

## 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 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790291

研究課題名（和文）Ror1 受容体を介したシグナル伝達機構とその発生及びがんにおける役割の解明

研究課題名（英文）Ror1-mediated signaling and its role in development and cancer

## 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（和文）：*Ror1;Ror2*ダブルノックアウトマウス胚線維芽細胞やヒトバーキットリンパ腫細胞を用いて Wnt5a に対する応答性を解析した結果、Wnt5a シグナルによる Wnt/b-catenin 経路の抑制作用に Ror2 だけでなく Ror1 も関与していることが明らかになった。また、Ror1 がヒトトリプルネガティブ乳がん細胞に過剰発現しており、c-Src、Akt、Erk、Stat3 といったシグナル伝達因子の活性化や細胞増殖を制御していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Mouse embryonic fibroblasts isolated from *Ror1;Ror2* double knockout mice and human Burkitt's lymphoma cells were used to study their responses to Wnt5a. We found that inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by Wnt5a is mediated not only by Ror2 but also by Ror1. We also found that Ror1 is overexpressed in human triple-negative breast cancer cells and thereby activates signaling molecules, such as c-Src, Akt, Erk and Stat3, and cell proliferation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：Ror 受容体チロシンキナーゼ、Wnt、がん

## 1. 研究開始当初の背景

Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼは、線虫やショウジョウバエからヒトにいたるまで種を超えて構造が良く保存されており、脊椎動物においては、構造の類似した 2 種類の遺伝子 (*Ror1*, *Ror2*) が存在する。我々は、*Ror2* ノックアウト (KO) マウスなどを用いた解析から、*Ror2* が液性シグナル因子である Wnt5a の受容体として、細胞の移動や極性を制御していることを

明らかにしてきた。また、Wnt5a-Ror2 シグナルは骨肉腫細胞において恒常的に活性化されており、その結果、マトリックスメタロプロテアーゼ 13 の遺伝子発現を介して浸潤能を亢進させることも明らかにしてきた。一方、*Ror1* KO マウスの表現型解析などから、*Ror1* が Wnt5a や Wnt9a の受容体として機能していることが示唆されているがその実態は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では Ror1 が Wnt5a もしくは Wnt9a 受容体として機能しているかどうかを分子・細胞・個体レベルで解析を行い、発生とがんにおける Ror1 の役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) Ror1 と Ror2 を発現していないマウス L 細胞に Ror1-Flag または Ror2-Flag 発現プラスミドを導入し、2 日後に精製 Wnt5a (400 ng/ml) を添加した。2 時間後に細胞を溶解し、Dishevelled (Dvl)2、Dvl3、 $\alpha$ -tubulin、Flag に対する抗体を用いて Western blot 解析を行った。Wnt5a 刺激による Dvl2 および Dvl3 のリン酸化レベルをそれぞれのバンドの移動度の違いによって評価した。

(2) *Ror1;Ror2* ダブル KO マウス由来の胚線維芽細胞 (MEF) を得るため、*Ror1;Ror2* ダブルヘテロ (*Ror1*<sup>+/-</sup>;*Ror2*<sup>+/-</sup>) マウスの雄雌の交配し、胎生 12.5 日目に胎仔から MEF を調製した。これらの MEF に Wnt/ $\beta$ -catenin (古典的) 経路の活性を評価するレポーター遺伝子 (*SuperTopFlash:STF*) を導入した後、Wnt3a と Wnt5a をそれぞれ単独または同時に添加し、8 時間後にレポーター活性をルシフェラーゼアッセイによって測定した。

(3) ヒトパーキットリンパ腫細胞株である Namalwa 細胞を用いて、siRNA による Ror1 の発現抑制処理を行った。siRNA 処理 2 日後に *STF* レポーターを導入し、さらに 12 時間後に Wnt3a と Wnt5a をそれぞれ単独または同時に添加し、8 時間後にレポーター活性をルシフェラーゼアッセイによって測定した。また、Ror1 発現抑制による細胞増殖に対する影響を WST-8 試薬を用いた比色法によって測定した。

(4) 8 種類のヒト乳がん細胞株における *Ror1*、*Ror2*、*Wnt5a* の発現を比較するため、各細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法によってそれぞれの発現量を解析した。それらの細胞株の中からトリプルネガティブ乳がん (TNBC) に分類される MDA-MB-435S 細胞を用いて、siRNA による Ror1 の発現抑制処理を行った。siRNA 処理後の 2 日目、4 日目、6 日目の細胞増殖率を WST-8 試薬によって測定した。また、siRNA 処理後の 2 日目と 4 日目に細胞を回収し、Western blot 法によって Akt、Erk、Stat3、c-Src の発現量とリン酸化レベル、および Ror1 の発現量の解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) Wnt5a シグナルの重要な伝達因子である Dvl は刺激依存的にリン酸化される。

