

平成22年4月15日現在

研究種目：学術創成研究費
 研究期間：2004～2009
 課題番号：16GS0311
 研究課題名（和文）生体内における細胞外マトリックス・リモデリングの役割と制御機構の解明
 研究課題名（英文）Roles and Regulatory Mechanisms of Extracellular Matrix Remodeling *in vivo*
 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

研究成果の概要（和文）：悪性転換抑制遺伝子 *RECK* は、マウスの発生に必須の膜アンカー型糖タンパク質をコードし、多種のヒト腫瘍で発現低下している。分子、細胞、個体レベルでの研究により、*RECK* が釣り鐘状2量体を形成し、多種の細胞外金属プロテアーゼを制御して細胞外マトリックスおよび細胞表面タンパク質の分解を抑制すること、また、*RECK* の発現が増殖因子、細胞密度、酸素濃度などによりダイナミックに制御されることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：*RECK*, first isolated as a transformation suppressor gene, encodes a membrane-anchored glycoprotein essential for mouse embryogenesis and down-regulated in various type of human cancer. Our studies at the molecular, cellular, and whole animal levels revealed that *RECK* forms cowbell-shaped dimer, regulates a wide spectrum of extracellular metalloproteases, and protects cell surface molecules as well as extracellular matrix components. We also found that *RECK* expression is under dynamic regulations by various external stimuli, including growth factors, cell density, and oxygen concentration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	75,200,000	22,560,000	97,760,000
2005年度	99,300,000	29,790,000	129,090,000
2006年度	96,400,000	28,920,000	125,320,000
2007年度	96,400,000	28,920,000	125,320,000
2008年度	96,400,000	28,920,000	125,320,000
総計	463,700,000	139,110,000	602,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：がん 発生 マウス遺伝学 MMP ADAM Notch シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景
 がん遺伝子 *Ras* の作用機構を解明する目的でその活性を抑制する遺伝子 cDNA の発現クローニング系を樹立し、新規遺伝子 *Krev-1 (RAP1A)* と *RECK* を単離した。この内 *RECK* は、多くのがん細胞株やがん組織で発現低下が見られ、マウス移植腫瘍を用いた実験

では腫瘍血管新生、浸潤、転移の抑制効果を示した。*RECK* 糖タンパク質 (125 KDa) は膜に GPI アンカーされ、MMP2、MMP9、MT1-MMP を阻害すること、また、*Reck* 欠損マウスが胎生中期 (E10.5) に血管発生の停止と組織構築の乱れを伴う致死形質を示すことが見出された。これらの知見から、

ショウジョウバエからヒトまで単一遺伝子として保存されてきた RECK が、細胞表面タンパク質分解の主要な制御因子である可能性が考えられた。

2. 研究の目的

RECK の分子、細胞、組織、個体レベルでの機能および発現制御機構を明らかにし、生理的あるいは病態における ECM リモデリングの役割に洞察を加える。また、新たな抗がん剤の探索系を確立する。

3. 研究の方法

(1) 条件的 *Reck* 欠損マウスおよび *Reck-Cre* マウスを作成する。

(2) *Reck* 欠損マウスの個体および培養細胞を用いて *Reck* の作用機構に洞察を加える。

(3) 組換え体 RECK タンパク質の発現、精製法を確立し、その構造と分子機能を解明する。

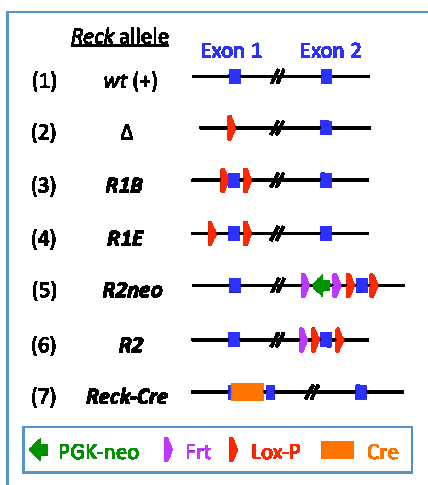
(4) *Reck* 遺伝子の発現制御機構を解明すると共に、*Reck* プロモーターの活性を変化させる薬剤を探索し、それらの薬理効果を検証する。

