

## 平成18年度 学術創成研究費 研究進捗状況報告書（中間評価用）

平成18年3月31日現在

ふりがな	のだ まこと		所属研究機関・ 部局・職	京都大学・医学研究科・教授				
研究代表者 氏名	野田 亮							
研究課題名 (英訳名)	生体内における細胞外マトリックス・リモデリングの役割と制御機構の解明 Roles and Regulatory Mechanisms of Extracellular Matrix Remodeling <i>in vivo</i>							
研究経費 (千円未満切捨) <small>平成16,17年度使用内訳は支出額、平成18年度以降の交付額は内約額、使用内訳は支出予定額を記入</small>	年度	研究経費(千円)		使用内訳(千円) <平成18年度以降は支出予定額>				
		交付額	支出額	設備備品	消耗品費	旅費	謝金等	その他
	平成16年度	75,200	75,200	40,390	26,309	405	4,368	3,728
	平成17年度	99,300	99,300	57,583	24,432	328	11,272	5,685
	平成18年度	96,400	-	21,500	54,000	500	14,500	5,900
	平成19年度	96,400	-	20,500	54,500	500	15,000	5,900
	平成20年度	96,400	-	19,500	55,000	500	15,500	5,900
総計	463,700							
<b>研究組織（研究代表者及び研究分担者）</b>								
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）					
野田 亮	京都大学・医学研究科 ・教授	分子腫瘍学	研究の総括。細胞培養における実験					
松崎 朋子	京都大学・医学研究科 ・助手	分子腫瘍学	生化学的実験および動物実験					
北山 仁志	京都大学・医学研究科 ・助教授	分子腫瘍学	生化学的実験（海外留学の為、平成17年度より転出）					
吉田 陽子	京都大学・医学研究科 ・助手	分子腫瘍学	生化学的実験および動物実験（平成18年度より参加）					
計4名								

**当初の研究目的** (交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。)

哺乳動物における組織形成の理解には、細胞自体の性質や挙動だけでなく、それらを制御しつつ形態形成に関わる細胞外マトリックス (ECM) の、時間的-空間的挙動への理解が必須と考えられる。ras がん遺伝子でトランスフォームした NIH3T3 細胞を正常復帰させる遺伝子として単離された RECK は、複数の ECM 分解酵素群 (MMP ファミリー) を制御する新規膜結合型 (GPI-アンカー) タンパク質をコードし、遺伝子欠損マウスの解析から、血管発生や ECM の維持に必須の遺伝子であることが明らかにされている。また、その発現異常が、がんを始めとする多くの ECM 異常を伴う疾患に関与することが示唆されている。しかし、RECK 欠損マウスが胎生致死形質を示すことから、発生後期から成体期における RECK の機能は未だ明らかにされていない。そこで、本研究課題では、(1) RECK タンパク質の基本的性質の解明、(2) conditional knockout mouse や transgenic mouse を用いた、発生後期から成体期における RECK の機能解明、(3) RECK の発現を制御する技術の開発、(4) 新たなトランスフォーメーション抑制遺伝子の単離と作用機構解明、の4つの研究を進め、ECM 制御のメカニズムと正常個体および病態における ECM の役割に洞察を加える。

**これまでの研究経過**

1. 本研究は、(1) 独自に開発した遺伝子および薬剤探索法を駆使する、(2) 細胞表面近傍における ECM の保護というユニークな活性を持つ RECK タンパク質を中心テーマとする、(3) 従来、脇役とみなされてきた ECM の役割解明に挑む、などの点で独自性がある。20 名余りの研究グループを形成し、創造的・革新的な成果を目指して積極的に研究を進めている。

2. 研究の進捗状況

**(1) RECK タンパク質の基本的性質に関する研究**

**i) 分子レベルでの解析**

His タグを持つ組換え体 RECK タンパク質を、培養細胞と大腸菌を宿主として発現させ、精製する方法を確立した (未発表)。RECK は細胞外タンパク質であるが、実験条件を調整することによって yeast two-hybrid クスリーニングによる結合タンパク質の検出が可能であることが分かった。この方法によって見出された分子には、細胞外プロテアーゼやイオンチャネルなど、興味深い分子が含まれている (未発表)。

**ii) 細胞レベルでの解析**

a. 筋肉分化との関わり： 胎生 13.5~14.5 日のマウスにおける RECK タンパク質の組織分布をモノクローナル抗体を用いた免疫染色法で調べたところ、筋肉組織に比較的高い発現が見られた。RECK の分布は、筋肉発生を制御する bHLH 型転写因子群の内 MRF4 と良く一致し、MyoD とは異なることが示唆された。培養細胞を用いた実験から、RECK 遺伝子の転写が MRF4 により活性化され MyoD により抑制されること、RECK の強制発現が筋管形成を抑制すること、逆に RECK の欠損や MMP の強制発現が筋管形成を促進することが見出された。これらより、RECK が MRF ファミリーによる発現制御を受け、筋肉分化に対して初期には抑制的に、後期には促進的に作用することが示唆された。また、これまで MRF ファミリーの各メンバーは、生体内における発現の時期や場所が異なるだけで、生物活性には大差がないと考えられてきたが、RECK の制御に関しては相反する活性を持つという意外な事実が明らかとなった (成果 8)。

b. 軟骨分化との関わり： 胎生 13.5~16.5 日のマウスにおける RECK mRNA の組織分布を *in situ* hybridization 法を用いて調べたところ、軟骨において、筋肉よりもさらに高い発現が検出された。軟骨分化を培養下で再現できる ATDC5 細胞を用いて RECK、MMP、コラーゲン (I 型および II 型) などの発現を解析したところ、細胞凝集の起こる初期には RECK の発現は低く細胞凝集部位における MMP の発現が見られるのに対し、II 型コラーゲンなどの細胞外マトリックスが蓄積してくる後期には、軟骨状結節の内部において RECK の発現が高まることを見出された。RECK 強制発現が細胞凝集を阻害し、RECK shRNA

**これまでの研究経過 つづき**

が軟骨状結節の成熟（細胞外マトリックスの蓄積）を阻害することも示された（近藤ら、投稿中）。これらの研究より、RECK の発現変化が組織形態形成の制御に關与する可能性が強く示唆された。

**(2) 哺乳類の発生期および成体における RECK の役割に関する研究**

i) conditional knockout マウス： Exon 1 を 2 つの loxP 配列で挟んだもの、Exon 2 を 2 つの loxP 配列で挟んだもの、という 2 種の targeting vector を構築し、Exon 1 については、組換え体 ES 細胞の樹立が完了した。

ii) conditional transgenic マウス： 全身発現性プロモーター（CAG）の下流に RECK cDNA をつないだ transgene を持つ、transgenic mouse を作成したところ、発生のごく初期に異常が起こり、胎生致死となることが分かった（未発表）。そこで、CAG プロモーターと RECK cDNA との間に 2 つの loxP 配列で挟んだ green fluorescent protein (GFP) 遺伝子を挿入した conditional transgene を構築し transgenic マウスを作成した。

iii) 臨床検体における RECK の発現： 大腸癌、肺非小細胞癌における RECK 発現と患者予後の相関性を示すデータが得られた（京大呼吸器外科および奈良医大消化器外科との共同研究）。また、大腸癌では、MMP-9 量というパラメーターを併用することによって、より正確な予後予測が可能であること（成果 4）、肺非小細胞癌では、血管内皮増殖因子（VEGF）の発現している腫瘍で微小血管密度と RECK 発現量との間に逆相関が見られること（成果 2, 9）なども分かった。

**(3) RECK の発現を制御する化合物の探索**

RECK プロモーターの下流にマーカー遺伝子（SEAP）をつないだリポーターを用いて、RECK 遺伝子誘導活性を持つ化合物を検索し、線維肉腫細胞の内在性 RECK 遺伝子の発現を誘導し、その浸潤能を抑制する新規化合物数種を見出した（未発表）。

**(4) 新たなトランスフォーメーション抑制遺伝子の単離と作用機構の解明**

i) 新たな transformation suppressor genes の単離： 市販の retroviral cDNA library を用いて、新たな Ras 悪性転換抑制遺伝子の検索を行い、12 株の flat revertants を得た。これらの細胞より、PCR 法による cDNA の回収を試み、これまでに 1 種類の新規遺伝子を回収した（未発表）。

ii) 新たな cDNA ライブラリーおよび遺伝子探索系の構築： ゲノムに組み込まれた proviral DNA 全体を容易に大腸菌プラスミドとして回収できる新たな retroviral vector を構築した（未発表）。また、RECK 活性化遺伝子の探索に用いる指示細胞として、蛍光タンパク質遺伝子 GFP と薬剤耐性遺伝子 BSD を融合させたものを RECK promoter の下流につなげたりポーターを構築し、これを NIH3T3 細胞に導入した。

iii) 完全長 cDNA コレクションを用いた予備実験： 既に annotation された完全長 cDNA 発現プラスミド 800 種を用いて RECK プロモーターの下流に luciferase をつないだリポーターと共に HEK-293 細胞に co-transfection し、RECK 活性化遺伝子の探索を試みた。その結果、17 種の比較的高い RECK 発現誘導活性を持つ cDNA が見出された。興味深いことに、これらの内には、RECK 自体よりも強い DT 細胞 flat reversion 誘導活性を示すものも含まれていた（未発表）。

その他の成果：(1) 細胞骨格制御タンパク質 Sept4 が、正常な形態と活動性を持った精子の形成に必須であることを見出した（成果 7）。(2) 悪性転換抑制因子として以前に同定した Rap1 が、神経細胞の電位依存性ナトリウム電流を抑制することを見出した（成果 3）。(3) 複数ある Rap1 活性化経路の内、C3G を介する経路を特異的に阻害する dominant negative Rap1 変異体を、独自の手法を用いて見つけ出した（成果 5）。(4) がん抑制遺伝子 Rb を欠損したマウスには甲状腺腫瘍が生ずる。多重変異マウスを用いた実験によって、従来がん遺伝子として知られていた N-ras が、この発がんモデル系においては、がん悪性化抑制因子として機能することを見出した（Dana Farber がん研究所、Ewen グループとの共同研究；成果 10）。(5) TIMP-2 が paxillin のリン酸化、RECK の発現亢進を介して血管内皮細胞の運動に影響を与えることを見出した（米国立がん研究所、Stetler-Stevenson グループとの共同研究；成果 6, 11）。

## 特記事項

これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入するとともに、推薦者の期待がどの程度達成されつつあるかについて記入してください。

### I. これまでに得られた成果の独創性、新規性、学術的インパクト

#### (1) 臨床医学へのインパクト

以前に報告した肝癌、膵癌に加え、大腸癌、非小細胞肺癌においても、腫瘍での RECK 発現量と患者の生存との間に相関性が見出された。別のグループによって、乳癌、骨肉腫などにおいても同様の知見が得られている。RECK ががんの浸潤、転移、血管新生を抑制する活性を持つことを考えると、本研究において既に見出されている RECK 活性化遺伝子や薬剤が、多種のがんの治療法開発に結びつく可能性が考えられる。

#### (2) 発生生物学へのインパクト

発生に伴う RECK の発現解析と培養細胞を用いた実験から、筋肉や軟骨の発生において、RECK の発現量が ECM の分解と蓄積のバランスの制御、ひいては組織形態形成に密接に関わることが強く示唆された。今後、条件的遺伝子改変マウスを用いた実験を進めることによって、この仮説を検証し、発生における RECK および ECM リモデリングの意義について新たなモデルを提唱できるものと考えている。

#### (3) 多数の有望な新規遺伝子および化合物の発見

これまでの研究から RECK 遺伝子を活性化する 10 種以上の遺伝子と数種の化合物を見出した。また、non-coding RNA を発現する新しいカテゴリーの transformation 抑制遺伝子も単離された。これらの解析を進めることによって、RECK 遺伝子の発現制御、ECM リモデリング、発がん等のメカニズム解明に向け、新たな突破口が開かれる可能性がある。

#### (4) 過去の研究課題の発展

科学研究費の助成を受けた過去の研究プロジェクトの発展として

1. N-ras は甲状腺腫瘍の悪性化抑制活性を持つ
2. Sept4 は精子形成に必須である

という 2 つの興味深い知見が得られ、それぞれ、インパクトの高い雑誌 (1. Nature Genetics; 2. Developmental Cell) に掲載されると共に新聞報道にも取り上げられた(主要各紙: 1. 2005/12/19; 2. 2005/3/1)。

### II. 目標達成度

推薦者からは、「RECK の機能解明が発生学および医学分野における重要課題の解決につながる可能性が高いと考え本研究課題を取り上げた」と承っている。これまでに、RECK の機能解析に関する研究としては、発生に関わる 3 つの研究と細胞機能に関する 4 つ研究において論文発表に十分な成果が得られ、その内 3 編が既刊 (内 2 編は共同研究)、1 編が投稿中、3 編が投稿準備中である。また、がんにおける RECK の発現量と良好な予後との関連性を示す、臨床材料を用いた研究成果が国内外の研究グループから続々と発表されていることから、RECK がヒトがんの悪性度を左右する重要な因子であることは、もはや疑いのないものと思われる。組換え体タンパク質の精製および遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* での研究は、当初の計画よりやや遅れている。一方、新規遺伝子や薬剤の探索においては、予備実験の段階から興味深い材料が多数得られ、予想を上回るペースで研究が進展している。従って、今後、タンパク質レベルおよび遺伝子改変マウスを用いた研究を重点的に促進する手立てを講ずると共に、新たに発見された分子の機能解析を、これまでの経験を活かしつつ積極的に進めることで、当初の目標は達成される可能性が高いものと考えている。

## 研究成果の発表状況

この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（投稿中の論文を記入する場合は、掲載が決定しているものに限ります。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）及び国際会議、学会等における発表状況について、2頁以内に記入してください。

1. J. Oh, R. Takahashi, E. Adachi, S. Kondo, S. Kuratomi, A. Noma, D. B. Alexander, H. Motoda, A. Okada, M. Seiki, T. Itoh, S. Itohara, C. Takahashi and M. Noda: Overlapping functions between two distinct matrix metalloproteinases, MMP-2 and MT1-MMP, in mouse. *Oncogene* **23**, 5041-5048 (2004)
2. K. Takenaka, S. Ishikawa, Y. Kawano, K. Yanagihara, R. Miyahara, Y. Otake, Y. Morioka, C. Takahashi, M. Noda, H. Wada and F. Tanaka: Expression of a novel MMP regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. *Eur. J. Cancer* **40**, 1617-1623 (2004)
3. Y. Imamura, N. Matsumoto, S. Kondo, H. Kitayama and M. Noda: Effects of Rap1 and Ras on voltage-gated sodium current in cultured neuronal cells. *Neuroscience* **127**, 973-981 (2004)
4. T. Takeuchi, M. Hisanaga, M. Nagao, N. Ikeda, H. Fujii, F. Koyama, T. Mukogawa, H. Matsumoto, S. Kondo, C. Takahashi, M. Noda, and Y. Nakajima: The Membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* **10**, 5572-5579 (2004)
5. S. Shi, M. Noda and H. Kitayama: Rap1 mutants with increased affinity for the guanine-nucleotide exchange factor C3G. *Oncogene* **23**, 8711-8719 (2004)
6. J. Oh, D. Seo, T. Diaz, B. Wei, Y. Ward, J. M. Ray, Y. Morioka, S. Shi, H. Kitayama, C. Takahashi, M. Noda and W. G. Stetler-Stevenson: TIMP-2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. *Cancer Res.* **64**, 9062-9069 (2004)
7. M. Ihara, A. Kinoshita, S. Yamada, H. Tanaka, A. Tanigaki, A. Kitano, M. Goto, K. Okubo, H. Nishiyama, O. Ogawa, C. Takahashi, S. Itohara, Y. Nishimune, M. Noda and M. Kinoshita: Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. *Developmental Cell* **8**, 343-352 (2005)
8. M. Echizenya, S. Kondo, R. Takahashi, J. Oh, S. Kawashima, H. Kitayama, C. Takahashi and M. Noda: The membrane-anchored MMP-regulator RECK is a target of myogenic regulatory factors. *Oncogene* **24**, 5850-5857 (2005)
9. K. Takenaka, S. Ishikawa, K. Yanagihara, R. Miyahara, S. Hasegawa, Y. Otake, Y. Morioka, C. Takahashi, M. Noda, H. Ito, H. Wada and F. Tanaka: Prognostic significance of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs expression in resected pathologic stage IIIA N2 non-small-cell lung cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **12**, 817-24 (2005)
10. C. Takahashi, B. Contreras, T. Iwanaga, Y. Takegami, A. Bakker, R. T. Bronson, M. Noda, M. Loda, J. L. Hunt and M. E. Ewen: N-ras loss induces metastatic conversion of Rb-deficient neuroendocrine thyroid tumor. *Nature Genetics* **38**, 118-123 (2006)
11. J. Oh, T. Diaz, B. Wei, H. Chang, M. Noda and W. G. Stetler-Stevenson: TIMP-2 upregulates RECK expression via dephosphorylation of paxillin tyrosine residues 31 and 118. *Oncogene* (in press)