

平成 22 年 6 月 23 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17014062

研究課題名（和文）DNA 損傷応答の分子機構とがん化によるその破綻

研究課題名（英文）Molecular mechanism of DNA damage-induced responses and its failure by carcinogenesis

研究代表者

南 康博 (MINAMI YASUHIRO)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70229772

研究成果の概要（和文）：DNA 損傷時に癌抑制遺伝子産物 ATM, Chk1, Chk2 キナーゼがリン酸化・活性化されチェックポイント機構が作動し、その後 p53 依存的に発現誘導される癌遺伝子産物 Wip1 ホスファターゼがこれらのキナーゼを脱リン酸化・不活化することにより作動したチェックポイント機構が解除されることが明らかになった。また、骨肉腫細胞等では、Wnt5a/Ror2 シグナルが恒常的に活性化しており、マトリックスメタロプロテアーゼ<sup>1,3</sup> が発現誘導される結果、浸潤能が亢進することが示された。

研究成果の概要（英文）：It has been shown that following DNA damage anti-oncogenic protein kinases, including ATM, Chk1 and Chk2 kinases, are phosphorylated and activated, thereby executing checkpoint machinery, leading to cell-cycle arrest. Subsequently, oncogenic Wip1 phosphatase are induced by p53, and dephosphorylates and inactivates phosphorylated protein kinases, thereby re-starts arrested cell-cycle. In addition, we have shown that in osteosarcoma cell lines constitutively active Wnt5a/Ror2 signaling induces matrix metalloproteinase-13, thereby confers invasive properties on osteosarcoma cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	14,300,000	0	14,300,000
2006 年度	13,900,000	0	13,900,000
2007 年度	13,900,000	0	13,900,000
2008 年度	13,900,000	0	13,900,000
2009 年度	13,900,000	0	13,900,000
総計	69,900,000	0	69,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：DNA 損傷応答、シグナル伝達、がん化、Chk2 キナーゼ、Wip1 ホスファターゼ、Wnt5a/Ror2 シグナル、がんの浸潤

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究開始当初においては、DNA 損傷に伴い、ATM (ataxia telangiectasia-mutated) キナーゼが自己リン酸化・活性化され、活性

化された ATM キナーゼが、チェックポイントキナーゼである Chk1, Chk2 をリン酸化により活性化することで、細胞周期チェックポイント機構が作動し、細胞周期停止またはアポ

トーンシスが誘導されることが明らかになっていた。また、DNA 損傷によるこれらのキナーゼのリン酸化部位は、S(セリン)Q(グルタミン)配列または T(スレオニン)Q(グルタミン)配列の S(セリン)または T(スレオニン)残基であることが見出されていた。既に、これらのキナーゼは癌抑制遺伝子産物として知られており、これらの発現・機能の欠失はがん化をもたらすことが知られていたが、DNA 損傷により作動したチェックポイント機構が、例えば DNA 損傷修復後、どのような仕組みで抑制され、細胞周期が再開するようになるかについては全く不明であった。

(2) 分泌タンパク質である Wnt ファミリー分子の一員である Wnt5a は、b カテニン非依存的な Wnt シグナル伝達を司り、細胞極性・細胞移動を制御することが知られていたが、Wnt5a によるシグナル伝達とがんとの関連については不明であった。本研究開始前に、我々は受容体チロシンキナーゼファミリーの一員である Ror2 が Wnt5a の受容体として機能し、細胞移動を制御することを見出していたが、Ror2 とがんとの関連についても不明であった。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究においては、DNA 損傷時の細胞周期チェックポイント制御機構作動の分子機構を明らかにするとともに、(DNA 損傷修復後)の作動したチェックポイント機構の解除の分子機構を解明することを目的とした。チェックポイント機能の作動・解除の分子機構の破綻はがん化等と密接に関連することが予想されるので、本研究では DNA 損傷応答のシグナル伝達異常と諸種のがんとの関連の解明も目指す。

(2) 本研究においては、細胞極性・細胞移動を制御する Wnt5a/Ror2 シグナル伝達の分子機構の解明とこのシグナル伝達の異常とがんとの関連の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) DNA 損傷時の細胞周期チェックポイントの制御機構とその異常とがんとの関連解析

① DNA 損傷により作動したチェックポイント機構を解除する分子の探索・同定: Chk2 を bait とした yeast two-hybrid 解析を行い、Chk2 と物理的に共役する分子の探索を行う。また、同定に成功した分子については、実際に培養細胞における分子間結合を検証するとともに、それらの分子についての機能解析を行う。