我々は、Ror2 が Wnt5a による Dvl のリン酸化に必要であることを報告した。実際、Ror1 と Ror2 が発現していないマウス L 細胞においては、Wnt5a 刺激による Dvl2 と Dvl3 のリン酸化 (バンドシフト) はほとんど認められ

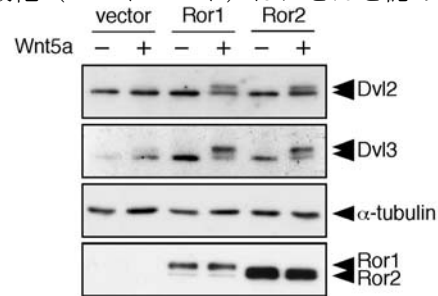


図 1. L 細胞において Wnt5a による Dvl のリン酸化は Ror1 または Ror2 依存的に誘導される。

ないが、Ror2 発現プラスミドを導入した場合には Wnt5a 刺激による Dvl2 と Dvl3 のリン酸化が引き起こされた (図 1)。また、Ror1 発現プラスミドを導入した L 細胞においても同様に Dvl2 と Dvl3 のリン酸化が認められた (図 1)。したがって、Ror1 は Ror2 同様に Wnt5a 受容体として Dvl のリン酸化制御を担っていることが示唆された。

(2) Wnt5a は Ror2 受容体を介して Wnt シグナル伝達経路の中でも非古典的経路を活性化させる。非古典的経路は Wnt3a 等によって活性化される古典的経路を抑制することが示されているため、本研究では Ror1 が Ror2 と同様に Wnt5a による非古典的経路の抑制に関与するかどうかについて *Ror1;Ror2* ダブル KO MEF を用いて解析した。*Ror1;Ror2* ダブルヘテロ (*Ror1*<sup>+/-</sup>;*Ror2*<sup>+/-</sup>) マウスの雄雌の交配によって得られた 12.5 日胚より、次の 4 種類の遺伝型の MEF を得た。*Ror1*<sup>+/-</sup>;*Ror2*<sup>+/-</sup> (ダブルヘテロ)、*Ror1*<sup>-/-</sup>;*Ror2*<sup>+/-</sup> (*Ror1* KO)、*Ror1*<sup>+/-</sup>;*Ror2*<sup>-/-</sup> (*Ror2* KO)、*Ror1*<sup>-/-</sup>;*Ror2*<sup>-/-</sup> (ダブル KO)。これらの MEF を用い、STF レポーター遺伝子によるレポーター解析を行った (図 2)。その結果、いずれの遺伝型の MEF においても Wnt3a 刺激によ

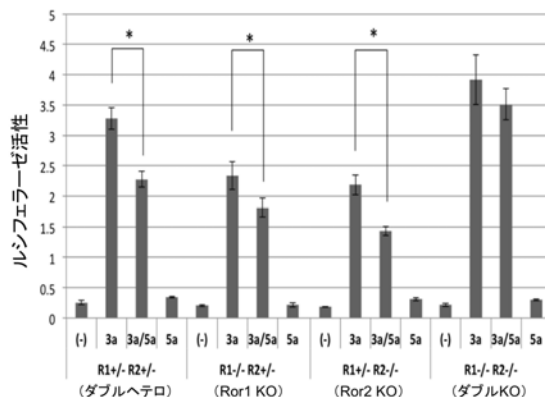


図 2. *Ror1;Ror2* ダブル KO MEF を用いた STF レポーター解析

レポーター活性の上昇が認められたが、Wnt5a 刺激はレポーター活性に影響を与えなかった。また、Wnt3a と Wnt5a を同時に添加した結果、ダブル KO 以外の MEF においては Wnt3a のみを添加した場合に比べて有意なレポーター活性の低下が認められたが、ダブル KO の MEF においてはレポーター活性に有意な差は認められなかった。これらの結果は、Ror1 と Ror2 の少なくともどちらか一方が発現していれば、Wnt5a が古典的経路を抑制できることを示している。したがって、Ror1 と Ror2 は冗長的に Wnt5a 受容体として古典的経路の抑制に関与していることが示唆された。

(3) 我々はヒトバーキットリンパ腫由来の複数の細胞株において、Ror2 は発現していないが Ror1 が過剰発現していることを見出していた。正常 B リンパ球においては Ror1、Ror2 ともに発現が検出されないことから、Ror1 がバーキットリンパ腫の発症に伴って発現する可能性が考えられた。本研究では、Ror1 が過剰発現しているヒトバーキットリンパ腫細胞株 Namalwa 細胞を用いて、STF レポーター遺伝子によるレポーター解析により Ror1 の Wnt シグナルにおける役割を解析した (図 3)。その結果、control siRNA を導入した細胞においては、Wnt3a 添加によるレポーター活性の上昇が Wnt5a の同時添加によって阻害された。Wnt5a 単独の添加によるレポーター活性への影響は認められな

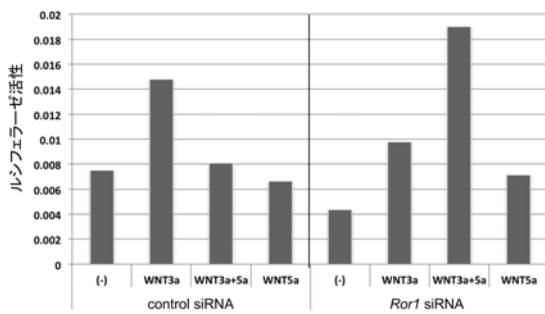


図 3. Namalwa 細胞を用いた STF レポーター解析

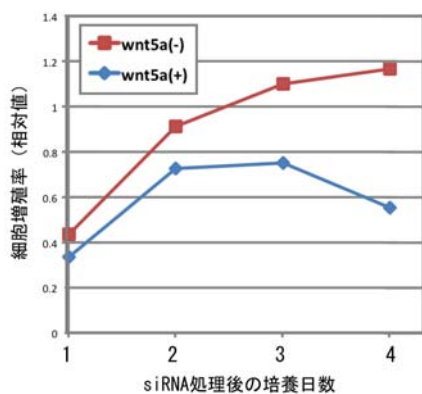


図 4. Namalwa 細胞の増殖に対する Wnt5a 処理の影響

かった。一方、Ror1 siRNA を導入した細胞においては、Wnt3a と Wnt5a が共にレポーター活性を上昇させた。これらの結果から、

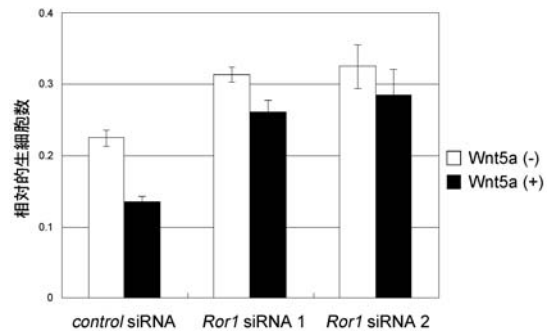


図 5. Wnt5a による Namalwa 細胞の増殖抑制作用に対する Ror1 発現抑制の影響

Namalwa 細胞において Ror1 は Wnt5a による古典的経路の抑制に必要であることが示唆された。また、Namalwa 細胞の増殖に対する Wnt5a 添加による影響を WST-8 試薬を用いて解析した結果、Wnt5a は Namalwa 細胞の増殖を有意に抑制することが分かった (図 4)。さらに Wnt5a による細胞増殖の抑制作用は Ror1 siRNA を導入した細胞では認められなかったことから (図 5)、Wnt5a は Ror1 を介して Namalwa 細胞の増殖を抑制することが示唆された。

(4) 様々な種類のヒト乳がん細胞株における Ror1、Ror2、Wnt5a の発現を解析した結果、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、HER2 の発現がいずれも陰性の TNBC 細胞株において、Ror1 が過剰発現していることを見出した (図 6)。一方、Ror2 はそれらのマーカー遺伝子の発現とは関係なく、一部の乳がん細胞株で発現が認められ、Wnt5a はほとんど全ての乳がん細胞株で発現が認められた。Ror1 が高発現している TNBC 細胞株 MDA-MB435S を用いて、Ror1 を標的とする siRNA の導入により内在性 Ror1 の発現を低下させた結果、細胞増殖能の顕著な低下が認められた (図 7)。同様の結果は、Ror1 の機能を阻害すると予想される Ror1 の細胞外領域に対する抗体を培地に添加した場合にも認められた。さらに、MDA-MB435S は軟寒天中において足場非依存的に増殖しコロニーを形

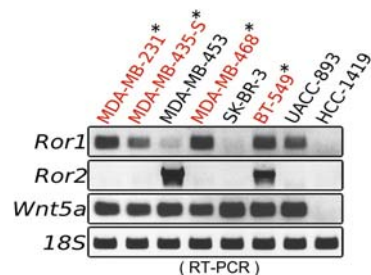


図 6. ヒト乳がん細胞株における Wnt5a と Ror の発現 \* : TNBC 細胞株

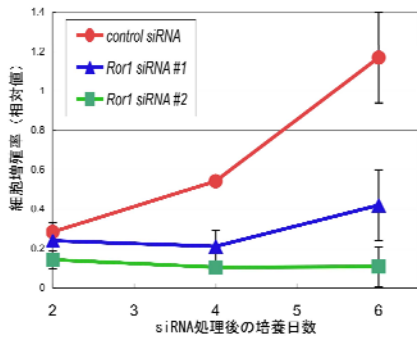


図 7. MDA-MB-435S 細胞の増殖に対する Ror1 発現抑制の影響

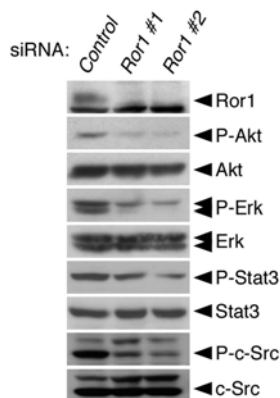


図 8. MDA-MB-435S 細胞において、Ror1 の発現抑制はシグナル伝達分子のリン酸化レベルを低下させる。

成するが、*Ror1* siRNA 処理によりコロニー形成能の低下も認められた。次に、*Ror1* の発現抑制によって影響を受ける細胞内シグナル伝達経路を明らかにするため、各種シグナル伝達因子のリン酸化特異的抗体を用いて、Western blot 解析を行った結果、*c-Src*、*Akt*、*Erk*、*Stat3* のリン酸化レベルが *Ror1* の発現抑制によって顕著に低減した (図 8)。また、MDA-MB-435S 細胞を *Wnt5a* で刺激した結果、それらのシグナル伝達因子のリン酸化レベルの亢進と増殖の促進が認められた。以上の結果から、TNBC 細胞において、*Ror1* が過剰発現し *Wnt5a-Ror1* シグナルが活性化されると、*c-Src*、*Akt*、*Erk*、*Stat3* 等を介して細胞増殖が促進されることが示唆された。

以上の結果から *Ror1* はがん細胞を含む異なる細胞種において *Wnt5a* のシグナル伝達に関与することが示された。今後は各細胞種における *Wnt5a-Ror1* シグナルの詳細なメカニズムの解明と、その生理的・病理的意義を細胞レベルだけでなく個体レベルで解明することが重要である。

##### 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 6 件)

1. Maeda, K., Kobayashi, Y., Udagawa, N., Uehara, S., Ishihara, A., Mizoguchi, T., Kikuchi, Y., Takada, I., Kato, S., Kani, S., Nishita, M., Marumo, K., Martin, T. J., Minami, Y., and Takahashi, N. *Wnt5a-Ror2* signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. **Nat. Med.** *18*: 405-412, 2012 査読有り
2. Endo, M., Doi, R., Nishita, M., and Minami, Y. Ror-family receptor tyrosine kinases regulate maintenance of neural progenitor cells in the developing neocortex. **J. Cell Sci.** 2012. 査読有り
3. Yamagata, K., Li, X., Ikegaki, S., Oneyama, C., Okada, M., Nishita, M., and Minami, Y. Dissection of *Wnt5a-Ror2* Signaling Leading to Matrix Metalloproteinase (MMP-13) Expression. **J. Biol. Chem.** *287*: 1588-1599, 2012. 査読有り
4. Ren, D., \*Minami, Y., and \*Nishita, M. Critical role of *Wnt5a-Ror2* signaling in motility and invasiveness of carcinoma cells following *Snail*-mediated epithelial-mesenchymal transition. **Genes Cells** *16*: 304-315, 2011. (\*:corresponding authors) 査読有り
5. \*Nishita, M., Itsukushima, S., Nomachi, A., Endo, M., Wang, Z., Inaba, D., Qiao, S., Takada, S., Kikuchi, A., and \*Minami, Y. Ror2/Frizzled complex mediates *Wnt5a*-induced AP-1 activation by regulating Dishevelled polymerization. **Mol. Cell. Biol.** *30*: 3610-3619, 2010. (\*: corresponding authors) 査読有り
6. Nishita, M., Enomoto, M., Yamagata, K., and Minami, Y. Cell/tissue-tropic functions of *Wnt5a* signaling in normal and cancer cells. **Trends Cell Biol.** *20*: 346-354, 2010. 査読有り

[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

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