが、ここではわかりやすさを重視し、便宜的に「胎児」と表記した。

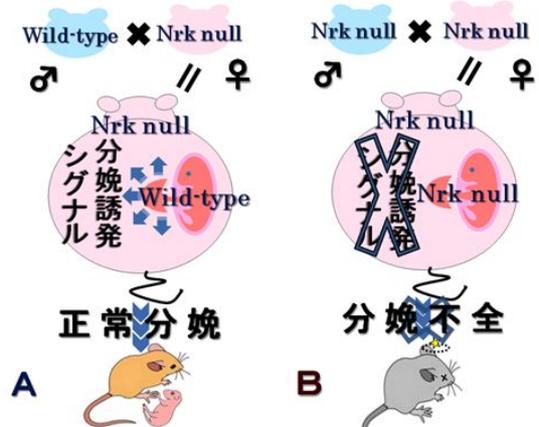


図 2. *Nrk* 欠損による胎児由来分娩誘発シグナルの喪失

その後、以下の顕著な表現型が、新たに *Nrk* ノックアウトマウスで見出された。

3) 妊娠出産を経ると乳がんになりやすい (breast cancer)

Nrk 欠損マウスのコロニー内において、致死的な乳腺腫瘍の発症が頻発した (図 3)。マウス乳腺は胸部三対、鼠径部二対の五対あり、側腹部に対称的に位置する。乳腺組織は妊娠以後、哺乳開始までに発達し、妊娠および授乳期間中は背部腹部とも頭部から尾根部に至るまで皮下組織はほとんど全て乳腺組織に占められるが、哺乳完了後に急速に消退していく。*Nrk* が機能しない欠損マウスにおいては、乳腺細胞の増殖制御がうまく働かず、発がんに至る可能性が考えられる。



図 3. 経産 *Nrk* 欠損マウス(♀)における致死的な乳腺腫瘍の形成

2. 研究の目的

Nrk 欠損マウスの解析によって、通常は NRK が少なくとも二つの臓器組織(胎盤と乳腺)において細胞増殖に抗して抑制制御することがわかった。本研究課題では、特に細胞がん化を重視し、*Nrk* が与るシグナル伝達経路が司る細胞増殖制御メカニズムの解明を目的とした。

Nrk ノックアウトマウスの非妊娠個体、妊娠個体、授乳抗体、加齢個体、発がん個体を必要数確保し、以下の一連の分子生理学的な解析を行った。培養細胞系を併用した機能解析ならびにプロテオミクスによる網羅的解析も加えることによって、がん抑制遺伝子 *Nrk* が周産期をはじめとしてどのような役割を果たすかを検討した。

3. 研究の方法

Nrk ノックアウトマウスを解析する実験においては、野生型の健常個体を常にコントロールとし、*Nrk*(+/-)ヘテロマウスと共に必要数を用意した。複数のマウスを揃える際は、妊娠の有無、授乳期、週齢等について、がんを発症しているか否かと共に留意した。

1) 乳腺組織における NRK の発現解析

野生型 マウスの乳腺組織において、妊娠期・授乳期における *Nrk* 発現の転写レベルの発現解析を行った。

2) 乳腺がんの組織学的解析

乳がんを発症したノックアウトマウス 個体において、病理組織学的ならびに免疫組織学的解析を行った。

3) リキッドバイオプシーによるホルモンレベルの計測

Nrk 欠損♀マウスの乳がん発症個体において、性ホルモン分泌量を解析した。マウス血中のステロイドホルモン (エストロゲンとプロゲステロン) 濃度について測定した。

他方、エストロゲン生合成過程において重要なアロマトラーゼの卵巣における発現レベルを定量的 PCR 解析し、*Nrk* 欠損のステロイドホルモン代謝系に対する影響を調べた。

