分子から生命現象を眺める

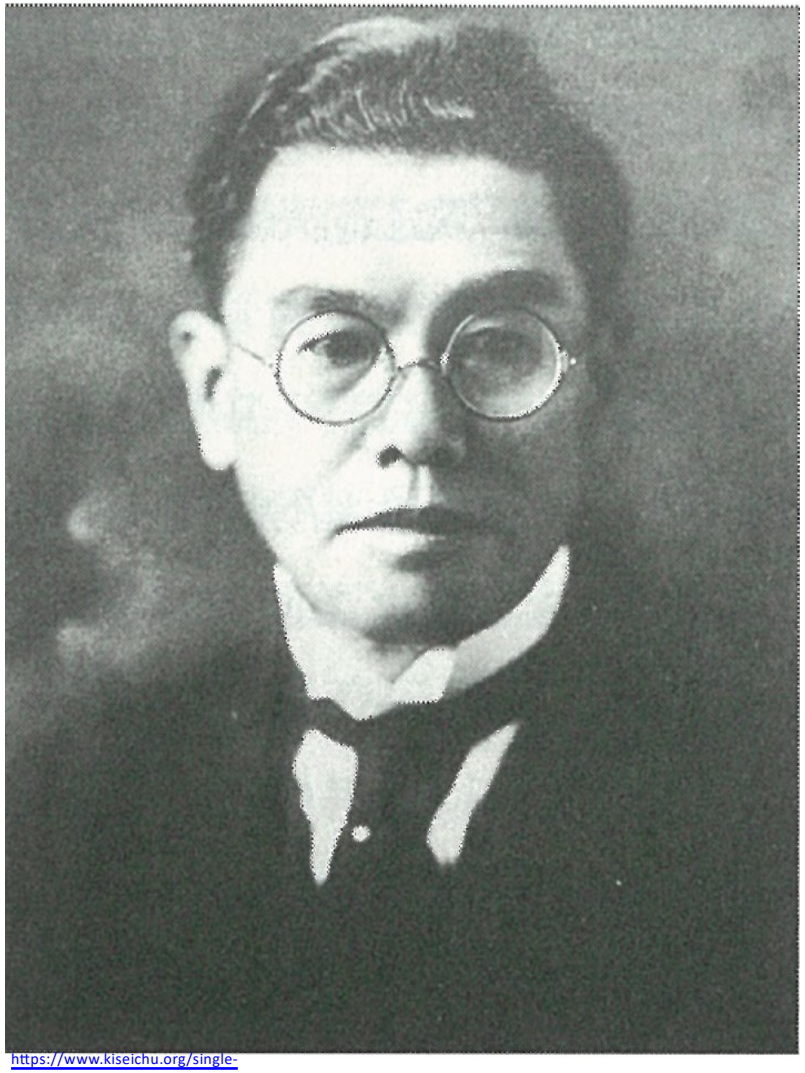
ー*RET*がん遺伝子の発見から学んだことー

分子病理学・腫瘍病理学
高橋　雅英

2020年3月13日名古屋大学最終講義

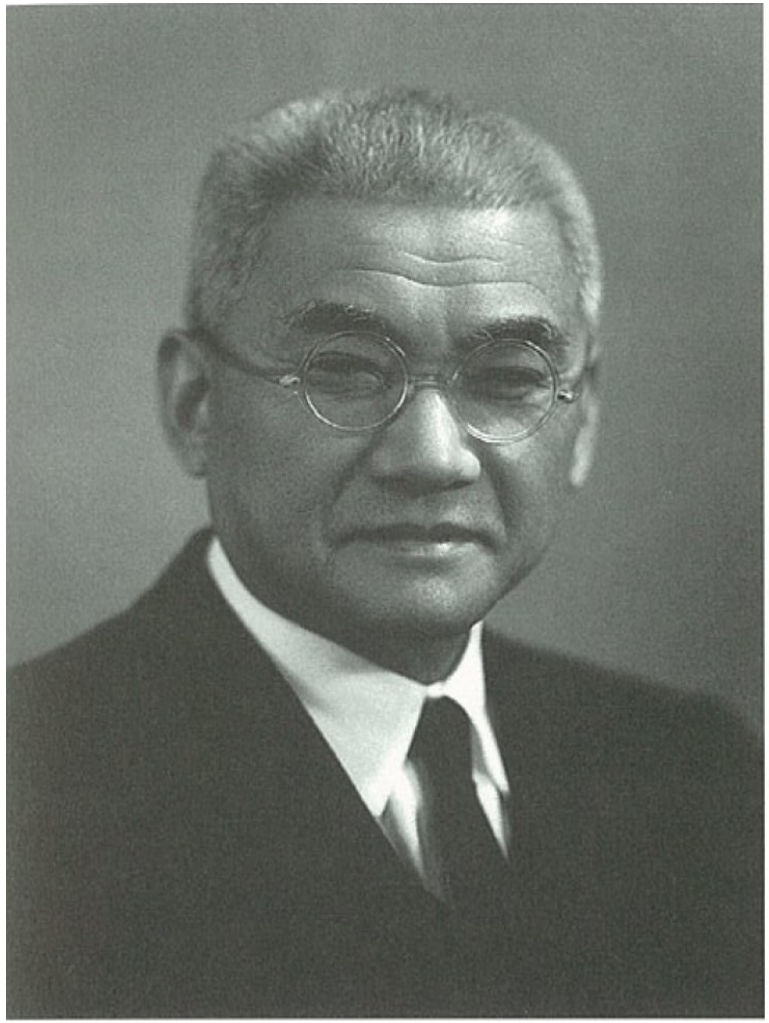
山極勝三郎と藤浪鑑

https://museum.umic.jp/yamagiwa/doctor01-2.html
2020/5/27



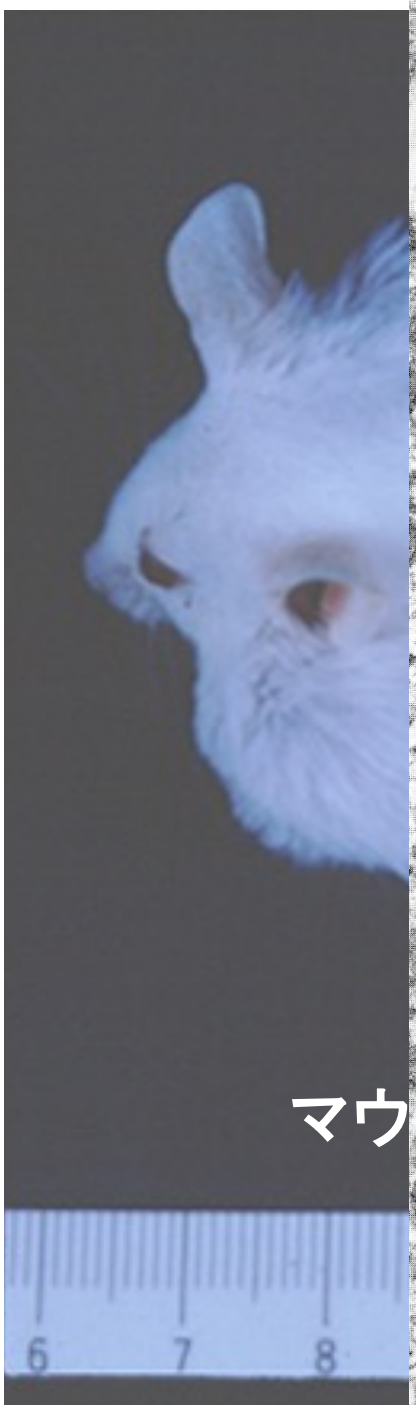
https://www.kiseichu.org/single-post/2018/01/08/1%E6%9C%8813%E6%97%A5%EF%BC%88%E5%9C%9F%EF%BC%89%EF%BD%9E%E3%80%8C100%E5%B9%B4%E5%89%8D%E3%81%AE%E5%AF%84%E7%94%9F%E8%99%AB%E6%95%99%E8%82%B2-%E2%80%95-%E8%97%A4%E6%B5%AA-%E9%91%91%E3%81%8C%E8%AC%9B%E7%BE%A9%E3%81%AB%E4%BD%BF%E3

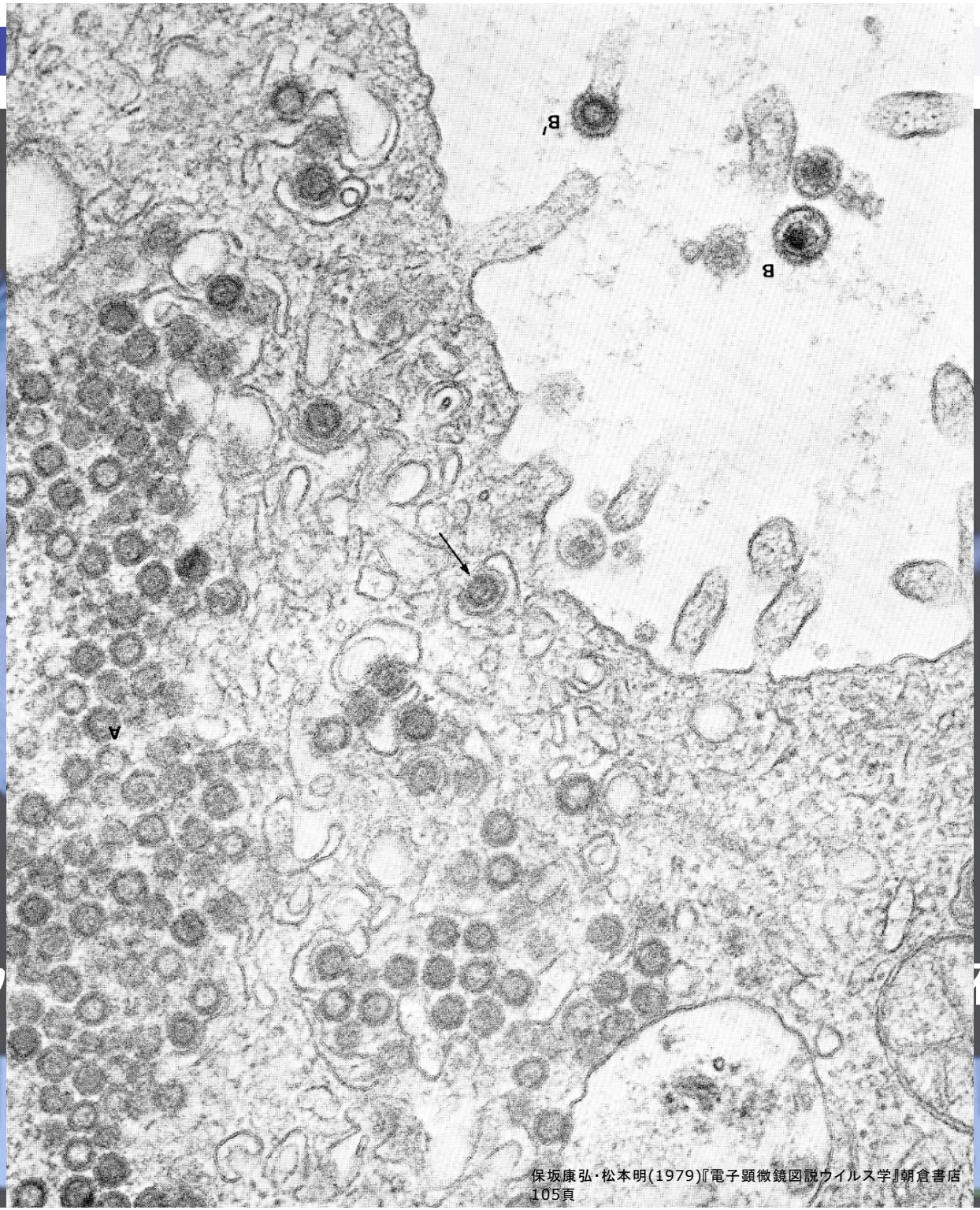
名古屋大学腫瘍病理学（旧第二病理学）教室における癌ウィルス研究



大島福造
（1895～1977）
家鶏肉腫ウィルス研究

星野宗光
(1932～1988)
マウス乳がんウィルス研究

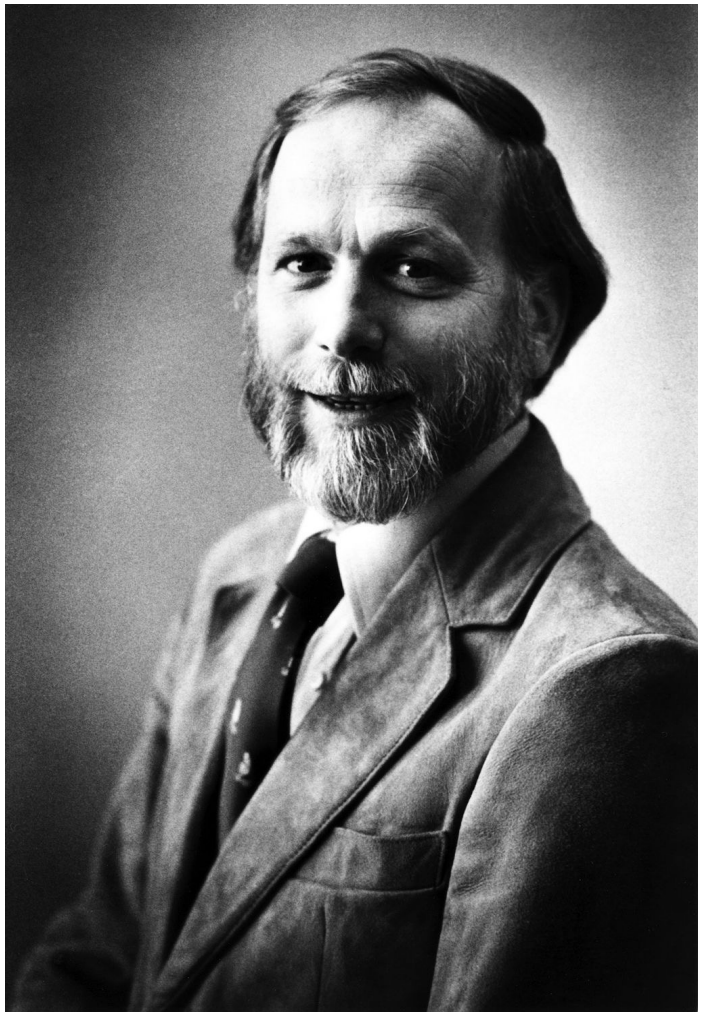




保坂康弘・松本明(1979)『電子顕微鏡図説ウイルス学』朝倉書店
105頁

マウ

夜腺がん



©wikipedia

©wikipedia

ウィルスがん遺伝子Srcが細胞由来の遺伝子であることの発見

（Michael Bishop & Harold Varmus, 1976）

1989年ノーベル生理学医学賞

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 79, pp. 3637–3640, June 1982
Medical Sciences

Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the *ras* genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses

(human tumors/transfection/retroviruses)

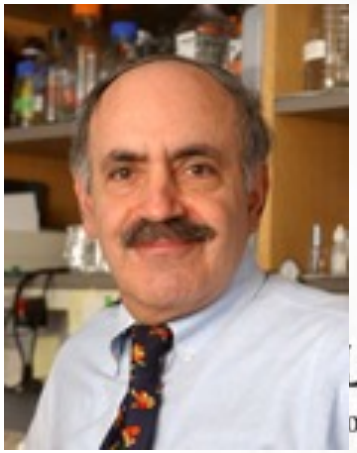
CHANNING J. DER, THEODORE G. KRONTIRIS, AND GEOFFREY M. COOPER

Sidney Farber Cancer Institute and Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115

Communicated by Baruj Benacerraf, March 22, 1982

https://www.bu.edu/biology/people/profiles/geoffrey-m-cooper/ 2020/6/5

Nature Vol. 297 10 June 1982



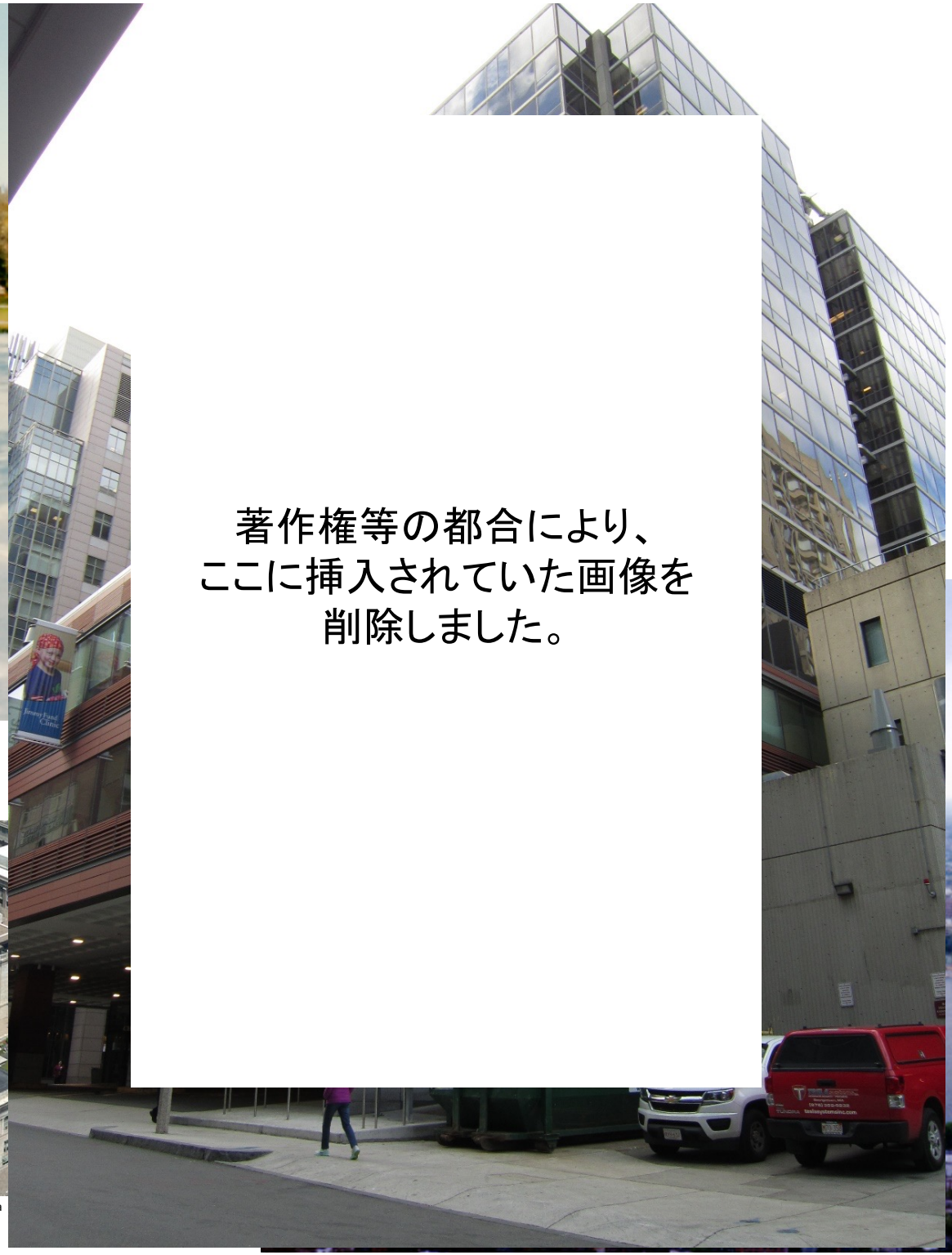
Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus *ras* gene

Luis F. Parada, Clifford J. Tabin, Chiaho Shih & Robert A. Weinberg

or Cancer Research and Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts 02139, USA

https://efraimracker.library.cornell.edu/lecture-series/71 2020/5/27

https://campusplanning.hms.harvard.edu/facilities-operations 2020/6/5a



著作権等の都合により、
ここに挿入されていた画像を
削除しました。

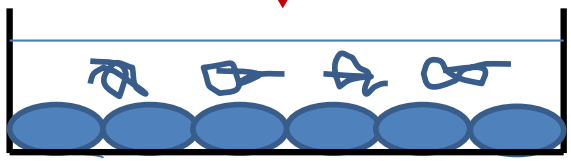
DNAトランスフェクション

がん細胞DNA

＋ リン酸
カルシウム

DNAの沈殿物

添加



NIH3T3細胞

2週間培養

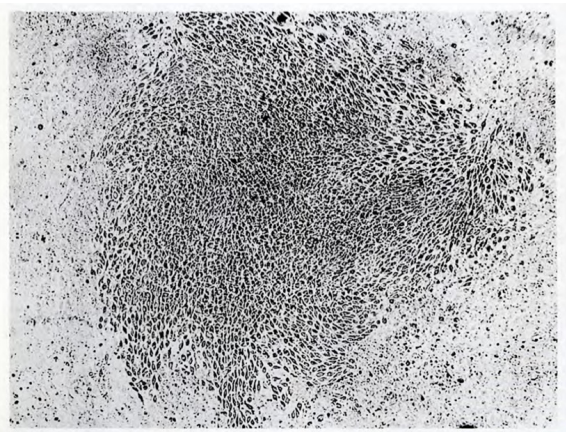


Figure 1. NIH 3T3 Cells Transformed by 3215 DNA
A representative focus induced in a tertiary transfection assay was photographed at 40× magnification.

がん遺伝子を取り込んだ
細胞が増殖してくる（focus）

点突然変異による*RAS* 遺伝子の活性化

Tabin et al. Nature (1982)
Reddy et al. Nature (1982)
Taparowski et al. Nature (1982)

RETがん遺伝子の発見（1985）

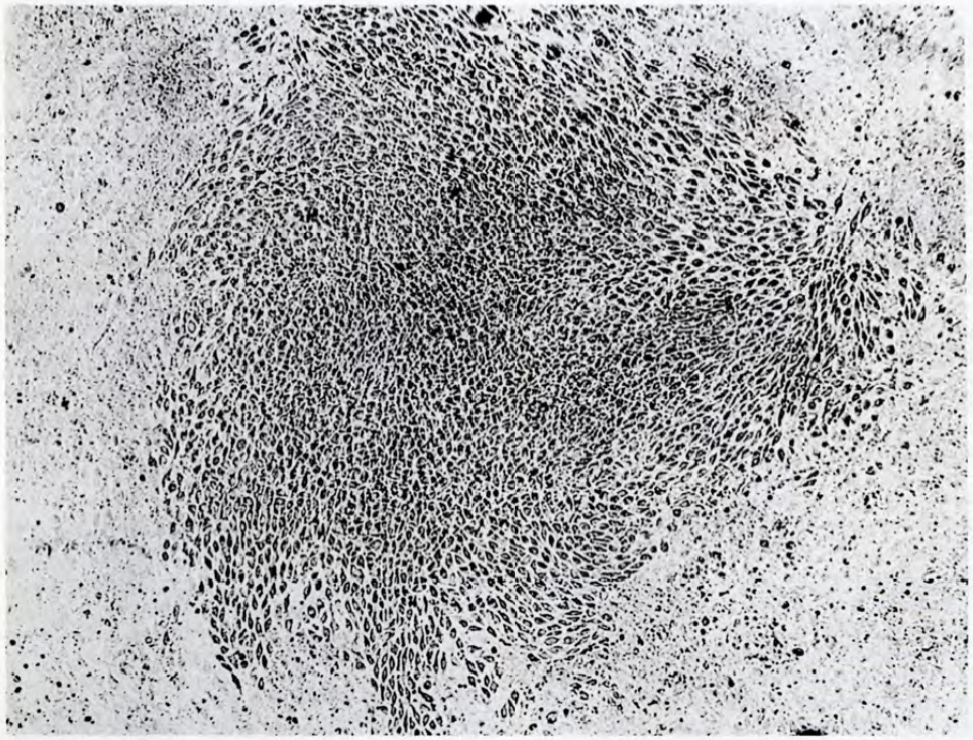
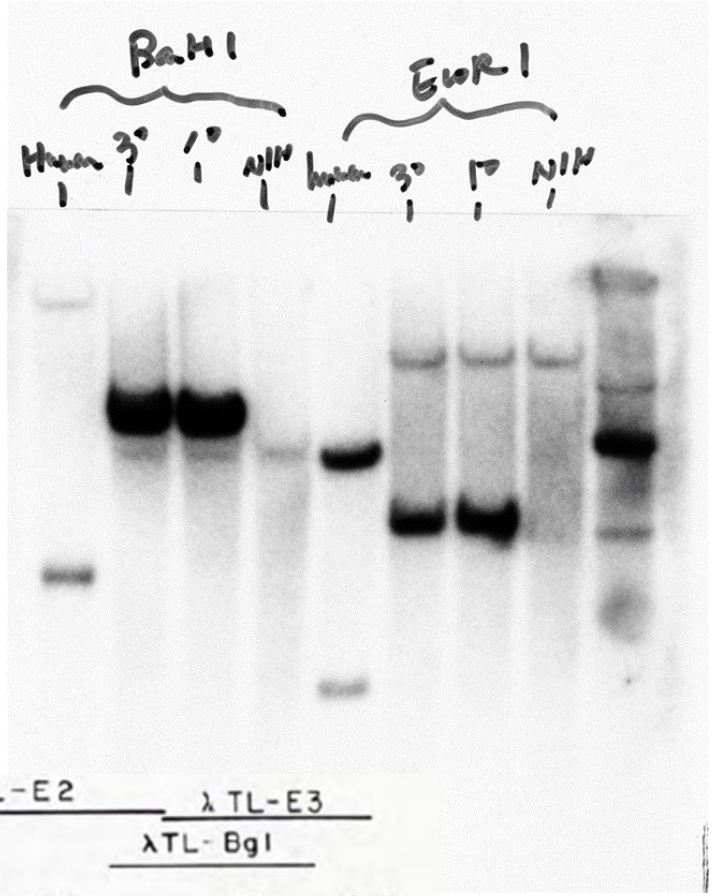
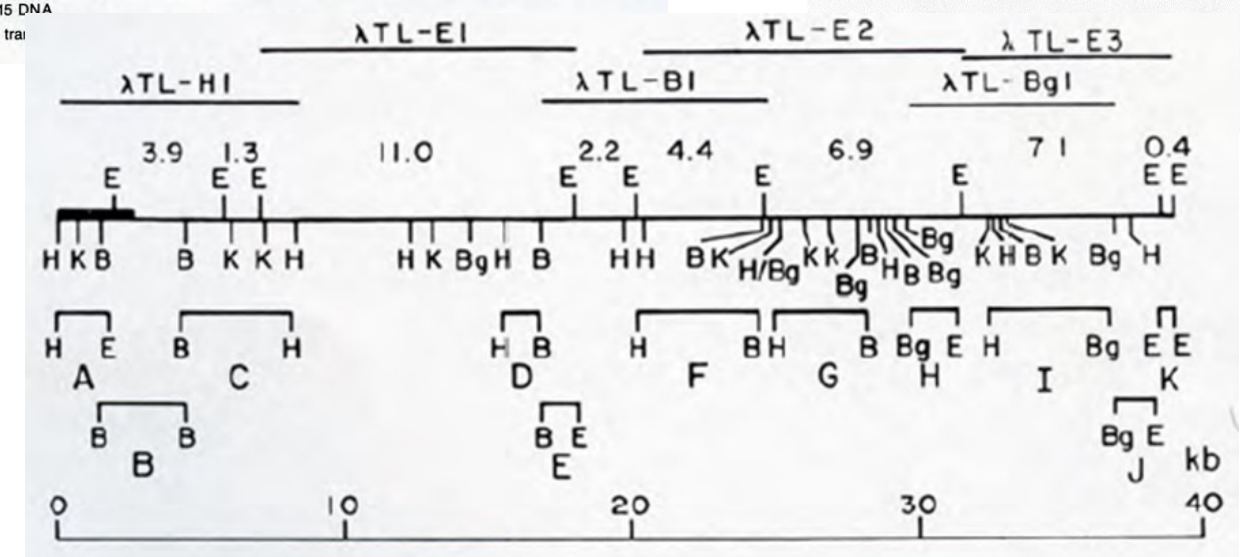
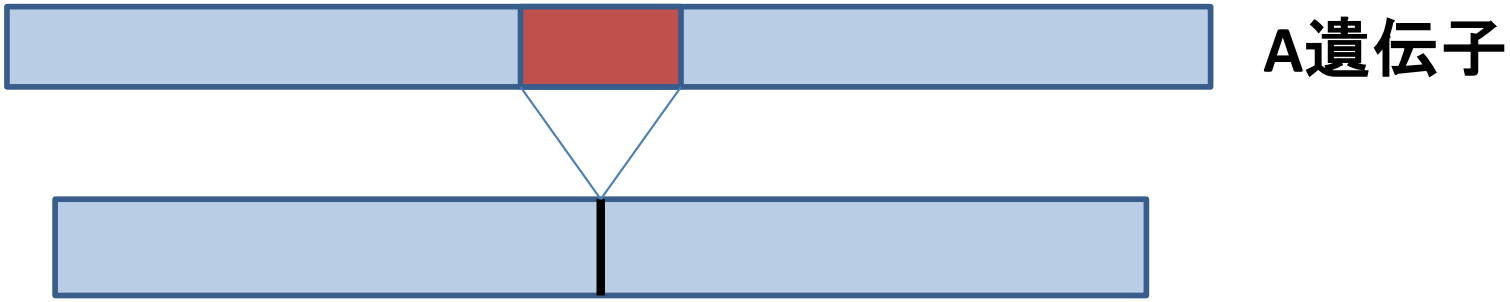


