

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21147

研究課題名(和文) RET生体可視化ツールを用いた、発生と病理における受容体輸送研究

研究課題名(英文) In vivo imaging of receptor trafficking of RET in organogenesis and pathogenesis

研究代表者

伊藤 圭祐 (Ito, Keisuke)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：10575468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：受容体の適切な細胞内の挙動は細胞の生理活動の基盤となる。神経栄養因子受容体・RETは様々な細胞の生理活動を支えるが、生細胞におけるRETの細胞内の挙動は分かっていない。申請者はGFP融合RETを発現するマウスを作成し、生細胞におけるRETの細胞内挙動を解析した。その結果、RETは細胞内において極性化した局在パターンを示し、細胞外基質に応じてその動態を変える事、Rab11やDyneinがRETの局在を制御する事を発見した。さらに培養系において疾患誘導型変異RETの異常な局在も発見した。以上より、RETの適切な局在は生理機能に必須で、変異産物の局在異常が病態形質を導く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Appropriate intracellular receptor trafficking underlie normal physiological activities of cells. RET, a Glial cell line neurotrophic factor receptor plays various roles in organogenesis, but its intracellular trafficking is largely unknown. In this project, I generated a knockin mouse line that express RET-GFP fusion proteins, and analyzed intracellular trafficking of RET in living cells. I found that RET exhibited polarized trafficking pattern and this pattern largely depends on types of extracellular matrices. I also found that Rab11 and Dynein pathways regulate RET trafficking. Finally, a mutant RET that can induces multiple human diseases showed aberrant localization. Therefore, it is suggested that appropriate RET trafficking is essential for normal physiological activities, and disruption of localization pattern of mutant RET leads to pathogenesis.

研究分野：神経発生学

キーワード：RET GDNF Rab11 Dynein 細胞外基質 Integrin 変異型RET

## 1. 研究開始当初の背景

器官発生とその維持機構を理解する事は生命科学の最優先課題であり、その解明は様々な疾患誘導機構の理解にも貢献する。現代生物学は器官発生における様々な分子の機能を解明してきたが、その本質的理解には、各分子が時空間的にどのような細胞内局在分布を示すのかという情報が不可欠である。特に膜受容体はリガンド結合後に細胞内に取り込まれ、特定部位に輸送される事が機能発現に重要であり、受容体輸送の破綻は器官形成の異常や癌を導く。しかし生理機能を保持した受容体の局在や輸送機構を、生きた組織・細胞で直接的に解析した例はなく、受容体輸送がどのように器官発生や疾患誘導と関連するのかが分かっていない。

グリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)の受容体・RETチロシンキナーゼは器官発生に中核的な役割を果たすタンパク質で、マウスではその遺伝子破壊により腸管神経系や末梢神経系、腎臓の形成異常が誘導される。一方ヒトではRETの1塩基変異により、多発性内分泌腺腫症2型や、先天性腸管神経欠損のヒルシュスプルング病が誘導される。

研究代表者は以上の視点に鑑み、器官形成においてRETが細胞内の適切な部位に局在・輸送される事が、その生理機能に重要であり、変異型RETはその局在に破綻が生じるため、病態形質が誘導されるという仮説を考えた。実際に固定細胞では変異型RETの局在異常が報告されている。しかし生細胞で野生型及び変異型RETの挙動を追跡できるシステムはなく、RETの局在・輸送と、器官形成・疾患誘との関連については未解明であった。

この問題を解決するため、研究代表者は生理機能を保持した野生型RET受容体を生体レベルで追跡できる、野生型Ret-GFPノックインマウス(以下、野生型Ret-GFPマウス)を作成した。この野生型RET可視化工具を用い、発生をRETに依存する各種細胞における野生型RETの細胞内局在・輸送のパターンを、生理的条件下で直接可視化する事に成功した。その結果、野生型RETは細胞内で極性化した局在パターンを示し、GDNFと共に細胞内に取り込まれ、取り込みを阻害すると細胞移動が減衰する事などを発見した。また細胞外基質によりRETの輸送速度が変化する事も発見し、RETの細胞内局在・輸送が、細胞外基質依存的な制御下で起きる可能性が新たに示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究は研究代表者が開発した野生型RET可視化工具を利用してさらに器官発生におけるRETの細胞内輸送の影響を探ると共に、これを応用して、1塩基変異を導入した疾患誘導型の変異型RET可視化工具(変異型Ret-GFPノックインマウス)を作成し、疾患誘導時における変異型RETがどの

