

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08641

研究課題名(和文) Ras変異体が誘導する新規チロシンリン酸化シグナルとがん悪性化の新機構

研究課題名(英文) The novel oncogenic signal with tyrosine phosphorylation induced by Ras

研究代表者

太田 聡 (Ohta, Satoshi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：40528428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、新規発がんシグナルRas/IL-33経路における受容体型チロシンキナーゼMerの役割の解明を目的とした。これまでに、私たちは、がん化型Ras(G12V)変異体による細胞の形質転換ではIL-33依存的にMerの発現が亢進することを見出した。本研究では、Ras(G12V)が誘導する細胞遊走能にIL-33とMerが必要であることがわかった。また、Ras(G12V)のシグナルによりMerのリン酸化が亢進し、Merのキナーゼ活性はRasによる細胞遊走能の促進に必要であることがわかった。以上のことから、Ras/IL-33経路は、Merを介してがんの発症と悪性化を結びつけていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Ras遺伝子の変異によるRasシグナルの異常な活性化は、多くのがんの原因となることが知られており、特に難治性がんの一つである膵がんでは約90%の患者でRas遺伝子の変異が見つかっている。Rasの下流シグナルについてもMAPキナーゼをはじめとして多くの知見が集積している一方で、MAPキナーゼ経路を標的とした抗がん剤治療には、耐性を示す患者も多く存在する。本研究によって新規Rasシグナルの構成因子とその機能が明らかになることは、今後の抗がん剤開発において重要な基盤となると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we attempted to clarify the role of Mer tyrosine kinase (Mer) in the novel oncogenic signal, Ras/IL-33 pathway. In the previous study, we concluded that Ras accelerates the expression of Mer in depending on IL-33. We found that IL-33 and Mer were required for Ras-induced cellular migration. Ras signal promoted the phosphorylation of Mer and the kinase activity of Mer was necessary for Ras-induced cellular migration. Taken together, it is suggested that Ras/IL-33 pathway contributes the cancer malignant progression via Mer tyrosine kinase.

研究分野：細胞内シグナル伝達系

キーワード：Ras Mer IL-33 がんの悪性化 がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RAS 遺伝子の突然変異は多くのがん発症の原因となるため、Ras を起点とする発がんシグナルを標的とした新しい治療薬の開発が求められている。Ras は低分子量 G タンパク質であり、Ras(G12V)などのがん化型 Ras 変異体は、ERK 経路と AKT 経路を恒常的に活性化し細胞増殖を促進する。さらに、浸潤・転移能を獲得した細胞は、悪性化へと進行する。これまでに開発された ERK 経路と AKT 経路の構成分子を標的とする抗がん剤は、Ras の異常による発がんシグナルを完全に抑制できていない。そのため、他の Ras を起点とした発がんシグナルを明らかにすることが重要になっている。また、Ras の活性化とがんの悪性化との関連が報告されており、その分子メカニズムの解明が急務である。

最近になり、私たちは、がん化型 Ras(G12V)変異体による細胞の形質転換では、サイトカイン IL-33 前駆体の発現が亢進し、その IL-33 前駆体が形質転換に必須であることを見出した (Ohta S. *et al.*, 2016)。さらに、この Ras/IL-33 経路依存的に発現が更新する遺伝子として受容体型チロシンキナーゼ Mer を同定した。以上のことから、Ras/IL-33 経路の下流で Mer ががんの発症や悪性化に関わることが示唆された。

2. 研究の目的

上記の通り私たちは、新規の Ras シグナルである Ras/IL-33 経路依存的に Mer の発現が亢進することを見出した。Mer はさまざまながん細胞、がん組織において発現が亢進しており、細胞増殖や細胞遊走に関わることから、がんの発生、転移、悪性化および予後に重要な役割をもつと考えられる。よって、Ras/IL-33 経路が Mer を介してがんの発生と悪性化を結びつけていることが予想された。本研究は、Ras/IL-33 経路における Mer の機能を明らかにすることを目的として行われた。

3. 研究の方法

(1) Ras(G12V)による細胞の細胞遊走能に対する Mer の作用の解析

Mer の細胞遊走能に対する作用を検討するため、Mer の発現を抑制した細胞について Ras(G12V)による細胞遊走能をボイデンチャンパー法で調べた。また、Mer が Ras/IL-33 経路の下流で機能しているのか検討するため、まず、IL-33 の発現を抑制することで Ras(G12V)による細胞遊走能および Mer の発現を阻害した細胞を作製した。この細胞に、Mer を過剰発現させ、細胞遊走能が回復するかをボイデンチャンパー法で調べた。

