

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 特定領域研究
 研究期間： 2005 ～ 2009
 課題番号： 17014039
 研究課題名（和文） 受容体型チロシンキナーゼによる増殖シグナルの制御機構
 研究課題名（英文） Regulation of cell proliferation by receptor tyrosine kinase

研究代表者
 高橋 雅英 (TAKAHASHI MASAHIDE)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号： 40183446

研究成果の概要（和文）：受容体型チロシンキナーゼの発現異常や変異による機能異常は細胞増殖、発がんあるいは発生異常の原因となる。RET チロシンキナーゼは、甲状腺髄様がんなどを発症する多発性内分泌腫瘍症 2 型と腸管神経細胞の分化異常を引き起こすヒルシュスプルング病の原因遺伝子で、その変異により多様なメカニズムでシグナル伝達異常を引き起こし、疾患発症につながる。本研究では、変異 RET 蛋白を発現する細胞株やトランスジェニックマウスに発生する腫瘍を用いて、RET の下流で活性化されるそれぞれのシグナル伝達系が、がん細胞の増殖、浸潤、転移能に果たす役割について、細胞生物学的およびマウスを用いた個体レベルの解析により明かにした。

研究成果の概要（英文）： Point mutations and structural alterations of receptor tyrosine kinase genes cause cancer and developmental abnormalities. Mutations of the *RET* tyrosine kinase gene is responsible for the development of multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung's disease. The mutations result in RET activation and inactivation by various mechanisms. In this study, we elucidated the roles of each downstream signaling of RET in cancer cell growth, invasion and metastasis using RET-expressing cancer cell lines and transgenic mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	8,400,000	0	8,400,000
2006 年度	9,800,000	0	9,800,000
2007 年度	9,800,000	0	9,800,000
2008 年度	9,700,000	0	9,700,000
2009 年度	9,700,000	0	9,700,000
総計	47,400,000	0	47,400,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：受容体型チロシンキナーゼ、RET チロシンキナーゼ、シグナル伝達、細胞増殖、細胞運動、CD109、Akt、Girdin

1. 研究開始当初の背景
 受容体型チロシンキナーゼの発現異常や変異による機能異常は細胞増殖、発がんあるいは

は発生異常の原因となる。RET チロシンキナーゼは、甲状腺髄様がんなどを発症する多発性内分泌腫瘍症 2 型と腸管神経細胞の分化異

常を引き起こすヒルシュスブルグ病の原因遺伝子で、その変異により多様なメカニズムでシグナル伝達異常を引き起こし、疾患発症につながる。RETの活性化は他の受容体型チロシンキナーゼと同様に、RAS/ERK, PI3-K/AKT, RAC/JNK シグナル伝達系を活性化する。RETチロシンキナーゼによる細胞増殖の制御機構に関わる新規分子の同定やDNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現の解析によって得られる知見は、他のレセプター分子を介したシグナル伝達系の新たな研究の展開やがんの治療戦略創造にも大きく貢献できるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、変異RET蛋白を発現する細胞株やトランスジェニックマウスに発生する腫瘍を用いて、RETの下流のそれぞれのシグナル伝達系が、がん細胞の増殖、浸潤、転移能にどのような役割を果たすかについて、細胞生物学的解析および個体レベルの解析を推進することにある。特定のシグナル伝達系に関与する新たなシグナル分子の同定や細胞の悪性化に伴って発現誘導される遺伝子群を明らかにし、それらの機能解析を通じて、受容体型チロシンキナーゼの活性化によるがん細胞の異常増殖の分子機序の理解を深め、新たな診断・治療のための開発研究に資する。

3. 研究の方法

(1) MEN2A型RET遺伝子を導入したトランスジェニックマウスに発生する腫瘍(甲状腺髄様がん、乳がん、唾液腺がん)において発現が変化する遺伝子をDNAマイクロアレイ法にて解析し、変動の見られた遺伝子の細胞増殖、発がんにおける役割について解析する。

