

平成 21 年 6 月 22 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～ 2008
 課題番号：19890276
 研究課題名（和文） NLR family protein の生理学的および発がんにおける機能の解析
 研究課題名（英文） Analysis on the function of NLR family protein in development and tumorigenesis
 研究代表者
 高取 敦志（ATSUSHI TAKATORI）
 千葉県がんセンター（研究所）・転移制御研究室・研究員
 研究者番号：40455390

研究成果の概要：

散発性神経芽腫の進展における分子機構の解明が急がれる。これまでの解析により、千葉県がんセンターにおいて同定された NLR が神経芽腫の特性やがんの進展に深く関与することが明らかとなってきている。本研究では、NLR の機能をさらに解析した。その結果、NLR ファミリータンパクは神経芽腫の進展において増殖と分化という異なる機能を果たすことが明らかとなった。また NLR1 ノックアウトマウスの作製を行い、その予備的観察の結果 NLR1 欠損が発生に影響を及ぼすことが明らかとなってきた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,290,000 円	0 円	1,290,000 円
平成 20 年度	1,130,000 円	339,000 円	1,469,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000 円	339,000 円	2,759,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：癌、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

複雑なシグナル伝達制御のメカニズムを理解するには、受容体および受容体関連因子からその下流因子にいたるまでどのような因子がそのシグナル伝達に関与し、様々な細胞環境によってそれがどのような影響を受けるのかを明らかにする必要がある。これまで活性化した受容体と膜直下で相互作用する Sos や Ras などの因子に関する研究は多くなされてきた。しかし、受容体と細胞膜上で相

互作用するタンパクに関する研究は少ない。その中で私は、神経系細胞の発達に関与することが最近明らかとなってきている LRR タンパクに注目した。LRR ドメインは多くのタンパクに存在しており、タンパク間相互作用に関与と考えられている。この LRR ファミリータンパクの中で、神経組織特異的に発現する分子として同定されたのが neuronal LRR (NLRR) である。NLRR は 1 回膜貫通型タンパクで、リガンドは不明であり、細胞接着や受容体としての機能が予想されている

が詳しい機能についてはいまだ不明のままである。

一方、散発性神経芽腫は近年の小児腫瘍に対する集学的治療法にもかかわらず、その多くは進行性かつ難治性である。最近、当がんセンターにおいて NLRR ファミリータンパクが神経芽腫に関連する遺伝子として同定されたことから、NLRR が神経芽腫発症において何らかの機能を持つことが予想されるが、いまだその詳しいその機能については不明のままである

2. 研究の目的

本研究では、細胞膜タンパクである NLRR によって制御される受容体および受容体関連因子およびその下流のシグナル伝達経路の同定を行うとともに、NLRR の生理学的機能および発がんにおける役割を明らかにすることを目的としている。

(1) 本研究における第一の目的は、これら NLRR1 により機能制御を受ける受容体および受容体関連因子を明らかとすることである。もっとも考えられるのはタンパク間相互作用に関わると言われている LRR ドメインやその他の細胞外ドメインを介して受容体と結合する場合である。NLRR1 によってどのようなシグナル伝達が制御されているか明らかにする必要がある。

(2) NLRR1 と同様に NLRR3 についてもどのような影響を細胞に与えるかを明らかにする。

(3) NLRR1 は個体発生において特に神経系に多く発現されることから、NLRR1 が神経系の発達において何らかの役割を担っていることが予想される。また、成体においても神経系だけではなく、種々の器官・組織において NLRR1 が発現されていることが分かっている。このことから個体の発生および発達以後も NLRR1 が何らかの役割を担っていることが予想されるが、これまでのところ詳しい検索は行われていない。そこで NLRR1 の KO マウスを作出し、NLRR1 欠損が個体発生および発がんに与える影響を検索する。

3. 研究の方法

(1) NLRR1 によって制御される受容体および受容体関連因子を同定するために NLRR を過剰発現させた細胞の lysate を用いて免疫沈降法により NLRR1 と結合するタンパクを同定する。NLRR が制御するシグナル伝達経路についても、同様に NLRR1 を過剰発現させた細胞または低等度発現することが分かっている細胞株を用いて、これまで

発生や発がんに関与することが分かっている主なシグナル伝達 (JNK などの ERK 以外の MAPK、p53、AKT や mTOR など) について主に Western blot 法を用いて検索を行う。その中で NLRR1 の関与がみられたシグナル伝達に関しては NLRR1 に対する siRNA を導入することにより NLRR1 の発現を抑制し、それによるシグナル伝達への影響を同様に検索する。

(2) NLRR3 に関しても NLRR1 と同様に細胞を用いた実験系において、細胞に及ぼす影響を検索する。

(3) NLRR1 の KO マウスを作出し、NLRR1 欠損が個体発生および発がんに与える影響を検索するために、ターゲティングベクターを BAC clone (RP23#20P) を用いて作製し、マウス ES 細胞に導入後、キメラマウスを得て KO マウスを確立する。得られた KO マウスの表現型を解析する。

4. 研究成果

(1) NLRR1 の機能を *in vitro* の実験系においてさらに解析した。その結果、以下の結果が得られた。

①NLRR1 は成長因子のうち少なくとも EGF および IGF によるシグナル伝達を増強する。(図 1)