Figure 1. NIH 3T3 Cells Transformed by 3215 DNA
A representative focus induced in a tertiary tra



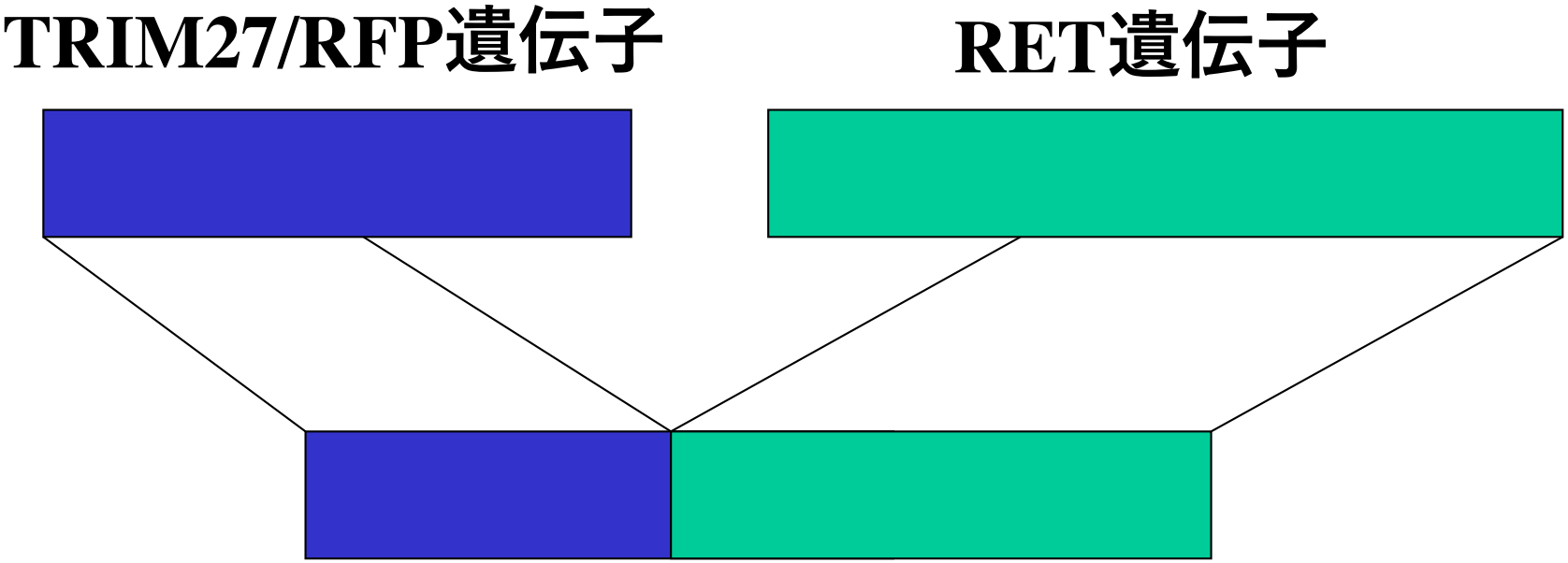


1. Internal Deletion



2. Rearrangement

遺伝子再構成によるRETがん遺伝子の活性化



活性化融合RET遺伝子(キメラ遺伝子)

↓

チロシンキナーゼ活性の上昇

↓

細胞増殖(腫瘍化)

Takahashi et al. Cell (1985)
Takahashi et al.
Mol. Cell. Biol. (1987)

Fused transcript of *abl* and *bcr* genes in chronic myelogenous leukaemia

Nature (1985)
慢性骨髄性白血病における
Bcr-Abl融合遺伝子の発見

Emma Shtivelman, Batia Lifshitz, Robert P. Gale* & Eli Canaani

Department of Chemical Immunology, The Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel
* Department of Medicine (Hematology and Oncology), UCLA School of Medicine, Los Angeles, California 90024, USA

Human chronic myelogenous leukaemia is characterized by a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22 resulting in an abbreviated form of chromosome 22 and the transfer of the abl cellular oncogene from chromosome 9 into the bcr gene of chromosome 22. Characterization of an 8-kilobase RNA specific to chronic myelogenous leukaemia shows it to be a fused transcript of the two genes. The fused protein that would be produced is probably involved in the malignant process.

Cell, Vol. 42, 581–588, September 1985, Copyright © 1985 by MIT

0092–8674/85/090581–08 $02.00/0

Activation of a Novel Human Transforming Gene, *ret*, by DNA Rearrangement

Cell (1985)

Masahide Takahashi,*‡ Jerome Ritz,†§ and Geoffrey M. Cooper*‡
* Laboratory of Molecular Carcinogenesis
† Division of Tumor Immunology
Dana-Farber Cancer Institute
‡ Department of Pathology
§ Department of Medicine
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts 02115

Summary

other transforming genes have not been established, blot hybridization analyses indicate that activation of *Blym-1*, *Tlym-I*, and *met* does not involve gene amplification or gross DNA rearrangements (Diamond et al., 1983; Lane et al., 1984; C. S. Cooper et al., 1984b).

Transfection of NIH 3T3 cells has also been used to investigate the potential transforming activity of genes of normal cells. Sonicated fragments (0.5-5 kb) of DNAs of normal chicken fibroblasts, nontransformed mouse fibroblasts (G. M. Cooper et al., 1980), and normal human lymphocytes (Schafer et al., 1984) induced transformation of NIH 3T3 cells with low efficiencies (approximately 0.001-0.003 transformants/μg DNA). In contrast, high efficien-

