

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：14501  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21390080  
 研究課題名（和文） Wnt シグナル伝達における Ror1、Ror2 受容体チロシンキナーゼの機能解析  
 研究課題名（英文） Functional analyses of receptor tyrosine kinases, Ror1 and Ror2, in Wnt signaling  
 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）：ヒトをはじめとする高等哺乳動物の発生における組織や器官の形成過程では、Wnt5a という分泌されるタンパク質とそれと結合し細胞内へ信号を伝える Ror1、Ror2 という細胞膜表面に存在する受容体が重要な役割を担っている。本研究では、Wnt5a が Ror2 または Ror1 に結合することにより、組織・器官における細胞の配置や運動の極性（方向性）が制御されること、またこれらによる情報伝達の異常が、奇形や癌の浸潤などの病態をもたらす仕組みの一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In mammals, including humans, binding of an secreted protein, Wnt5a, to its cognate receptors, the receptor tyrosine kinases, Ror1 and Ror2, elicits intracellular signalings that play important roles in the morphogenesis of tissues and organs during the developmental processes. In this study, we have shown that Wnt5a-Ror1/Wnt5a-Ror2 signalings play important roles in the morphogenesis of tissues and organs by regulating cell polarity and migration, and have elucidated the relationship between abnormalities in these signalings and developmental anomalies and cancer invasion.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：Wnt5a、Ror1、Ror2、癌の浸潤、神経細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

発生過程において重要な役割を担う一群のタンパク質である Wnt ファミリー分子の中で、Wnt5a は平面内細胞極性及び収斂伸長運動を制御することにより形態形成において重要な役割を担うことやその発現亢進は癌の浸潤・転移と関連することが知られていた。我々は世界に先駆け、Wnt5a の受容体として機能する Ror1、Ror2 を同定し、これらのノックアウトマウスを作製し、これらのノック

アウトマウスにおいては、内耳、骨軟骨系、心臓、肺・気管支、外生殖器などの組織・器官の形成過程の異常が見られることを明らかにしていた。特に、Ror2 については、*Ror2* 遺伝子が劣性遺伝性 Robinow 症候群や優性遺伝性 B 型短趾症の原因遺伝子であることが報告され、我々も *Ror2* ノックアウトマウスが Robinow 症候群の疾患モデルであることを報告し（Dev. Dyn. 229: 400, 2004）、多くの注目が集まるようになった。

このような個体レベルでの研究に加え、我々は各種の培養細胞株や癌細胞株を用いた解析を行い、Wnt5a-Ror2 シグナルが、線維芽細胞では Wnt5a/JNK (c-Jun N-terminal kinase) 経路を活性化し、アクチン細胞骨格を制御することにより、極性を持った細胞運動を制御することや骨肉腫細胞株では *MMP-13* (*matrix metalloproteinase 13*) の発現誘導や浸潤突起 (invadopodium) の形成を亢進させることにより、それらの癌細胞の浸潤能を増強していること、等を明らかにした。また、これまでに遺伝学的解析から Wnt シグナルにおける重要性が指摘されていた Dishevelled (Dvl) については、Wnt5a-Ror2 シグナルにより Dvl がリン酸化を受けることや細胞質内集積を誘導されること等を見出し、そのシグナル伝達機構の解析を進めていた。一方、Wnt5a, Ror1, Ror2 は発生過程の大脳皮質において、神経幹前駆細胞 (以下、神経幹細胞) に顕著な発現が認められることを見出していたが、それらの役割については不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究においては、1. に記載した背景を踏まえて、Wnt5a-Ror1, Wnt5a-Ror2 シグナルについて、分子・細胞・組織/器官・個体レベルでの解析を行い、主に以下の(1)~(4)を明らかにすることを目的とした。

- (1) Wnt5a-Ror2 シグナルによる Dvl のリン酸化・細胞質内集積の機構解析、およびこれらの機能の解析。
- (2) 骨肉腫細胞株での Wnt5a-Ror2 シグナルによる *MMP-13* 遺伝子の発現誘導機構の解析。
- (3) Wnt5a-Ror1, Wnt5a-Ror2 シグナルの異常と奇形との関連解析。
- (4) 神経幹細胞における Wnt5a-Ror1, Wnt5a-Ror2 シグナルの機能解析。