② DNA 損傷によるチェックポイント機能の作動・解除に関わる分子の機能と構造機能関連解析: Chk2 および Chk2 と会合する分子の DNA 損傷応答における機能解析を分子細胞生物学的・生化学的手法を駆使して行う。さら

に、Chk2 および Chk2 会合分子について、分子内機能ドメインを明らかにするとともに、ドメイン欠失変異体等を構築し培養細胞に発現させ、両分子の構造機能関連解析を行う。

③ DNA 損傷応答に関わる分子を標的としたがん治療薬の作用機構の解析: オール・トランス・レチノイン酸(ATRA)に耐性となった急性前骨髄球性白血病(APL)の治療に用いられている亜砒酸(三酸化砒素: トリセノックス)の標的となる分子を DNA 損傷応答シグナル系において探索する。

(2) Wnt5a/Ror2 シグナル伝達の分子機構解析とその異常とがんの浸潤との関連解析

① Wnt5a/Ror2 シグナルによる細胞極性細胞移動の分子機構の解析: NIH3T3 細胞などの培養線維芽細胞を用いた *in vitro* 創傷治癒モデル実験を行い、Wnt5a/Ror2 シグナルによる極性を持った細胞移動制御機構を細胞生物学的手法により解析する。

② Wnt5a/Ror2 シグナルの異常と骨肉腫細胞の浸潤との関連解析: 骨肉腫細胞株(SaOS-2, U2OS 細胞)における Wnt5a/Ror2 シグナルの異常の有無を解析するとともに、細胞生物学的手法(マトリゲル浸潤アッセイ等)を用いて、Wnt5a/Ror2 シグナルの異常と骨肉腫細胞の浸潤能の関連を解析する。また、4. 研究成果の項に記載したように、骨肉腫細胞では Wnt5a/Ror2 シグナルが恒常的に活性化しているが、このシグナルの標的遺伝子を明らかにする目的で、培養細胞において Wnt5a または Ror2 の発現を siRNA を用いたノックダウンにより抑制し、DNA マイクロアレイ解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) DNA 損傷時の細胞周期チェックポイントの制御機構とその異常とがんとの関連解析

① DNA 損傷により作動したチェックポイント機構を解除する Wip1 ホスファターゼの同定: Chk2 キナーゼを bait とした yeast two-hybrid 解析により、Chk2 会合分子として、核内に局在する癌遺伝子産物である Wip1 ホスファターゼを同定した(Wip1 は DNA 損傷時に p53 依存的に発現誘導されることが、他のグループにより報告されている)。実際、Chk2 と Wip1 は核内に共局在し、会合していることが見出された、DNA 損傷により、ATM, Chk1, Chk2 キナーゼは SQ, TQ 配列の S または T が ATM によりリン酸化されることが知られていたが、Wip1 はこれらの(SQ, TQ 配列において)リン酸化された S または T を脱リン酸化することにより、これらのキナーゼを不活化することが明らかとなった。

② DNA 損傷によるチェックポイント機能の作動・解除に関わる Chk2, Wip1 の構造機能関連解析: Chk2, Wip1 分子内の各ドメインの

欠変異体を構築し、培養細胞に発現させることにより、両分子間の会合を解析したところ、Chk2のSQ/TQドメインを含むN末端側領域とWip1のN末端側ドメインが両者の会合に必要十分であることが明らかになった。前記のように、Wip1はリン酸化・活性化されたATM, Chk1, Chk2を脱リン酸化することにより不活化するが、一方活性化されたChk2はWip1の46番目のS(セリン)残基をリン酸化することにより、Wip1の機能を制御することが見出された。46番目のSがリン酸化されたWip1はWip1は、14-3-3g, 14-3-3ξと会合することが示され、Wip1と14-3-3との会合がWip1の機能制御に重要であることが示唆される。

③ ATRA耐性のAPL治療薬である亜硫酸の作用機構解析：亜硫酸は、酸化ストレスを惹起してATM(及びATR), Chk1, Chk2を活性化しチェックポイント機構を作動させるとともに、Wip1に直接に作用し、そのホスファターゼ活性を抑制することにより最終的にアポトーシスを誘導することが明らかになった。また、構造解析による亜硫酸のWip1結合部位の予測により、亜硫酸はWip1ホスファターゼの活性中心に結合することが示唆された。亜硫酸は正常細胞においても酸化ストレスを惹起するが、今後亜硫酸をリード化合物とし、Wip1の阻害するが、酸化ストレスを惹起することのない化合物を探索することにより、より適切な治療薬の開発に繋がることが期待される。