ような局在異常を示すのかを探り、RETの細胞内局在・輸送機構の生理的意義を追求する。以上の目的を達成するため、研究開始時点において以下の研究を策定した。

### (1) 器官発生における野生型RET受容体の輸送機構の解析

野生型Ret-GFPマウスから、発生をRETに依存する細胞を単離し、RETの輸送と細胞の挙動との相関を見出す。また細胞外環境の違いがRETの輸送に与える影響を検討する。

### (2) 変異型Ret-GFPマウスの作成と、病態細胞のイメージング

腫瘍性病変および腸管神経欠損の表現型を呈する事が知られる、RetのCys620がArgに変化したC620R変異を持つノックインマウスを作成する。この変異型Ret-GFPマウスで侵される組織・細胞を単離し、高解像度イメージングにより野生型RETとの挙動の差を見出す。

### (3) RETの輸送を制御する分子機構の解析

野生型及び変異型Ret-GFPマウスの細胞抽出物を抗GFP抗体で免疫沈降し、RETと相互作用する分子の中からRETの輸送を制御する可能性のある分子を探索する。また既知の分子も候補として策定する。

### (4) RETの輸送制御分子の発現操作

同定したRETの輸送制御分子の発現レベルを操作し、正常細胞への影響を見て輸送制御分子の機能を探る。また病態細胞でもRET輸送制御分子の発現を操作し、変異型RETの挙動が正常化するか、それに伴い病態形質が抑制されるを検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 器官発生における野生型RET受容体の輸送機構の解析

#### 野生型Ret-GFPマウス由来細胞の高解像度イメージング

野生型Ret-GFPマウスより細胞や組織を単離し、CO<sub>2</sub>インキュベーターが付いた高解像度カメラ搭載のスピンニングディスク共焦点顕微鏡および全反射蛍光顕微鏡を用いてRETの輸送動態を観察した。既に集積したデータを含めて定量解析し、RETの輸送パターンと細胞の挙動との相関を探った。また組織培養以外にも、より純度の高い、RET発現細胞のみが存在するような条件下でもタイムラプス解析を進めるため、発生期腸管を解離し、これをp75-NTR抗体が結合した磁器ビーズとインキュベートする事により、p75-NTRとRETを共発現する腸管神経前駆細胞を単離した。また各末梢神経節においては、神経節を摘出後、これを解離し、細胞懸濁液を培養ディッシュ上で数時間培養した。神経細胞は他種の細胞に比べて培養ディッシュ底面への貼りつきが少ない事を利用し、数時間培養後に懸濁液を回収し、新たなガラスボトム培養ディッシュ

シユへまいて、神経細胞の純度の高い培養を実現した。この培養細胞を用いて高解像度イメージングを行った。

細胞外環境が RET の受容体輸送に与える影響の解析

申請者はこれまでの研究で、RET の輸送は細胞外基質(フィブロネクチン、ラミニン)の影響を受ける事を明らかにした。そこでコラーゲンなど他の基質上での RET の輸送を観察し、既存データとの比較を行った。また 2 種の細胞外基質をストライプ状に交互にコートするため、シリコン製の膜を作成し、これを櫛状にカットしてストライプパターンを作成し、ガラスボトムディッシュにストライプ上に交互に基質をコートした。

#### ( 2 ) 変異型 Ret-GFP マウスの作成、イメージング

野生型 Ret-EGFP の cDNA をもつプラスミド(pcDNA-Retwt-GFP)を鋳型にして、620 番目のシステインがアルギニンに変化した RetC620R-EGFP の cDNA を、inverse PCR 法により作成した。これにより完成した、pcDNA-RetC620R-EGFP を BmgBI と BspEI で切断し、C620R 変異をもつ断片を、野生型 Ret-GFP ノックインマウスを作成する際のターゲティングベクターへ繋ぎ換え、RetC620R-GFP ノックインマウス作成用のターゲティングベクターを作成した。これを NotI で線状化し、ES 細胞へ導入・選択後、胚盤胞へ注入する予定であったが、マウス飼育室ケージ数の関係から、研究期間内にマウスを作成・維持する事が出来なかった。