## 3. 研究の方法

(1) Wnt5a-Ror2 シグナルによる Dvl のリン酸化・細胞質内集積の機構解析、およびこれらの機能の解析。

Ror2 及び Ror1 の発現が認められないマウス線維芽細胞である L 細胞に Ror2 (野生型及び各種変異体) と蛍光タンパク質 (GFP) と Dvl の融合タンパク質を発現させ、Wnt5a 刺激に伴う Dvl の細胞質内集積をライブイメージングにより解析した。また、Wnt5a 刺激に伴う Dvl のリン酸化については、抗 Dvl 抗体による免疫ブロット解析を行い、電気泳動における移動度のシフトを指標に解析を行った。また、この解析の過程で、Ror2 の会合分子として他の細胞膜表面タンパク質である Frizzled 7 (Fz 7) を同定したので、Ror2-Fz7 の機能解析を行った。さらに、Dvl の下流で機能するシグナル伝達分子の同定・機能解析

を分子細胞生物学的手法により行った。

(2) 骨肉腫細胞株での Wnt5a-Ror2 シグナルによる *MMP-13* 遺伝子の発現誘導機構の解析。

まず Wnt5a-Ror2 シグナルによる *MMP-13* 遺伝子の発現誘導機構を明らかにする目的で、Wnt5a-Ror2 シグナルに応答する *MMP-13* 遺伝子の上流領域のシスエレメントの検索・同定を行った。*MMP-13* 遺伝子の上流 3105bp, 1004bp および 253bp の領域をそれぞれ Luc (ルシフェラーゼ) 遺伝子に繋いだレポーターコンストラクトを作成し、骨肉腫細胞株 SaOS-2 に遺伝子導入後、Wnt5a または Ror2 の発現をそれぞれに対する siRNAs を用いて抑制し、ルシフェラーゼ活性を計測し、Wnt5a-Ror2 シグナルに応答する領域を検索した。次に、Wnt5a-Ror2 シグナルに応答する *MMP-13* 遺伝子の上流領域の中に存在する転写因子結合候補シスエレメントをデータベースにより検索し、転写因子 AP-1 と Runx2 が結合する AP1-binding site と OSE-2 site を見出したので、AP1-binding site または OSE-2 site に変異を導入したレポーターコンストラクトを構築・発現させ、ルシフェラーゼアッセイを行った。さらに、AP1-binding site が重要なシスエレメントとして同定されたので、これを含む上流領域について ChIP (chromatin-immunoprecipitation) アッセイを行い、AP1-binding site に結合する転写因子の同定を行った。加えて、生化学的解析により、このシグナル伝達経路の詳細な解析を行った。

(3) Wnt5a-Ror1, Wnt5a-Ror2 シグナルの異常と奇形との関連解析。

*Wnt5a*, *Ror1*, *Ror2* またはこれらのダブルノックアウトマウスを作製し、これまでに解析を行っていないマウス胚の組織・器官について形態学的・免疫学的解析を行った。

(4) 神経幹細胞における Wnt5a-Ror1, Wnt5a-Ror2 シグナルの機能解析。

発生過程のマウス大脳皮質より分離した初代培養系、スフィアアッセイ系、及び個体レベルでの *in-utero* electroporation 法による *Wnt5a*, *Ror1* または *Ror2* の siRNA を用いた発現抑制系を行い、神経幹細胞の幹細胞性維持における Wnt5a-Ror2 及び Wnt5a-Ror1 シグナルの役割について分化マーカーを指標にして解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) Wnt5a-Ror2 シグナルによる Dvl のリン酸化・細胞質内集積の機構解析、およびこれらの機能の解析。

Wnt5a による Dvl のリン酸化・細胞質内集積には、Ror2 が必須の役割を担うことが明らかになった。また、その際 Ror2 の細胞内領域は必要がないことが示された。そこで、Ror2 がその細胞外領域または膜貫通領域を

介して、他の細胞表面タンパク質に会合することが考えられたが、実際 Ror2 はその細胞外システイン・リッチドメインを介して、Fz7 と会合し、Ror2-Fz7 が Dvl のリン酸化・細胞質内集積に重要な役割を担うことが明らかになった。さらに、細胞質内に集積した Dvl と Rho ファミリー低分子量 G タンパク質のメンバーの 1 つである Rac1 が共局在すること、また Dvl-Rac1 を介して転写因子である AP-1 を活性化することが示された。