(2) Wnt5a/Ror2シグナル伝達の分子機構解析とその異常とがんの浸潤との関連解析

① Wnt5a/Ror2シグナルによる細胞極性・細胞移動の分子機構の解析：NIH3T3細胞などの線維芽細胞を用いた*in vitro*創傷治療モデル実験により、創傷部位に位置する(創傷末端)細胞において、Wnt5a刺激によりRor2を介して極性を持った細胞移動が亢進することが明らかになった。細胞極性については、創傷末端での細胞に見られる極性をもった(アクチン重合による)葉状突起の形成、安定化微小管の局在、および微小管形成中心(MTOC)の再配向を指標として解析した。このWnt5a/Ror2シグナルによる極性を持った細胞移動では、Ror2の細胞内領域に結合したアクチン結合タンパク質フィラミンA(FLNa)がシグナル伝達の足場として重要な役割を担うこと、ならびにFLNa依存的にJNK(c-Jun N-terminal kinase)が活性化されることが必須であることが見出された。さらに、Wnt5a/Ror2シグナルは、創傷により活性化されるPas/aPKC(PKCz)シグナルと協調的に作用することが明らかとなった。

② Wnt5a/Ror2シグナルの異常と骨肉腫細胞の浸潤との関連解析：骨肉腫細胞株(SaOS-2,

U2OS細胞)においては、構成的にWnt5aおよびRor2が発現しており、その結果恒常的にWnt5a/Ror2シグナルが活性化していることによりがん細胞の浸潤能が亢進していることが見出された。実際、これらの細胞においてWnt5aまたはRor2の発現をノックダウンにより抑制すると、浸潤能は顕著に減弱した。また、DNAマイクロアレイ解析の結果、骨肉腫細胞株SaOS-2におけるWnt5a/Ror2シグナルの標的遺伝子の1つとして*matrix metalloproteinase-13(MMP-13)*遺伝子を同定することに成功した。Wnt5aあるいはRor2の発現を抑制すると、MMP-13の発現量(mRNA・タンパク質レベル)が減少する。さらに、Wnt5a/Ror2シグナルによるMMP-13の発現誘導には、Srcチロシンキナーゼが関与しており、Wnt5a/Ror2/Src/MMP-13シグナル経路が浸潤能の亢進に必須の役割を担うことが明らかになった。今後このシグナル経路の分子を標的とする治療薬の開発が期待される。

## 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14件)

① Nishita, M., Enomoto, M., Yamagata, K., Minami, Y.: Cell/tissue-tropic functions of Wnt5a signaling in normal and cancer cells. **Trends in Cell Biol.** 20: 346-354, 2010. 査読有

② Yamada, M., Udagawa, J., Matsumoto, A., Hashimoto, R., Nishita, M., Minami, Y., Otani, H.: Ror2 is required for midgut elongation during mouse development. **Dev. Dyn.** 239: 941-953, 2010. 査読有

③ Minami, Y., Oishi, I., Endo, M., Nishita, M.: The Ror-family receptor tyrosine kinases in non-canonical Wnt signaling: Their implications in developmental morphogenesis and human diseases. **Dev. Dyn.** 239: 1-15, 2010. 査読有

④ Mikels, A., Minami, Y., Nusse, R.: The Ror2 receptor requires tyrosine kinase activity to mediate Wnt5a signaling. **J. Biol. Chem.** 284:30167-30176, 2009. 査読有

⑤ Enomoto, M., Hayakawa, S., Itsukushima, S., Dayong, R., Matsuo, M., Tamada, K., Oneyama, C., Okada, M., Takumi, T., Nishita, M., Minami, Y.: Autonomous regulation of osteosarcoma cell invasiveness by Wnt5a/Ror2 signaling. **Oncogene** 28: 3197-3208, 2009. 査読有

⑥ He, F., Xiong, W., Yu, X., Espinoza, R., Liu, C., Nishita, M., Yamada, G., Minami, Y., Chen, Y.: Wnt5a regulates directional

cell migration and cell proliferation via the Ror2-mediated noncanonical pathway in mammalian palate development. **Development** 135: 3871-3879, 2008. 査読有

⑦ Nomachi, A., Nishita, M., Inaba, D., Enomoto, M., Hamasaki, M., Minami, Y.: Receptor tyrosine kinase Ror2 mediates Wnt5a-induced polarized cell migration by activating c-Jun N-terminal kinase via actin-binding protein filamin A. **J. Biol. Chem.** 283: 27973-27981, 2008. 査読有

⑧ Yoda, A., Toyoshima, K., Watanabe, Y., Onishi, N., Hasaka, Y., Tsukuda, Y., Tsukada, J., Kondo, T., Tanaka, Y., Minami, Y.: Arsenic trioxide augments Chk2/p53-mediated apoptosis by inhibiting oncogenic Wip1 phosphatase. **J. Biol. Chem.** 283: 18969-18979, 2008. 査読有