(5) 新たな悪性転換抑制遺伝子を網羅的に単離し、それらの機能および相互作用を調べる。

4. 研究成果

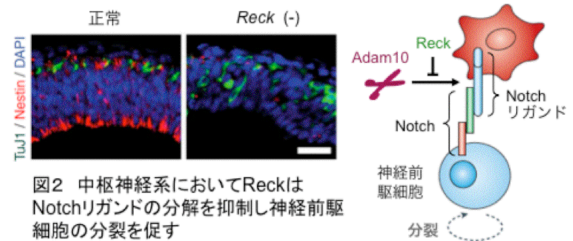
(1) 条件的 *Reck* 遺伝子欠損マウスの作成：第1エクソンを loxP で挟んだ遺伝子座2種および第2エクソンを loxP で挟んだ遺伝子座1種を持つマウスをそれぞれ作成した。また、後者を作成する過程で *Reck* mRNA 量の低下した遺伝子座 (*R2neo*) を得た。*Reck* の第5コドン以降に CreERT2 配列をノックインしたマウスを作成した。これらは、*Reck* の組織・時期特異的欠損、発現パターン解析、*Reck* 発現細胞における各種遺伝子操作に有用と考えられる。

(2) *Reck* および *Mmp* 欠損マウスの解析：E10.5 の野生型マウスでは神経管の Nestin 陽



本研究で樹立された改変*Reck*遺伝子座

性細胞で *Reck* の高い発現が見られる。*Reck* 欠損マウスではこの Nestin 陽性細胞数が激減し、分化した神経細胞が広範囲に散在することが見出された。これは、ADAM10 の脱制御による Notch リガンドの過剰 shedding によることが判明した。



Reck 欠損線維芽細胞では接着斑と細胞移動の方向の安定性が失われること、線維肉腫細胞では RECK が MT1-MMP、CD13 など細胞表面プロテアーゼのエンドサイトーシスと分解促進に関わることを見出した。また、*Mmp2/Mmp14* 二重欠損マウスが血管や筋肉の発達遅延を伴う新生仔致死形質を示すことも見出した。これは *Mmp* 間の機能的冗長性を明らかにした最初の例である。

(3) RECK タンパク質の性質：*Mmp2/Mmp14/Reck* 三重欠損線維芽細胞株を宿主として組換え体 RECK タンパク質 (RECK-His) を発現し、単一バンドにまで精製する方法を確立した。この材料を用い

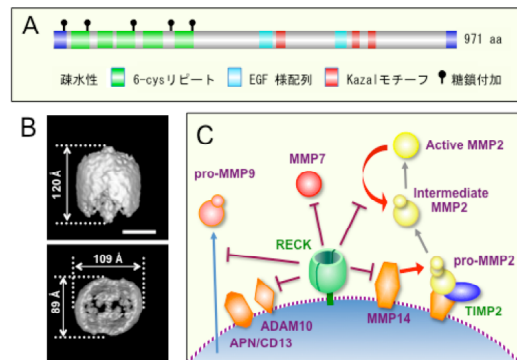


図3 A. RECKタンパク質の一次構造
B. RECKタンパク質2量体の形態
C. RECKタンパク質の活性

た解析から RECK がユニークな釣り鐘状2量体を形成すること、MMP7 による fibronectin の切断を抑制することなどを見出した。

(4) *Reck* の発現制御：野生型マウスの発生後期において筋線維、軟骨、神経筋接合部などにおける *Reck* の高発現を見出した。正常線維芽細胞においては、*Reck* の発現が細胞密度と血清濃度によって大きく変動し、これらの制御には Src、Fak、PI3-kinase が関与することを見出した。また、ヒト大腸が

ん由来細胞株では、RAS/ERK 経路によって発現誘導される miR-21、低酸素によって発現誘導される miR-372/373、構成的に発現される miR-15/16 という 3 群のマイクロ RNA が RECK タンパク質の発現量を負に制御することを見出した。Reck 遺伝子プロモーターの下流に分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) 遺伝子をつないだものを導入したラット線維芽細胞を樹立し、Reck プロモーターを活性化する薬剤スクリーニング系を作った。既知化合物 880 種を用いた予備実験では、既知の抗がん剤や転移抑制活性を持つ薬剤が多数見出された。