*RET*遺伝子の変異によって発症する疾患

遺伝子再構成による活性化

甲状腺乳頭がん：5~30％（Cell, 1990年）

肺腺がん：1～2％（Nature Medicine, 2012年）

大腸がん、乳がん、唾液腺がん

点突然変異による活性化

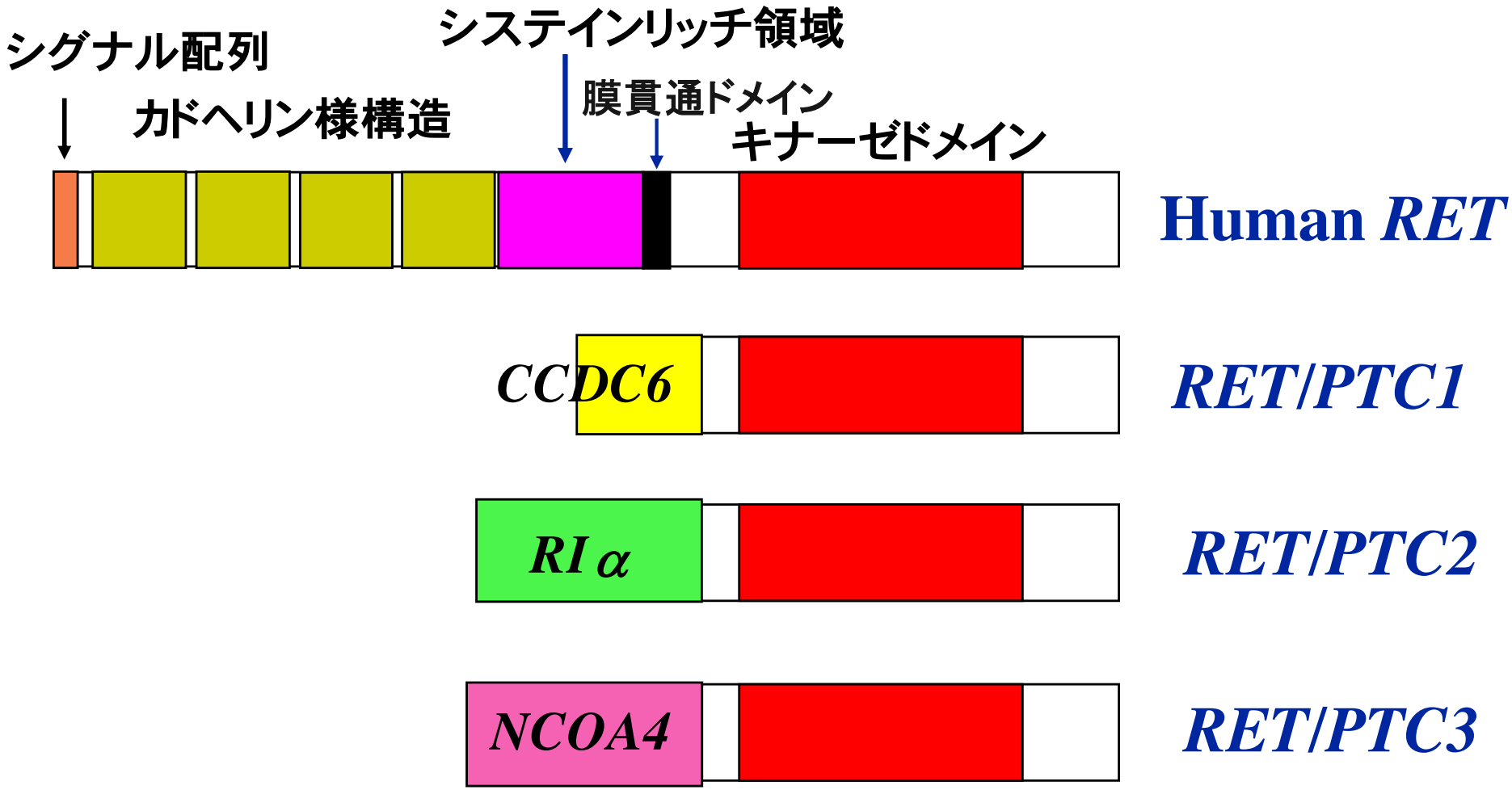
多発性内分泌腫瘍症2型（Nature, 1993,1994年）

散発性甲状腺髄様がん

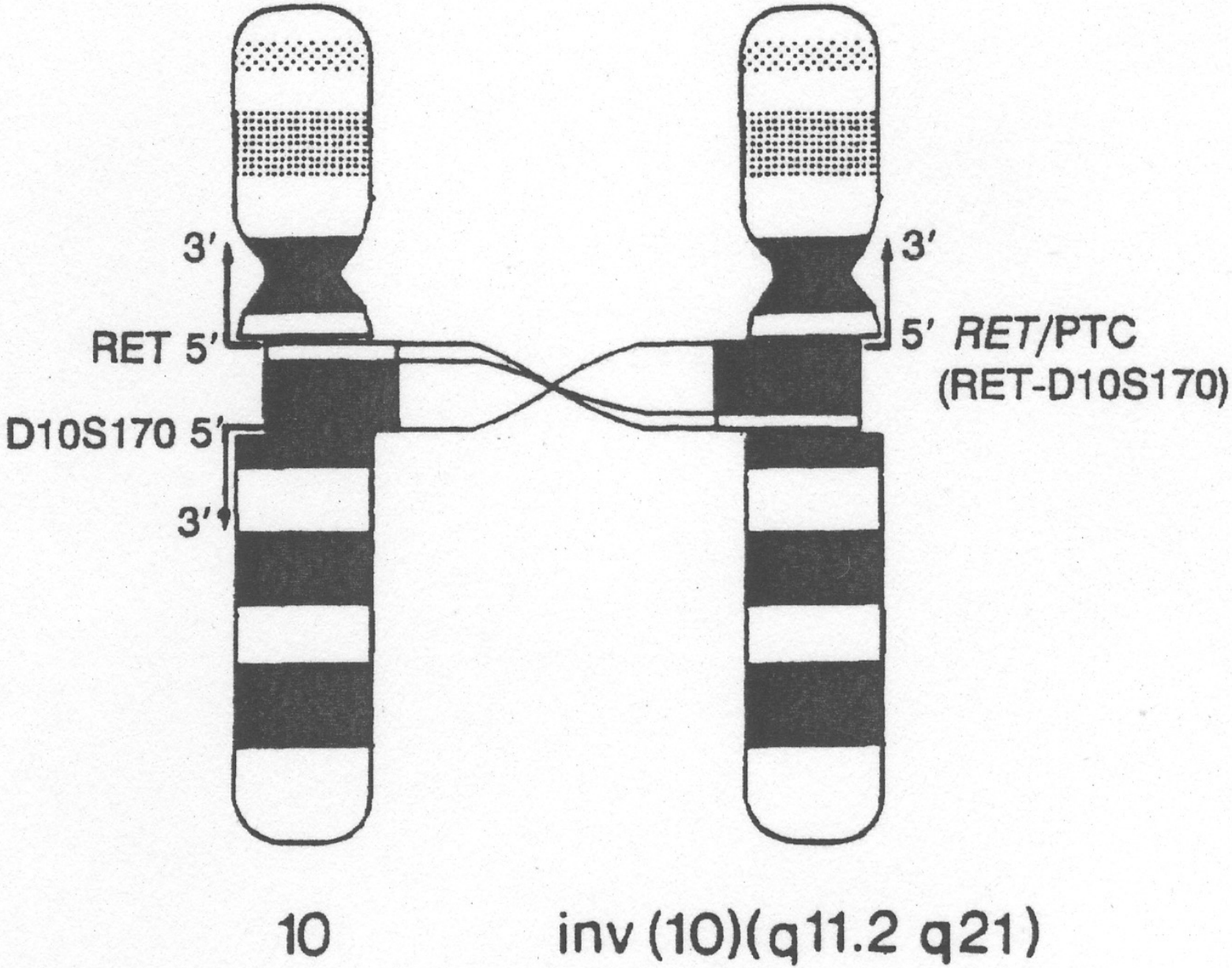
点突然変異や遺伝子欠失などによる不活性化

Hirschsprung病（Natute, 1994年）

甲状腺乳頭がんにおける*RET*融合遺伝子



甲状腺がんで検出された10番染色体の逆位



Pierotti et al. PNAS (1992)

名古屋大学編

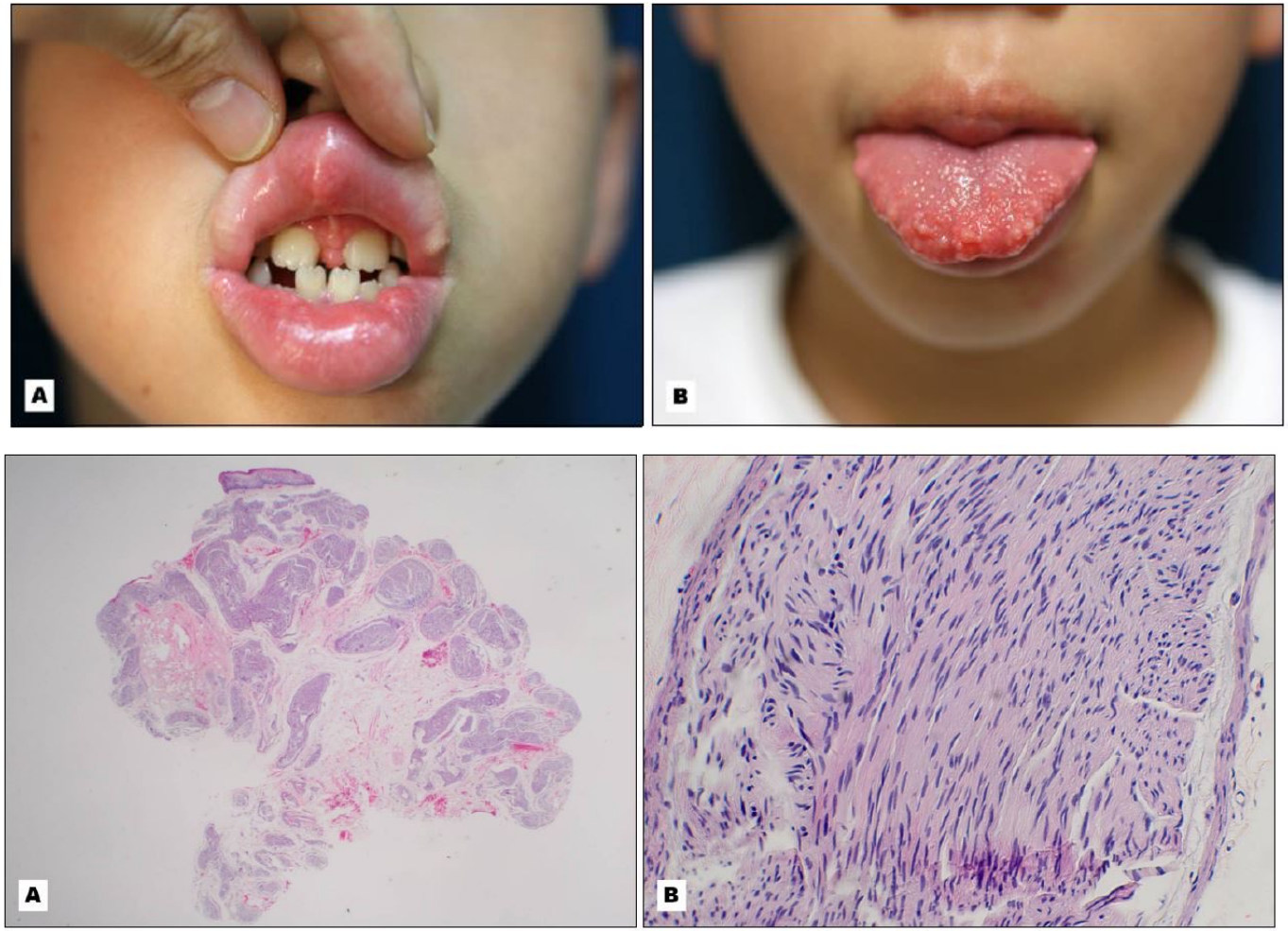
1990年4月～2020年3月

多発性内分泌腫瘍症2型の臨床像
(Multiple Endocrine Neoplasia 2: MEN2)

MEN 2A	MEN 2B	FMTC
甲状腺髄様癌	甲状腺髄様癌	甲状腺髄様癌
副腎褐色細胞腫	副腎褐色細胞腫	
副甲状腺過形成	粘膜神経腫	
	消化管神経節腫	
	マルファン様体型	

MEN2B : Multiple Endocrine Neoplasia 2B

Mucosal neuroma

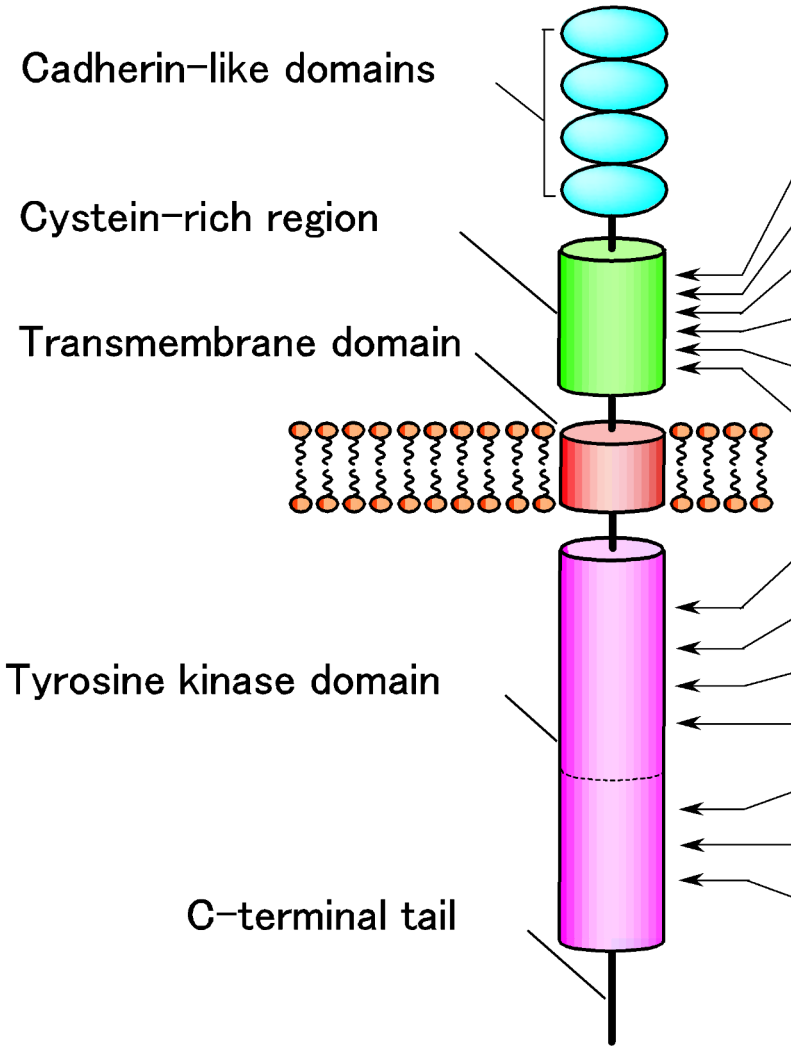


Ann Dermatol Vol. 22, No. 4, 2010

Marfanoid habitus

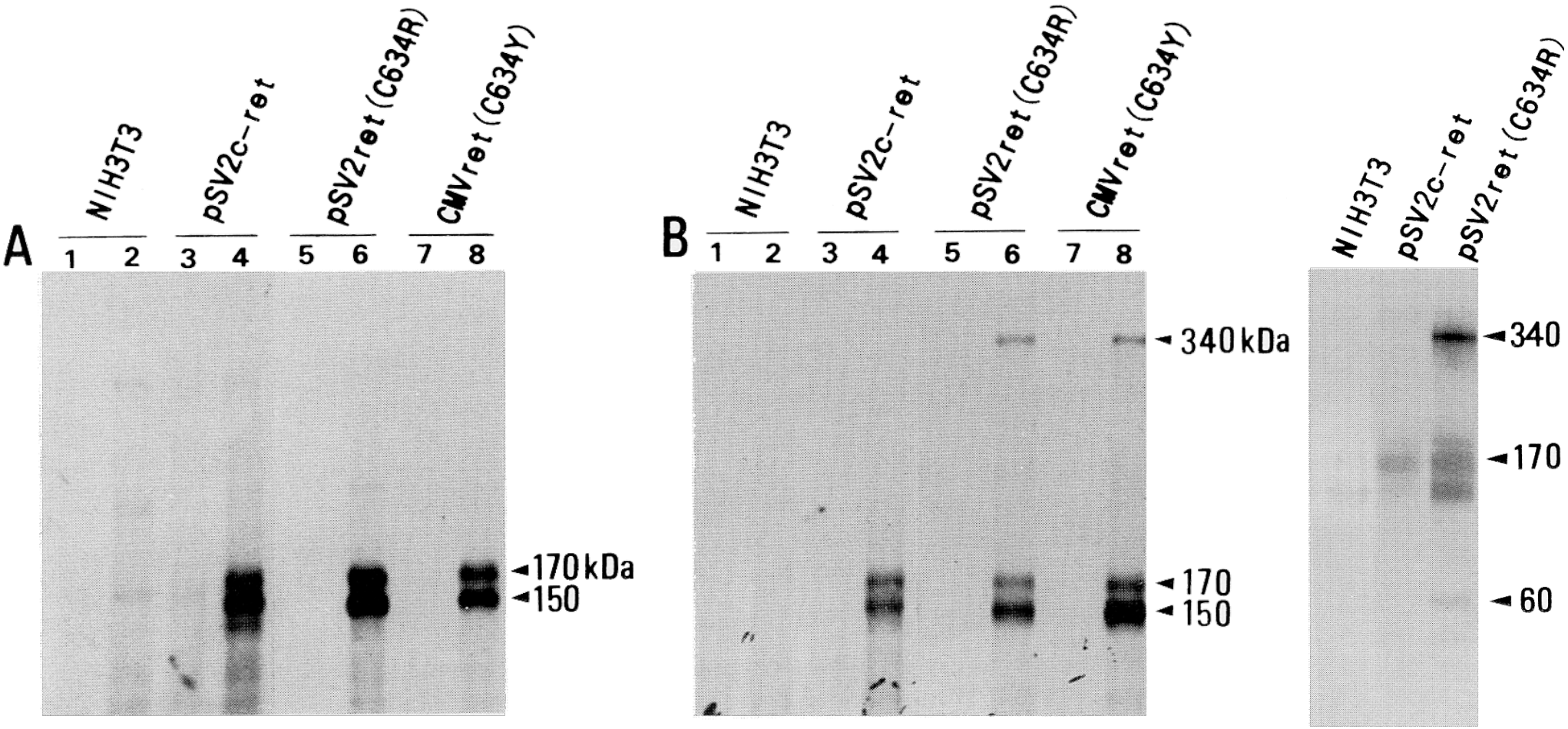
Arq Bras Endocrinol Metab vol.52 no.8 São Paulo Nov. 2008

