

科学研究費補助金（学術創成研究費）公表用資料
〔事後評価用〕

平成16年度採択分

平成22年3月31日現在

研究課題名（和文）

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

研究課題名（英文） Roles and Regulatory Mechanisms of Extracellular Matrix Remodeling *in vivo*

研究代表者

氏名 野田 亮 (Noda, Makoto)

所属研究機関・部局・職 京都大学・医学研究科・教授



推薦の観点：創造的・革新的・学際的学問領域を創成する研究

研究の概要：がん遺伝子による悪性転換を抑制する因子として発見された *RECK* は、細胞外マトリックス (ECM) 分解酵素群 (MMPs) の膜アンカー型阻害因子をコードする。*RECK* の発現は多くのがんで悪性度と相関して低下しており、*RECK* の強制発現は腫瘍血管新生、浸潤、転移を抑制する。一方、*Reck* 欠損マウスは組織構築の乱れを伴う胎生致死形質を示すことから、発生における重要性も示唆された。そこで、発生後期および成体における *Reck* や ECM の役割解明を目指して種々の *Reck* 遺伝子改変マウスを作成した。また、*RECK* の分子、細胞、組織レベルにおける働き、*RECK* の発現制御機構、*Reck* 遺伝子活性化物質、新たな悪性転換抑制遺伝子などの研究を進めた。本研究で得られた知識や材料は、がんを含む細胞外マトリックス制御の異常を伴う疾患の診断や治療の開発に役立つと考えられる。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：がん 発生 マウス遺伝学 MMP ADAM Notch シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

がん遺伝子 *Ras* の作用機構を解明する目的でその活性を抑制する遺伝子 cDNA の発現クローニング系を樹立し、新規遺伝子 *Krev-1 (RAP1A)* と *RECK* を単離した。この内 *RECK* は、多くのがん細胞株やがん組織で発現低下が見られ、マウス移植腫瘍を用いた実験では腫瘍血管新生、浸潤、転移の抑制効果を示す。*RECK* 糖タンパク質 (125 KDa) は膜に GPI アンカーされ、MMP2、MMP9、MT1-MMP を阻害すること、また、*Reck* 欠損マウスが胎生中期 (E10.5) に血管発生の停止と組織構築の乱れを伴う致死形質を示すことが見出された。これらの知見から、ショウジョウバエからヒトまで単一遺伝子として保存されてきた *Reck* が、細胞表面タンパク質分解の主要な制御因子である可能性が考えられた。

2. 研究の目的

Reck の分子、細胞、組織、個体レベルでの機能および発現制御機構を明らかにし、生理的あるいは病態における ECM リモデリングの役割に洞察を加える。また、新たな抗がん剤の探索系を確立する。

3. 研究の方法

1) 条件的 *Reck* 欠損マウスおよび *Reck*-Cre マウスを作成する。
2) *Reck* 欠損マウスの個体および培養細胞を用いて *Reck* の作用機構に洞察を加える。

3) 組換え体 *RECK* タンパク質の発現、精製法を確立し、その構造と分子機能を解明する。

4) *RECK* 遺伝子の発現制御機構を解明すると共に、*RECK* プロモーターの活性を変化させる薬剤を探索し、それらの薬理効果を検証する。

5) 新たな悪性転換抑制遺伝子を網羅的に単離し、それらの機能および相互作用を調べる。

4. 研究の主な成果

1) 条件的 *Reck* 欠損マウスの作成：第1エクソンを loxP で挟んだ遺伝子座2種および第2エクソンを loxP で挟んだ遺伝子座1種を持つマウスをそれぞれ作成した。また、後者を作成する過程で *Reck* mRNA 量の低下したマウスを得た。*Reck* の第5コドン以降に Cre 配列をノックインしたマウスを作成した。これらは、*Reck* の組織・時期特異的欠損、発現パターン解析、*Reck* 発現細胞における各種遺伝子操作に有用となる。

2) *Reck* および *Mmp* 欠損マウスの解析：E10.5 の野生型マウスでは神経管の Nestin 陽性細胞で *Reck* の高い発現が見られる。*Reck* 欠損マウスではこの Nestin 陽性細胞数が激減し、分化した神経細胞が広範囲に散在することが見出された。これは、ADAM10 の脱制御による Notch リガンドの過剰 shedding によることが判明した。*Reck* 欠損線維芽細

胞では接着斑と細胞移動の方向の安定性が失われること、線維肉腫細胞では RECK が MT1-MMP、CD13 など細胞表面プロテアーゼのエンドサイトーシスと分解促進に関わることを見出した。また、*Mmp2/Mmp14* 二重欠損マウスが血管や筋肉の発達遅延を伴う新生仔致死形質を示すことも見出した。これは *Mmp* 間の機能的冗長性を明らかにした最初の例である。

3) RECK タンパク質の性質：*Mmp2/Mmp14/Reck* 三重欠損線維芽細胞株を宿主として組換え体 RECK タンパク質 (RECK-His) を発現し、単一バンドにまで精製する方法を確立した。この材料を用いた解析から RECK がユニークな釣り鐘型 2 量体を形成すること、MMP7 による fibronectin の切断を抑制することなどを見出した。

4) RECK の発現制御：野生型マウスの発生後期において筋線維、軟骨、神経筋接合部などにおける Reck の高発現を見出した。正常線維芽細胞においては、Reck の発現が細胞密度と血清濃度によって大きく変動し、これらの制御には Src、Fak、PI3-kinase が関与することを見出した。また、ヒト大腸がん由来細胞株では、RAS/ERK 経路によって発現誘導される miR-21、低酸素によって発現誘導される miR-372/373、構成的に発現される miR-15/16 という 3 群のマイクロ RNA が RECK タンパク質の発現量を負に制御することを見出した。Reck 遺伝子プロモーターの下流に分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) 遺伝子をつないだものを導入したラット線維芽細胞を樹立し、Reck プロモーターを活性化する薬剤スクリーニング系を作った。既知化合物 880 種を用いた予備実験では、既知の抗がん剤や転移抑制活性を持つ薬剤が多数見出された。

5) 新たな悪性転換抑制遺伝子の探索：新たに開発したファージミド・ベクターを用いて全長 cDNA 発現ライブラリーを構築し、高効率に悪性転換抑制遺伝子を単離同定できる系を確立した。既に 75 種の cDNA を取得し、一部の機能解析を進めている。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

期間内に RECK に関する 18 編の論文を発表した。この間、Title に「RECK」を含む論文は世界中から 76 編発表されている。cDNA、抗体、プロモーター等のリクエストも毎年数件ずつ寄せられている。Reck 遺伝子改変マウスは、細胞運動、分化、発がん、血管新生、浸潤、転移などの分子機構を調べる上で重要なツールとなる。Notch シグナルが関与する生命現象は多く、この経路に RECK が関わるという知見の影響は広い。本研究で得られた RECK の機能、発現制御機構、発現制御分子に関する知識は、がんを始めとする ECM 異常を伴う疾患の新たな診

断、治療法の開発に役立つと考えている。

6. 主な発表論文

1. Loayza-Puch F, Yoshida Y, Matsuzaki T, Takahashi C, Kitayama H, Noda M. Hypoxia and RAS-signaling pathways converge on, and cooperatively downregulate, the RECK tumor-suppressor protein through microRNAs.

Oncogene 2010

2. Omura A, Matsuzaki T, Mio K, Ogura T, Yamamoto M, Fujita A, Okawa K, Kitayama H, Takahashi C, Sato C, Noda M. RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits matrix metalloproteinase-catalyzed cleavage of fibronectin. *J Biol Chem* 284, 3461-3469, 2009

3. Morioka Y, Monypenny J, Matsuzaki T, Shi S, Alexander DB, Kitayama H, Noda M. The membrane-anchored metalloproteinase regulator RECK stabilizes focal adhesions and anterior-posterior polarity in fibroblasts. *Oncogene* 28, 1454-1464, 2009

4. Kawashima S, Imamura Y, Chandana EPS, Noda T, Takahashi R, Adachi E, Takahashi C, Noda M. Localization of the membrane-anchored MMP-regulator RECK at the neuromuscular junctions. *J Neurochem* 104, 376-385, 2008

5. Muraguchi T, Takegami Y, Ohtsuka T, Kitajima S, Chandana EP, Omura A, Miki T, Takahashi R, Matsumoto N, Ludwig A, Noda M, Takahashi C. RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. *Nat Neurosci* 10, 838-845, 2007

6. Kondo S, Shukunami C, Morioka Y, Matsumoto N, Takahashi R, Oh J, Atsumi T, Umezawa A, Kudo A, Kitayama H, Hiraki Y, Noda M. Dual effects of the membrane-anchored MMP regulator RECK on chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *J Cell Sci* 120, 849-857, 2007

7. Noda M, Takahashi C. Recklessness as a hallmark of aggressive cancer. *Cancer Sci* 98, 1659-1665, 2007

8. Echizenya M, Kondo S, Takahashi R, Oh J, Kawashima S, Kitayama H, Takahashi C, Noda M. The membrane-anchored MMP-regulator RECK is a target of myogenic regulatory factors. *Oncogene* 24, 5850-5857 (2005)

ホームページ等

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1503/
<http://www.med.kyoto-u.ac.jp/GCOE/result/view/noda/noda.html>