4) 乳腺組織の遺伝子発現解析

乳腺細胞において、エストロゲン受容体の mRNA レベルの発現を半定量的解析した。測定対象として、マウス乳腺組織および乳がんの培養細胞 MCF-7 を用いた。

5) NRK と結合するタンパク質の解析

酵母ツーハイブリッド法によってスクリーニングされた NRK と結合する候補となるタンパク質について、哺乳動物細胞内での相互作用を免疫沈降法で調べた。

6) *Nrk* ノックアウトが与えるプロテオミクス変動の検討

Nrk 欠損胎盤組織におけるプロテオーム解析を行い、NRK 発現の有無についてのタンパク質発現レベルを網羅的に解析した。リン酸基を特異的に捕捉する Phos-tag によるリン酸化タンパク質の高感度検出できるリン酸化プロテオームの動態についても検討した。

4. 研究成果

1) 乳腺組織における NRK の発現解析

Nrk 変異マウスのコロニーにおいて、乳腺に腫瘍ができ、しばらく後に死に至る個体がしばしば現れた。この現象は *Nrk* 欠

損メス個体に限られ、これまでのところオスには起こらず、メスでも妊娠・出産経験のない場合は認められない。実際に *Nrk* 欠損メスでは一定期間のうちにほとんどの個体で乳がんが発症した (図 4)。

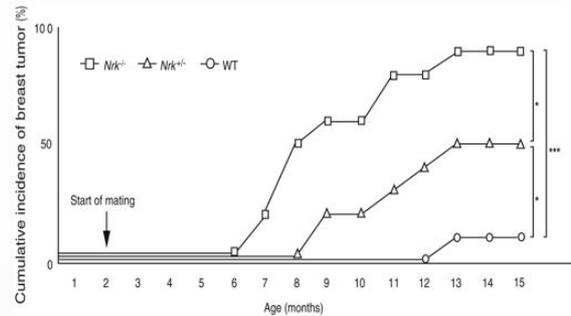


図4. *Nrk*欠損経産マウスは乳がんを発症し死に至る *Nrk*^{+/-}においても乳がんの発症リスクは比較的高い

そこまず、野生型メスマウスの乳腺組織において、妊娠期・授乳期における *Nrk* 発現を解析した。その結果、非妊娠期の乳腺では発現しない NRK は妊娠後期の乳腺で発現誘導されてくることがわかった。このことは、妊娠後のホルモン作用によって産後授乳に備えて乳腺が発達した後に乳腺細胞の増殖が止む以前に、予め妊娠後期のうちから *Nrk* が発現誘導されて乳腺上皮細胞の過増殖を抑制すること、その破綻が乳がんにつながることを示唆するものである (図 5)。

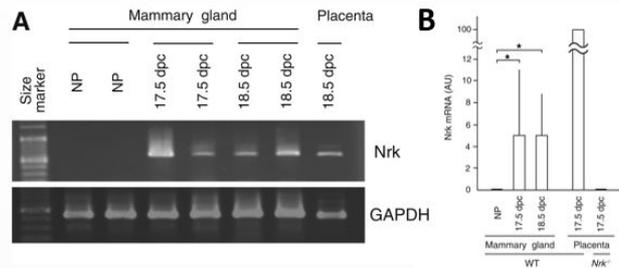


図5. *Nrk*は妊娠後期に乳腺組織で発現が誘導される *Nrk* mRNAレベルの発現量を(A) RT-PCR および (B) real-time RT-PCRで解析した

2) 乳腺がんの組織学的解析

乳がんを発症した *Nrk* 欠損マウス個体の病理組織学的解析を行った結果、周囲の正常組織への浸潤や転移があまりみられない非浸潤性がんであることがわかった。

次に、免疫組織学的な検討を加えたところ、このがん細胞はホルモン (エストロゲン) 受容体陽性、増殖因子受容体 HER2 陰性であり、遺伝子発現に基づいたヒト乳がんサブタイプ分類中のいわゆる「ルミナル B 型 (HER2 陰性)」に近かった (図 6)。

