

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590316

研究課題名(和文) Gタンパク質共役型受容体の新規調節因子CRELD1の生体内機能の解明

研究課題名(英文) In vivo study of CRELD1 as a novel general gerulator for G-protein coupled receptors

研究代表者

西宗 敦史(Nishimune, Atsushi)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：40311310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)： 私達は様々な薬物やホルモンなどの生体内の情報伝達物質の作用点となっているG-タンパク質共役型受容体の候補調節因子としてCRELD1を見つけました。試験管内の実験で受容体量を大きく変動させる性質を持つCRELD1の生体内機能を調べるため、マウスのCRELD1遺伝子を破壊した実験を行ったところ、想定されたような大幅な受容体量の変化は見つけれませんでした。上あごに発生する癌がマウスに好発することを発見しました。上顎癌の発生の仕組みは他の癌に比べて解明が遅れているため、ヒトと類似した仕組みで上顎癌を発生するマウスは病因の解明や治療法の開発に役立てられると考えられます。

研究成果の概要(英文)： Our previous in vitro studies indicated that the CRELD1 could be a general regulator for multiple G-protein coupled receptors including adrenaline and/or muscarinic acetylcholine receptors. To obtain experimental evidence to support these observations, we created CRELD1 knock-out mice. At least for the heterozygous mice which carried one null allele for CRELD1, showed no significant receptor amount difference to their wild type litter mates. However, we made remarkable observation that these apparently healthy CRELD1 knock-out heterozygous animals developed later terrible maxillary sinus carcinoma at anomalous high frequency. Previous studies identified that 3p25, where human CRELD1 exists, as a candidate locus for the maxillary carcinoma. Although most researchers hypothesize several other tumor suppressor genes as powerful candidate genes, CRELD1 might be a genuine causative gene for the carcinoma. This study highlighted a potential importance of CRELD1 as a disease related gene.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、1L アドレナリン受容体の形成機構を分子レベルで解明するために、受容体の構成サブユニットである 1a 受容体ポリペプチドに結合するタンパク質の同定を試み、ヒト前立腺cDNA ライブラリーより酵母2 ハイブリッド法を用いたスクリーニングによって新規受容体結合タンパク質としてCRELD1 (Cysteine-Rich Epidermal growth factor-Like Domain 1) を単離した。受容体とCRELD1のCHO 細胞での共発現実験によって、実際に 1L アドレナリン受容体の *in vitro* 再構成に成功した。以上の結果より、もし CRELD1 が生体内でも 1Lアドレナリン受容体形成の必要条件となっていれば、CRELD1 欠失によって生体内から 1L 型表現型が消失し、おそらく 1A 型の表現型に転換することが予想された。

CRELD1 と 1A 以外のアドレナリン受容体サブタイプとの結合を解析するために、Yeast Two-hybrid assay を行ったところ、全てのアドレナリン受容体サブタイプと結合を示した。これは予想外の結果であったが、他の様々なGPCR についても同様に調べてみると、ClassA GPCR の広範なメンバーと結合が見られることが明らかとなった。

CRELD1 と結合の見られた 1 アドレナリン受容体の場合は、1A アドレナリン受容体の場合と同様に、CHO細胞、HEK293細胞などにおける共発現によって、受容体の細胞表面への発現の著しい減少が観察された。

以上のpreliminaryな観察結果に基づき、CRELD1のGタンパク質共役型受容体に対する機能的な影響は 1) 細胞膜表面への発現量の調節作用、及び 2) 相互作用する受容体の一部については、生体内での薬理学的性質の修飾、を有する事が考えられた。従って、上記の *in vitro* 実験において結合及び相互作用の見られたGPCRsを中心として、CRELD1は生体内で実際にGPCRsの制御に関与しているのかど

うかが次に解析すべき重要な研究課題として浮かび上がってきた。

他方、我々以外の複数の研究グループからヒトの先天性心疾患である心房心室中隔欠損症 (AVSD) の患者の一部がCRELD1の点突然変異を持つことが報告されてきた。既存の突然変異はいずれもミスセンス型の変異であり、ヘテロ接合で10%程度の不完全浸透性を示すことが知られており、AVSDの原因遺伝子の一つであると考えられてきた。最初の報告から続報として、複数のミスセンス変異アレルの存在が本邦を含む多様な地域から報告されている事から、ヒトの病態への関与が強く示唆されてきたが、CRELD1の生体機能に関する知見が乏しいため、疾患の発生機序については全く不明であった。

現在までのところヒトでのCRELD1欠失の症例は報告されていないのに対し、AVSD患者のもつミスセンス変異の報告は年々増えていている。このため、CRELD1を完全欠失させてしまった場合には致死を含むさらに重篤な表現型 (心奇形) を示す可能性も考えられた。しかしながら、もし完全欠失のヘテロ接合体で再現性よく中隔欠損症が見られるならば、疾患発生機序研究のための有用なモデル動物となる可能性が期待された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の3つの生命現象に対するCRELD1の個体レベルの役割を解明することである。

- (1) 1L アドレナリン受容体形成における役割と受容体量調節機能を持っているかどうかの決定。
- (2) ClassA GPCRs に対する個体レベルでの調節機構として機能しているかどうかの評価
- (3) 心発生における役割の解明、特にノックアウトによってAVSDが引き起こされるかどうか。

### 3. 研究の方法

CRELD1 の完全欠失アレルを持たせたノックアウトマウスを作製し、仔動物の遺伝子型と表現型の解析を行った。受容体の量と表現型については、放射性リガンドの組織片結合実験法を用い、生体内で受容体が機能している状態を模倣した環境で薬理的な受容体の性質を分析した。

### 4. 研究成果

CRELD1の完全欠失アレルは、ホモ接合体が胎生12日令までに全て胎生致死となった。野生型及びヘテロ接合体の仔の個体数比は、ホモ接合体が胎生致死である場合に予想される個体数比によく一致しており、欠失アレルをヘテロ接合に持つことのみでは出生時までの生存に特に影響を及ぼさないものと解釈された。継続して飼育しても、体重増加のタイムコースについては同腹の野生型個体と有為差が認められなかった。またヘテロ接合体に共通して特異な解剖学的異常は認められなかった。研究目的の(1)に関しては、ヘテロ接合およびその同腹の野生型ホモ接合の個体間で、3、5、9、週齢の雄個体について、顎下腺、大脳皮質、海馬、心房、心室、大動脈、肺、肝、膀胱、輸精管より試料を調製し、組織片ラジオリガンド結合実験を行って解析した。生体内の受容体量および表現型については、*in vitro*実験から示唆されたような著明な差は観察されず、CRELD1のhaploinsufficiencyによる受容体表現型への影響については否定的な結果となった。当初計画に含めていた、コンディショナルノックアウト(cKO)アレルを導入したマウスの作製が遅れ、最初の試みではキメラ個体10系統から、野生型C57BL/6との交配で得られた約200個体のF1の中にcKOアレルを持つヘテロ接合体が得られなかったため、ES細胞への再導入からやり直している段階で、個体レベルではCRELD1欠失ホモ接合体の表現型の解析は完了していない。

代替実験として、RNA干渉法を用いた、初代培養大脳皮質神経細胞でのノックダウン実験を行った。合成shRNAを初代培養細胞に導入し、ウェスタンブロッティング法で評価したCRELD1ポリペプチド量で対照の10%程度までノックダウンされたが、1アドレナリン受容体の受容体量に関しては対照と有意差が認められなかった。以上の結果より、*in vitro* 実験で観察された興味深い表現型は再現されず、受容体の制御に関しては生体内で機能していることを支持するデータは得られなかった。次に研究目的の(2)に関して、1アドレナリン受容体以外の他のGPCRsに関する影響についてもアドレナリン受容体及びムスカリン性アセチルコリン受容体について同様に結合実験を行った。こちらについても残念ながら*in vitro* 実験で観察された興味深い表現型は再現されず、受容体の制御に関しては生体内で機能していることを支持するデータは得られなかった。

胎子の発生はCRELD1完全欠失個体では胎生12日齢までには全数胎児死亡となり、発生が進行しなくなった。死亡する前日の胎生11日齢で解剖すると、野生型及びヘテロ接合体ではすでに二心房二心室が形成されているのに対し、ホモ接合体では発生が遅れ、対照より心臓全体が半分以下とかなり小さく、心室は左右とも形成されているが、右心房がまだ十分に発達しておらず、一見したところ心房が一つしかないように見えた。胎生致死の場合その原因が何かを決定することは困難な場合が多いが、この時期は胎児の循環が胎児自身の心臓に依存し始める時期であり、心発生の異常に伴う循環不全が直接的な死因となる場合が多い。心発達の遅延が観察されたことから、CRELD1の完全欠失体の場合の胎児死亡は、心形成に異常に由来するものであると結論した。ところが、右心房の発達の遅延がみとめられるものの、左右両心室間には一応開口の認められない中隔が形成されており、この形

態的異常および機能不全は、主因として中隔欠損によるものであるとは結論できなかった。以上より、研究目的(3)についての結論は、「CRELD1は胎児期の正常な心発生に必須の遺伝子の一つであり、完全欠失によって心発生に異常を来すため、胎生致死となるが、発生異常は中隔欠損を恐らく起こしておらず、更に重篤な表現型を示す。」こととなった。

計画の段階では全く予想されなかったことであるが特筆すべき結果として、40週齢以上の長期飼育を行った個体の中から、上顎に悪性腫瘍を生じた結果、片側の眼球が圧迫されて移動あるいは突出してくる個体が出現した。症状と組織像は上顎洞扁平上皮癌に類似していた。発症は全例(現在までに27個体)CRELD1ノックアウトアレルのヘテロ接合体で、ホモ接合体は胎生致死、野生型での発症例は一例もない。またこのように再現性よく同部位に発症する腫瘍もこれだけで、頭頸部の他の部位に腫瘍が形成された例は観察されていない。また、死亡個体を含めこの腫瘍が著明に生育した個体では、身体他の部位に少なくとも肉眼的に認められる明らかな腫瘍を生じたものはなかった。その意味で、発癌多発系統というよりも、上顎癌好発系統と言うべきものであると思われる。図1

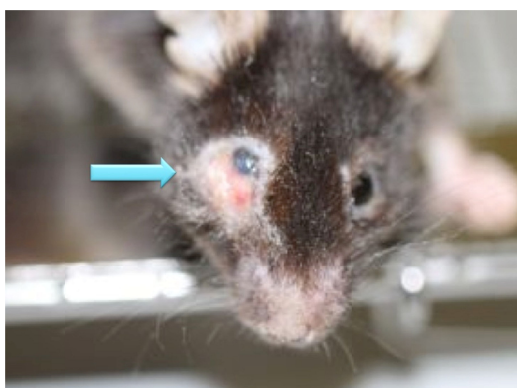


図1 CRELD1<sup>+/-</sup>個体が発症した上顎腫瘍の一例 右上顎に発生した腫瘍(矢印)が著しく眼球を上方へ圧迫している様子が認められる。いずれも対側は正常であり、両側に腫瘍の発生した個体は一例も観察されていない。

上顎洞癌などの上顎腫瘍は、発癌機構が他のよく研究されている悪性腫瘍とは異なることが明らかとなっており、腫瘍発生の

モデル動物の開発も遅れている。今後の研究課題として、上顎腫瘍の貴重なモデル動物として利用し、発癌の分子機序を追究してゆきたい。

## 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 3 件)

Sohtome T., Wada T., Mizuno T., Nemoto Y., Igarashi S., Nishimune A., Aono T., Ito Y., Kanda J., and Ishimaru T. Radiological impact of TEPCO's Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident on invertebrates in the coastal benthic food web. **J. Environ. Radioact.** **138**: 106 - 115. (2014). (査読有) doi: 10.1016/j.jenvrad.2014.08.008.

Ikeda T., Anisuzzaman AS., Yoshiki H., Sasaki M., Koshiji T., Uwada J., Nishimune A., Itoh H., and Muramatsu I. Regional quantification of muscarinic acetylcholine receptors and  $\beta$ -adrenoceptors in human airways. **Br. J. Pharmacol.** **166**:1804-1814. (2012). (査読有) doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01881.x.

伊藤貴之・西宗敦史. 魚類における放射性セシウムの局在性について(短報). **福島県水産試験場研究報告** 16:115-118. (2013) (査読無)

〔学会発表〕(計 1 件)

早乙女忠弘他、福島県海域の餌料生物から検出された東電福島第一原子力発電所事故に起因する放射性Cs濃度の推移 平成25年度 日本水産学会春季大会(2013)

〔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

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

西宗 敦史 (Nishimune, Atsushi)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：40311310

### (2)研究分担者

村松 郁延 (Muramatsu, Ikunobu)

福井大学・金沢医科大学・特命教授

研究者番号：10111965