

平成 28 年度「共同利用・共同研究・熊本地震支援」成果報告書

研究テーマ「チロシンキナーゼ受容体 RET に惹起される細胞極性形成シグナルの探索」

氏名：榎本 秀樹

所属：神戸大学大学院医学研究科 神経分化・再生分野 職位：教授

<背景と目的>

チロシンキナーゼ受容体は多様性に富み、その多くが器官形成において不可欠の受容体として機能する。RET チロシンキナーゼ はグリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) ファミリーのシグナル受容体であり、腸管神経系および腎臓形成に中核的に働く。さらに RET の変異は先天性の腸管神経系欠損 (ヒルシュスプルング病) や先天性腎尿路異常を誘導する。したがって RET の活性化にともない惹起される細胞内シグナル分子の同定は、腸管神経系・腎臓の形成機構に重要な知見を提供する。

我々は、RET 細胞内ドメインの PLC γ 結合チロシン残基 (Y1015) をフェニルアラニンに置換した、Y1015F 変異を持つマウス (Ret-Y1015F マウス) を作製した。このマウスの腸管神経前駆細胞では細胞極性が侵され、細胞移動の方向性の制御が障害されてヒルシュスプルング病様の腸管神経欠損が起きる。このため Ret-Y1015F マウスは、RET による腸管神経前駆細胞の極性形成の理解に重要な基盤情報を提供する。本研究では、RET-Y1015F と野生型 RET が腸管神経前駆細胞において活性化する細胞内シグナル分子を比較し、細胞極性形成に中核的に働く分子を同定することを目指す。

<材料と方法>

①腸管神経前駆細胞の大量培養系の樹立

胎生 12.5 日目の Ret-Y1015F マウス胚より腸管神経前駆細胞を採取し、ニューロスフェアを作製してフィブロネクチンコートしたディッシュ上で単層培養し、MYCN 遺伝子を発現するレンチウイルスに感染させた。48 時間後に細胞を薬剤選択し、長期培養してコロニー形成を促した。各コロニーは個別に単離クローンとして維持した。免疫染色により、移動中の腸管神経前駆細胞を多く含むクローンを単離し、最終的には複数のクローンを混合して不死化腸管神経前駆細胞株としてリン酸化プロテオミクス解析に使用した。コントロールとして、野生型 Ret を発現するマウスより同様の手法で不死化細胞株を樹立した。

②腸管神経前駆細胞の GDNF 刺激による、リン酸化タンパク質差異の探索

樹立したコントロールマウスおよび Ret-Y1015F マウス由来腸管神経前駆細胞株を、ポリ D リジンコートした 6cm ディッシュに撒き、6 時間血清飢餓状態に置いた後、GDNF で 0 分および 15 分刺激した。刺激後、細胞を HEPES バッファーで洗浄し、グアニジン酸バッファーに溶解して -80°C で凍結保存した。凍結させたタンパク質サンプルは、ドライアイス包埋下で徳島大学先端酵素学研究所 細胞情報学分野へ送付し、リン酸化プロテオミクス解析を行った。

<結果>

野生型マウスより樹立した不死化腸管神経前駆細胞株を用い、GDNF 刺激による RET の既知

下流分子のリン酸化が、今回用いるリン酸化プロテオミクス法により同定できるかどうかを検証した。その結果、GDNF 刺激により約 1500 のリン酸化ペプチド配列が同定され、その中には MAPK や PLC γ のような、RET の既知の下流分子が認められた。またそれ以外に細胞極性に関与する分子も多数認められた。

コントロールマウスおよび Ret-Y1015F マウスから不死化腸管神経前駆細胞株を樹立した。これら腸管神経前駆細胞株を用い、GDNF 刺激前後のタンパク質サンプルを回収しリン酸化プロテオミクス解析を行った。

<考察>

腸管神経系は、発生期に腸管神経前駆細胞が腸管壁内を前腸から肛門方向へ移動し、全腸管領域を支配する事により形成される。GDNF-RET シグナルはこの細胞移動に必須の役割を果たしているものの、個々の細胞にどのようなシグナル経路の活性化を促し、正常な細胞移動を制御しているのかは未解明であった。Ret-Y1015F マウスでは、細胞極性に異常が生じ、腸管神経前駆細胞の個々の細胞の移動方向制御が障害され、ヒトヒルシュスプルング病様の腸管神経欠損が導かれる。細胞移動の方向性は細胞外基質や拡散性因子などの細胞外環境に依存して決定されるが、Ret-Y1015F 変異体の詳細な解析により、細胞外環境に応じて細胞内に駆動される細胞移動シグナルの同定が可能になると考える。リン酸化プロテオミクス解析は、bias なく網羅的なデータ取得が可能であることから、本研究に応用することにより、細胞移動を制御するシグナルの全貌を俯瞰するとともに新規の分子メカニズムの解明にも貢献することが期待される。今回の共同研究では、短い期間にも関わらず、その基盤データ取得が達成された。御支援いただいた徳島大学に感謝したい。

今後は、研究室間で引き続き共同研究を継続し、細胞の極性・移動の確立に核となる候補分子群を同定していく。候補分子群については、リン酸化とそれに伴う活性化を生化学的に検証し、ゲノム編集技術などを活用して分子の生理機能を生体レベルで明らかにしていく予定である。以上の取組みにより、RET-Y1015 を起点とするどのようなシグナル経路が細胞の移動方向を制御するのかを解明していく。本研究の進展は細胞移動方向性制御の新規分子メカニズムの解明に加え、ヒルシュスプルング病新規治療戦略の構築に貢献すると期待している。

<謝辞>

本研究の遂行にあたり、数々の助言に加え、リン酸化プロテオミクス解析をご担当された、徳島大学先端酵素学研究所 藤井節郎記念医科学センター 細胞情報学分野の小迫英尊先生に心より感謝申し上げます。