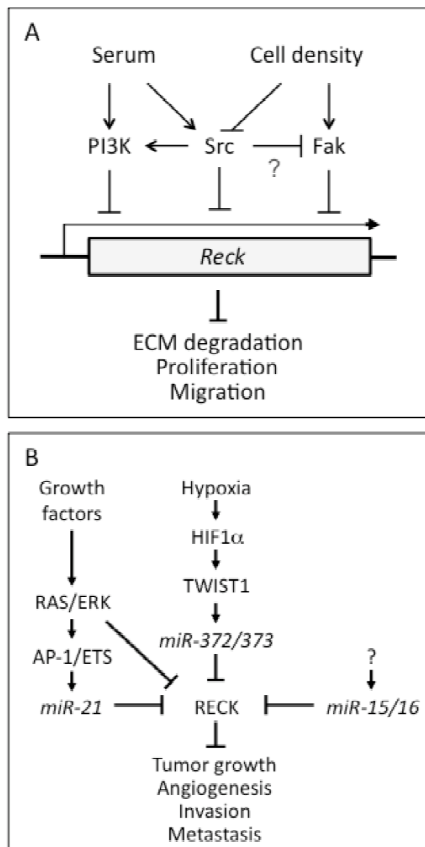


図4 A. 線維芽細胞におけるReckの転写制御
B. 線維肉腫細胞におけるマイクロRNAを介したRECKの発現制御

(5) 新たな悪性転換抑制遺伝子の探索：新たに開発したフェージミド・ベクターを用いて全長 cDNA 発現ライブラリーを構築し、高効率に悪性転換抑制遺伝子を単離同定できる系を確立した。既に75種の cDNA を取得し、一部の機能解析を進めている。

(6) 共同研究：高橋智聡博士グループとの共同研究において、がん抑制遺伝子 Rb を欠損したマウスで見られる甲状腺神経内分泌腫瘍では、プロトがん遺伝子 Nras ががん抑制遺伝子として機能するという予想外の現象を見出した。この現象の分子メカニズムを解析する中で、Rb が E2F の阻害を介して Nras の脂質修飾 (活性に必須) を抑制するという機構を見出した。Rb 欠損マウスで

は、Nras の過剰な活性化がおり、これが細胞老化、DNA 損傷修復応答などを惹起するものと考えられる。

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30件)

- Loayza-Puch F, Yoshida Y, Matsuzaki T, Takahashi C, Kitayama H., Noda M., Hypoxia and RAS-signaling pathways converge on, and cooperatively downregulate, the RECK tumor-suppressor protein through microRNAs. *Oncogene* 29, 2638-2648 (2010). (査読有)
- Miki T, Shamma A, Kitajima S, Takegami Y, Noda M, Nakashima Y, Watanabe K, Takahashi C. The beta1-integrin-dependent function of RECK in physiologic and tumor angiogenesis. *Mol Cancer Res* 8, 665-676 (2010). (査読有)
- Kimura T, Okada A, Yatabe T, Okubo M, Toyama Y, Noda M., Okada Y. RECK Is Up-Regulated and Involved in Chondrocyte Cloning in Human Osteoarthritic Cartilage. *Am J Pathol* (2010) [Epub ahead of print]. (査読有)
- Shamma A, Takegami Y, Miki T, Kitajima S, Noda M., Obara T, Okamoto T, Takahashi C. Rb Regulates DNA damage response and cellular senescence through E2F-dependent suppression of N-ras isoprenylation. *Cancer Cell* 15, 255-269 (2009). (査読有)
- Omura A, Matsuzaki T, Mio K, Ogura T, Yamamoto M, Fujita A, Okawa K, Kitayama H., Takahashi C, Sato C, Noda M., RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits matrix metalloproteinase-catalyzed cleavage of fibronectin. *J Biol Chem* 284, 3461-3469 (2009). (査読有)
- Morioka Y, Monypenny J, Matsuzaki T, Shi S, Alexander DB, Kitayama H., Noda M.,

