

令和元年6月7日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05152

研究課題名(和文) 組織損傷修復、炎症および癌の進展におけるWnt5a-Rorシグナルの分子機構解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms of Wnt5a-Ror signaling in repair after tissue damage, inflammation, and cancer progression

研究代表者

南 康博 (Minami, Yasuhiro)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：70229772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：受容体型チロシンキナーゼRor1、Ror2は、これまで液性因子Wnt5aの受容体として機能し、Wnt5a依存的に発生過程の形態形成などを制御することが知られていたが、Ror1、Ror2は成体においてもWnt5a依存的・非依存的な機構により、大脳皮質の損傷修復や炎症制御、および骨格筋の損傷修復などにおいて重要な役割を担うことが明らかとなった。また、Ror2やRor1は骨肉腫細胞、乳がん細胞、悪性胸膜中皮腫細胞、大腸がん細胞などで高発現しており、これらを介するシグナル伝達によりがん細胞の浸潤が亢進することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、受容体型チロシンキナーゼRor1、Ror2は組織損傷修復において重要な役割を担うことが明らかとなり、今後Ror1、Ror2の発現・機能を制御することにより、損傷組織の修復や再生医療に応用できると予想される。また、Ror1、Ror2はがんの進展・増悪における浸潤過程において重要な役割を担うことが見出され、がんの新たな診断・治療法の開発における分子標的となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been well established that Ror1 and Ror2 receptor tyrosine kinases play important roles in developmental morphogenesis and tissue-/organo-genesis by acting as receptors for Wnt5a. In this study, we have shown that Ror1 and Ror2 play important roles in regulating repair and inflammatory responses after damage of brain neocortex and skeletal muscle by using experimental animal models. Furthermore, we show that Ror2 as well as Ror1 are expressed at high levels in various types of cancer cells, including osteosarcoma cells, breast cancer cells, malignant pleural mesotheliomas, and colo-rectal cancer cells, thereby promoting invasion of these cancer cells by activating similar and/or different signaling pathways.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Wnt5a-Rorシグナル 神経損傷修復 神経炎症 がんの浸潤 骨格筋損傷修復 組織損傷修復 遺伝子発現制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、これまでに Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼ (Ror1, Ror2) が発生を制御する液性タンパク質 Wnt5a の受容体として機能し、発生過程における平面内細胞極性や収斂伸長運動を制御することにより、発形態形成や組織・器官構築において重要な役割を担うことを明らかにしていた。また、線維芽細胞などを用いた解析から、Wnt5a-Ror2 シグナルがアクチン細胞骨格再編成を誘導し、極性を持った細胞移動 (運動) を制御することや骨肉腫細胞などにおける浸潤突起の形成を介して浸潤能の亢進に重要な役割を担うことを見出ししていた。さらに、上皮組織における損傷・炎症や上皮性がん細胞株の上皮間葉転換 (EMT: epithelial-to-mesenchymal transition) に伴い、Wnt5a, Ror2 (または Ror1) の発現が誘導され、細胞運動能や浸潤能の亢進に関与することが明らかになっていた。

## 2. 研究の目的

上記の研究開始当初の背景を踏まえ、本研究では、(1) マウスを用いた大脳皮質損傷モデル (神経損傷・炎症モデル) や初代培養アストロサイトなどを用いて、神経損傷修復・炎症における Wnt5a や Ror2 の役割を明らかにすること、(2) マウス片側顎下腺結紮による顎下腺炎症モデルを用いて、顎下腺炎の遷延過程における Wnt5a や Ror2 の役割を明らかにすること、(3) マウス片側前脛骨筋へのカルディオトキシン (CTX: cardiotoxin) 投与による骨格筋損傷モデルや筋芽細胞の増殖・分化モデルとして使用される C2C12 細胞を用いて、骨格筋損傷修復における Ror1, Ror2 の役割を明らかにすること、および(4) ヒト骨肉腫細胞株、乳がん細胞株、悪性胸膜中皮腫細胞株、大腸がん細胞株を用いて、これらのがん細胞の浸潤過程における Wnt5a や Ror1, Ror2 の役割を明らかにすること、などを目的として、マウス個体や培養細胞株を用いて多面的に研究を推進した。