RET mutations in MEN 2



Codon	Phenotype
C609	MEN2A,FMTC,HSCR
C611	MEN2A,FMTC,HSCR
C618	MEN2A,FMTC,HSCR
C620	MEN2A,FMTC,HSCR
C630	MEN2A,FMTC
C634	MEN2A,FMTC
E768	MEN2A,FMTC
L790	MEN2A,FMTC
Y791	MEN2A,FMTC
V804	MEN2A,FMTC
A883	MEN2B
S891	MEN2A,FMTC
M918	MEN2B

MEN2A型変異RETのリガンド非依存性2量体化による活性

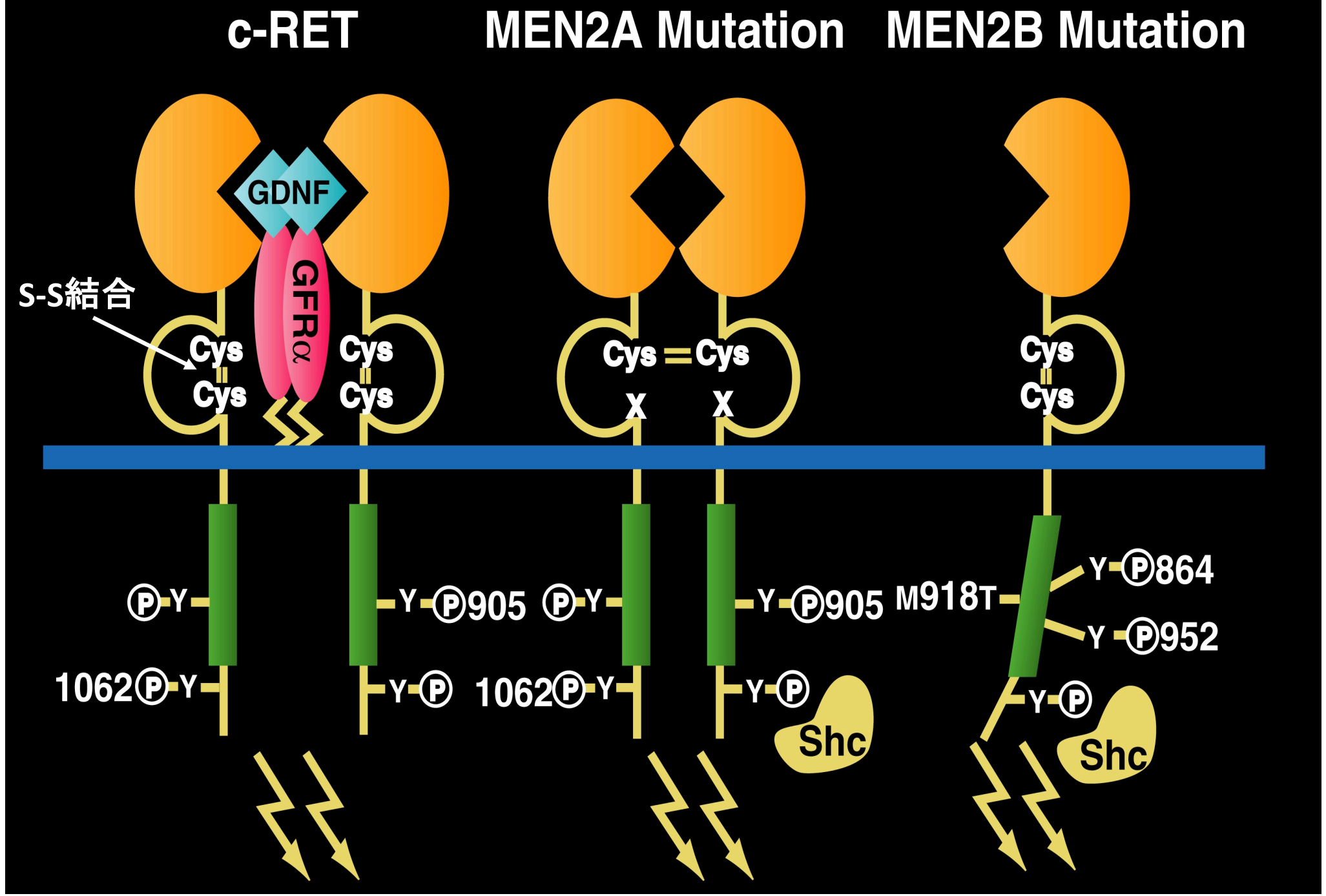


還元条件　　非還元条件

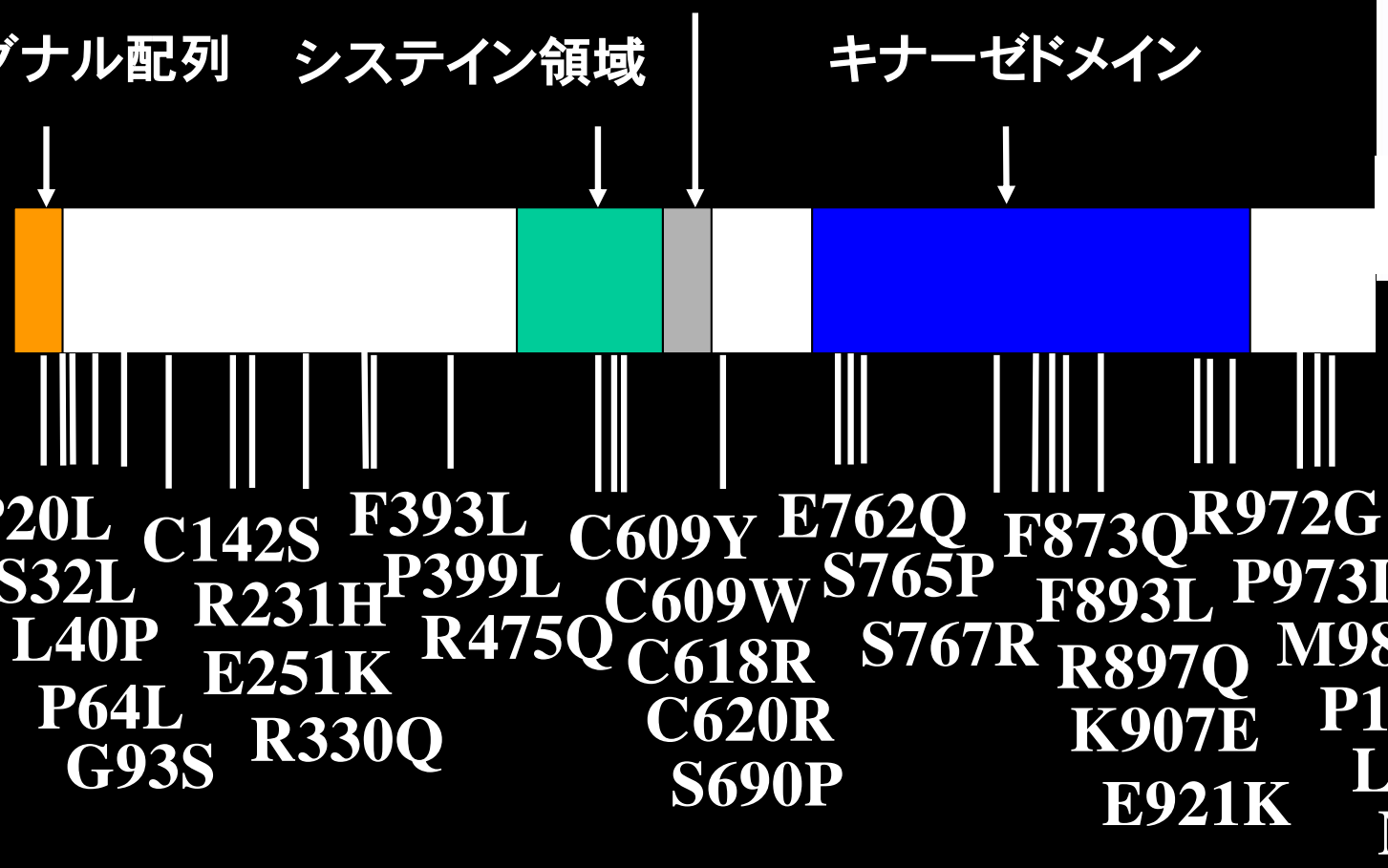
IP: anti-RET　　IB:anti-pY

Asai et al. Mol. Cell. Biol. (1995)

MEN2型遺伝子変異によるRETの活性化機構



ヒルシュスプルング病における*RET*遺伝子の変異



著作権等の都合により、ここに挿入されていた画像を削除しました。

RET

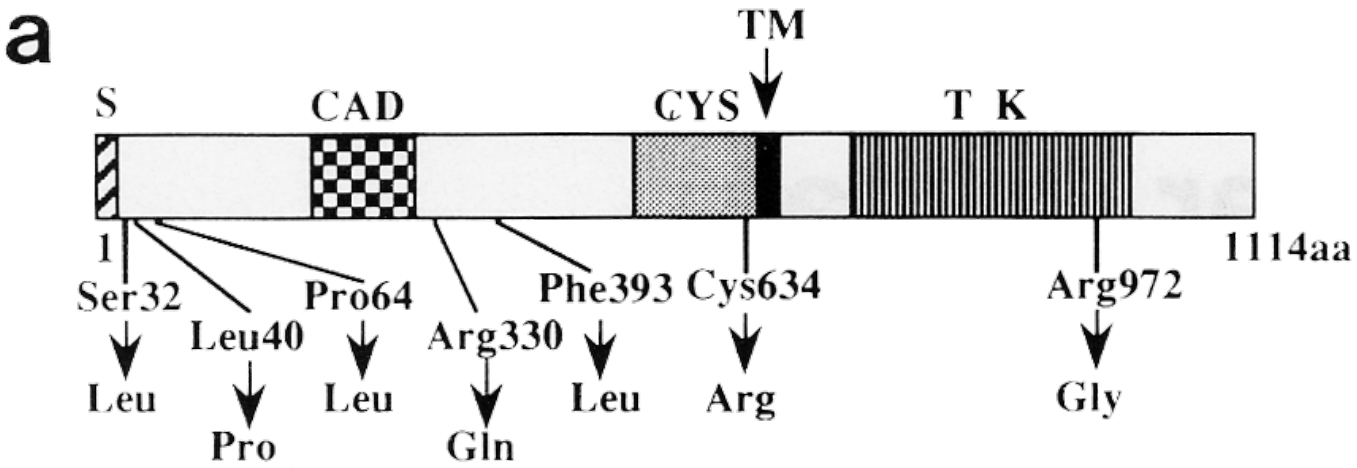
https://asylumeclectica.com/malady/malady.htm 2020/5/27