(2) 骨肉腫細胞株での Wnt5a-Ror2 シグナルによる *MMP-13* 遺伝子の発現誘導機構の解析。

骨肉腫細胞株 SaOS-2 において、*MMP-13* 遺伝子の上流 253bp 内に Wnt5a-Ror2 シグナルに応答する転写制御領域が存在すること、及びその領域内に存在する AP1-binding site が *MMP-13* 遺伝子の発現誘導において重要な役割を担うことが明らかになった。また、ChIP アッセイにより、c-Jun と ATF2 が AP-1 複合体として *MMP-13* 遺伝子プロモーターの AP1-binding site に結合することが見出された。加えて、Wnt5a-Ror2 シグナルにより c-Jun と ATF2 はリン酸化を受けるが、このリン酸化は JNK によることが明らかとなった。さらに、生化学的解析から、SaOS-2 細胞においては恒常的に活性化された Wnt5a-Ror2 シグナルは、Dvl2 や Rac1 を介して JNK を活性化し、それによりリン酸化された c-Jun・ATF2 複合体が *MMP-13* 遺伝子プロモーター内の AP1-binding site に結合し、*MMP-13* の発現を誘導し浸潤能を亢進させることが示された。一方、他の骨肉腫細胞株である U2OS 細胞でも構成的に Wnt5a、Ror2 が発現し、恒常的に活性化された Wnt5a-Ror2 シグナルが *MMP-13* 遺伝子の発現を誘導するが、U2OS 細胞の場合には、SaOS-2 細胞と異なり、Dvl2 ではなく、Dvl3 が重要な役割を担うことが見出された。このことから、骨肉腫細胞でも異なる癌細胞株によって、Wnt5a-Ror2 シグナルに関わるシグナル伝達分子が異なることが示唆された。

(3) Wnt5a-Ror1, Wnt5a-Ror2 シグナルの異常と奇形との関連解析。

*Ror2* ノックアウトマウスの解析から、Wnt5a-Ror2 シグナルは発生過程の中腸の伸長過程において重要な役割を担うことが明らかになった。また、*Ror1* ノックアウトマウスの詳細な検討から、Wnt5a-Ror1 シグナルは骨軟骨系や生殖器の発生に重要であること、及びマウス胚の成長に重要であることが見出された。また、*Wnt5a* ノックアウトマウス胚、*Ror1* ノックアウトマウス、*Ror2* ノックアウトマウス胚及び *Ror1*, *Ror2* ダブルノックアウトマウス胚の解析結果から、Wnt5a-Ror1, Wnt5a-Ror2 シグナルは腎・尿管の発生過程において重要な役割を担うことが示された。

(4) 神経幹細胞における Wnt5a-Ror1, Wnt5a-Ror2 シグナルの機能解析。

発生過程のマウス大脳皮質より分離した初代培養系、スフィアアッセイ系、及び個体レベルでの *in-utero* electroporation 法による *Wnt5a*, *Ror1* または *Ror2* に対する siRNA を用いた発現抑制実験を行ったところ、神経幹細胞の（対称分裂によると考えられる）神経幹細胞の維持が阻害され、ニューロン分化やグリア細胞（アストロサイト等）分化が亢進することが明らかとなった。逆に、*Ror1*, *Ror2* を *in-utero* electroporation 法により過剰発現させた場合には、神経幹細胞の幹細胞性が維持され、ニューロン産生が抑制された。また、Wnt5a-Ror1, Wnt5a-Ror2 シグナルによる神経幹細胞の幹細胞性の維持には、Wnt シグナルにおける重要なシグナル伝達分子である Dvl2 が重要な役割を担うことが明らかとなった。

## 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 13 件）（総計 16 件）

① Endo, M., Doi, R., Nishita, M., Minami, Y.: Ror-family receptor tyrosine kinases regulate maintenance of neural progenitor cells in the developing neocortex. J. Cell Sci., in press, 2012 (PMID:22328498).

② Maeda, K., Kobayashi, Y., Udagawa, N., (省略 7 名), Nishita, M., Marumo, K., Martin, T. J., Minami, Y., Takahashi, N.: Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblasts and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. Nat. Med. 18: 405-412, 2012.