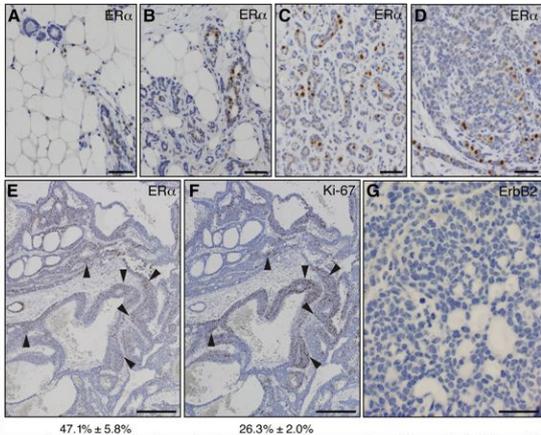


図6. *Nrk*欠損マウスが発症する乳がんはエストロゲン受容体陽性である

さらに、*Nrk* 欠損マウスの非妊娠期と妊娠後期の乳腺の病理組織学的解析を行った。非妊娠期においては、野生型と *Nrk* 欠損で乳腺組織に差異は認められなかったが、妊娠後期では一部の *Nrk* 欠損マウス乳腺においてエストロゲン受容体を高発現した乳腺上皮細胞が密に存在する腺房が IHC 染色で観察された (図 7)。野生型の乳腺では、妊娠後期にエストロゲン受容体の発現レベルが低下することを考慮すると、エストロゲン受容体の高発現を維持した乳腺上皮細胞の集団が乳がんの原発巣となることが示唆される。

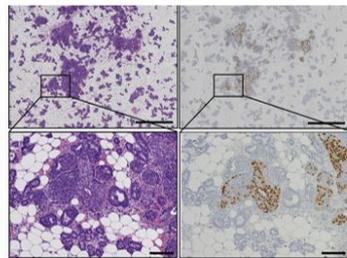


図7. *Nrk*欠損乳がん組織は妊娠後期にエストロゲン受容体が高発現する

3) リキッドバイオプシーによるホルモンレベルの計測

妊娠後期の野生型マウスと *Nrk* 欠損マウスから採血し、質量分析法を利用して血中ホルモン濃度を測定した。その結果、*Nrk* 欠損マウスでは二倍程度まで血中エストロゲン濃度が上昇しており、*Nrk* がエストロゲンの合成・分泌の制御に関与する可能性が示唆された (図 8A)。したがって、*Nrk* 欠損マウスでは本来ならば妊娠後期に発現誘導される *Nrk* による乳腺上皮細胞の増殖停止プロセスの喪失と共に、エストロゲンが強く働くことによって乳がんの引き金が引かれると考えられる。

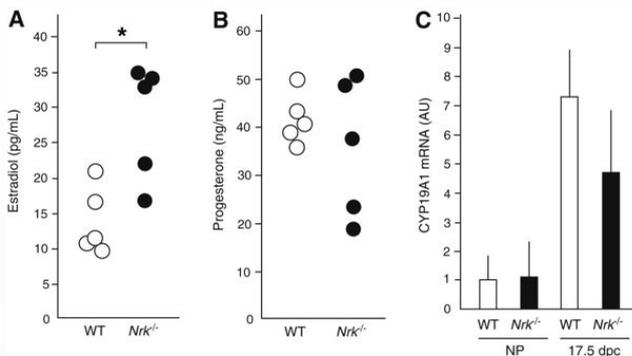


図8. *Nrk*欠損マウスでは妊娠後期にエストロゲン濃度が上昇する

4) 乳腺組織の遺伝子発現解析

乳腺組織におけるエストロゲン受容体の発現量は *Nrk* の有無によって変わらなかった。乳がん培養細胞 MCF-7 にキナーゼ不活性化型 *Nrk* 変異体 (K54E) をトランスフェクションさせ、*Nrk* 遺伝子を発現させてもエストロゲン受容体の発現量やリン酸化に対する影響は認められなかった (図 9)。したがって、NRK はエストロゲン生合成経路に直接影響を与えないものと考えられる。さらに、エストロゲン生合成の主要な場である卵巣のアロマターゼの発現量を qPCR 解析しても、*Nrk* 欠損による有意な差異は認められなかった (図 8C)。