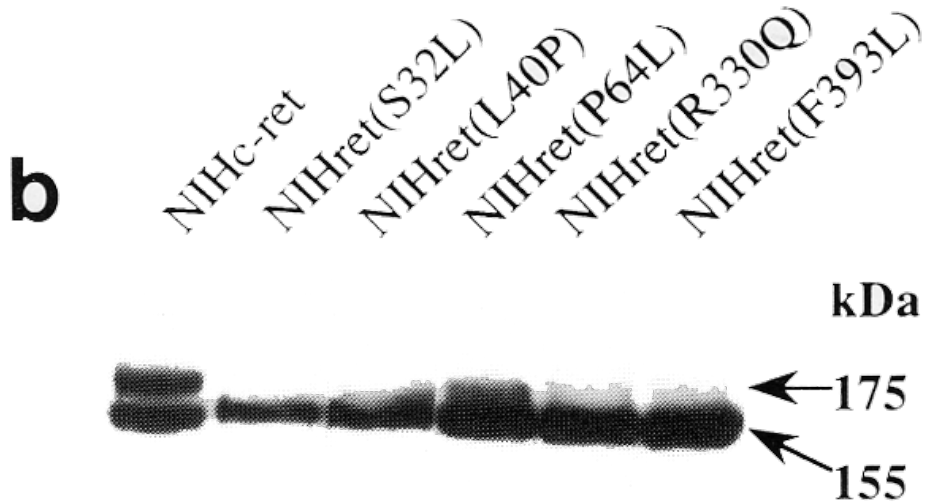
RETタンパクの成熟障害
細胞表面への発現障害

チロシンキナーゼ
活性の低下

細胞内シグナル
伝達障害

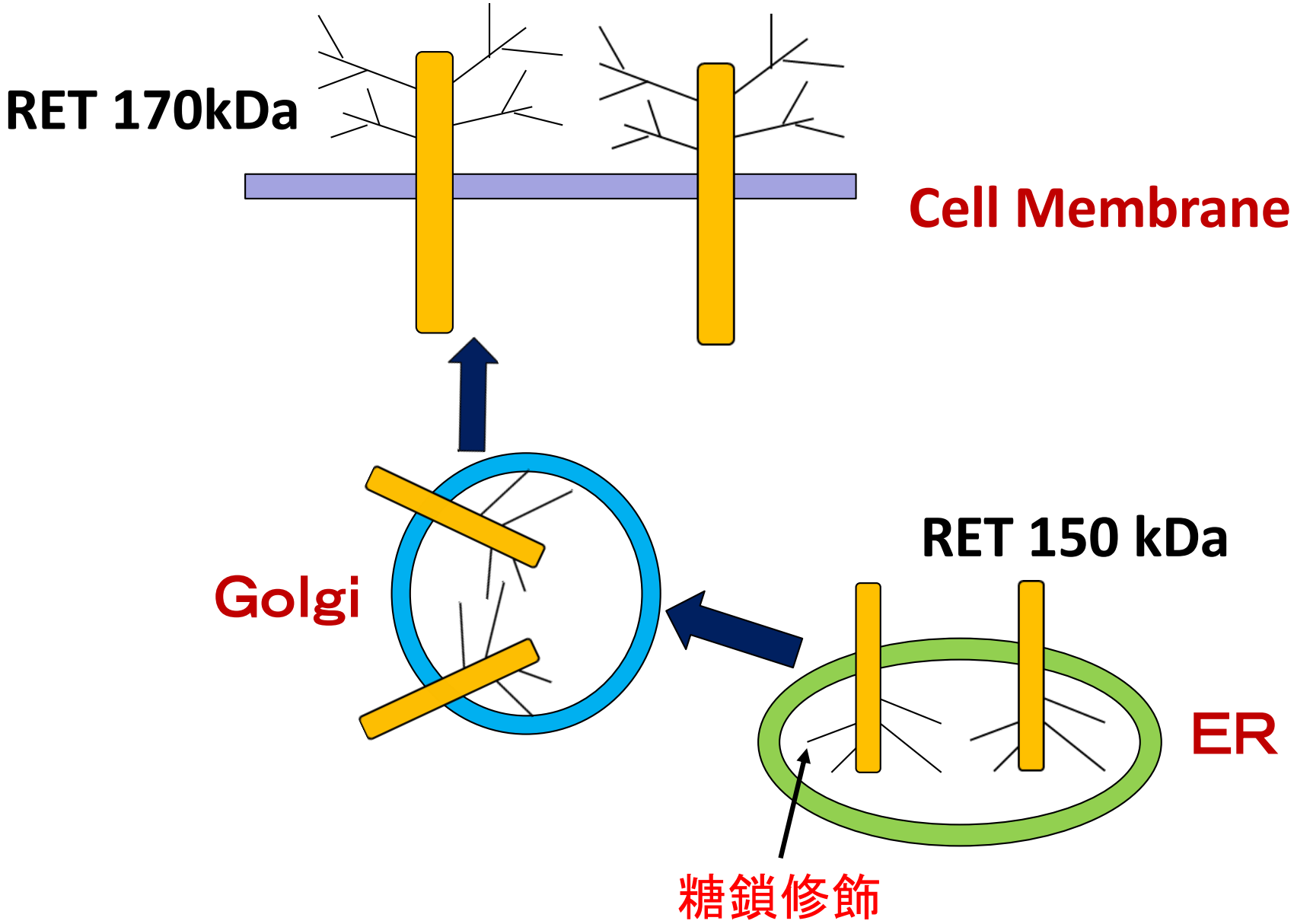
ヒルシュスプルング型変異RETの細胞表面発現障害



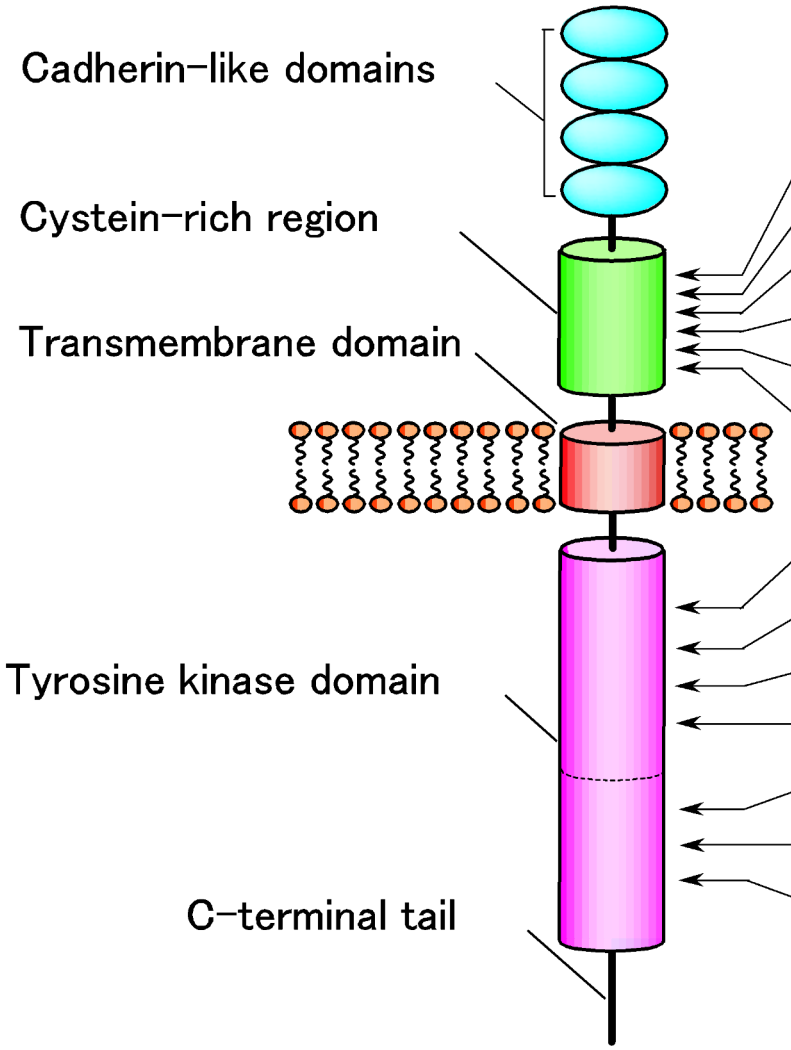


Iwashita et al. Hum. Mol. Genet. (1996)

RETタンパクの成熟過程

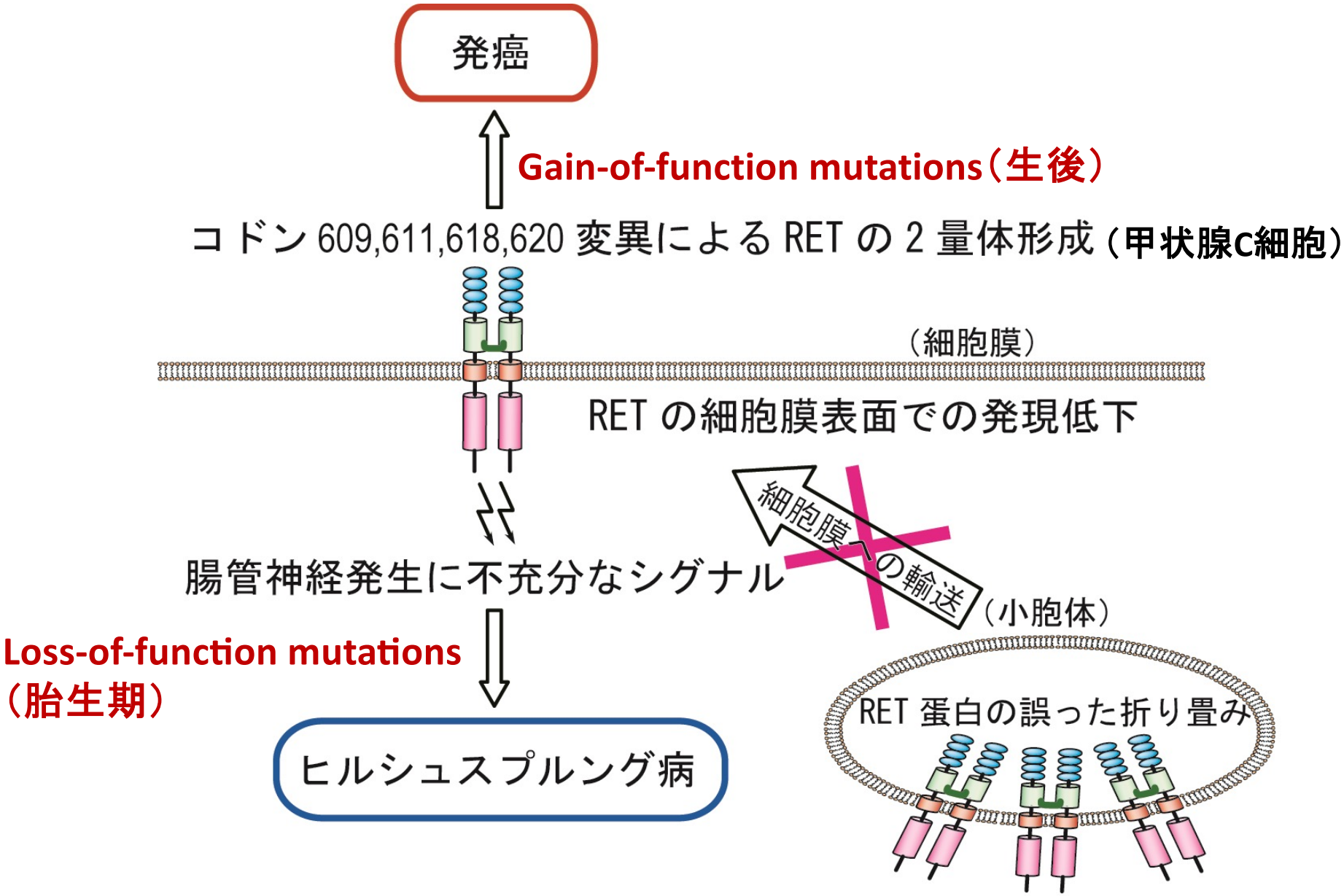


RET mutations in MEN 2



Codon	Phenotype
C609	MEN2A,FMTC,HSCR
C611	MEN2A,FMTC,HSCR
C618	MEN2A,FMTC,HSCR
C620	MEN2A,FMTC,HSCR
C630	MEN2A,FMTC
C634	MEN2A,FMTC
E768	MEN2A,FMTC
L790	MEN2A,FMTC
Y791	MEN2A,FMTC
V804	MEN2A,FMTC
A883	MEN2B
S891	MEN2A,FMTC
M918	MEN2B

Cys 609, 611, 618, 620変異によるMEN2AとHSCRの合併



Ito, Iwashita et al. Cancer Res. (1997), Takahashi et al. Hum Mutat. (1999)

GDNF

Science (1993)

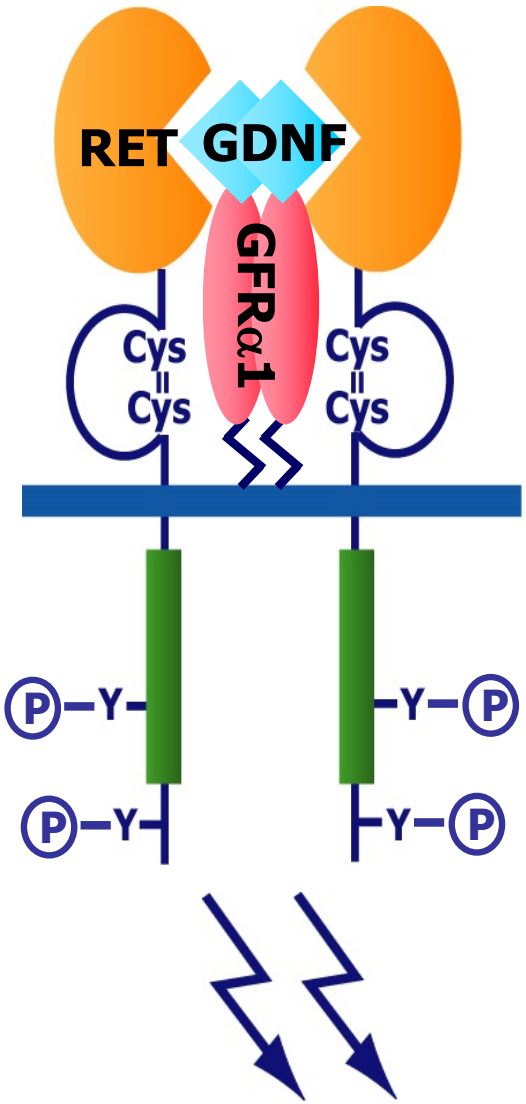
GDNF: A Glial Cell Line–Derived Neurotrophic Factor for Midbrain Dopaminergic Neurons

Leu-Fen H. Lin, Daniel H. Doherty, Jack D. Lile, Susan Bektesh, Frank Collins*

A potent neurotrophic factor that enhances survival of midbrain dopaminergic neurons was purified and cloned. Glial cell line–derived neurotrophic factor (GDNF) is a glycosylated, disulfide-bonded homodimer that is a distantly related member of the transforming growth factor–β superfamily. In embryonic midbrain cultures, recombinant human GDNF promoted the survival and morphological differentiation of dopaminergic neurons and increased their high-affinity dopamine uptake. These effects were relatively specific; GDNF did not increase total neuron or astrocyte numbers nor did it increase transmitter uptake by γ-aminobutyric containing and serotonergic neurons. GDNF may have utility in the treatment of Parkinson's disease, which is marked by progressive degeneration of midbrain dopaminergic neurons.

