Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Receptor tyrosine kinase Ror2 mediates Wnt5a-induced polarized cell migration by activating c-Jun N-terminal kinase via actin-binding protein filamin A

野町, 昭

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2009-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲4669
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004669

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏　　名	野町　昭
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学　位　記　番　号	博い第 4669 号
学位授与の　要　件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の　日　付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Receptor tyrosine kinase Ror2 mediates Wnt5a-induced polarized cell migration by activating c-Jun N-terminal kinase via actin-binding protein filamin A(受容体型チロシンキナーゼ Ror2 はアクチン結合蛋白質 filamin A を介して Wnt5a による c-Jun N-terminal キナーゼの活性化と細胞極性・移動を制御する)

審　査　委　員

主　査　　教　授　片岡　徹
　　教　授　饗場　篤
　　教　授　古瀬　幹夫

受容体型チロシンキナーゼ Ror2 はマウス初期胚において主に移動能の高い神経堤細胞、体幹の間葉系細胞に強く発現すること、さらに Ror2 欠損マウスの作製ならびに表現型についての解析から、Ror2 欠損マウスは神経堤細胞、間葉系細胞によって形成される顔面及び中軸骨格・附属肢の低形成といった表現型を呈することが知られている。*Ror2* 遺伝子の異常によるヒト疾患として、劣性遺伝性 Robinow 症候群と優性遺伝性 B 型短趾症が報告されており、特に劣性遺伝性 Robinow 症候群は顔面異常、四肢の短小化、外生殖器の低形成など Ror2 欠損マウスの表現型と類似している。この Ror2 欠損マウスの表現型は細胞外分泌蛋白質 Wnt5a の欠損マウスの表現型と類似することから、Wnt5a シグナル伝達経路における Ror2 の関与について解析がなされ、Ror2 が Wnt5a 受容体として機能することが報告された。さらに Ror2 が Wnt5a による細胞運動の制御に必須であることが明らかにされた。Wnt5a に関しては、がん細胞の移動に関与することが報告されているが、Wnt5a がどのようにして細胞運動を制御しているのか不明である。本研究は、Wnt5a による細胞運動の制御における Ror2 の役割について、詳細な分子メカニズムの解明を目的として行った。

細胞は細胞外からの様々な刺激によりアクチンや微小管などの細胞骨格の再編成を行い、移動方向前後で極性を獲得し、方向性をもった移動を行うことが知られている。まず、Wnt5a による細胞運動制御の分子メカニズムを明らかにする目的で *in vitro* wound healing assay を用いて解析を行った。*In vitro* wound healing assay はコンフルエントな状態の単層培養細胞に引っ掻き傷をつけ模擬的な傷を作り、傷口の細胞が移動する過程を観察する方法として知られている。内在性に Ror2 の発現が認められる NIH3T3 細胞に Wnt5a 刺激を行ったところ、傷に面した方向に対して葉状仮足の形成（アクチン細胞骨格再編成）、microtubule-organizing center（MTOC）の再配置（極性の獲得）、ならびに細胞移動能がそれぞれ促進することを見出した。そこで Wnt5a による方向性をもった細胞運動に Ror2 が関与するか検討を行うために siRNA を用いて Ror2 の発現抑制を行ったところ、Wnt5a による葉状仮足形成、MTOC 再配置、細胞移動能がそれぞれ抑制された。次に Wnt5a による細胞運動を制御するシグナル伝達機構について解析を行ったところ、MAP キナーゼである JNK が Wnt5a によって活性化されることが明らかになった。また免疫染色法により JNK の活性化動態について調べたところ、Wnt5a 刺激によって傷口に面した細胞において強く JNK の活性化が検出された。このことから、Wnt5a による 細胞運動の制御には JNK の活性化が重要な役割を担うことが示唆された。そこで JNK の活性化が方向性をもった細胞運動制御に必要であるか検討を行う目的で、JNK 阻害剤を用いた薬理学的解析を行ったところ、Wnt5a による葉状仮足形成、MTOC 再配置、細胞移動能がそれぞれ抑制された。また Ror2 発現抑制細胞では Wnt5a による JNK の活性化や、傷口に面した細胞での JNK の活性化が抑制されることから、Wnt5a は Ror2 を介して JNK を活性化し、その活性化が細胞運動の制御に必須であると考えられた。

これまでに Ror2 を介する細胞内シグナル伝達機構の解析を目的として yeast two-hybrid 法を用いたスクリーニングにより、Ror2 の細胞内プロリンリッチドメインを含む C 末端領域に会合する分子として filamin A を同定した。filamin A はアクチン線維のクロスリンクに関与するだけでなく、シグナル伝達の足場タンパク質として機能することも報告されている。そこで、filamin A が Wnt5a による JNK の活性化に関与するか検討を行った。filamin A を発現しているメラノーマ細胞（A7）においては、Wnt5a 刺激による JNK の活性化が認められたのに対し、内在性に filamin A を発現していないメラノーマ細胞（M2）や filamin A 発現抑制細胞では、Wnt5a 刺激による JNK の活性化が認められなかった。また M2 細胞に filamin A の野生型（FLNa WT）ならびに Ror2 との会合ドメインを失欠させた変異体 FLNa Δ 20 をそれぞれ発現させた細胞（M2/FLNaWT, M2/FLNa Δ 20）を用いて解析を行ったところ、M2/FLNaWT では Wnt5a 刺激により JNK の活性化が認められたのに対し、M2/FLNa Δ 20 では JNK の活性化は認められなかった。また細胞移動能や MTOC の再配置に関しても M2/FLNaWT では Wnt5a 刺激により促進されるのに対し、M2/FLNa Δ 20 での促進は認められなかった。したがって、filamin A は Ror2 と会合することで、Wnt5a による JNK の活性化と方向性をもった細胞運動を制御することが明らかになった。