(2) 既知の Ras の発がんシグナルに Mer が作用しているか検討するため、まず、Mer の発現を抑制した細胞について、Ras の下流に位置する既知の細胞増殖因子 ERK、AKT、および細胞遊走因子 Pak1 の活性化状態を、リン酸化を指標に調べた。さらに、細胞遊走時に形成される特徴的な構造の糸状仮足と葉状仮足を、細胞遊走因子アクチンと Cdc42 および Rac の免疫染色により調べた。

(3) 一般に、受容体型チロシンキナーゼの活性化は、リガンドの結合、二量体化、自己リン酸化の過程からなる。まず、Mer のリン酸化状態を調べるため、Ras(G12V)により形質転換した

細胞の抽出液から得た Mer の免疫沈降物について抗リン酸化チロシン抗体によるイムノブロットを行った。次に、Mer の自己リン酸化状態を解析するため、Mer のキナーゼドメイン内の ATP 結合部位に変異を導入した変異体を発現させた細胞を作製し、Ras(G12V)による細胞遊走能を解析した。

- (4) Mer のファミリー分子として、受容体型チロシンキナーゼの Axl と Tyro3 が知られている。また、Mer のリガンドとして Gas6 と Protein S が知られている。そこで、Ras/IL-33 経路によって、Axl、Tyro3、Gas6、Protein S の発現が Mer と同様に亢進するのか検討した。まず、Ras(G12V)により形質転換した細胞について IL-33 の発現を抑制し、つぎに、各タンパク質の発現を qPCR により解析した。
- (5) Mer の活性化因子と Mer の下流でシグナルを受けとる因子を同定するため、FLAG タグを付加した Mer の組換えタンパク質を発現させた細胞の抽出液から Mer 複合体を精製し、Mer 結合タンパク質を質量分析計により同定した。次に、Mer 結合タンパク質の発現系を構築し、Mer と Mer 結合タンパク質との相互作用を免疫沈降法により検討した。

4 . 研究成果

私たちは、これまでに、Ras(G12V)の発現により形質転換したマウス線維芽細胞 NIH-3T3 細胞では、IL-33 とともに受容体型チロシンキナーゼ Mer の発現が増加すること、さらに、IL-33 の発現を抑制すると Mer の発現は転写レベルで抑制されることを見出している。Mer のファミリータンパク質である受容体型チロシンキナーゼの Axl と Tyro3、および、Mer のリガンドである Gas6 と Protein S の発現量を qPCR で調べたところ、Ras(G12V)の発現と IL-33 の発現抑制の双方で発現量に変化はみられなかった。

IL-33 は受容体 ST2L に結合しサイトカインとして機能することから、Mer の発現亢進が IL-33/ST2L 経路に依存するのか検討した。ST2L の発現を抑制したところ、Ras(G12V)による Mer の発現量に影響はみられなかった。このことから、Ras/IL-33 経路による Mer の発現亢進に ST2L は関与しないことが明らかとなった。

Mer は細胞遊走に関わることから、Ras (G12V)による細胞遊走能に対する Mer の影響をポイデンチャンパー法により検討したところ、IL-33 または Mer の発現を抑制した細胞では細胞遊走能が低下することがわかった。この IL-33 の発現抑制による細胞遊走能の低下は、Mer の過剰発現により回復した。

ヒト細胞においても IL-33 と Mer が Ras による細胞遊走を促進するか調べるため、多くのがんでは変異が見出される Ras ファミリーの一つである K-Ras に変異をもつヒト細胞株 A549 細胞を用いて解析を行った。その結果、A549 細胞においても IL-33 と Mer の発現抑制により細胞遊走能の低下が見られた。また、Mer の阻害剤 UNC569 で処理した NIH-3T3 細胞と A549 細胞では、双方において細胞遊走能が阻害された。

以上のことから、Mer は Ras/IL-33 経路下で細胞遊走の制御に関わると考えられ、Ras/IL-33 経路の発がんシグナルは、Mer を介してがんの発症と悪性化を結びつけていることが示唆された。

次に、受容体型チロシンキナーゼである Mer のリン酸化とキナーゼ活性の、Ras (G12V)が誘導する細胞遊走能に対する影響を検討した。まず、shRNA を用いて Mer または IL-33 の発現を抑

制した細胞に、shRNA 耐性の野生型 Mer または Mer のキナーゼ不活性型変異体を発現させた。次に、それぞれの免疫沈降産物について抗リン酸化抗体でイムノブロットしたところ、野生型 Mer のみが Ras (G12V)により形質転換した細胞において強くリン酸化されることがわかった。また、IL-33 の発現抑制による Ras (G12V)の細胞遊走能の低下を野生型 Mer の発現は回復できたが、キナーゼ不活性型変異体の発現は回復できなかった。以上のことから、Ras/IL-33 経路によって Mer は発現誘導されるとともにリン酸化され、Mer のキナーゼ活性は Ras による細胞遊走能の促進に必要であることが明らかとなった。

さらに、Ras/IL-33/Mer 経路の下流で機能する因子を探索するため、Mer を過剰発現させた細胞の抽出液から Mer 複合体を精製し、その構成因子を質量分析計により同定した。その結果、新規の Mer 結合タンパク質として、STK38 と ARHGAP18 を同定した。STK38 は、G1 期/S 期移行、中心体複製、分裂期の染色体整列といった細胞周期の進行への関与が報告されている。ARHGAP18 は、RhoGTP アーゼ活性化タンパク質であり、細胞の遊走と浸潤を促進するとの報告がある。以上のことから、Ras/IL-33 経路は、その下流のシグナル分子である Mer と STK38、ARHGAP18 を介して形質転換と細胞遊走に必要なシグナルを送っていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tago K, Funakoshi-Tago M, Ohta S, Kawata H, Saitoh H, Horie H, Aoki-Ohmura C, Yamauchi J, Tanaka A, Matsugi J, Yanagisawa K.	4. 巻 13(11)
2. 論文標題 Oncogenic Ras mutant causes the hyper-activation of NF- κ B via acceleration of its transcriptional activation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Oncol.	6. 最初と最後の頁 2493-2510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1878-0261.12580.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tago K, Ohta S, Funakoshi-Tago M, Aoki-Ohmura C, Matsugi J, Tominaga SI, Yanagisawa K.	4. 巻 7
2. 論文標題 STAT3 and ERK pathways are involved in cell growth stimulation of the ST2/IL1RL1 promoter.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio.	6. 最初と最後の頁 293-302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tago K, Ohta S, Kashiwada M, Funakoshi-Tago M, Matsugi J, Tominaga SI, Yanagisawa K.	4. 巻 3
2. 論文標題 ST2 gene products critically contribute to cellular transformation caused by an oncogenic Ras mutant	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e00436-e00436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2017.e00436	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawashima A, Karasawa T, Tago K, Kimura H, Kamata R, Usui-Kawanishi F, Watanabe S, Ohta S, Funakoshi-Tago M, Yanagisawa K, Kasahara T, Suzuki K, Takahashi M.	4. 巻 199
2. 論文標題 ARH2 Ubiquitinates NLRP3 and Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Immunol	6. 最初と最後の頁 3614-3622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1700184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細胞遊走を亢進する新規RasシグナルRas/IL-33/MerTK経路の解析
2. 発表標題 太田聡、多胡憲治、松儀実広、柳澤健
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（福岡）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多胡 憲治、多胡 めぐみ、藤原 研、小宮根 真弓、太田 聡、大村 千尋、齊藤 博司、大多和 宏季、松儀 実広、大槻 マミ太郎、大野 伸彦、山内 淳司、柳澤 健
2. 発表標題 神経線維腫症 I型由来細胞において Rasと ARFの機能的相互作用は miR-222-3pの発現を介して p27Kip1の発現を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（福岡）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多胡 憲治、多胡 めぐみ、太田 聡、大村 千尋、松儀実広、富永眞一、柳澤健
2. 発表標題 ST2Lの新規結合タンパク質IFITM3はST2Lのリソソーム分解を介してIL-33シグナルを制御する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（横浜）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田聡、多胡憲治、松儀実広、柳澤健
2. 発表標題 受容体型チロシンキナーゼMer (MerTK)のがん化型Ras変異体が誘導する発がんシグナルにおける役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（横浜）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多胡憲治、多胡めぐみ、太田聡、大村千尋、松儀実広、柳澤健
2. 発表標題 新規K-Ras変異体は独特なシグナル伝達系を介して細胞のがん化を誘導する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（横浜）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田聡、多胡憲治、松儀実広、柳澤健
2. 発表標題 Ras変異体が誘導する発がんシグナルにおける受容体型チロシンキナーゼMer (MerTK)の機能解析
3. 学会等名 第90回日本生化学会大会・第40回日本分子生物学会年会（神戸）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 多胡憲治、多胡めぐみ、太田聡、松儀実広、柳澤健
2. 発表標題 K-Ras遺伝子の新しい突然変異は発がん活性を示す
3. 学会等名 第90回日本生化学会大会・第40回日本分子生物学会年会（神戸）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考