- The membrane-anchored metalloproteinase regulator RECK stabilizes focal adhesions and anterior-posterior polarity in fibroblasts. *Oncogene* 28, 1454-1464 (2009). (査読有)
7. Hatta M, Matsuzaki T, Morioka Y, Yoshida Y, Noda M.. Density- and serum-dependent regulation of the Reck tumor suppressor in mouse embryo fibroblasts. *Cell Signal* 21, 1885-1893 (2009). (査読有)
 8. Ohne Y, Takahara T, Hatakeyama R, Matsuzaki T, Noda M., Mizushima N, Maeda T. Isolation of hyperactive mutants of mammalian target of rapamycin. *J Biol Chem* 283, 31861-31870 (2008). (査読有)
 9. Lee H, Lim C, Lee J, Kim N, Bang S, Min B, Park G, Noda M., Stetler-Stevenson WG, Oh J. TGF-beta signaling preserves RECK expression in activated pancreatic stellate cells. *J Cell Biochem* 104, 1065-1074 (2008). (査読有)
 10. Kawashima S, Imamura Y, Chandana EP, Noda T, Takahashi R, Adachi E, Takahashi C, Noda M.. Localization of the membrane-anchored MMP-regulator RECK at the neuromuscular junctions. *J Neurochem* 104, 376-385 (2008). (査読有)
 11. Xu J, Shi S, Matsumoto N, Noda M., Kitayama H.. Identification of Rgl3 as a potential binding partner for Rap-family small G-proteins and profilin II. *Cell Signal* 19, 1575-1582 (2007). (査読有)
 12. Noda M., Takahashi C. Recklessness as a hallmark of aggressive cancer. *Cancer Sci* 98, 1659-1665 (2007). 総説 (査読有)
 13. Muraguchi T, Takegami Y, Ohtsuka T, Kitajima S, Chandana EP, Omura A, Miki T, Takahashi R, Matsumoto N, Ludwig A, Noda M., Takahashi C. RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. *Nat Neurosci* 10, 838-845 (2007). (査読有)
 14. Miki T, Takegami Y, Okawa K, Muraguchi T, Noda M., Takahashi C. The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. *J Biol Chem* 282, 12341-12352 (2007). (査読有)
 15. Kondo S, Shukunami C, Morioka Y, Matsumoto N, Takahashi R, Oh J, Atsumi T, Umezawa A, Kudo A, Kitayama H., Hiraki Y, Noda M.. Dual effects of the membrane-anchored MMP regulator RECK on chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *J Cell Sci* 120, 849-857 (2007). (査読有)
 16. Ihara M, Yamasaki N, Hagiwara A, Tanigaki A, Kitano A, Hikawa R, Tomimoto H, Noda M., Takanashi M, Mori H, Hattori N, Miyakawa T, Kinoshita M. Sept4, a Component of Presynaptic Scaffold and Lewy Bodies, Is Required for the Suppression of alpha-Synuclein Neurotoxicity. *Neuron* 53, 519-533 (2007). (査読有)
 17. Takahashi C, Contreras B, Iwanaga T, Takegami Y, Bakker A, Bronson RT, Noda M., Loda M, Hunt JL, Ewen ME. Nras loss induces metastatic conversion of Rb1-deficient neuroendocrine thyroid tumor. *Nat Genet* 38, 118-123 (2006). (査読有)
 18. Oh J, Diaz T, Wei B, Chang H, Noda M., Stetler-Stevenson WG. TIMP-2