⑨ Yamamoto, S., Nishimura, O., Misaki, K., Nishita, M., Minami, Y., Yonemura, S., Tarui, H., Sasaki, H.: Cthrc1 selectively activates planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing Wnt-receptor complex. **Dev. Cell** 15: 23-36, 2008. 査読有

⑩ Kani, S., Nakayama, E., Yoda, A., Onishi, N., Sougawa, N., Hazaka, Y., Umeda, T., Takeda, K., Ichijo, H., Hamada, Y., Minami, Y.: Chk2 kinase is required for methylglyoxal-induced G2/M cell-cycle checkpoint arrest: implication of cell-cycle checkpoint regulation in diabetic oxidative stress signaling. **Genes Cells** 12: 919-928, 2007. 査読有

⑪ Nishita, M., Yoo, S-K., Nomachi, A., Kani, S., Sougawa, N., Ohta, Y., Takada, S., Kikuchi, A., Minami, Y.: Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. **J. Cell. Biol.** 175: 555-562, 2006. 査読有

⑫ Shreeram, S., Demidov, O. N., Hee, W. K., Yamaguchi, H., Onishi, N., Kek, C., Timofeev, O. N., Dudgeon, C., Fornace, A. J., Anderson, C. W., Minami, Y., Appella, E., Bulavin, D. V.: Wip1 phosphatase modulates ATM-dependent signaling pathways. **Mol. Cell** 23: 757-764, 2006. 査読有

⑬ Yoda, A., Xu, X. Z., Fujimoto, H., Kato, N., Onishi, N., Oishi, I., Minami, Y.: Intrinsic kinase activity and SQ/TQ cluster domain of Chk2 kinase as well as N-terminal domain of Wip1 phosphatase are required for regulation of Chk2 by Wip1. **J. Biol. Chem.** 281: 24847-24862, 2006. 査読有

⑭ Fujimoto, H., Onishi, N., Kato, N., Takekawa, M., Xu, X. Z., Kosugi, A., Kondo, T., Oishi, I., Yoda, A., Imamura, M., Minami, Y.: Regulation of the anti-oncogenic Chk2 kinase by the oncogenic Wip1 phosphatase. **Cell Death Differ.** 13: 1170-1180, 2006. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 南 康博 (代表)、「Wnt5a-Ror2 シグナルによる細胞極性・移動制御とがんの浸潤」、第 62 回日本細胞生物学会大会 (ミニシンポジウム)、2010 年 5 月 20 日、大阪国際会議場
- ② 南 康博 (代表)、「Wnt5a・Ror2 受容体チロシンキナーゼによる細胞極性・移動制御におけるタンパク質リン酸化の役割」、第 82 回日本生化学会大会 (シンポジウム)、2009 年 10 月 21 日、神戸ポートアイランド国際会議場
- ③ 西田 満、南 康博、「Wnt5a/Ror2 シグナルによる細胞運動制御」、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (シンポジウム)、2008 年 12 月 12 日、神戸ポートピアホテル
- ④ Yasuhiro Minami、「Role of Ror2 receptor tyrosine kinase and its in invasion and metastasis of osteosarcoma cells」、2nd The Japn-Korea Joint Meeting on Wnt signaling and human diseases、2008 年 11 月 21 日、Hiroshima Univ. Hiroshima
- ⑤ Yasuhiro Minami、「Ror2 receptor tyrosine kinase and its implication in human diseases」、1st The Japn-Korea Joint Meeting on Wnt signaling and human diseases、2007 年 10 月 26 日、Yonsei Univ. Korea
- ⑥ 南 康博 (代表)、「DNA 損傷に伴う細胞周期チェックポイントの作動・解除及びアポトーシスの制御機構とがんの分子標的治療への応用」、第 64 回日本癌学会学術総会 (シンポジウム)、2005 年 9 月 15 日、ロイトン札幌

[図書] (計 1 件)

① 西田 満、依田 成玄、南 康博: イラストレイテッド生化学 原著 4 版 "Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry 4th ed. (石崎 泰樹、丸山 敬監訳)、丸善 (株) 出版 (2008) (翻訳)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

南 康博 (MINAMI YASUHIRO)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70229772

### (2) 研究分担者

依田 成玄 (YODA AKINORI)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70335454

西田 満 (NISHITA MICHIRU)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30379359

遠藤 光晴 (ENDO MITSUHARU)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90436444

山形 薫 (YAMAGATA KAORU)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80533786

### (3) 連携研究者

該当なし