(2) MEN2B型変異RETによって発現誘導されるGPIアンカー型の細胞表面蛋白CD109の機能解析を行う。CD109蛋白を高発現させたがん細胞とノックダウンした細胞を用いて、CD109蛋白発現量ががん細胞の増殖に及ぼす影響を検討する。CD109 cDNAをケラチンのプロモーターに結合したコンストラクトを用いて、トランスジェニックマウスを作製し、個体レベルでCD109の過剰発現がどのような効果を及ぼすか解析する。

(3) RET蛋白に結合するDok蛋白ファミリーDOK-4およびDok-6の細胞増殖における役割についてRETを発現する神経芽細胞腫細胞株を用いて細胞生物学的に解析する。

(4) 受容体型チロシンキナーゼの下流で活性化されるAktの新規基質Girdinの機能解析を進める同時に、その発現とがんの悪性度との関連について検討を行う。種々のヒトがん組織を用いて、Girdin、リン酸化Girdin

の発現を免疫染色にて解析し、がんの組織型、予後との関連を明らかにする。Yeast-two hybrid法やmass spectrometryを用いて、Girdinの結合タンパクを同定し、細胞運動におけるGirdinの機能解析を進める。

4. 研究成果

(1) 受容体型チロシンキナーゼRETの変異は多発性内分泌腫瘍症2型(MEN2AおよびMEN2B)における腫瘍発生に関与している。われわれが作製したMEN2A型変異RET導入トランスジェニックマウスにおいては甲状腺髄様がん、耳下腺がん、乳がんが発生する。DNAマイクロアレイで解析した結果、これらのがん組織では正常組織と比較し、いずれにおいてもMAPキナーゼファミリーに対する脱リン酸化酵素であるMKP-2の発現が有意に上昇していることが明らかになった。そこでトランスジェニックマウスに発生した乳がんより樹立した細胞株(以下MKK-f)を用いて、MKP-2の発現の意義を解析した。MKP-2をノックダウンしたMKK-f細胞は増殖速度が有意に低下し、ヌードマウスへの移植においても腫瘍増殖が低下した。細胞周期の検討を行った結果、MKP-2をノックダウンすると、G2/M期の移行の遅れが認められた。この結果と一致して、ノックダウン細胞においてcyclinB1の発現低下がみられ、M期移行において、cyclinB1と複合体を形成するCDK1(Cdc2)のリン酸化も低下していた。同調培養の条件下でも、MKP-2をノックダウンしたMKK-f細胞でcyclinB1の発現レベルとCDK1のリン酸化のピークの遅れがみられ、G2/M期における細胞周期の遅延と矛盾しない結果であった。以上の結果より、MEN2A型トランスジェニックマウスでは変異RETによりMKP-2の発現が誘導され、細胞周期を制御することにより、腫瘍増殖に関わっているという新たな細胞増殖のメカニズムを提示することができた。

(2) CD109はGPIアンカー型細胞表面蛋白であり、食道、肺などの扁平上皮がん(SCC)において高発現していることを明らかにした。さらに口腔悪性腫瘍(前がん病変の疑いを含む)と診断された124症例の組織検体を用いて、CD109の発現と臨床像との相関を検討した結果、CD109は正常口腔粘膜では陰性である一方、carcinoma in situ (CIS)および高分化型SCCでは全例陽性であった。陽性率は中分化型SCCでは88.9%、低分化型SCCでは63.6%と分化度が低くなるにつれて低下した。また前がん病変と考えられるDysplasiaについて3年以内がんに化した群(Group A)とがん化しな

った群(Group B)に分類すると、Group Aにて有意に陽性率が高く、CD109の発現と前がん病変の悪性化と相関していることが示された。よってCD109の発現が前がん病変の悪性化の予測因子として使用できる可能性を示唆した。