代替実験として、研究代表者はレンチウイルスベクターに Ret-GFP および RetC620R-GFP を組み込み、これを細胞へ感染させる実験を行った。作成したレンチウイルスをヒト神経芽腫由来の細胞株であり、かつ内在性に RET を発現しない CHP126 に感染させた。感染細胞をタイムラプスイメージングし、変異型 RET の局在パターンを野生型 RET と比較した。

#### ( 3 ) RET の輸送制御分子の探索

##### 抗 GFP 抗体による免疫沈降

Ret-GFP マウス由来の腸管神経前駆細胞を、Nmyc を発現するレンチウイルスに感染させる事によって、細胞を不死化させた。この不死化細胞株を培養し、血清飢餓状態に置いた後、GDNF で 15 分刺激してタンパク質を抽出した。これを GFP 抗体で免疫沈降し、銀染色により GDNF 刺激ありなしで変動するバンドを探索した。

##### 候補分子の選定

RET の輸送を制御する可能性のある既知のモータータンパク質や小胞関連分子を候補とし、これら分子群と RET との共有の有無を調べ、候補分子を策定した。

#### B1-integrin の関与

研究代表者はフィブロネクチン上で培養された細胞において、膜上での RET の挙動が低下し、繫留された状態にある事を発見した。興味深い事に、フィブロネクチン受容体の構成タンパクである B1-integrin が、RET の co-receptor である GFRa1 と相互作用する事、B1-integrin ノックアウトマウスは腸管神経前駆細胞の移動に異常が生じる事などが既に報告されている。そこで B1-integrin ノックアウトマウスと野生型 Ret-GFP マウスとを掛け合わせる事により B1-integrin 非存在下での RET の輸送をイメージングし、正常細胞におけるパターンと比較した。

#### ( 4 ) RET の輸送制御分子の発現操作

野生型 RET の輸送を制御する候補分子群の機能を調べるため、これら分子群の機能阻害実験を行い、RET の輸送をイメージングしてその変化を調べ、それが軸索伸長や細胞移動といった細胞の挙動にどのように影響するのかを調べる。

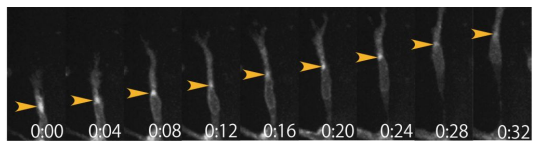
#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) 器官発生における野生型 RET 受容体の輸送機構の解析

##### 野生型 Ret-GFP マウス由来細胞の高解像度イメージング

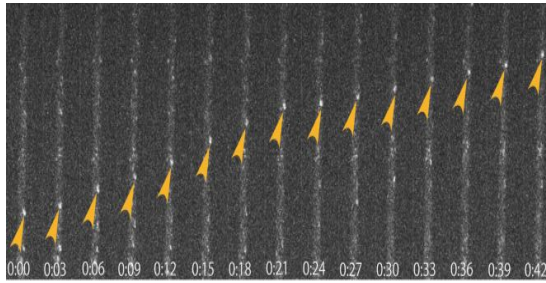
発生期腸管の組織培養を行って共焦点顕微鏡によりタイムラプスイメージングを行った所、RET-GFP タンパク質は腸管神経前駆細胞の細胞体全体に一様に存在するのではなく、細胞内で極性化した局在を示すことが分かった。すなわち RET は細胞の移動方向に対して、核よりも前側に存在する割合が有意に増加していた(下図: 矢頭)。

また拡大して観察した所、核近辺に蓄積した



RET-GFP から小さい顆粒状の RET-GFP が、移動方向に対して細胞体の前側を盛んに運動する様子も発見した。この運動を詳細に調べた所、細胞の移動方向に対して順行性方向および逆行正方向の割合が一致していた。このため、RET は細胞体の前側に局在しやすいという極性化したパターンを示すものの、細胞体の前側ではほぼランダムな方向性で運動するという事が明らかになった。またさらに詳細に観察を重ねた結果、腸管前駆細胞同士が接触する面で、一時的な RET の蓄積が確認された。この現象については今後のさらなる定量的解析が必要となるだろう。