## 3. 研究の方法

(1) マウス (野生型マウス、*Wnt5a* または *Ror2* 遺伝子欠失マウス) を用いた大脳皮質損傷モデルや初代培養アストロサイトを用いて、神経損傷・炎症に伴うアストロサイトにおける Ror2 の発現・機能の解析を行った。

(2) マウス片側顎下腺結紮実験を行い、結紮後の顎下腺炎に伴う顎下腺上皮細胞における EMT に伴う Wnt5a や Ror2 などの発現解析や免疫組織化学的解析を行い、炎症病態の解析を行った。

(3) マウス片側前脛骨筋への CTX 投与による骨格筋損傷モデルを用いて、骨格筋組織幹細胞である衛星細胞 (SC: satellite cells) や間葉系前駆細胞 (MPC: mesenchymal progenitor cells) における Ror1, Ror2 などの発現・機能解析を行った。また、マウス個体での知見を踏まえて、筋芽細胞の増殖・分化モデルとして知られる C2C12 細胞を用いて細胞レベルで分子機構の解析を行った。

(4) 骨肉腫細胞株、乳がん細胞株、悪性胸膜中皮腫細胞株を用いて、これらのがん細胞の (個々のがん細胞の浸潤過程における Ror2 および Ror1 を介するシグナル伝達機構の解析を行った。また、最近になり集団的がん細胞の浸潤ががんの進展・増悪と関係することが示唆されるようになってきた大腸がん細胞を用いて、大腸がん細胞の集団的浸潤の機構解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) マウス (野生型マウス、*Wnt5a* または *Ror2* 遺伝子欠失マウス) を用いた大脳皮質損傷モデルや初代培養アストロサイトを用いて、神経損傷・炎症に伴うアストロサイトにおける Ror2 の発現・機能の解析を行った。

(2) マウス片側顎下腺結紮実験を行い、結紮後の顎下腺炎に伴う顎下腺上皮細胞における EMT に伴う Wnt5a や Ror2 などの発現解析や免疫組織化学的解析を行い、炎症病態の解析を行った。

(3) マウス片側前脛骨筋への CTX 投与による骨格筋損傷モデルを用いて、骨格筋組織幹細胞である衛星細胞 (SC: satellite cells) や間葉系前駆細胞 (MPC: mesenchymal progenitor cells) における Ror1, Ror2 などの発現・機能解析を行った。また、マウス個体での知見を踏まえて、筋芽細胞の増殖・分化モデルとして知られる C2C12 細胞を用いて細胞レベルで分子機構の解析を行った。

(4) 骨肉腫細胞株、乳がん細胞株、悪性胸膜中皮腫細胞株を用いて、これらのがん細胞の (個々のがん細胞の浸潤過程における Ror2 および Ror1 を介するシグナル伝達機構の解析を行った。また、最近になり集団的がん細胞の浸潤ががんの進展・増悪と関係することが示唆されるようになってきた大腸がん細胞を用いて、大腸がん細胞の集団的浸潤の機構解析を行った。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

- 1 Aoki, T., Nishita, M., Sonoda, J., Ikeda, T., Kakeji, Y., Minami, Y.,  
Intraflagellar transport 20 promotes collective cancer cell invasion H. by