口腔扁平上皮がん細胞にCD109を過剰発現させると、コントロール細胞に比べ、有意に増殖能が亢進し、逆にCD109の発現をノックダウンすると増殖能が低下した。この結果はCD109の発現が細胞増殖と相関していることを示している。近年他のグループにより、CD109がTGFβレセプターの複合体を形成していることが報告されたので、CD109を過剰発現した細胞株におけるTGFβ/Smadシグナルの変化を解析した。その結果、CD109過剰発現細胞株ではTGFβ刺激に伴うSmad2のリン酸化が抑制されており、TGFβによる細胞増殖抑制効果も認められなかった。逆に、CD109ノックダウン細胞ではSmad2のリン酸化が増強した。よって、CD109はTGFβ/Smadシグナルを負に制御し、TGFβによる抗細胞増殖効果を抑制していると考えられた。

(3)Dok 蛋白ファミリーのDok-4, 5, 6が受容体型チロシンキナーゼの中でRETに比較的特異的に結合することが知られている。RETチロシンキナーゼによる細胞増殖、神経分化におけるDok-4の役割について解析した結果、Dok-4の過剰発現は神経芽細胞腫細胞TGWの細胞増殖には影響をおよぼさないものの、著しい神経突起の伸長を誘導することを明らかにした。この現象はDok-4がRap-1の活性化を介して、Erkの持続的な活性化をひき起こすことによるものであった。Dok-4のこの活性にはDok-4に存在するコドン187, 220および270のチロシンが重要な役割を果たしていることを証明した。以上の結果から、Dok-4は細胞増殖よりも分化シグナルを活性化することが示唆された。一方、Dok-6の過剰発現やノックダウンは神経芽細胞腫細胞株の増殖や神経突起伸長に影響を与えず、主要な細胞内シグナル伝達系の活性化にも有意な変化を及ぼさなかった。Bindingアッセイの結果、RETに対するDok-6の結合能はDok-1やDok-4に比べ有意に低く、Dok-6の発現がRETの下流シグナルに影響を与えない結果と一致した。この結果より、Dokファミリー蛋白間でRETの下流のシグナル伝達における役割の違いが明らかになった。

(4)Akt-Girdinシグナル伝達系の腫瘍細胞の浸潤、増殖における役割についてMDA-MB-231ヒト乳がん細胞を用いて検討した。MDA-MB-231細胞にGirdinのshort

hairpin型siRNAをトランスフェクトし、Girdinの発現をノックダウンした細胞株を樹立した(以下MDA-Girdin KOと呼ぶ)。ポイデンチャンバー法やWound healing法により、IGF-1非存在下、存在下におけるMDA細胞とMDA-Girdin KO細胞の細胞運動能を比較したところ、IGF-1存在の有無に関わらずMDA-Girdin KO細胞の運動能が有意に低下していることが判明した。また細胞増殖能を検討した結果、MDA-Girdin KO細胞の増殖能はMDA細胞に比較して軽度に低下するものの、両者の間に有意差は認めなかった。さらに、両細胞株を3x10⁶個ヌードマウスの皮下に移植して10週間後の肺への転移能を比較した結果、MDA-Girdin KO細胞の転移能は著しく低下した。以上の結果よりGirdinのノックダウンにより引き起こされるアクチン線維の再構成の異常は、MDA-MB-231細胞の運動能を低下させることより、肺への転移を抑制することが明らかになった。がん転移に対する治療法として、Akt-Girdinシグナル伝達系を制御することの有用性が示唆された。

次にGirdinの発現を免疫染色法にてヒトの乳がんおよび消化器がん組織で検索した。その結果、正常乳腺上皮や消化管粘膜上皮には発現を認めないものの、がん細胞の約10-20%の症例でGirdinが高発現し、20-30%の症例で中等度に発現していることが判明した。今後Girdinの発現ががん細胞の悪性度に関与しているかどうか検討する必要がある。

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48件) すべて査読有

1. Kurotsuchi, A., Murakumo, Y., Takahashi, M. et al. (11人中⑩番目)
Analysis of DOK-6 function in downstream signaling of RET in human neuroblastoma cells.
Cancer Sci. in press.2010
2. Weng, L., Enomoto, A., Ishida-Takagishi, M., Asai, N. and Takahashi, M.
Girding for migratory cues: Role of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis.
Cancer Sci. in press.2010
3. Hagiwara, S., Murakumo, Y., Takahashi, M. et al. (8人中⑧番目)
Processing of CD109 by furin and its role in the regulation of TGF-beta signaling.
Oncogene in press.2010
4. Kumasaka, M.Y., Yajima, I., Takahashi, M. et al. (9人中⑦番目), .

