

## 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7日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590436

研究課題名（和文） Ret チロシンキナーゼによって誘導されるアポトーシスの解析と病態における役割

研究課題名（英文） Study of Ret proapoptotic activity and its relation with human diseases

研究代表者

浅井 直也（ASAI NAOYA）

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80273233

研究成果の概要（和文）：受容体型チロシンキナーゼである Ret は依存性受容体であり、リガンド非結合で細胞にアポトーシスを誘導する。Ret は D707 と D1017 で切断された断片化することでアポトーシス活性を示す。個体レベルでの機能解析を目的として、Ret のアポトーシス活性を喪失する D707N 変異のノックインマウスを作製して調べたところ、腸管神経、交感・副交感神経および下垂体前葉に過形成が起こっていた。また、Ret 断片は細胞の核に局在し、転写抑制活性を示した。

研究成果の概要（英文）：Ret tyrosine kinase is a member of “dependence receptor” which induces apoptosis in the absence of its ligands. Ret is cleaved at D707 and D1017 by caspase, and intracellular fragment between D707 and D1017 can induce cell death. To determine the importance of Ret proapoptotic activity *in vivo*, we generated Ret D707N mutant mice. D707N Homozygote showed hyperplasia of neural cells in enteric, sympathetic and parasympathetic neural systems. In addition, adenopituitary lobe in pituitary gland was hyperplastic in D707N mice. To study the molecular mechanism of Ret proapoptotic activity, we examined the biological function of Ret fragment. Interestingly, Ret fragment is localized in the cell nucleus, and Ret fragment shows suppressive transcriptional activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理

キーワード：Ret チロシンキナーゼ、依存性受容体、アポトーシス、遺伝子改変マウス、神経発生、下垂体発生、転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の生存とアポトーシスは、受容体を介する外部からのシグナルによって別々に制御されていると考えられてきたが、近年、ひ

とつの受容体が生存とアポトーシスの両者を制御する例が知られるようになった。こうした受容体はリガンドとの結合で生存のシグナルを、リガンド非結合でアポトーシスの

シグナルを細胞に伝えるという両義的な機能を示し、依存性受容体 (dependence receptor) と呼ばれる。

我々が研究テーマとする Ret チロシンキナーゼは、リガンドである GDNF ファミリーにより活性化され、腸管神経と腎臓の発生に重要な役割を果たす。近年の報告で、Ret が依存性受容体であり、細胞内のアミノ酸 D707 と D1017 の部位で切断され、断片化してアポトーシスを引き起こすことが示された。この知見に従い、我々は Ret の依存性受容体としての機能を個体レベルで解析する目的で、Ret のアポトーシス活性を喪失する D707N 変異のノックインマウスを作製して解析を行ったところ、腸管神経・交感神経において神経細胞の数が増えていた。これは、変異によりアポトーシスが喪失したため細胞数が増加したと考えられる。この知見は Ret が依存性受容体として生理的に機能することを示すもので、本研究を構想する上で基盤となった。

## 2. 研究の目的

Ret D707N 変異マウスを用いた個体レベルでの解析と、培養細胞による生化学的解析を行うことで、Ret によるアポトーシス活性の生物学的な意義と分子メカニズムの理解を目指すことを研究の目的とする。

また、Ret は癌遺伝子であり、神経芽細胞腫などの各種の腫瘍組織において Ret が高発現している。癌における Ret のアポトーシス活性が腫瘍に及ぼす影響を調べる。

## 3. 研究の方法

### (1) Ret D707N 変異マウスの解析

一般染色および抗 Ret 抗体による免疫染色を行い、Ret D707N 変異マウスにおいて、どの組織で Ret 陽性細胞の数が増加しているかを詳細に検索する。また、組織の発生において、どの時期に細胞数の増加が起こっているかを調べるとともに、野生型マウスと変異マウスとでアポトーシスに差があるかを TUNEL 法、抗 cleaved Caspase3 抗体による免疫染色にて検索し、Ret によるアポトーシスが、いつ・どこで起こっているかを確定する。