運動神経および感覚神経においては、RET は優先的に逆行性に輸送される様子が観察された(下図)。



このことから、RET は Neurotrophin-Trk の系と同様に、標的由来の GDNF を成長円錐上で取り込み、GDNF-RET 複合体が軸索を逆行性に輸送され、細胞体で生存シグナルを促進させ、神経細胞全体の生存を保障するという生存戦略を用いていることが示唆された。今後どのような分子メカニズムによってこの逆行性輸送が制御されるのか、またそこに Neurotrophin-Trk の系と違いが存在するのかを調べることは興味深い。

一方で他種の細胞を減少させた環境で腸管神経前駆細胞や末梢神経節由来神経細胞を培養し、イメージングを行ったが、これまでの局在パターンと大きな変化は認められなかった。

細胞外環境が RET の受容体輸送に与える影響の解析

コラーゲンコートした培養ディッシュ上で腸管神経前駆細胞を培養した結果、Ret の輸送動態はフィブロネクチン上での挙動と大差がなかった。今後例数を増やし、定量解析を行う予定である。

またストライプ状に基質をコートするため、基質に赤の蛍光色素を混ぜてコートした所、蛍光の光が顕微鏡の GFP のフィルターに漏れ込み、RET-GFP の挙動を正確に追跡する事が困難であった。今後実験を継続するための最適条件を検討する必要がある。

## (2) 変異型 Ret-GFP マウスの作成、イメージング

前述の通り、研究代表者は RetC620R-GFP マウスの研究期間内の作成を行う事が出来なかった。一方で代替実験として、RetC620R-GFP を組み込んだレンチウイルスを作成し、これをヒト神経芽腫由来細胞株である CHP126 へ感染させ、タイムラプスイメージングを行った。その結果、野生型 RET-GFP タンパク質は細胞膜および細胞質への局在が認められ、顆粒状のシグナルが細胞内を動く様子が認められたのに対し、RET C620R-GFP タンパク質は専ら細胞質のみに存在し、膜への局在を認めなかった。これは固定細胞を用いた過去の報告と一致していた。このため変異型 RET の発現による病態形質の誘導は、RET の異常局在、およびその局在制御機構の破綻に起因する事が強く示唆された。

研究代表者は変異型 Ret-GFP マウスを胎児期および生後数週にて使用する予定であ

るため、定期的な系統維持を経ることなく変異マウスを得る手段として、CRISPR/Cas9 システムに着目している。受精卵に gRNA および Cas9 タンパク質、および標的ゲノム領域の相補的配列を含む一本鎖デオキシヌクレオチドをエレクトロポレーションする事により、効果的に一塩基変異を誘導する事が知られている。研究代表者は Fgf10 遺伝子に対する gRNA を作成し、これを Cas9 タンパク質と共に受精卵にエレクトロポレーションした。Fgf10 ノックアウトマウスは四肢欠損の表現型を呈する事が知られており、エレクトロポレーションした受精卵を代理母マウスへ移植して胎児を観察した結果、効率よく四肢欠損胚を得る事に成功した。このため今後は野生型 Ret-GFP マウスの受精卵にこの系を応用し、C620R の一塩基変異導入を試みる予定である。

## (3) RET の輸送制御分子の探索

### 抗 GFP 抗体による免疫沈降

Ret-GFP マウスの不死化腸管神経前駆細胞株を GDNF で刺激し、その細胞抽出物を抗 GFP 抗体および市販の GFP trap beads を用いて免疫沈降およびプルダウンアッセイを行った。しかし GDNF 刺激ありなしで顕著な差を見せるバンドは認められなかった。

### 候補分子の選定

RET の輸送を制御する可能性のある既知のモータータンパク質として、研究代表者は Dynein や Kif family、また小胞関連タンパク質として Rab small GTPase family に着目した。Dynein は逆行性軸索内輸送を担うモータータンパク質であり、Kif family のうち、Kif26 は腸管神経系の発生に必須の役割を持つ事が知られている。またいくつかの Rab small GTPase を、腸管神経前駆細胞で免疫染色した所、RET-GFP タンパク質は Rab11 と高い割合で共局在する事が分かった。