- A novel mouse model for de novo melanoma.
Cancer Res. 70: 24-29 (2010).
5. Lu, B., Cebrian, C., Takahashi, M., et al. (17人中⑬番目)
Etv4 and Etv5 are required downstream of GDNF and Ret for kidney branching morphogenesis.
Nature Genet. 41: 1295-1302 (2009).
 6. Jiang, P., Enomoto, A. and Takahashi, M.
Cell biology of the movement of breast cancer cells: intracellular signaling and the actin cytoskeleton.
Cancer Lett. 284: 122-130 (2009).
 7. Puseenam, A., Yoshioka, Y., Takahashi M et al. (9人中⑧番目).
A novel Drosophila Girdin-like protein is involved in Akt pathway control of cell size.
Exp. Cell Res. 315: 3370-3380 (2009).
 8. Kato, T., Shimono, Y., Takahashi, M. et al. (8人中⑧番目)
Characterization of the HDAC1 complex that regulates the sensitivity of cancer cells to oxidative stress.
Cancer Res. 69: 3597-3604 (2009).
 9. Hagiwara, S., Murakumo, Y., Takahashi, M. et al. (7人中⑦番目)
Up-regulation of CD109 expression is associated with carcinogenesis of the squamous epithelium of the oral cavity.
Cancer Sci. 99: 1916-1923 (2008).
 10. Hasegawa, T., Enomoto, A., Takahashi, M. et al. (14人中⑭番目)
Roles of induced expression of MAPK phosphatase-2 in tumor development in RET-MEN2A transgenic mice.
Oncogene 27: 5684-5695 (2008).
 11. Hasegawa, M., Moritani, S., Takahashi, M. et al. (12人中⑫番目)
CD109 expression in basal-like breast carcinoma.
Pathol. Int. 58: 288-294 (2008).
 12. Kitamura, T., Asai, N., Takahashi, M. et al. (13人中⑬番目)
Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin.
Nature Cell Biol., 10:329-337 (2008).
 13. Jiang, P., Enomoto, A., Takahashi, M. et al. (10人中⑩番目)
An actin-binding protein Girdin regulates the motility of breast cancer cells.
Cancer Res., 68:1310-1318 (2008).
 14. Jijiwa, M., Kawai, K., Takahashi, M. et al. (11人中⑪番目)
GDNF-mediated Signaling via RET Tyrosine 1062 is Essential for Maintenance of Spermatogonial Stem Cells.
Genes Cells, 13:365-374 (2008).
 15. Sato, T. Murakumo, Y., Takahashi, M. et al. (6人中⑥番目)
High level expression of CD109 in lung squamous cell carcinoma.
Pathol. Int. 57: 719-724 (2007).
 16. Ishida, M., Ichihara, M., Takahashi, M. et al. (11人中⑪番目)
Sprouty2 regulates growth and differentiation of human neuroblastoma cells through RET tyrosine kinase.
Cancer Sci. 98: 815-821 (2007).
 17. Asai, N., Fukuda, T., Takahashi, M. et al. (7人中⑦番目)
Targeted mutation of serine 697 in the Ret tyrosine kinase causes migration defect of enteric neural crest cells.
Development 133: 4507-4516 (2006).
 18. Uchida, M., Enomoto, A., Takahashi, M. et al. (13人中⑬番目)
Dok-4 regulates GDNF-dependent neurite outgrowth through downstream activation of Rap1 and mitogen-activated protein kinase.
J. Cell Sci. 119: 3067-3077 (2006).
 19. Enomoto, A., Murakami, H., Takahashi, M. et al. (10人中⑩番目)
Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE.
Dev. Cell 9: 389-402 (2005).
 20. Fukuda, T., Asai, N., Enomoto, A., and Takahashi, M.
Activation of c-Jun amino-terminal kinase by GDNF induces G2/M cell cycle delay linked with actin reorganization.
Genes Cells 10: 655-663 (2005).
- [学会発表] (計 18 件)
1. 高橋雅英, 浅井直也
依存性受容体としてのRETチロシンキナーゼの機能と腸管神経系の発生
第62回日本自律神経学会総会 2009年11月5日(和歌山)
 2. 高橋雅英
Aktの基質蛋白Girdinの細胞運動における役割
第82回日本生化学会大会 2009年10月23日(神戸)
 3. Takahashi, M.
Role of an actin-binding protein Girdin in cancer cell motility and angiogenesis.
Global Center of Excellence (COE) Program, 1st International Symposium Signaling of Cancer Cells
January 23, 2009 (Nagoya)
 4. 高橋雅英
アクチン結合蛋白Girdinのがん転移、血