### (2) Ret によるアポトーシス機構の解析

Ret によるアポトーシスの分子メカニズムを調べるため、全長の Ret 蛋白およびアポトーシス活性を示す Ret 断片蛋白を培養細胞に発現させてアポトーシスを誘導し、生化学的解析を行う。

### (3) Ret によるアポトーシスと腫瘍の関連

Ret にはアポトーシス活性があるにもかかわらず、Ret が発現している腫瘍では細胞が増殖しており、アポトーシスの抑制、もしくはアポトーシスを相殺する細胞増殖

が起こっているものと考えられる。Ret が高発現している腫瘍細胞株における、Ret の断片化の抑制、アポトーシスのシグナル経路の抑制について調べる。

## 4. 研究成果

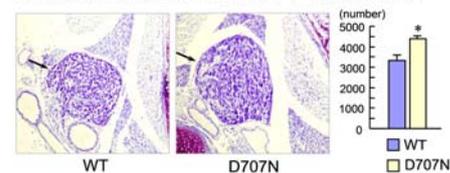
### (1) RetD707N 変異マウスの解析

組織発生において Ret が重要な働きを示す部位として、腸管神経と腎臓がある。また、それ以外に Ret が発現する組織として、中枢・末梢神経、下垂体前葉、甲状腺 C 細胞、副腎髄質などがある。

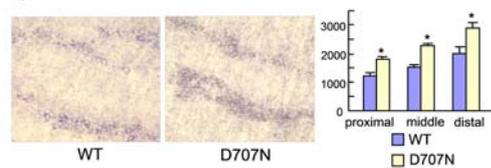
Ret によるアポトーシス活性が喪失する D707N 変異をノックインしたマウスの表現型を調べるため、生後 0 日令で組織学的検索を行ったところ、変異マウスのホモでは、①腸管神経系において、小腸の全長および大腸の近位部での神経細胞の数が約 30% 増加している、②交感神経である上頸交感神経節および副交感神経である顎下神経節において神経細胞の数が 25~30% 増加している、③下垂体前葉の体積が約 40% 増加している、などが明らかとなった。また、Ret 陽性細胞が神経細胞全体の 100% を占める腸管神経、交感・副交感神経だけではなく、④ Ret 陽性細胞が全体の一部のみを占める三叉神経節、脊髄後根神経節においても Ret 陽性神経細胞の数が約 20% 増加していることが明らかとなった。これらの表現型は、D707N 変異によって Ret のアポトーシス活性が抑制されたとするストーリーに合致すると考えられた。(図 1)

図 1: Ret D707N 変異マウスで見られた神経組織の過形成

#### A) 交感神経における神経細胞の増加 (上頸交感神経節)



#### B) 腸管神経における神経細胞の増加 (小腸の筋層間神経叢)



また、⑤甲状腺 C 細胞の数には変異マウスと野生型マウスで差がない、⑥腎臓には異常がない、⑦副腎髄質には異常がない、などの所見から、Ret が発現する組織・細胞の全てでアポトーシス活性の抑制による過形成が起こる訳ではないことが判明し、組織における依存性受容体としての Ret による生存・アポトーシスの活性が組織特異的な制御を受けていると考えられた。

一方、変異マウスには、⑧腸管神経において大腸の遠位部にて腸管神経の欠損が起こる、という想定外の表現型が示された。腸管

神経の過形成についてはアポトーシス抑制にて説明が可能であるが、神経欠損に関してはメカニズムの説明が困難である。マウスの腸管神経は、神経堤細胞に由来する神経前駆細胞がE10.0の時期に前腸の口側から侵入し、消化管遠位に沿って移動し、E14.5に肛門へ達する。変異マウスにおいて神経前駆細胞の移動を調べたところ、神経の移動スケジュールが約一日遅れていることが明らかとなった。神経前駆細胞の Ret リガンドである GDNF に対する走化性が移動に重要と知られていることから、変異マウスの発生過程の消化管片をコラーゲンゲル中で培養し GDNF に対する走化性を調べたところ、移動能が低下していた。従って、変異マウスではアポトーシス活性の以外にも Ret シグナルに質的な異常が生じている可能性が考えられたが、培養細胞を用いて既知の Ret の下流シグナルを調べた限りにおいては、明らかな異常を見出すことは出来なかった。