- upregulates RECK expression via dephosphorylation of paxillin tyrosine residues 31 and 118. *Oncogene* 25, 4230-4234 (2006). (査読有)
19. Nakaji K, Ihara M, Takahashi C, Itohara S, Noda M., Takahashi R, Tomimoto H. Matrix metalloproteinase-2 plays a critical role in the pathogenesis of white matter lesions after chronic cerebral hypoperfusion in rodents. *Stroke* 37, 2816-2823 (2006). (査読有)
 20. Chang H, Lee J, Poo H, Noda M., Diaz T, Wei B, Stetler-Stevenson WG, Oh J. TIMP-2 promotes cell spreading and adhesion via upregulation of Rap1 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 1201-1206 (2006). (査読有)
 21. Takenaka K, Ishikawa S, Yanagihara K, Miyahara R, Hasegawa S, Otake Y, Morioka Y, Takahashi C, Noda M., Ito H, Wada H, Tanaka F. Prognostic significance of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs expression in resected pathologic stage IIIA N2 non-small-cell lung cancer. *Ann Surg Oncol* 12, 817-824 (2005). (査読有)
 22. Ihara M, Kinoshita A, Yamada S, Tanaka H, Tanigaki A, Kitano A, Goto M, Okubo K, Nishiyama H, Ogawa O, Takahashi C, Itohara S, Nishimune Y, Noda M., Kinoshita M. Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. *Dev Cell* 8, 343-352 (2005). (査読有)
 23. Echizenya M, Kondo S, Takahashi R, Oh J, Kawashima S, Kitayama H., Takahashi C, Noda M.. The membrane-anchored MMP-regulator RECK is a target of myogenic regulatory factors. *Oncogene* 24, 5850-5857 (2005). (査読有)
 24. Takeuchi T, Hisanaga M, Nagao M, Ikeda N, Fujii H, Koyama F, Mukogawa T, Matsumoto H, Kondo S, Takahashi C, Noda M., Nakajima Y. The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 10, 5572-5579 (2004). (査読有)
 25. Takenaka K, Ishikawa S, Kawano Y, Yanagihara K, Miyahara R, Otake Y, Morioka Y, Takahashi C, Noda M., Wada H, Tanaka F. Expression of a novel matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 40, 1617-1623 (2004). (査読有)
 26. Shi S, Noda M., Kitayama H.. Rap1 mutants with increased affinity for the guanine-nucleotide exchange factor C3G. *Oncogene* 23, 8711-8719 (2004). (査読有)
 27. Oh J, Takahashi R, Adachi E, Kondo S, Kuratomi S, Noma A, Alexander DB, Motoda H, Okada A, Seiki M, Itoh T, Itohara S, Takahashi C, Noda M.. Mutations in two matrix metalloproteinase genes, MMP-2 and MT1-MMP, are synthetic lethal in mice. *Oncogene* 23, 5041-5048 (2004). (査読有)
 28. Oh J, Seo DW, Diaz T, Wei B, Ward Y, Ray JM, Morioka Y, Shi S, Kitayama H, Takahashi C, Noda M., Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial

cell migration through increased expression of RECK. *Cancer Res* 64, 9062-9069 (2004). (査読有)

29. Kanda H, Tanaka T, Matsumoto M, Umemoto E, Ebisuno Y, Kinoshita M, Noda M., Kannagi R, Hirata T, Murai T, Fukuda M, Miyasaka M. Endomucin, a sialomucin expressed in high endothelial venules, supports L-selectin-mediated rolling. *Int Immunol* 16, 1265-1274 (2004). (査読有)
30. Imamura Y, Matsumoto N, Kondo S, Kitayama H, Noda M. Effects of ras and Rap1 on electrical excitability of differentiated NG108-15 cells. *Neuroscience* 127, 973-981 (2004). (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

(1) 吉田陽子

細胞周期における RECK の役割

2008 年 10 月 28 日

第 67 回日本癌学会学術総会

名古屋国際会議場

(2) 大村 彰

転移/血管新生抑制タンパク質 RECK の分子構造と新規機能

2008 年 10 月 29 日

第 67 回日本癌学会学術総会

名古屋国際会議場

(3) 森岡洋子

繊維芽細胞の接着と移動における Reck の役割

2008 年 10 月 28 日

第 67 回日本癌学会学術総会

名古屋国際会議場

(4) 野田 亮

The membrane-anchored MMP-regulator Reck plays a crucial role in intussusceptive vascular remodeling.

2008 年 8 月 14 日-17 日

Mechanisms&Models of Cancer

Cold Spring Harbor (アメリカ合衆国)

[その他]

ホームページ等

<http://www.users.iimc.kyoto-u.ac.jp/~z59192/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

北山 仁志 (KITAYAMA HITOSHI)

京都大学・医学研究科・助教授

研究者番号：30231286

(H16 年)

松崎 朋子 (MATSUZAKI TOMOKO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50402855

(H17 年-H19 年)

吉田 陽子 (YOSHIDA YOKO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60130324

(H18 年-H19 年)

今村 行雄 (IMAMURA YUKIO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90447954

(H19 年)

(3) 連携研究者

松崎 朋子 (MATSUZAKI TOMOKO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50402855

(H20 年-H21 年)

吉田 陽子 (YOSHIDA YOKO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60130324

(H20 年-H21 年)

今村 行雄 (IMAMURA YUKIO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90447954

(H20 年-H21 年)