### β1-integrin の関与

β1-integrin ノックアウトマウスと RetGFP マウスを掛け合わせ、β1-integrin 欠損下での RET の細胞内動態を解析した所、コントロールマウスに比して、RET の膜上での局在が増加する事を発見した。また細胞内における挙動も有意に上昇する事を発見した。このため、フィブロネクチンが β1-integrin を介して RET を膜上に繫留し、GDNF 結合による効果的なエンドサイトーシスを促進している可能性が示唆された。一方で β1-integrin を欠損すると RET の制御が外れ、RET は膜上を無秩序に動き、GDNF が存在しても効果的なエンドサイトーシスが起らないのではという仮説が示唆された。

しかし使用した β1-integrin ノックアウトマウスの表現型にばらつきがあり、本実験で本当に β1-integrin の欠損を反映しているのが疑われた。このため今後別系統の

β1-integrin ノックアウトマウスを利用するか、CRISPR/Cas9 により β1-integrin を Ret-GFP マウス受精卵でノックアウトさせる事により、本実験の結論を得ようと考えている。または Ret-GFP 由来の培養細胞で β1-integrin の CRISPR/Cas9 を試みる事も検討している。

(4) RET の輸送制御分子の発現操作  
研究代表者はまずモータータンパク質である Dynein に着目した。Dynein-Dynactin complex を解離させる作用をもつ Dynamitin を腸管神経前駆細胞に過剰発現させると、RET の細胞内動態が有意に減少する事を発見した。また Dynein の薬理阻害剤である EHNA を投与しても、RET の細胞内動態が減少した。同じ濃度で Dynein 阻害剤を腸管神経前駆細胞に投与した所、細胞移動速度も有意に減少する事が分かった。一方で Kif family のいくつかを siRNA により阻害しても、RET の細胞内動態に影響はなかった。研究代表者はまた RET-GFP タンパク質がリサイクリングエンドソームマーカーである Rab11 とも共局在することを発見したため、Rab11 のドミナントネガティブフォームを過剰発現させた所、同様に RET の細胞内動態が減少する事を発見した。以上の結果から、RET の細胞内輸送に Dynein および Rab11 を介した経路が必要である事が示唆された。

本研究により、移動中の腸管神経前駆細胞において RET は移動方向に対して細胞体の前側に有意に局在する事が示され、その領域においてランダムで且つ活発な運動を示す事が明らかになった。発生中の軸索においては、RET は軸索先端から細胞体への逆行性方向への輸送が優先的に認められた。これらの観察結果から、RET には細胞内で至適な局在部位があり、至適な輸送方向が存在するという事が明らかになった。このような局在・輸送の特性が、適切な細胞移動や軸索伸長に重要であるという事が示唆される。

一方で当初本研究の目的としていた、変異型 RET の病態誘導過程における RET の細胞内挙動の実体については、研究期間中にマウスを作成する事ができなかったため、解析する事が出来なかった。しかしレンチウイルスを用いた代替実験により、変異型 RET の細胞内挙動に異常が生じる事が分かったため、成体内でもこれと類似した、RET の正常な局在パターンの破綻が認められる事が期待できる。今後 CRISPR/Cas9 システムの導入により、変異型 Ret-GFP マウスの作成・解析を進めていきたい。

#### 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 1 件)

1. Ito K and Enomoto H (2016). Retrograde transport of neurotrophic factor signaling: implications in neuronal development and pathogenesis. The Journal of Biochemistry, 160, 77-85.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Ito K and Enomoto H. Polarized trafficking of RET tyrosine kinase in migrating enteric neural crest-derived cells. 4th international symposium, Development of the enteric nervous system: cells, signals, genes and therapy. 2015 年 4 月 オランダ・ロッテルダム

2. Ito K and Enomoto H. Polarized intracellular trafficking of RET tyrosine kinase in living neurons. 第 38 回日本神経科学大会 2015 年 7 月 神戸

〔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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊藤 圭祐 (ITO Keisuke)  
神戸大学大学院・医学研究科・助教  
研究者番号：10575468

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )