

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390080

研究課題名(和文) 上皮間葉転換を伴う炎症や癌の進展におけるWnt5a-Rorシグナルの分子病態解析

研究課題名(英文) Molecular pathological analyses of Wnt5a-Ror signaling in inflammation and cancer progression accompanying epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

南 康博 (Minami, Yasuhiro)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70229772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt5a-Rorシグナルは発生過程において一過的に活性化され上皮間葉転換と関連し、形態形成や組織構築において重要な役割を担う。生後においてWnt5a、Rorの発現は著しく減弱するが、本研究では、細胞・組織・個体レベルでの解析により、組織損傷修復、線維症などの遷延化した炎症やがんの増悪においてこれらの分子の発現が誘導されることによりWnt5a-Rorシグナルが異常に活性化され、これらの病態と密接に関連することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Wnt5a-Ror signaling has been shown to be activated transiently during embryogenesis and to play important roles in developmental morphogenesis and tissue-genesis via induction of epithelial-mesenchymal transition and so on. After birth, expression levels of Wnt5a and Ror proteins are very low in general. In this study, we have shown by employing in vitro and in vivo analyses that these proteins are induced during tissue repair after injury, chronic inflammation, and progression of cancers, thereby resulting in aberrant activation of Wnt5a-Ror signaling. We have also found possible relationships between these pathological conditions and aberrant activation of Wnt5a-Ror signaling.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Wnt5a-Ror シグナル伝達 上皮間葉転換 (EMT) 慢性炎症 がんの増悪 組織損傷修復 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

Wnt5a とその受容体として機能する Ror 受容体型チロシンキナーゼ (Ror1, Ror2) は発生過程において一過的に発現誘導され、Wnt5a-Ror シグナルが(一過的に)活性化され、平面内細胞極性 (PCP: planar cell polarity) や収斂伸長 (CE: convergent extension) 運動を制御することにより、形態形成や組織構築において重要な役割を担うことが知られていた。一方、Wnt5a、Ror タンパク質の発現は、組織幹細胞などを除けば、その発現は生後に著しく減弱するが、悪性黒色腫、骨肉腫などの各種がん細胞において高発現していること、上皮様がん細胞である A431 細胞の(上皮間葉転換関連転写因子である) Snail の過剰発現による上皮間葉転換に伴い発現誘導され、その結果 Wnt5a-Ror2 シグナルが活性化され浸潤能が亢進することが明らかになっていた。また、腎線維症モデルであるマウスにおける片側尿管閉塞 (UUO: unilateral ureter obstruction) 実験やマウス前脛骨筋へのカルディオトキシン投与による骨格筋損傷修復モデルにおいて Wnt5a あるいは Ror タンパク質が誘導されることが見出されていた。

2. 研究の目的

1.に記載した背景を踏まえて、本研究においては、組織損傷に伴う慢性炎症(腎線維症など)、がんの増悪化(浸潤・転移能の亢進)および組織損傷修復過程における Wnt5a-Ror シグナルの活性化とこれらの病態等の関連を、上皮間葉転換 (EMT) にも着目した上で、分子・細胞・組織・個体レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、慢性炎症(線維症など)のモデルとして、マウスにおける片側尿管閉塞 (UUO) 実験、顎下腺導管結紮実験を行い、それぞれ尿細管上皮、唾液腺上皮における上皮細胞の上皮間葉転換と Wnt5a-Ror シグナルの活性化や組織破壊との関連解析を行うとともに、骨肉腫細胞などのがん細胞における Wnt5a-Ror シグナルの活性化とがん細胞の浸潤能との関連を分子レベルで解析する。また、組織損傷修復については、マウス前脛骨筋へのカルディオトキシン投与による骨格筋損傷修復モデルやマウス大脳皮質損傷モデルを用いて、Wnt5a-Ror シグナルの活性化と組織損傷修復との関連を詳細に解析する。解析手法としては、分子細胞生物学的手法、生化学的手法、免疫組織化学的手法やメタボローム解析を用いた。

4. 研究成果

(1) マウスを用いた片側尿管閉塞 (UUO) 実験による腎線維症モデルを作製し、Wnt5a-Ror シグナルの活性化動態・機能解析を行った。その結果、UUO 処理後に TGF- β

が産生され、TGF- β シグナルの活性化により腎尿細管上皮細胞の上皮間葉転換 (EMT) が誘導され、Wnt5a、Ror2 の発現が誘導されることにより、Wnt5a-Ror2 シグナルが活性化されることが見出された。また、活性化された Wnt5a-Ror2 シグナルにより MMP (matrix metalloproteinase)-2 の発現・産生が亢進し、尿細管基底膜が破壊されるとともにコラーゲン等の産生が亢進することにより炎症の遷延化(線維化等)がもたらされることが明らかになった。さらに、腎線維化において間質に α SMA 陽性・Ror2 陽性の活性化筋線維芽細胞が検出されることから、Wnt5a-Ror2 シグナルは線維芽細胞の活性化過程にも関与することが示唆された。また、マウスの顎下腺導管結紮実験により、顎下腺上皮細胞において Ror2 の発現が誘導されることが見出された(未発表)。

(2) 間葉系前駆細胞に由来する骨肉腫細胞では、Snail を内在性に発現しており、それにより Wnt5a、Ror2 が構成的に高発現し、その結果 Wnt5a-Ror2 シグナルが異常に活性化していることにより、このシグナルの標的遺伝子産物である MMP-13 や一次繊毛形成に必須な因子である IFT (intraflagellar transport)20 などが発現誘導され、がん細胞の浸潤能が亢進していることが明らかとなった (IFT20 については未発表)。また、骨肉腫細胞において Ror2 または IFT20 の発現を抑制すると、ゴルジ体の分散、ゴルジ体の細胞内配置(極性)の異常、および浸潤突起形成阻害が起こること、などが見出された。Ror2 の発現抑制によるゴルジ体の分散や浸潤突起形成阻害は、IFT20 を強制発現することにより回復することが見出された。これらの知見から、骨肉腫細胞において活性化された Wnt5a-Ror2 シグナルは IFT20 の発現誘導を介して、ゴルジ体の構造・極性を制御し、浸潤突起形成や MMP-13 による細胞外基質の分解に関わることが明らかになった(未発表)。

(3) 成獣マウスを用いた大脳皮質損傷モデルの解析により、損傷部位近傍に存在する活性化アストロサイトにおいて Ror1 の発現が誘導されることが見出された(未発表)。また、成獣マウス骨格筋(片側前脛骨筋)へのカルディオトキシンの投与による骨格筋損傷モデルの解析から、損傷後に産生される IL-1 β 、TNF- α 等の炎症性サイトカインにより筋衛星細胞において NF- κ B 経路の活性化を介して Ror1 の発現が誘導されること、および発現誘導された Ror1 は筋衛星細胞の増殖(幹細胞性維持)を促進するとともに、筋分化を抑制するという重要な役割を担うことが明らかになった(未発表)。

(4) 若齢マウスと老齢マウスにおける骨格筋筋衛星細胞、および唾液腺における Wnt5a-Ror シグナル系等の分子(遺伝子)の発現解析を行ったところ、老齢マウスの筋衛星細胞では Ror1 の発現が減弱するととも

に、古典的 Wnt シグナルを司る Frizzled 1 の発現が亢進すること、また唾液腺では顎下腺において Ror2 の発現が亢進していることが見出された (未発表)。

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 11 件)

1 Sato, A., Kayama, H., Shojima, K., Matsumoto, S., Koyama, H., Minami, Y., Nojima, S., Morii, E., Honda, H., Takeda, K., Kikuchi, A.: The Wnt5a-Ror2 axis promotes the signaling circuit between interleukin-12 and interferon- γ in colitis. **Scientific Rep.**, in press, 2015.

2 Endo, M., Nishita, M., Fujii, M., Minami, Y.: Insight into the role of Wnt5a-induced signaling in normal and cancer cells. **Int. Rev. Cell Mol. Biol.** 314: 117-148, 2015.

3 Nishita, M., Qiao, S., Miyamoto, M., Okinaka, Y., M., Yamada, M., Hashimoto, R., Iijima, K., Otani, H., Hartmann, C., Nishinakamura, R., Minami, Y.: Role of Wnt5a-Ror2 signaling in morphogenesis of the metanephric mesenchyme during ureteric budding. **Mol. Cell. Biol.** 34 (16): 3096-3105, 2014.

4 Mori, K., Kitazawa, R., Kondo, T., Mori, M., Hamada, Y., Nishita, M., Minami, Y., Haraguchi, R., Takahashi, Y., Kitazawa, S.: Diabetic osteopenia by decreased β -catenin signaling is partly induced by epigenetic derepression of *sFRP-4* gene. **PLoS One** 9 (7): e102797, 2014.

5 Okamoto, M., Udagawa, N., Yamashita, T., Nakamichi, Y., Uehara, S., Kato, H., Saito, N., Minami, Y., Takahashi, N., Kobayashi, Y.: Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/ β -catenin signaling during osteogenesis. **Scientific Report** 4: 4493, 2014.

6 Doi, R., Endo, M., Yamakoshi, K., Yamanashi, Y., Nishita, M., Fukada, S-I., Minami, Y.: Critical role of Frizzled1 in age-related alterations of Wnt/ β -catenin signal in myogenic cells during differentiation. **Genes Cells** 19 (4): 287-296, 2014.

7 Fukuyo, S., Yamaoka, K., Sonomoto, K., Oshita, K., Okada, Y., Saito, K., Yoshida, Y., Kanazawa, T., Minami, Y., and Tanaka, Y.: IL-6-accelerated calcification by induction of Ror2 in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells is STAT3-dependent. **Rheumatology** 53 (7): 1282-1290, 2014.

8 Li, X., Yamagata, K., Nishita, M., Endo, M., Arfian, N., Rikitake, Y., Emoto, N., Hirata, K., Tanaka, Y., Minami, Y.: Activation of Wnt5a-Ror2 signaling associated with epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of tubular epithelial cells during renal fibrosis. **Genes Cells** 18 (7): 608-619, 2013.

9 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., Takahashi, N.: Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblasts and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. **Nat. Med.** 18: 405-412, 2012.

10 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.** 125: 2017-2029, 2012.

11 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.

[学会発表](計 10 件)

1 Koki Kamisaki, Ryosuke Doi, Suguru Kato, Soichiro Fukada, Motoi Kanagawa, Tatsushi, Mitsuharu Endo, Yasuhiro Minami: Role of NF- κ B-mediated expression of Ror1 during skeletal muscle regeneration: UNIV. WASHINGTON-KOBE UNIV.

INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 2014 年 12 月 15 日、Kobe, Japan

2 Yasuhiro Minami: Roles of Wnt5a-Ror Signaling in Pathological Conditions: UNIV. OF WASHINGTON-KOBE UNIV.

SYMPOSIUM, 2014 年 3 月 27 日、UW, Seattle, U.S.A.

3 Michiru Nishita, Sen Qiao, Mari Miyamoto, Yuka Okinaka, Makiko Yamada, Ryuju Hashimoto, Kazumoto Iijima, Hiroki Otani, Christine Hartmann, Ryuichi Nishinakamura, Yasuhiro Minami: Role of Wnt5a-Ror2 signaling in patterning the metanephric mesenchyme during ureteric budding: Keystone Symposia "Developmental Pathways and Cancer, 2014 年 2 月 4 日、Banff, Canada

4 遠藤 光晴、加藤 英、疋田 壮舞、南 康博: 反応性アストロサイトにおける Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼの役割: 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸

5 Mitsuharu Endo, Yasuhiro Minami: Functional analysis of Wnt5a-Ror signaling in regulation of progenitor proliferation during neocortical neurogenesis: Neuroscience 2013、2013 年 11 月 11 日、San Diego, U.S.A.

6 西田 満、喬 森、宮本 真里、沖中 由佳、山田 真紀子、飯島 一誠、大谷 浩、Christine Hartmann, 西中村 隆一、南 康博: 尿管芽形成における Wnt5a-Ror2 シグナ

ルの役割と腎尿路奇形: 第 22 回発達腎研究会、2013 年 9 月 14 日、大阪(高槻)

7 遠藤 光晴、土井 亮助、西田 満、南康博: 炎症性サイトカインによりアストロサイトで発現誘導される Ror1 受容体の機能解析: 2013 年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ、2013 年 8 月 31 日、名古屋

8 Yasuhiro Minami, Kaoru Yamagata, Mitsuharu Endo, Hiroki Otani, Ryuichi Nishinakamura, Michiru Nishita: Roles of Wnt/PCP signaling in pathological conditions of epithelial tubular tissues: First International Meeting for Epithelial Tubulology, 2013 年 6 月 23 日、Sapporo, Hokkaido

9 土井亮介、遠藤光晴、南康博: 骨格筋分化・再生モデルを用いた Ror シグナルの機能解析: 第 3 5 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場・マリンメッセ

10 西田満、喬森、宮本真理、山田真紀子、大谷浩、Christine Hartmann、西中村隆一、南康博: マウス腎臓発生における Wnt5a-Ror2 シグナルの役割: 第 3 5 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場・マリンメッセ

〔図書〕(計 2 件)

1 Endo, M., Nishita, M., Doi, R., Hayashi, M., Minami, Y.: ROR Receptor Tyrosine Kinase Family. Chapter 13, Receptor Tyrosine Kinases: Family and Subfamilies. edited by Wheeler, D. L. and Yarden, Y. (DOI 10.1007/978-3-319-11888-8_13) Springer Science, in press, 2015.

2 Endo, M., Minami, Y.: Regulation of neural progenitor cells by Wnt5a-signaling in the developmental central nervous system. Chapter 4, p. 71-86, **Progenitor Cells: Biology, Characterization and Potential Clinical Applications** (Horton, P. M., Lawrence, B. E. edited), Nova Science Publishers, Inc., 2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔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

遠藤 光晴(ENDO, Mitsuharu)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 90436444

(3) 連携研究者

該当なし()

研究者番号: