

受賞者

吉村 昭彦

慶應義塾大学 医学部 微生物学免疫学教室

研究テーマ

MAPキナーゼ制御因子Spred/Sproutyの遺伝性疾患と癌における機能解析

1. はじめに

MAP kinaseファミリーの一つ、ERK (Extracellular stimulus-activated kinase)は、様々な細胞反応を制御する重要な役割を果たしており、ほとんどのあらゆる細胞外刺激により活性化を受ける。基本的には活性化されたRasがRaf (Raf1および B-Raf)を、RafがMEK (MEK1, MEK2)を、MEKがERKをリン酸化して活性化する。RasはGEF (GDP/GTP exchange factor)のひとつであるSOS (son of sevenless)によって活性化 (GTP型に変換)され、逆にRasGAP (GTPase activating protein)によって不活性化 (GDP型に変換)される。RasGAPは何種類か知られているが、神経線維腫症1型 (Neurofibromatosis Type 1; NF1)の原因タンパク質であるneurofibrominもそのひとつで、この経路の負の制御因子である。一方、Sprouty/Spredファミリーはショウジョウバエから哺乳類まで保存されたERKシグナルの負の調節因子である。Sproutyはショウジョウバエの遺伝学的解析によりFGFシグナルを負に調節する分子として1998年に同定された。Spred (Sprouty-related EVH-1 domain containing protein)は我々が2001年にチロシンキナーゼ型の受容体であるc-kit (SCF受容体)に会合するSproutyに似た分子として発見し、Ras/ERK経路の抑制因子として報告した遺伝子である(1)。哺乳類ではSproutyは4種類、Spredは3種類のホモログが報告されている。我々はこれまでSprouty2, Sprouty4, Spred1, Spred2の欠損マウスの作製を行い、解析を行ってきた(2-7)。Spred1欠損マウスの解析から、Spred1が生理的にSCFやIL-3, IL-5のシグナルを抑制し、造血系を負に制御することを明らかにした(2, 3)。しかしヒト疾患との関係はこれまで不明であった。本研究ではじめてヒトにおいてSPRED1の変異が発見された(8)。

2. 方法

①ベルギー、フランス、アメリカとの国際共同研究において、カフェオレ斑を持つが、NF1遺伝子に変異を認めない家族性優性遺伝のNF1様患者での連鎖解析を行った。その結果、5家系について第15番染色体上のSPRED1遺伝子が候補遺伝子として挙がった。SPRED1遺伝子の塩基配列決定を行い、実際に変異が複数発見された。また孤発例でNF1に変異のない例についてもシーケンシングを行った。これらの変異体cDNAを発現ベクターにクローニングし機能解析を行った。

②Ras-ERK経路の活性化抑制効果は293T細胞を用いてElk-レポーター (Clontech), in vitro Rafキナーゼアッセイ, Raf-1の自己リン酸化アッセイを用いて評価した。In vitro kinase assayは293T細胞にSpred1cDNA, HA-Raf-1をco-transfectしたのちFGFで刺激後Raf1を回収後、組み替え体不活性化型MEKとATPを加えてを用いてincubationし、MEKのリン酸化を抗リン酸化MEK抗体によるWestern-blottingによって評価した。

3. 結果

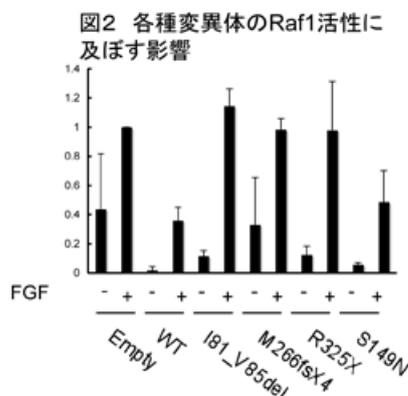
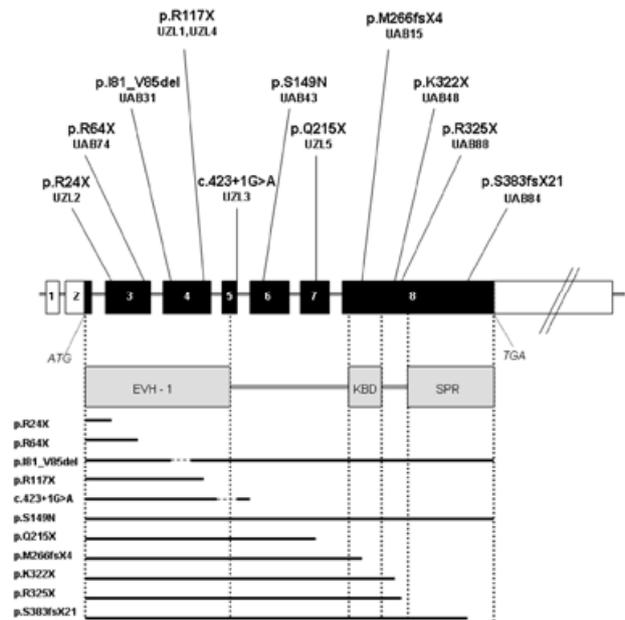
① 5家系および孤発例で見つかったほとんどはナンセンス変異によるC末側欠失変異である。図1に発見された変異の位置を示す。SPRED1に変異を持つ患者は、カフェオレ斑、腋窩の雀卵斑、ヌーナ

ン症候群様顔貌（眼間開離・眼瞼下垂）、巨頭症、注意欠陥障害・学習障害を示した。

②見つかった変異型SPRED1が機能喪失型であるかどうかを検討するために、野生型 SPRED1 (WT) と変異型 SPRED1 (in-frame deletion (I81_V85del), frameshift (M266fsX4), およびnonsense (R325X)) を用いて、生化学的な機能解析を行った。293T細胞においてin vitro Raf1 キナーゼアッセイ、Elk レポーターアッセイを行ったところ、I81_V85del, M266fsX4, R325X 変異体はFGFおよびEGFによるERK経路の活性化を全く抑制できなかった(図2)。またM266fsX4, R325X 変異体には野生型と同レベルの発現

ではドミナントネガティブ効果はみられなかった。すなわちこれらの変異はすべて単純な機能欠失であってヒトではSPRED1の発現量が半分に低下するだけでNF1様の症状を起こすことになる。また孤発例で見つかったS149N変異では、ERK活性化の抑制効果は野生型と変わらなかった。

図1 NF様家系で見つかった変異



4. 考察

'neuro-cardio-facial-cutaneous' (NCFC) 症候群とは2006年にB. Neelらによって提唱された Ras-Raf-ERK経路の異常によって起こる表現型が重複する先天性遺伝性疾患の総称である。NCFC症候群にはNF1、ヌーナン (Noonan) 症候群、LEOPARD症候群、Costello症候群、Cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群が含まれる。すべて常染色体優性遺伝形質を示す疾患で、現在わかっている原因遺伝子はすべてRas-Raf-ERK経路の分子 (SOS, SHP2, Ras, B-Raf, MEKなどの機能獲得型変異) もしくはその負の制御因子 (neurofibromin (NF1)) である。今回Spred1の変異がNF1様疾患で見つかったことでSpred1がRas-Raf-ERK経路の負の制御因子であることが改めて確認された。

Spred欠損マウスの表現型が多彩である。Spred1ホモ欠損マウスでは顔面の変形、低成長、メラニン色素の異常蓄積、学習障害などが認められ(8)、ヒトでのSPRED1変異による症状をよく再現している。さらにわれわれはSpred1ホモ欠損マウスの学習能力は低いことも見いだしている。またNF1ヘテ

ロ欠損マウスや変異SHP2ノックインマウスと同様にSpred1ホモ欠損マウスは骨髄増殖性疾患を呈する。しかし今回の5家系では3例に固形腫瘍がみられるものの白血病は報告されていない。ヒトで見つかった5家系も症状はまちまちであり、同様にSpred1ホモ欠損マウスの表現型は遺伝的背景に大きく依存する。このことはSPRED1以外の疾患感受性遺伝子の存在を疑わせる。Sprouty/Spredファミリー遺伝子はいくつかの癌で発現の低下が報告されつつある(9)が、癌でのこれらの遺伝子の変異は未だ報告されていない。今回SPRED1に家族性の変異が見つかったことで、癌や他の遺伝性疾患においてもSprouty/Spredファミリー遺伝子の変異が見つかる可能性は高いと思われる。

今回の解析ではSpred1タンパクの一部が欠失する変異の解析を行った。その後の調査で10数個の点変異(アミノ酸置換)も見つかっており今後解析を行っていきたい。

5. 発表論文、参考文献

1: [Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling.](#)

Wakioka T, Sasaki A, Kato R, Shouda T, Matsumoto A, Miyoshi K, Tsuneoka M, Komiya S, Baron R, Yoshimura A.
Nature. 2001 Aug 9;412(6847):647-51.

2: [Spred-1 negatively regulates allergen-induced airway eosinophilia and hyperresponsiveness.](#)

Inoue H, Kato R, Fukuyama S, Nonami A, Taniguchi K, Matsumoto K, Nakano T, Tsuda M, Matsumura M, Kubo M, Ishikawa F, Moon BG, Takatsu K, Nakanishi Y, Yoshimura A.
J Exp Med. 2005 Jan 3;201(1):73-82.

3: [Spred-1 negatively regulates interleukin-3-mediated ERK/mitogen-activated protein \(MAP\) kinase activation in hematopoietic cells.](#)

Nonami A, Kato R, Taniguchi K, Yoshiga D, Taketomi T, Fukuyama S, Harada M, Sasaki A, Yoshimura A.
J Biol Chem. 2004 Dec 10;279(50):52543-51.

4: [Loss of mammalian Sprouty2 leads to enteric neuronal hyperplasia and esophageal achalasia.](#)

Taketomi T, Yoshiga D, Taniguchi K, Kobayashi T, Nonami A, Kato R, Sasaki M, Sasaki A, Ishibashi H, Moriyama M, Nakamura K, Nishimura J, Yoshimura A.
Nat Neurosci. 2005 Jul;8(7):855-7.

5: [Sprouty2 and Sprouty4 are essential for embryonic morphogenesis and regulation of FGF signaling.](#)

Taniguchi K, Ayada T, Ichiyama K, Kohno R, Yonemitsu Y, Minami Y, Kikuchi A, Maehara Y, Yoshimura A.
Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jan 26;352(4):896-902.

6: [Spred-2 suppresses aorta-gonad-mesonephros hematopoiesis by inhibiting MAP kinase activation.](#)

Nobuhisa I, Kato R, Inoue H, Takizawa M, Okita K, Yoshimura A, Taga T.
J Exp Med. 2004 Mar 1;199(5):737-42.

7: [Spreds are essential for embryonic lymphangiogenesis by regulating vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling.](#)

Taniguchi K, Kohno R, Ayada T, Kato R, Ichiyama K, Morisada T, Oike Y, Yonemitsu Y, Maehara Y, Yoshimura A.
Mol Cell Biol. 2007 Jun;27(12):4541-50.

8: [Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype.](#)

Brems H, Chmara M, Sahbatou M, Denayer E, Taniguchi K, Kato R, Somers R, Messiaen L, De Schepper S, Fryns JP, Cools J, Marynen P, Thomas G, Yoshimura A, Legius E.
Nat Genet. 2007 Sep;39(9):1120-6.

9: [Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors.](#)

Yoshida T, Hisamoto T, Akiba J, Koga H, Nakamura K, Tokunaga Y, Hanada S, Kumemura H, Maeyama M, Harada M, Ogata H, Yano H, Kojiro M, Ueno T, Yoshimura A, Sata M.
Oncogene. 2006 Oct 5;25(45):6056-66.