プロテインキナーゼ C（PKC）は方向性をもった細胞運動で重要な役割を担っていることが知られている。また最近、atypical PKC（aPKC）として知られている PKCζ が Wnt シグナル伝達因子 Dishevelled と会合することで、線維芽細胞の極性を制御することが明らかにされた。そこで Wnt5a による方向性をもった細胞運動の制御に PKC が関与するか検討を行った。PKC の各種アイソフォーム（α/β, η, θ, ζ）特異的 pseudo-substrate（PS）を用いて Wnt5a によって誘導される JNK の活性化に及ぼす影響について調べたところ、JNK の活性化は PKCζ PS において特異的に抑制された。また Wnt5a による MTOC の再配置も PKCζ PS により抑制された。この結果から PKCζの活性が Wnt5a による JNK の活性化と細胞極性制御に必須であることが明らかになった。

以上より、Wnt5a は Ror2 を介して JNK を活性化し、その活性化が方向性をもった細胞運動を制御することを明らかにした。さらに Ror2 の C 末端領域に会合する分子として同定した filamin A が Wnt5a による JNK の活性化と細胞運動の制御に必須であること、また PKCζも JNK の活性化を調節し、方向性をもった細胞運動の制御に関与することを明らかとした。しかしながら filamin A や PKCζがいかにして JNK の活性化を調節しているのか、また JNK がどのような分子機構によって方向性をもった細胞運動を制御しているのかといった問題は不明である。優性遺伝性 B 型短趾症の患者では Ror2 の C 末端領域を欠失した Ror2 蛋白質を発現していることが報告されており、filamin A との結合が起こらないと考えられることから、シグナル伝達の異常と疾患との関連解析を行うことも今後重要である。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2007号	氏　名	野町　昭
論文題目 Title of Dissertation	Receptor tyrosine kinase Ror2 mediates Wnt5a-induced polarized cell migration by activating c-Jun N-terminal kinase via actin-binding protein filamin A （受容体型チロシンキナーゼ Ror2 はアクチン結合蛋白質 filamin A を介して Wnt5a による c-Jun N-terminal キナーゼの活性化と細胞極性・移動を制御する）		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	片岡 徹 古瀬幹夫 饗場 篤	
審査終了日	平成２１年　２月　　日		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

受容体型チロシンキナーゼ Ror2 はマウス初期胚において主に移動能の高い神経堤細胞、体幹の間葉系細胞に強く発現し、また Ror2 欠損マウスの作製・表現型解析から、Ror2 欠損マウスは神経堤細胞、間葉系細胞によって形成される顔面及び中軸骨格・附属肢の低形成といった表現型を呈することが知られている。*Ror2* 遺伝子の異常によるヒト疾患として、劣性遺伝性 Robinow 症候群と優性遺伝性 B 型短趾症が報告されており、特に劣性遺伝性 Robinow 症候群は顔面異常、四肢の短小化、外生殖器の低形成など Ror2 欠損マウスの表現型と類似している。この Ror2 欠損マウスの表現型は、細胞外分泌蛋白質 Wnt5a の欠損マウスの表現型と類似することから、Wnt5a シグナル伝達経路における Ror2 の関与について解析がなされ、Ror2 が Wnt5a 受容体として機能することが報告された。さらに Ror2 が Wnt5a による細胞運動の制御に必須であることが明らかにされた。本研究は、Wnt5a による細胞運動の制御における Ror2 の役割について、詳細な分子メカニズムの解明を目的として行われた。

本研究者は、Wnt5a による細胞運動制御の分子メカニズムを明らかにする目的で *in vitro* wound healing assay を用いて解析を行った。内在性に Ror2 の発現が認められる NIH3T3 細胞に Wnt5a 刺激を行ったところ、傷に面した方向に対する葉状仮足の形成（アクチン細胞骨格再編成）、microtubule-organizing center (MTOC) の再配置（極性の獲得）、ならびに細胞移動能がそれぞれ促進することを見出した。そこで Wnt5a による方向性をもった細胞運動における Ror2 の関与について検討したところ、Wnt5a による葉状仮足形成、MTOC 再配置、細胞移動能には Ror2 が必須であることがわかった。次に Wnt5a による細胞運動を制御するシグナル伝達機構について解析を行ったところ、Wnt5a は Ror2 を介して MAP キナーゼの JNK を活性化し、その活性化が細胞運動の制御に必須であると考えられた。さらに Ror2 の C 末端領域に会合する分子として同定した filamin A が Ror2 と会合し、Wnt5a による JNK の活性化と方向性をもった細胞運動を制御することを明らかにした。プロテインキナーゼ C (PKC) は方向性をもった細胞運動で重要な役割を担っていることが知られており、Wnt5a による方向性をもった細胞運動の制御に PKC が関与するか検討を行った。PKC の各種アイソフォ

ーム (α/β, η, θ, ζ) 特異的 pseudo-substrate (PS) を用いて Wnt5a によって誘導される JNK の活性化に及ぼす影響について解析したところ、JNK の活性化は PKCζPS において特異的に抑制された。また Wnt5a による MTOC の再配置も PKCζPS により抑制された。これらの結果より、PKCζの活性化が JNK の活性化と細胞極性制御に重要であると結論した。

本研究は、Wnt5a による方向性をもった細胞運動における Ror2 の役割を研究したものであるが、従来ほとんど解明されていなかった filamin A との共役による Ror2 の JNK 活性化機能や PKCζの協調的作用の意義に関して重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。