- regulating polarized organization of Golgi-associated microtubules, *Cancer Sci.*, 査読有、110、2019、1306-1316
- 2 Kishimoto, K., Tamura, M., Nishita, M., Minami, Y., Matsuoka, A., Abe, T., Shigeta, M., Morimoto, M., Synchronized mesenchymal cell polarization and differentiation shape the formation of the murine trachea and esophagus, *Nat. Commun.*, 査読有、9、2018、2816  
doi: 10.1038/s41467-018-05189-2
  - 3 Saji, T., Nishita, M., Ogawa, H., Doi, T., Sakai, Y., Maniwa, M., Minami, Y., Critical role of the Ror-family of receptor tyrosine kinases in proliferation and invasion of malignant mesothelioma cells, *Genes Cells*, 査読有、23、2018、606-613
  - 4 Endo, M., Minami, Y., Diverse roles for the Ror-family Receptor Tyrosine Kinases in Neurons and Glial Cells during Development and Repair of the Nervous System, *Dev. Dyn.*, 査読有、247、2018、24-32
  - 5 Kamizaki, K., Doi, R., Hayashi, M., Saji, T., Kanagawa, M., Toda, T., Fukada, S-I., Ho, H. H., Greenberg, M. E., Endo, M., Minami, Y., The Ror1 receptor tyrosine kinase plays a crucial role in regulating satellite cell proliferation during regeneration of injured muscle, *J. Biol. Chem.*, 査読有、292、2017、15939-15951
  - 6 Endo, M., Ubulkasim, G., Kobayashi, C., Onishi, R., Aiba, A., Minami, Y., Critical role of Ror2 receptor tyrosine kinase in regulating cell cycle progression of reactive astrocytes following brain injury, *Glia*, 査読有、65、2017、182-197
  - 7 Nishita, M., Nishio, T., Park, S-Y., Kamizaki, K., Wang, Z-C., Tamada, K., Takumi, T., Hashimoto, R., Otani, H., Pazour, G. J., Hsu, V. W., Minami, Y., Ror2 signaling regulates Golgi structure through IFT20 for tumor invasiveness, *Scientific Rep.*, 査読有、7、2017  
doi: 10.1038/s41598-016-0028-x

〔学会発表〕(計 15 件)

- 1 Kamizaki, K., Yamamoto, A., Doi, R., Kanagawa, M., Toda, T., Uezumi, A., Fukada, S-I., Endo, M., Minami, Y., Ror2 regulates adipogenic differentiation of Mesenchymal progenitor cells in the skeletal muscle, *ASCB/EMBO meeting*, 2018
- 2 青木 文明、西田 満、掛地 吉弘、南 康博、IFT20 は微小管ダイナミクスを制御することで大腸癌細胞の浸潤能亢進に寄与する、日本癌学会学術総会、2018
- 3 西田 満、松本 邦夫、南 康博、Ror1 は SmgGDS-Rif 経路を介して肺腺がん細胞の糸状突起形成と浸潤を促進する、日本癌学会学術総会、2018
- 4 遠藤 光晴、大田 絢斗、南 康博、脳の損傷修復における増殖性アストロサイトの役割、日本組織細胞化学会、2017
- 5 南 康博、西田 満、Ror2 受容体型チロシンキナーゼのがん-胎児タンパク質としての機能、日本癌学会総会、2016
- 6 遠藤 光晴、小林 千穂、グリジャハン オブリカスム、南 康博、エピジェネティック機構を介した受容体型チロシンキナーゼ Ror2 の発現誘導によるアストロサイトの細胞周期制御、日本神経化学会大会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/medzoo/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：西田 満

ローマ字氏名：NISHITA, michiru

所属研究機関名：神戸大学

部局名：大学院医学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30379359

研究分担者氏名：遠藤 光晴

ローマ字氏名：ENDO, mitsuharu

所属研究機関名：神戸大学

部局名：大学院医学研究科

職名：講師

研究者番号(8桁)：90436444

研究分担者氏名：林 真琴

ローマ字氏名：HAYASHI, makoto

所属研究機関名：神戸大学

部局名：大学院医学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：50722930

研究分担者氏名：内匠 透

ローマ字氏名：TAKUMI, toru

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：脳神経科学研究センター

職名：チームリーダー

研究者番号(8桁)：00222092

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。