- 管新生、神経系における機能
第1回グローバルCOE国内シンポジウム
2008年11月14日(名古屋)
5. 高橋雅英、長谷川太作、榎本篤、加藤琢哉、石田麻紀、時々輪真由美、浅井直也、村雲芳樹、後藤秀実
RETチロシンキナーゼのシグナル伝達と発がん
第67回日本癌学会学術総会 2008年10月29日(名古屋)
 6. 高橋雅英
Aktの新規基質 Girdin の細胞運動と血管新生における役割
第5回日本病理学会カンファレンス「がん」と「幹細胞」 2008年8月1日(湘南国際村)
 7. 高橋雅英
Aktの新規基質 Girdin の細胞運動と血管新生における役割
第3次対がん10か年総合戦略
第2回合同シンポジウム「がんの罹患率と死亡率の激減を目指して」
2008年2月29日(東京)
 8. Takahashi, M.
Role of a new Akt substrate, Girdin in cancer and angiogenesis.
The 21st Century COE program,
4th international symposium on functional molecules linked to neurogeneration and oncogenesis -Towards molecular targeted therapy-
October 25-26, 2007 (Nagoya)
 9. 高橋雅英、浅井直也
依存性受容体としてのRETチロシンキナーゼの機能解析
第66回日本癌学会総会 2007年10月3日(横浜)
 10. 高橋雅英
RETチロシンキナーゼを介したシグナル伝達と発がん
第52回日本人類遺伝学会大会 2007年9月15日(東京)
 11. Takahashi, M.
Role of a new Akt substrate, Girdin in cancer and angiogenesis.
Kyoto 21st Century COE international symposium 2007
Genomic analysis of disease model animals with multiple genetic alterations
June 1-2, 2007 (Kyoto)
 12. 高橋雅英
形態形成と病態の発症に関わるGDNF/RETシグナル伝達系の個体レベルでの解析
第53回日本実験動物学会総会 2006年5月12日(神戸)
 13. 高橋雅英
増殖因子シグナルと細胞運動
第3回21世紀COE国内シンポジウム
神経疾患・悪性腫瘍に共通する病態機能分子 2005年7月1日(名古屋)
- [産業財産権]
○出願状況(計2件)
1. 名称: アクチン結合タンパク質の細胞運動関連疾患への利用
発明者: 高橋雅英、榎本篤、室原豊明
権利者: 国立大学法人名古屋大学
種類: 特許
番号: 特願2006-060330
出願年月日: 2006年3月6日
国内外の別: 国内
 2. 名称: Application of actin-binding protein to disease associated with cell motility
発明者: Masahide Takahashi, Atsushi Enomoto, Toyooki Murohara
権利者: Nagoya University
種類: 特許
番号: US12/085, 142
出願年月日: 2006年11月10日
国内外の別: 国外
- [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
高橋 雅英 (TAKAHASHI MASAHIDE)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 40183446