GDNF:グリア細胞由来神経栄養因子

GDNF/RET signaling



GDNF/RET signaling

GDNF:Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor

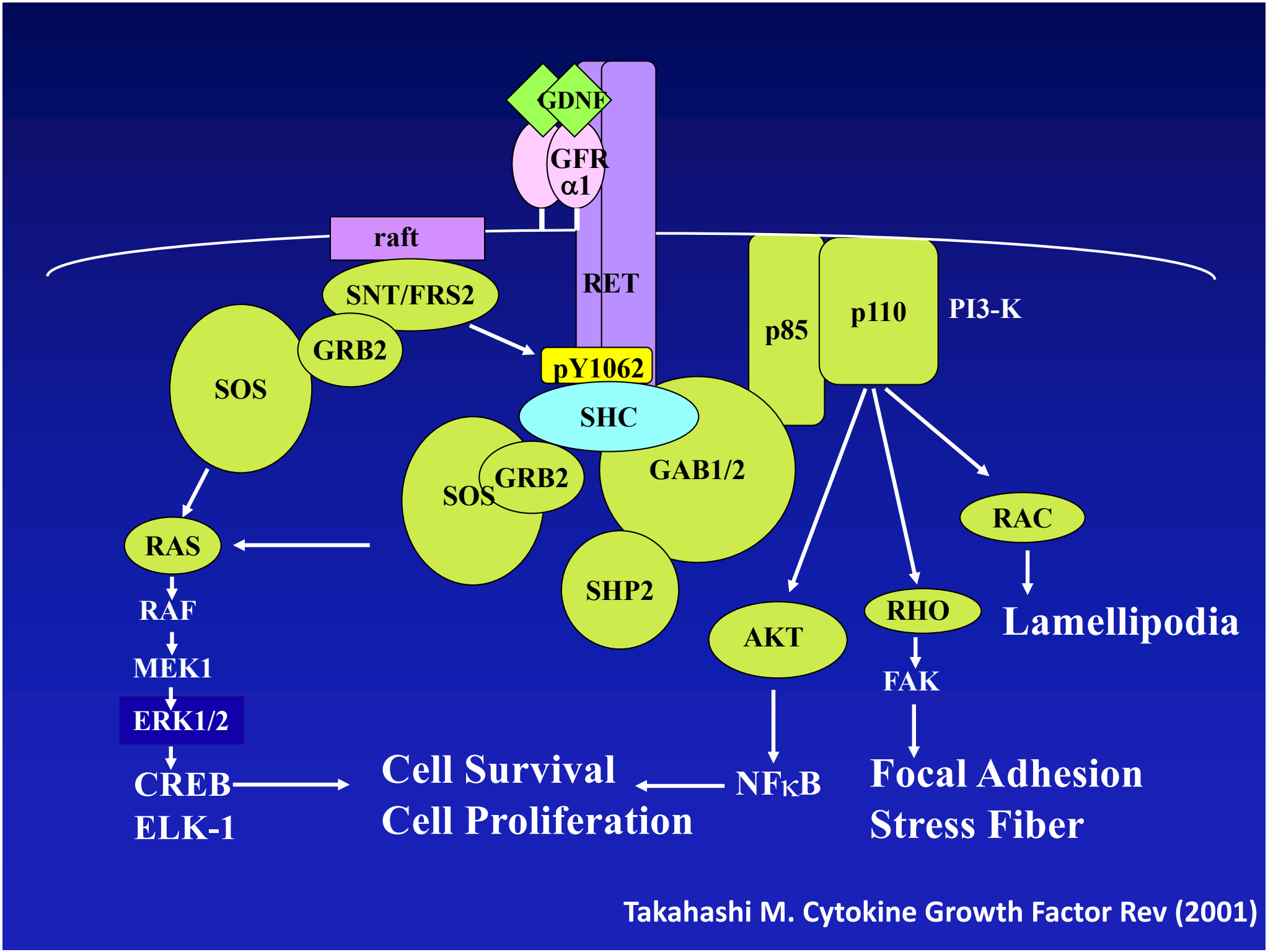
グリア細胞由来神経栄養因子

©wikipedia

Dr. Arnon Rosenthal

神経系の発生（腸管神経系など）
腎臓の発生
精子形成

Nature (1996), Nature (1997)

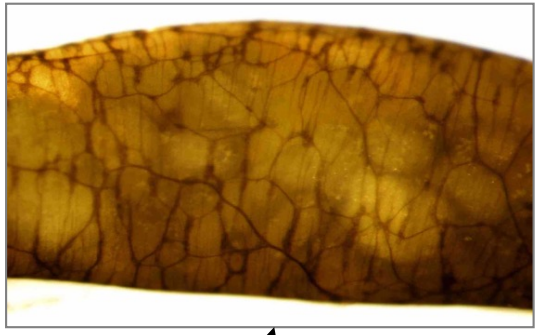


Takahashi M. Cytokine Growth Factor Rev (2001)

RET変異マウスにおける巨大結腸症

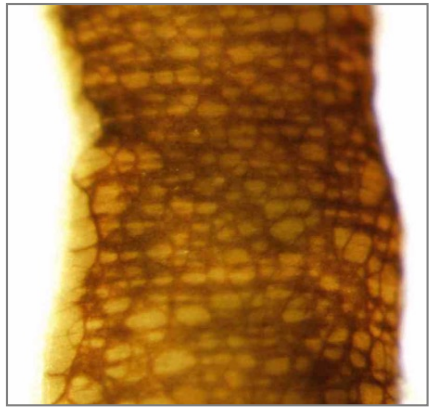
Jijiwa et al. Mol. Cell. Biol. (2004)

RET変異マウスにおける腸管神経系の欠損



マウス大腸

大腸近位部
正常

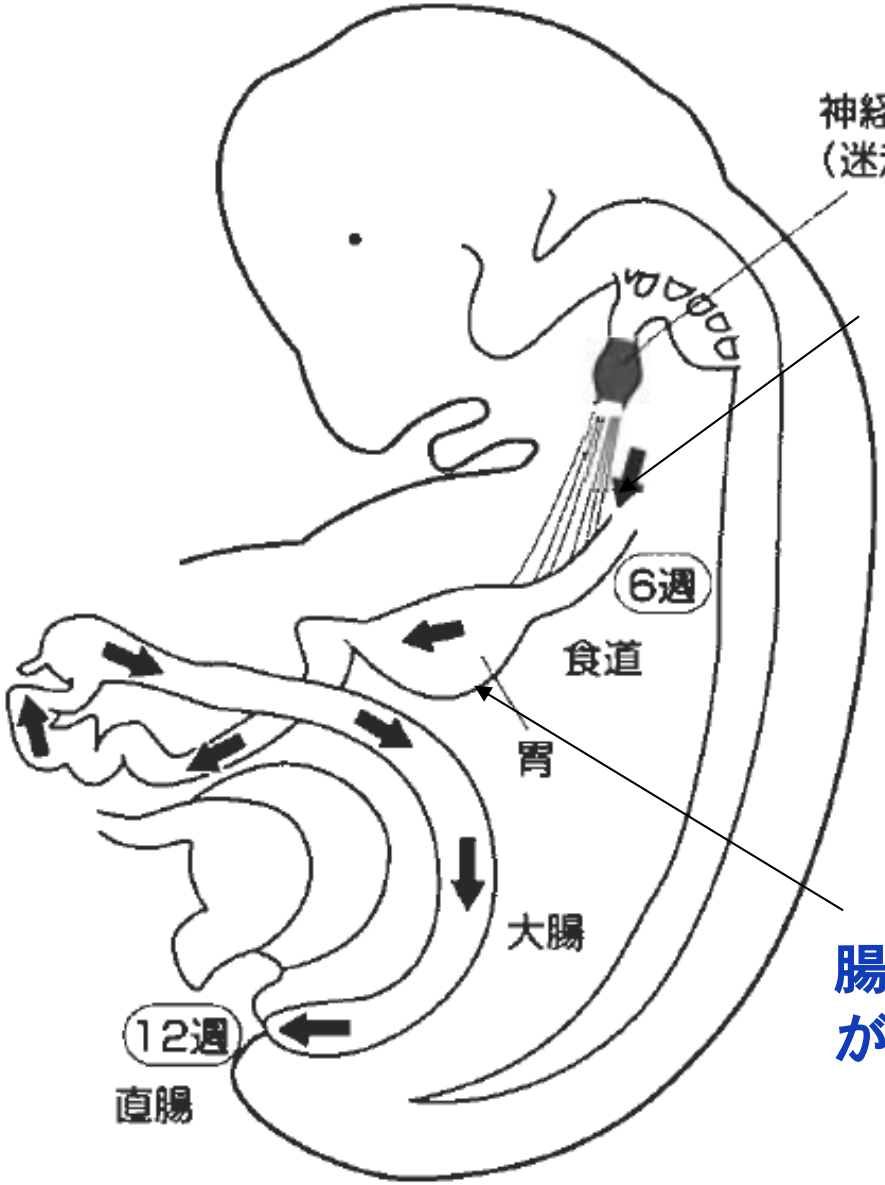


大腸遠位部
欠損

（Acetylcholinesterase staining）

Asai et al. Development (2006)

腸管神経系の発生



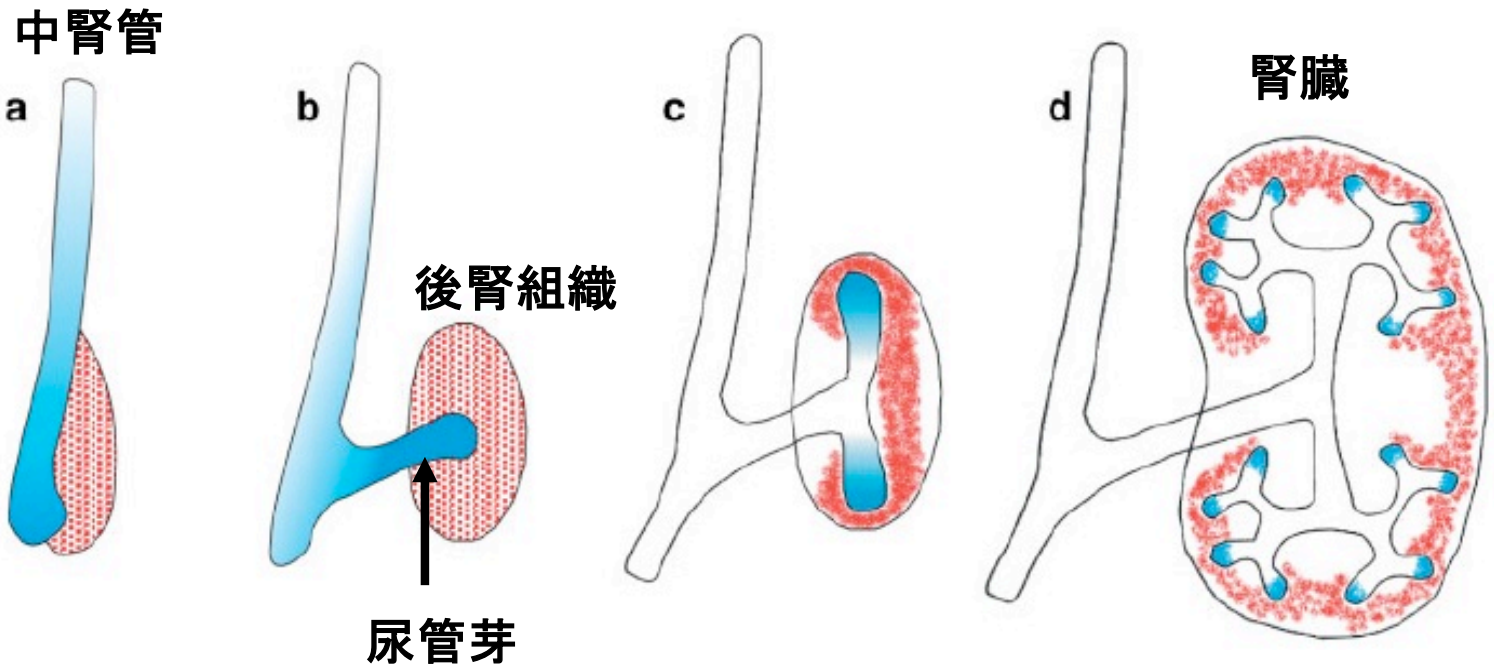
RET, GFRα1を発現する神経堤細胞が食道から肛門まで6−7週間かけて移動し、腸管神経系が形成される。