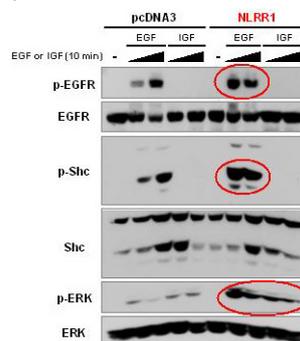


図 1 : NLRR1 は EGF および IGF シグナルの ERK 経路の活性化を促進する

②神経芽腫由来細胞株において NLRR1 の発現抑制により、EGF および IGF によるシグナル伝達および細胞増殖効果が抑制される。

③NLRR1 発現は神経芽腫の発生において重要な転写因子である N-myc により制御されている。

④NLRR1 によって増強された EGF シグナル伝達が N-myc の発現をさらに正に制御する。

(2) また、NLRR1 と同じファミリー遺伝子である NLRR3 についても解析を行った結果、以下のことが明らかとなった。

①NLRR3 は予後良好の神経芽腫において高い発現がみられるが、神経系培養細胞の分化を

誘導すると NLRR3 の発現が増加する。
 ②NLRR3 の過剰発現により分化が誘導される。
 ③NLRR3 の発現は N-myc により負に制御される。

以上のことから、NLRR1 および NLRR3 は N-myc によって正および負に制御され、神経芽腫の進展において増殖と分化という異なる機能を果たすファミリー遺伝子であることが明らかとなった。(図 2)

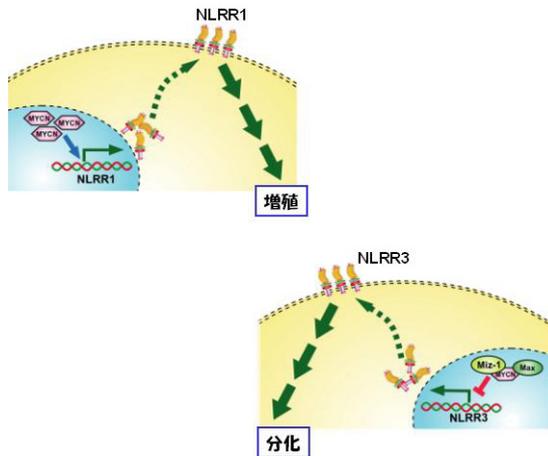


図 2 : NLRR1 および NLRR3 は神経芽腫の進展において増殖と分化という異なる機能を果たす。

(3) また、NLRR1 ノックアウトマウスの作製を行い、そのキメラマウスを得て C57BL/6 への戻し交配を開始した。その予備的観察によりこれまでに NLRR1 欠損による発生への影響を示すデータが得られてきており、NLRR1 が発生においても重要な役割を持つこと示唆された。

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 1 件)

①高取敦志、Geh E、Chen L、Zhang L、Meller J、Xia Y.
 Differential transmission of MEKK1 morphogenetic signals by JNK1 and JNK2
 Development, 135(1), 23-32 (2008), 査読有

[学会発表] (計 5 件)

①高取敦志、Shamim Hossain、Jesmin Akter、中川原章
 NLRR1 enhances cell growth signals induced by EGF and IGF in cancer cells including

neuroblastoma
 第 6 7 回日本癌学会学術総会
 平成 2 0 年 1 0 月 2 8 日
 名古屋国際会議場

②Jesmin Akter、Shamim Hossain、尾崎俊文、高取敦志、末永雄介、中村洋子、中川原章
 A novel neuronal receptor, NLRR3, is negatively regulated by MYCN and induces differentiation of neuroblastoma
 第 6 7 回日本癌学会学術総会
 平成 2 0 年 1 0 月 2 8 日
 名古屋国際会議場

③Shamim Hossain、高取敦志、Jesmin Akter、王弘、大平美紀、尾崎俊文、中川原章
 Neuronal leucine rich repeat (NLRR1) is a target gene of MYCN and regulates aggressiveness of neuroblastoma
 第 6 7 回日本癌学会学術総会
 平成 2 0 年 1 0 月 2 8 日
 名古屋国際会議場

④Shamim Hossain、高取敦志、Jesmin Akter、王弘、大平美紀、尾崎俊文、中川温子、中川原章
 MYCN directly transactivates NLRR1 gene for promoting cell proliferation in Neuroblastoma
 第 2 4 回日本小児がん学会学術集会
 平成 2 0 年 1 1 月 1 5 日
 幕張メッセ国際会議場

⑤Jesmin Akter、Shamim Hossain、尾崎俊文、高取敦志、末永雄介、中村洋子、中川温子、中川原章
 NLRR3 is negatively targeted by MYCN and induced during differentiation of neuroblastoma
 第 2 4 回日本小児がん学会学術集会
 平成 2 0 年 1 1 月 1 5 日
 幕張メッセ国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：癌の治療薬のスクリーニング法
 発明者：中川原 章、高取 敦志
 権利者：久光製薬
 種類：特許権
 番号：2008-53959
 出願年月日：2008 年 3 月 4 日
 国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高取 敦志 (ATSUSHI TAKATORI)

千葉県がんセンター（研究所）・転移制御研究室・研究員

研究者番号：40455390

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし