

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461394

研究課題名(和文) GH-IGF1軸シグナル伝達の新展開 分子間相互作用の解明

研究課題名(英文) New Insights into the GH-IGF1 axis of Signal Transduction: Elucidation of the Molecular Interactions

研究代表者

京 雪楓 (Jing, Xuefeng)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・准教授

研究者番号：70316123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン様成長因子(IGF1)は生後の成長に重要な役割を果たす。このIGF1産生においてこれまでは成長ホルモン(GH/GHR)シグナルのみが重要であるとされてきたが、私達はephrin/EphA4シグナル伝達系がこのシグナル系と相互作用していることを以前に報告している。今回の研究ではこれら2つのシグナル伝達系分子の分子間相互作用を調べた。それぞれのシグナル伝達系の分子が複雑に相互作用し、シグナル伝達を強化していることが判明した。GHRの発現がシグナル伝達に必須であることも発見した。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that EphA4, a member of the Eph family of RTK, is an important modulator of growth hormone (GH) signaling, leading to augmented synthesis of IGF1 for postnatal body growth. We report here the molecular interactions of EphA4, GH receptor (GHR), JAK2 and STAT5B. EphA4 binds to GHR at both its extracellular and intracellular domains and phosphorylates GHR when stimulated with a ligand. The cytoplasmic domain of EphA4 binds to the carboxy-terminus of JAK2. STAT5B binds to the amino-terminal kinase domain of EphA4. Ligand-activated EphA4 and JAK2 phosphorylate each other and STAT5B, but JAK2 does not appear to phosphorylate EphA4-bound STAT5B. Ligand-activated EphA4 induces the nuclear translocation of STAT5B in a JAK2-independent manner. GHR expression is required for the activation of STAT5B signaling, even via the JAK2-independent pathway. These findings suggest the molecular mechanisms by which ephrin/EphA4 signaling enhances the canonical GH-IGF1 axis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：EphA4 GHR JAK2 STAT5B GH-IGF1

1. 研究開始当初の背景

生後の体格形成には、GH-IGF1 軸と一括して呼ばれる下垂体からのGH 分泌、および肝や末梢組織におけるGHR 下流シグナルを介するIGF1 産生が大きく関わっている。GHR のシグナル伝達機構としては、これまでリガンドはGH のみとされ、これがGHR に結合することによりJAK2 が活性化され、JAK2 がSTAT5B を活性化し、活性化されたSTAT5B が核内に移動することにより転写因子として働いてIGF1 の転写を亢進するという経路が定説と考えられてきた。

私どもは、生直後の体重には差が無いにも拘らず、その後のEpha4 KO マウスの体格が小さいことから、EphA4 の作用機序を *in vivo* および *in vitro* で詳細に研究し、EphA4 がGH/GHR シグナル系のGHRと直接結合することにより体格決定に関与していることを突き止めた。この結合はEphA4 が活性化されたときにおこり、GHR の下流シグナルであるJAK2 およびSTAT5B の活性化を増強する。さらに、EphA4 はSTAT5B と直接結合してこれを活性化することもJak2 (-/-) およびGhr (-/-) 細胞を用いて証明した。これらの2 経路によるSTAT5B の活性化に比例してIgf1 の転写も亢進した。Epha4 KO マウスにおいては、肝およびその他の複数の臓器からのIGF1 産生が低下しており、血中IGF1 も低下していた。治療に対する反応としては、EphA4 KO マウスの成長障害はIGF1 皮下注により改善されるが、GH 皮下注は無効であることも判明した。これらのことから、私どもはこれまでの定説を修正するGHR/EphA4/JAK2/STAT5B およびEphA4/STAT5B の2 つのSTAT5B 活性化経路とその下流のIGF1 産生機構の存在を明らかにした。

2. 研究の目的

(1) EphA4 が従来の定説に基づく複合体 (GHR/JAK2/STAT5B) にどのような働きをす

るかを調べるために、EphA4 のどのドメインがGHR、JAK2 およびSTAT5B と結合するかを決定する。

(2) GHR 無発現状態でのEphA4 のIGF1 産生への作用機序を調べるために、Ghr (-/-) 線維芽細胞を使ってEphA4 の活性化によるJAK2 の活性化(リン酸化)、STAT5B の活性化(リン酸化)およびIGF1 産生の変化を調べる。

(3) EphA4 のIGF1 産生への作用がどの程度JAK2 に依存しているのかを調べるために、Jak2(-/-) 線維芽細胞でも同様にEphA4 の活性化によるGHR の活性化(リン酸化)、STAT5B の活性化(リン酸化)、およびIGF1 産生の変化を調べる。

(4) JAK2 無発現下でEphA4 の作用発揮がどの程度GHR に依存しているかを調べるため、Jak2(-/-) 線維芽細胞内でshRNA を用いてGhr ノックダウンを行い、その影響をSTAT5B の活性化(リン酸化)、およびIGF1 産生の変化を指標として調べる。

3. 研究の方法

(1) EphA4 のどのドメインがGHR、STAT5B およびJAK2 と結合するかを決定した。EphA4 およびGHR の部分的欠損分子発現ベクターをpcDNA3.1 vector を使って作製し、HEK293T 細胞で発現させた後に免疫沈降および免疫プロット(IP&IB)実験にて調べた。

(2) GHR 無発現下でのEphA4 のIGF1 産生への作用機序を調べるために、Ghr (-/-) 線維芽細胞を使ってEphA4 の活性化によるJAK2 の活性化(リン酸化)、STAT5B の活性化(リン酸化)およびIGF1 産生の変化を調べた。Ghr (-/-) マウス胚から線維芽細胞を作製・培養し、内在性EphA4 をリガンドで刺激することによりJAK2 およびSTAT5B のリン酸化をIP&IB 実験にて調べた。

Igf1 mRNA を定量的RT-PCR にて調べた。培養液中のIGF1 はELISA で測定した。上記結

果を、GHR 発現をレスキューした線維芽細胞とで比較した。

(3) EphA4 による IGF1 産生の JAK2 依存度を調べるために、*Jak2* (-/-) 線維芽細胞でも同様に EphA4 の活性化による GHR の活性化 (リン酸化)、STAT5B の活性化 (リン酸化)、および IGF1 産生の変化を調べた。

(4) JAK2 無発現下で EphA4 の作用発揮がどの程度 GHR に依存しているかを調べた。*Ghr* に対する shRNA (および control shRNA) を lentivirus にて導入し *Ghr* ノックダウンを行った。その影響を IP&IB 実験による STAT5B の活性化 (リン酸化) で調べた。

4. 研究成果

EphA4、GHR、JAK2 および STAT5B の相互作用に関する研究を実施した。EphA4 と GHR は細胞内外両ドメインで結合すること、EphA4 のキナーゼドメインの N 端に STAT5B が結合すること、JAK2 の N 端に GHR が結合し、JAK2 の C 端に EphA4 が結合することを発見した。EphA4 がリガンドで刺激された場合、直接 STAT5B をリン酸化して活性化するのみではなく、JAK2 をリン酸化することにより活性化しこの JAK2 による STAT5B の活性化にも間接的に関わることも発見した。興味あることに、*Jak2* (-/-) の線維芽細胞でも、EphA4 が STAT5B を活性化するためには GHR の発現が必須であることを発見した。このことは、EphA4 は GHR と複合体を形成することにより STAT5B への作用の場を提供されていると考えることができる。つまり、GHR の発現が、STAT5B が活性化されるための必須条件であるということである。

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 4 件)

1 Sawada T*, Arai D* (*co-first author), Xuefeng Jing, Miyajima M, Stuart J. Frank, Sakaguchi K. Molecular Interactions of EphA4, GH receptor, JAK2 and STAT5B leading to

IGF1 production. PLoS ONE (2017, in press)

2 Xuefeng Jing (corresponding author), Sonoki T, Miyajima M, Sawada T, Terada N, Takemura S, Sakaguchi K. EphA4-deleted microenvironment regulates cancer development and leukemoid reaction of the isografted 4T1 murine breast cancer via reduction of an IGF1 signal. Cancer Medicine 査読有 1-14, 2016: DOI: 10.1002/cam4.470.

3 Sawada T*, Arai D*, Xuefeng Jing* (*co-first author), Furushima K, Chen Q, Kawakami K, Yokote H, Miyajima M, Sakaguchi K. Trans-Activation between EphA and FGFR Regulates Self-Renewal and Differentiation of Mouse Embryonic Neural Stem/Progenitor Cells via Differential Activation of FRS2 α . PLoS ONE. 査読有, 29;10(5) 2015: e0128826. DOI: 10.1371/journal.pone.0128826.

4 Chen Q, Arai D, Kawakami K, Sawada T, Xuefeng Jing, Miyajima M, Hirai S, Sakaguchi K et al. EphA4 Regulates the Balance between Self-Renewal and Differentiation of Radial Glial Cells and Intermediate Neuronal Precursors in Cooperation with FGF Signaling. PLoS ONE 査読有, 10(5) 2015: e0126942. DOI: 10.1371/journal.pone.0126942.

[学会発表] (計 5 件)

1 Xuefeng Jing, Sonoki T, Miyajima M, Sawada T, Terada N, Takemura S, Sakaguchi K. Host EphA4 regulates Breast cancer progression via crosstalk of humoral and cell-cell contact-mediated signals. The 38th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan with the 88th Annual Meeting of the Biochemistry, Kobe, 2015/12/1

2 澤田貴宏、新井大貴、京雪楓、古島謙亮、陳清法、河上和紀、横手秀行、宮嶋正康、鎌田一、坂口和成. Eph-FGFR-FRS2 α 複合体シグナルがマウス胎生神経細胞の増殖と分化を調節する 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2015/12/1

3 新井大貴、澤田貴宏、京雪楓、古島謙亮、坂口和成. EphA4/GH 受容体ヘテロ複合体を介する IGF1 産生シグナル制御メカニズムの解析 (続報) 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014/11/25

4 新井大貴、澤田貴宏、京雪楓、古島謙亮、河上和紀、宮嶋正康、坂口和成. 新規体格形成シグナル伝達系における分子機構の解析. 第 87 回日本内分泌学会学術総会、福岡、2014/4/24

5 Sawada T, Arai D, Xuefeng Jing, Miyajima M, Chen Q, Kawakami K, Furushima K, Sakaguchi K. Molecular mechanisms of EphA4-mediated signal modulation of the growth hormone

(GH)-insulin-like growth factor 1 (IGF1) axis.
Endocrine Society's 95th Annual Meeting. San
Francisco 2013/6/15

〔招待講演〕(計2件)

1 坂口和成、澤田貴宏、新井大貴、京雪楓、古島謙亮、河上和紀、宮嶋正康 成長ホルモン様成長因子(IGF1)軸(GH-IGF1 axis)シグナル伝達系の新展開. 第56回日本甲状腺学会学術集会、和歌山県民文化会館、2013/11/16

2 坂口和成、澤田貴宏、京雪楓、新井大貴、古島謙亮、飯田啓二、千原和夫、宮嶋正康 体格決定の新規分子機構 第86回日本内分泌学会学術総会、仙台国際センター、2013/4/27

6. 研究組織

(1)研究代表者

京 雪楓 (JING Xuefeng)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・准教授

研究者番号：70316123

(2)研究分担者

澤田 貴宏 (SAWADA Takahiro)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・非常勤講師

研究者番号：00382325

坂口 和成 (SAKAGUCHI Kazushige)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・教授
研究者番号：60178548

宮嶋 正康 (MIYAJIMA Masayasu)

和歌山県立医科大学・共同利用施設・講師
研究者番号：80137257

(3)連携研究者

(4)研究協力者

Stuart J. Frank MD. Professor and Director,
Department of Medicine, Division of
Endocrinology and Metabolism, University
of Alabama at Birmingham, USA