

平成21年6月1日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790233
 研究課題名（和文）Wnt5a-Ror2によるアクチンダイナミクスと細胞移動の制御機構の解析

研究課題名（英文）Roles of Wnt5a-Ror2 in actin dynamics and cell migration

研究代表者

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

研究成果の概要:我々は受容体型チロシンキナーゼ Ror2 が Wnt5a 受容体として Wnt5a による細胞の極性化や細胞移動に必要であることを明らかにした。また、ヒト骨肉腫細胞株において、Wnt5a または Ror2 の発現を抑制した結果、浸潤能が顕著に低下した。さらに骨肉腫細胞において Ror2 および Wnt5a によって遺伝子発現が制御される分子として、マトリックスメタロプロテアーゼ MMP-13 を同定し、MMP-13 が Wnt5a-Ror2 シグナルによる骨肉腫細胞の浸潤に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医学

キーワード：Wnt5a、Ror2、細胞移動、細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

Wnt5a と Ror2 は細胞移動に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。しかし、Wnt5a 刺激によってアクチン細胞骨格がいかにして時空間的に制御されているのか、また、がん細胞の浸潤や創傷治癒などにおける Wnt5a-Ror2 シグナルの役割など不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

Wnt5a-Ror2 シグナルによるアクチン細胞骨格の時空間的・協調的制御の基本機構を蛍光イメージング技術を用いて解明するとと

もに、がん細胞の浸潤・転移と創傷治癒における Wnt5a-Ror2 の役割を明らかにすることを目的としている

3. 研究の方法

本研究では恒常的に Wnt5a と Ror2 を発現しているヒト骨肉腫細胞株 SaOS-2 を用いて、siRNA による Ror2 または Wnt5a の発現抑制による浸潤能の変化について検討した。浸潤能の測定にはマトリゲルをコートしたトランスウェルチャンバーを用いた。また、浸潤能を有するがん細胞を細胞外基質上で培養すると、細胞外基質を分解しながら基質中に伸長

する浸潤突起(invadopodium)が観察される。蛍光標識した細胞基質上で SaOS-2 細胞を培養し、細胞外基質の分解による蛍光の消失を蛍光顕微鏡によって検出することにより、浸潤突起形成能(細胞外基質分解能)を測定した。本研究ではさらに Wnt5a/Ror2 シグナルの下流において、浸潤能の制御に関与する分子を見出すために、Ror2 の発現抑制により発現が変動する遺伝子を DNA マイクロアレイを用いて解析した。

4. 研究成果

siRNA による Ror2 の発現抑制効率をウエスタンブロット法により確認した(図 1a)。この細胞を用いて、マトリゲル浸潤解析を行ったところ、Ror2 の発現抑制細胞はコントロールに比べて有意に浸潤が抑制された(図 1b)。また、siRNA による Wnt5a の発現抑制を RT-PCR 解析によって確認した(図 1c)。Ror2 の発現抑制と同様に Wnt5a の発現抑制でも浸潤能の低下が認められた(図 1d)。

次に浸潤突起の形成能について検討した結果、siRNA による Ror2 または Wnt5a の発現抑制によって、浸潤突起を形成した細胞の割合は顕著に低下した(図 2)。以上より、SaOS-2 細胞では Wnt5a/Ror2 シグナルが浸潤突起形成、細胞外基質の分解を誘導し、浸潤過程に重要な役割を担っていることが示唆

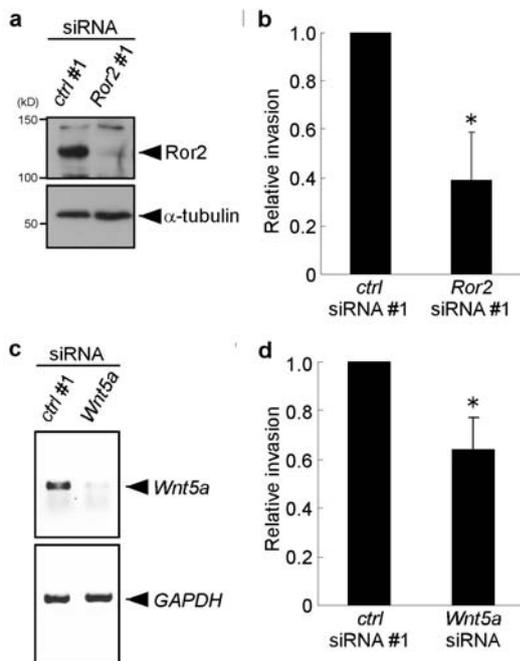


図1 Ror2 及び Wnt5a 発現抑制による SaOS-2 細胞の浸潤抑制

された。

Wnt5a/Ror2 シグナルの下流において、浸潤能の制御に関与する分子を見出すために、

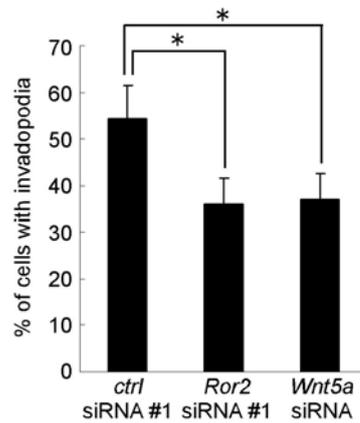


図2 Ror2 及び Wnt5a の発現抑制による浸潤突起形成の阻害

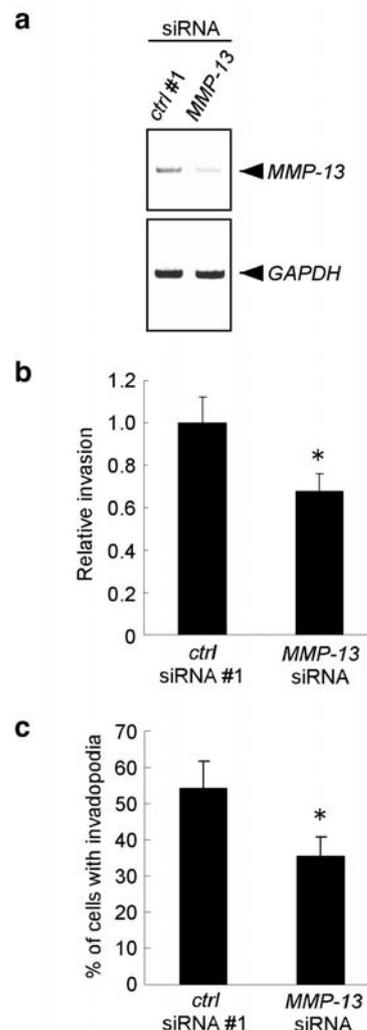


図3 MMP-13 の発現抑制による SaOS-2 細胞の浸潤能の阻害

Ror2 の発現抑制により発現が変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ解析によって検討した結果、Ror2 の発現抑制により Matrix Metalloproteinase (MMP)-13 の発現が 0.29 倍

に減弱することが見出された。SaOS-2 細胞の浸潤における MMP-13 の役割を明らかにするために、siRNA を用いて MMP-13 の発現抑制を行い、その効果を RT-PCR 解析で確認した (図 3a)。MMP-13 の発現抑制細胞では、Ror2 や Wnt5a の発現抑制細胞と同様に、細胞浸潤及び浸潤突起形成が抑制された (図 3b, c)。したがって、SaOS-2 細胞の浸潤には MMP-13 が重要であることが明らかになった。以上の結果から、骨肉腫細胞において Wnt5a/Ror2 シグナルは MMP-13 の遺伝子発現を介して浸潤突起形成を誘導し、がん細胞の浸潤を促進していることが示唆された。

骨肉腫は小児に好発する悪性腫瘍で、診断時、30%の症例に転移を認め、また、5年生存率は転移がない場合は 60-70%であるが、転移がある場合は 20-30%と、予後は転移により大きく左右される。本研究は、Wnt5a/Ror2 シグナルが骨肉腫細胞の浸潤を制御することを始めて示したものであり、骨肉腫の浸潤機構の解明にとって重要な知見になると考えられる。また、Wnt5a/Ror2 シグナルを標的とした診断法や治療法の開発を目的とした研究にも発展することが期待される。

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 5 件)

- ①. Enomoto, M., Hayakawa, S., Itsukushima, S., Ren, D., Matsuo, M., Tamada, K., Oneyama, C., Okada, M., Takumi, T., Nishita, M.*, and Minami, Y. * Autonomous regulation of osteosarcoma cell invasiveness by Wnt5a/Ror2 signaling. **Oncogene**, *In press*. (*: co-corresponding author) 査読有り
- ②. Minami, Y., Oishi, I., Endo, M., and Nishita, M. Ror-family receptor tyrosine kinases in non-canonical Wnt signaling: Their implications in developmental morphogenesis and human diseases. **Dev. Dyn.**, *In press*. 査読有り
- ③. He, F., Xiong, W., Yu, X., Espinoza-Lewis, R., Liu, C., Gu, S., Nishita, M., Suzuki, K., Yamada, G., Minami, Y., and Chen, Y. Wnt5a regulates directional cell migration and cell proliferation via Ror2-mediated noncanonical pathway in mammalian palate development. **Development**, *135*: 3871-3879, 2008 査

読有り

- ④. Nomachi, A., Nishita, M.*, Inaba, D., Enomoto, M., Hamasaki, M., and 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. (*: co-corresponding author) 査読有り
- ⑤. Yamamoto, S., Nishimura, O., Misaki, K., Nishita, M., Minami, Y., Yonemura, S., Tarui, H., and Sasaki, H. Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. **Dev. Cell** *15*: 23-36, 2008. 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

- ①. 西田 満、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 (2008.12.12、神戸)
- ②. 西田 満、Regulation of Dishevelled in Wnt5a/Ror2 signaling. 第 2 回日韓共同研究プログラム合同ミーティング (2008.11.21、広島)
- ③. 西田満、Ror2 regulates cytoskeletal rearrangements to mediate Wnt5a-induced polarized cell migration. 第 30 回日本分子生物学会年会 (2007.12.14、横浜)
- ④. 西田 満、Role of Ror2 receptor tyrosine kinase in the regulation of Wnt5a-induced cell polarization and migration. 第 1 回日韓共同研究プログラム合同ミーティング (2007.10.26、韓国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者