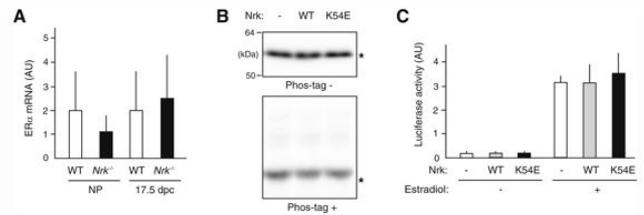


図9. *Nrk*欠損はエストロゲン受容体の発現に直接影響しない

5) NRK と結合するタンパク質の解析

細胞内での NRK の挙動を知る目的で、これまで酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより取得していた NRK 結合タンパク質について、培養細胞系で発現させ、免疫沈降法によって *in vivo* での相互作用を調べた。さらにどの領域どうして結合するのか解析している。

6) *Nrk* ノックアウトが与えるプロテオミクス変動の検討

NRK がリン酸化する基質タンパク質とその下流で発現誘導される標的遺伝子を同定するため、*Nrk* 欠損個体の細胞組織のプロテオミクス動態を解析した。得られた候補タンパク質について、シグナル伝達の要となりそうなリン酸化基質因子であるか検証である。また、Phos-tag を用いてリン酸化プロテオミクス解析を行い、リン酸化基質を探索した。

乳がんは、日本を含む多くの先進諸国において女性の部位別がんの罹患率が最も高い悪性腫瘍であり、ここ最近その死亡率も増加の一途をたどる。*Nrk* 欠損マウスは、乳がんの疾患モデルマウスとしても有益と考えられる。本研究の達成は、新たな乳がん治療の開発に貢献できるものである。

謝辞：本研究は、科研費（先端モデル動物支援プラットフォーム；JSPS KAKENHI Grant Number JP 16H06276）の交付（支援）を受けて行った研究成果である。

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 1 件)

1. Yanagawa T, Denda K, Inatani T, Fukushima T, Tanaka T, Kumaki N, Inagaki Y, Komada M. (2016) Deficiency of X-Linked Protein Kinase NrK during Pregnancy Triggers Breast Tumor in Mice. *Am J Pathol*. 2016 Oct; 186 (10) : 2751-2760.

doi: 10.1016/j.ajpath.2016.06.005. Epub 2016 Sep 12.

(査読有)

[学会発表](計 5 件)

1, 3P-0416 胎盤特異的なプロテインキナーゼ NrK が与るシグナル伝達機構の解明 傳田 公紀, 井田 可奈子, 氏本 慧, 林 宣広 (東工大・生命理工)

第 38 回 日本分子生物学会 (20151201-20151204). 神戸国際会議場 (兵庫・神戸)

2. 2P-0435 脱ユビキチン化酵素 USP37 におけるユビキチン結合モチーフ UIM の機能 西川 周平, 桑原 直之, 伝(傳)田 公紀, 川崎 政人, 駒田 雅之, 加藤 龍一 (東工大・生命理工)

第 38 回 日本分子生物学会 (20151201-20151204). 神戸国際会議場 (兵庫・神戸)

3. 2P-0394 胎盤特異的なプロテインキナーゼ NrK が与るシグナル伝達機構の解明 伝田 公紀, 土居 里奈, 井田 可奈子, 氏本 慧, 林 宣宏 (東工大・生命理工)

第 39 回 日本分子生物学会 (20161130-20161202). パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)

4. 2P-0849 胎盤特異的なプロテインキナーゼ NrK が司る細胞増殖制御機構の解明 伝田 公紀, 二口 充, 丹野正隆, 田邊 暢子, 林 宣宏 (東工大・生命理工)

2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (20171206-20171208). 神戸国際会議場 (兵庫・神戸)

5. 2P-39 胎盤特異的な新規プロテインキナーゼ NRK は乳腺組織における細胞増殖制御を司る 伝田 公紀, 二口 充, 丹野 正隆, 福嶋 俊明, 田邊 暢子, 林 宣宏 (東工大・院・生命理工)

先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会 (20180124-20180125). 琵琶湖ホテル (滋賀・大津)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 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]

<https://www.titech.ac.jp/english/news/2016/036094.html>

<https://academist-cf.com/journal/?p=2454>

6. 研究組織

(1)研究代表者

傳田 公紀 (DENDA, Kimitoshi)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号 : 50212064

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

駒田 雅之 (KOMADA, Masayuki)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授

研究者番号 : 10225568