③ Yamagata, K., Li, X., Ikegaki, S., Oneyama, C., Okada, M., Nishita, M., Minami, Y.: Dissection of Wnt5a-Ror2 signaling leading to *matrix metalloproteinase (MMP)-13* expression. J. Biol. Chem. 287: 1588-1599, 2012.

④ Endo, M., Nishita, M., Minami, Y.: Analysis of Wnt/Planar cell polarity pathway in cultured cells. Methods Mol. Biol. 839: 201-214,

2012.

⑤ Ren, D., Minami, Y.\*, Nishita, M.\* (corresponding authors): Critical role of Wnt5a-Ror2 signaling in motility and invasiveness of epidermoid carcinoma cells following Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Genes Cells*, 16: 304-315, 2011.

⑥ Gao, B., Song, H., (省略7名), Minami, Y., Economides, A. N., Yang, Y.: Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. *Dev. Cell* 20: 163-176, 2011.

⑦ Lyashenko, N., Weissenböck, M., Sharir, A., Erben, R. G., Minami, Y., Hartmann, C.: Mice lacking the orphan receptor Ror1 have distinct skeletal abnormalities and are growth retarded. *Dev. Dyn.* 239: 2266-2277, 2010.

⑧ Nishita, M., Itsukushima, S., Nomachi, A., Endo, M., Wang, Z-C., Inaba, D., Qiao, S., Takada, S., Kikuchi, A., Minami, Y.: Ror2/Frizzled complex mediates Wnt5a-induced AP-1 activation by regulating Dishevelled polymerization. *Mol. Cell. Biol.* 30: 3610-3619, 2010.

⑨ 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.

⑩ 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.

⑪ 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.

⑫ Mikels, A., Minami, Y., Nusse, R.: The Ror2 receptor requires tyrosine kinase activity to mediate Wnt5a signaling. *J. Biol. Chem.* 284:30167-30176, 2009.

⑬ 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.

[学会発表] (計6件)

① K. Yamagata, S. Ikegaki, X. Li, Y. Minami: Dissection of Wnt5a-Ror2 signaling leading to matrix metalloproteinase (MMP)-13 expression. 第34回日本分子生物学会年会、平成23年12月16日、パシフィコ横浜

② 遠藤光晴、土井亮助、西田満、南康博: Rorファミリー受容体型チロシンキナーゼは大脳皮質神経幹細胞の維持に働く、第34回日本分子生物学会年会、平成23年12月13日、パシフィコ横浜

③ 遠藤光晴、西田満、南康博: Ror-family receptor tyrosine kinases regulate maintenance of neural progenitor cells in the developing neocortex. 第63回日本細胞生物学会大会(ワークショップ)、平成23年6月28日、北海道大学 クラーク会館

④ 南康博、山形 薫、西田 満: 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)、平成22年5月20日、大阪国際会議場

⑤ 遠藤 光晴、任 大勇、田中 浩之、南康博: Expression and functional analysis of Ror-family RTKs during developmental neurogenesis、第32回日本分子生物学会年

会、平成 21 年 12 月 11 日、パシフィコ横浜  
⑥ 南 康博、西田 満：Wnt5a・Ror2 受容体  
型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  
回日本生化学大会（シンポジウム）、平成 21  
年 10 月 21 日、神戸国際会議場

〔図書〕（計 3 件）

- ① Endo, M., Nishita, M., Doi, R., Minami, Y.: Ror receptor family. The Receptor Tyrosine Kinase Handbook. (edited by Wheeler, D. L. and Yarden, Y.) Springer Science, in press, 2012.
- ② 遠藤 光晴、南 康博：非古典的 Wnt シグナルによる極性と幹細胞性維持の制御：生体の科学、63 巻 3 号、印刷中、2012.
- ③ 西田 満、モハメド・アンワル・ハック、南 康博：Wnt5a と Ror2 によるシグナル伝達と細胞機能制御：医学のあゆみ（生体システムとしての Wnt シグナル・ネットワーク研究）、233 巻 10 号、955-959、2010.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：疾患モデルとしての細胞種・組織特異的 Ror2 ノックアウトマウス

発明者：南 康博、西田 満、可児 修一

権利者：神戸大学

種類：特許

番号：特願 2011-071014

出願年月日：2011 年 3 月 28 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

該当なし

〔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

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

### (3) 連携研究者

遠藤 光晴 (ENDO MITSU HARU)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90436444