Ret D707N 変異が gain of function なのか loss of function なのかを調べるため、Ret および GDNF ノックアウトマウスと Ret D707N 変異マウスとを交配させた重複変異マウスを作製し、解析を行った。Ret ノックアウトとの重複変異マウス、GDNF ノックアウトマウスのヘテロを背景とした Ret D707N 変異のホモマウスの両者は変異 Ret シグナルが半分量になるが、この2種の重複変異マウスのいずれにおいても腸管神経の欠損領域の拡大が観察されると共に、神経欠損が生じていない小腸の近位部で腸管神経の数の増加が生じなかった。したがって、D707N 変異に伴う腸管神経前駆細胞の移動能の障害と腸管神経の過形成は gain of function による効果ではないと想定された。

TUNEL 法、抗 cleaved Caspase3 抗体による免疫染色での検索で、アポトーシスおよび細胞増殖について変異マウスと野生型マウスで比較を行ったが、胎生期 E14.5 では差が得られなかった。理研 CDB の榎本秀樹ら研究グループは、腸管神経における GDNF シグナル欠損で生じる神経死では Caspase 非依存的なメカニズムは働くことを示しており、そうしたことが今回、細胞死の差を検出することが出来なかった理由なのかもしれない (Uesaka T, et al. J Neurosci, 2010)。

#### (2) Ret によるアポトーシス機構の解析

Ret によるアポトーシス活性について調べる目的で、野生型および D707N Ret を導入した培養細胞株の樹立を試みたが、野生型 Ret ではクローンがごく少数しか得られなかったのに対して、D707N 変異 Ret では多数のクローンが得られた。これは、クローン化の過程で野生型 Ret が細胞死を引き起こしているものと考えられた。一方、Ret が依存性受容体であることを示した論文にあった一過性

の Ret 発現による細胞死についての実験は、我々の手では再現性が不安定であったため、Tet-on システムによる発現誘導の実験系を試みた。しかしながら、十分な発現を誘導できる細胞クローンを得ることは出来ず、残念ながら生化学的な解析は困難であった。

Ret は細胞内の D707 と D1017 の二箇所が切断されて蛋白断片が作られることがアポトーシス活性に重要なステップであることが示されている。Ret 蛋白断片の機能を解析する目的で、培養細胞を用いて断片の細胞内局在を調べたところ、核への局在が明らかとなった。断片の N 末端ある核移行配列候補の領域にアミノ酸変異を導入したところ、核への局在性が失われた。したがって、蛋白断片の N 末端は核移行シグナルとして機能していると考えられた。

Ret 蛋白断片の核における機能を解析する目的で、ルシフェラーゼアッセイを用いて転写調節能を調べたところ、Ret 蛋白断片には転写抑制機能があることが明らかとなった。転写抑制能に必要なドメインは N 末端側の 1/3 の領域であり、転写抑制能にはチロシinkinase 活性は不必要であることが明らかとなった。転写抑制の機能とアポトーシス誘導の機能に関連がある可能性が考えられた。

#### (3) Ret によるアポトーシスと腫瘍の関連

Ret が発現している腫瘍由来の培養細胞株にて、Ret の断片化が生じているかをウエスタンブロットにて調べたところ、通常の培養条件において、わずかな割合での断片化が検出された。断片化は薬剤によるアポトーシスの誘導によって亢進された。また、Ret の断片化は Caspase 阻害剤にて抑制された。これらの結果は、腫瘍細胞において、Ret の断片化を低く抑えることでアポトーシス活性を抑制している機構が存在している可能性を示唆するものと考えられた。マウスの組織から Ret 発現細胞を初代培養して同様の実験を試みたが、抗体の感度が低いためか断片化を検出できず、正常組織と腫瘍組織での比較は困難であった。

#### 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7件)

① Partial impairment of c-Ret at tyrosine 1062 accelerates age-related hearing loss in mice.

Ohgami N, Ida-Eto M, Sakashita N, Sone M, Nakashima T, Tabuchi K, Hoshino T, Shimada A, Tsuzuki T, Yamamoto M, Sobue G, Jijiwa M, Asai N, Hara A, Takahashi M, Kato M.

Neurobiol Aging. 査読有

2012 Mar;33(3):626.e25-34.

- ② Loss of Sprouty2 partially rescues renal hypoplasia and stomach hypoganglionosis but not intestinal aganglionosis in Ret Y1062F mutant mice.

Miyamoto R, Jijiwa M, Asai M, Kawai K, Ishida-Takagishi M, Mii S, Asai N, Enomoto A, Murakumo Y, Yoshimura A, Takahashi M.

Dev Biol. 査読有

2011 Jan 15;349(2):160-8.

- ③ c-Ret-mediated hearing loss in mice with Hirschsprung disease.

Ohgami N, Ida-Eto M, Shimotake T, Sakashita N, Sone M, Nakashima T, Tabuchi K, Hoshino T, Shimada A, Tsuzuki T, Yamamoto M, Sobue G, Jijiwa M, Asai N, Hara A, Takahashi M, Kato M.

Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有

2010 Jul 20;107(29):13051-6.

- ④ Analysis of DOK-6 function in downstream signaling of RET in human neuroblastoma cells.

Kurotsuchi A, Murakumo Y, Jijiwa M, Kurokawa K, Itoh Y, Kodama Y, Kato T, Enomoto A, Asai N, Terasaki H, Takahashi M.

Cancer Sci. 査読有

2010 May;101(5):1147-55.

- ⑤ Etv4 and Etv5 are required downstream of GDNF and Ret for kidney branching morphogenesis.

Lu BC, Cebrian C, Chi X, Kuure S, Kuo R, Bates CM, Arber S, Hassell J, MacNeil L, Hoshi M, Jain S, Asai N, Takahashi M, Schmidt-Ott KM, Barasch J, D'Agati V, Costantini F.

Nat Genet. 査読有

2009 Dec;41(12):1295-302.

- ⑥ Ret-dependent cell rearrangements in the Wolffian duct epithelium initiate ureteric bud morphogenesis.

Chi X, Michos O, Shakya R, Riccio P, Enomoto H, Licht JD, Asai N, Takahashi M, Ohgami N, Kato M, Mendelsohn C, Costantini F.

Dev Cell. 査読有

2009 Aug;17(2):199-209.

- ⑦ 浅井直也、高橋雅英、RET 遺伝子の機能と多発性内分泌腫瘍症 2 型、ホルモンと臨床、査読無、2009、57 (3) 39-45

[学会発表] (計 4 件)

- ① 浅井直也、時々輪真由美、高橋雅英、腸管神経における GDNF/Ret シグナルの役割、第 88 回日本生理学界・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2011 年 3 月、震災の

ため、誌上開催

- ② 高橋雅英、浅井直也、依存性受容体としての RET チロシンキナーゼの機能と腸管神経の発生、第 62 回日本自律神経学会総会、2009 年 11 月 5~6 日、和歌山県、和歌山市

- ③ 浅井直也、高橋雅英、Ret チロシンキナーゼにより形成される細胞内断片の転写制御因子としての作用、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1~3 日、神奈川県、横浜

- ④ Takahashi M, Asai N, Costantini F, Functional analysis of RET tyrosine kinase receptor as a dependence receptor. 2<sup>nd</sup> International symposium, Development of the enteric nervous system: cells, signals and genes, 2009 年 2 月 22~25 日, London, UK

[図書] (計 0 件)

[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.nagoya-u.ac.jp/patho2/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅井 直也 (ASAI NAOYA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：80273233

### (2) 研究分担者なし

### (3) 連携研究者 なし