腸管の間質細胞にGDNFが発現

RET変異マウスにおける腎臓の低形成

正常マウスの腎臓　　変異RETマウスの腎臓

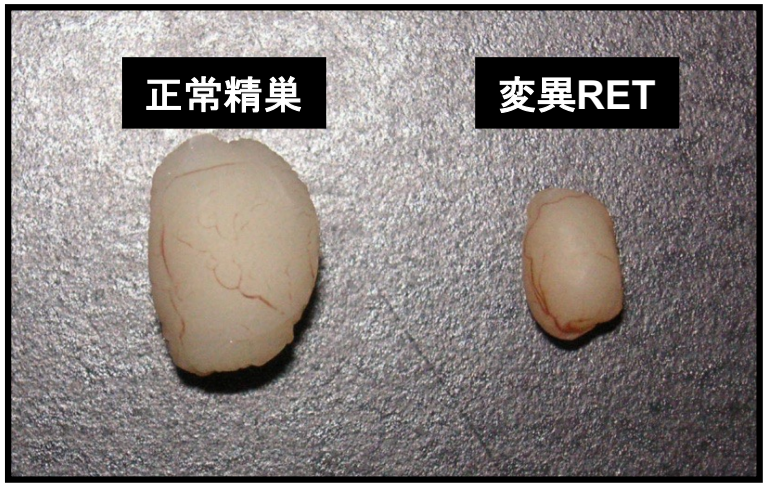
腎臓の発生



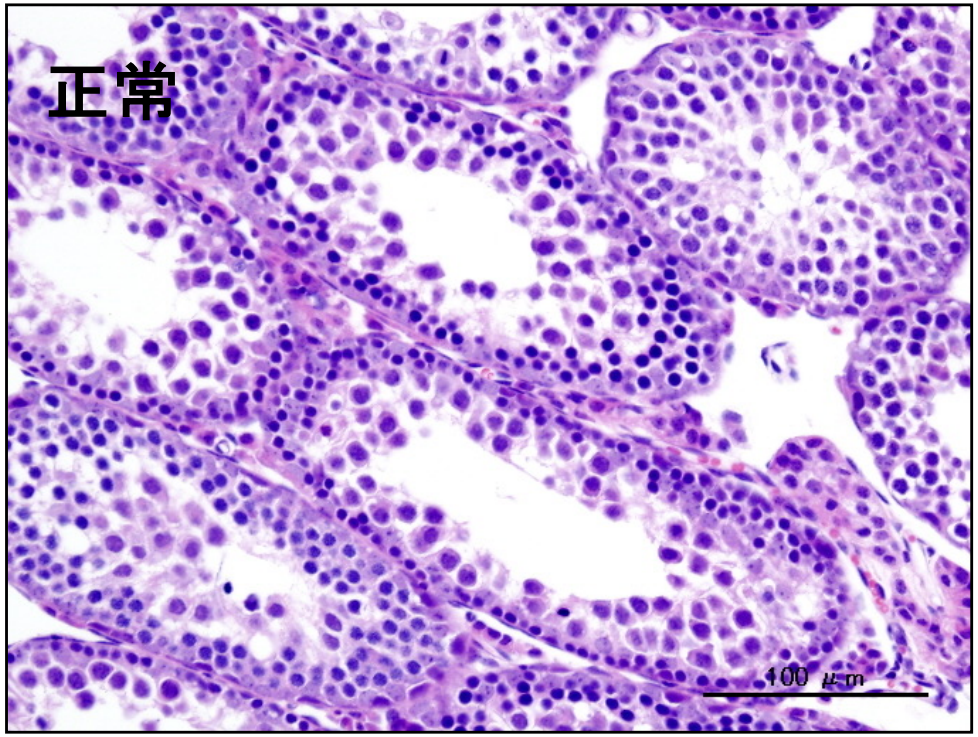
青：RET, GFRα1が発現している部位

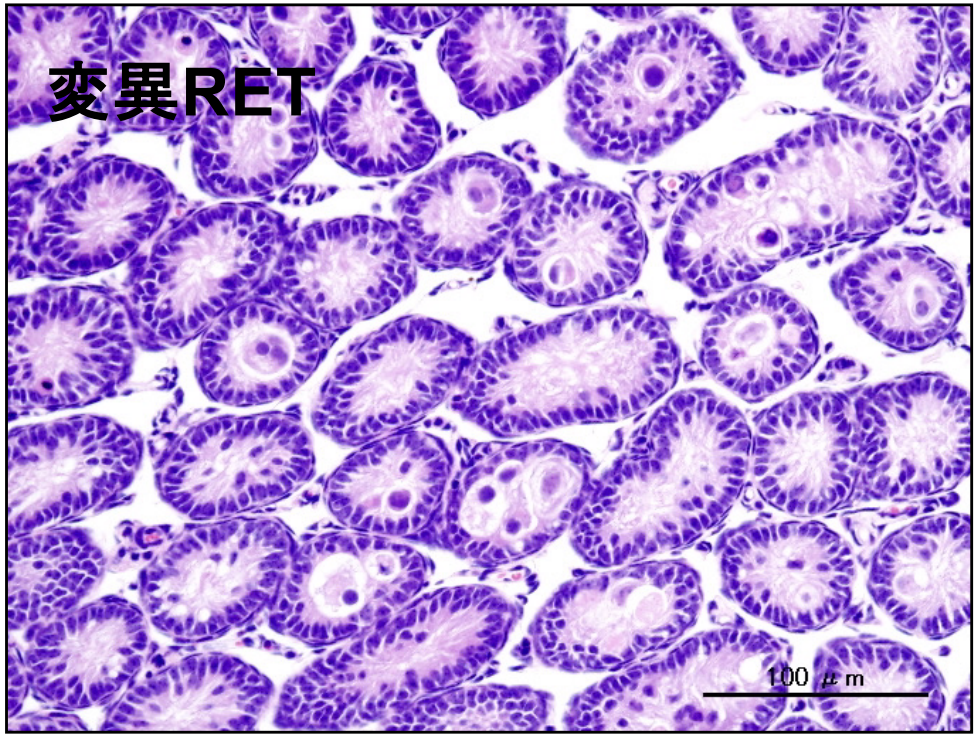
赤：GDNFが発現する部位

GDNF/Ret signaling and the development of the kidney.
Costantini F, Shakya R.
Bioessays. 2006 Feb;28(2):117-27. doi: 10.1002/bies.20357.



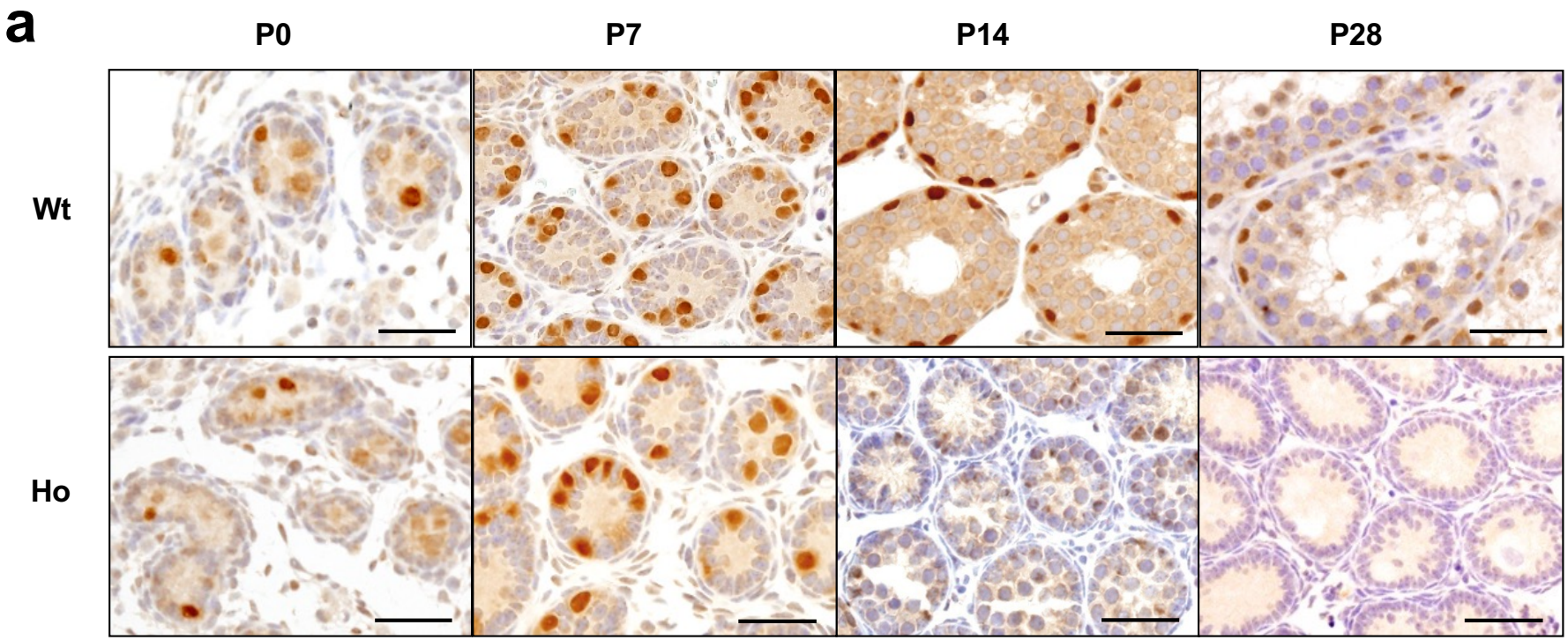
RETの変異マウスにおける精巣の低形成

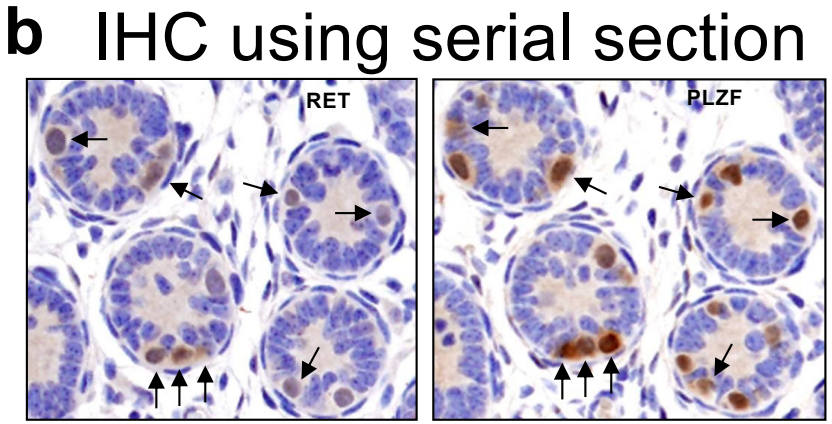


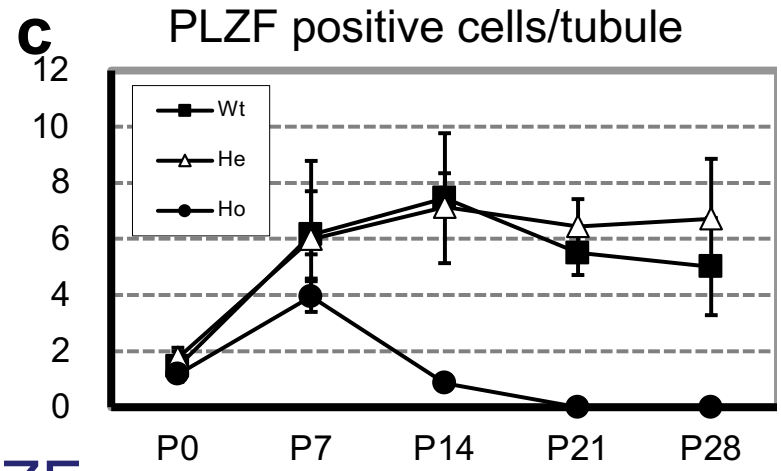


精子形成を認めない

RET変異マウスにおける精子幹細胞の消失(PLZF 染色)



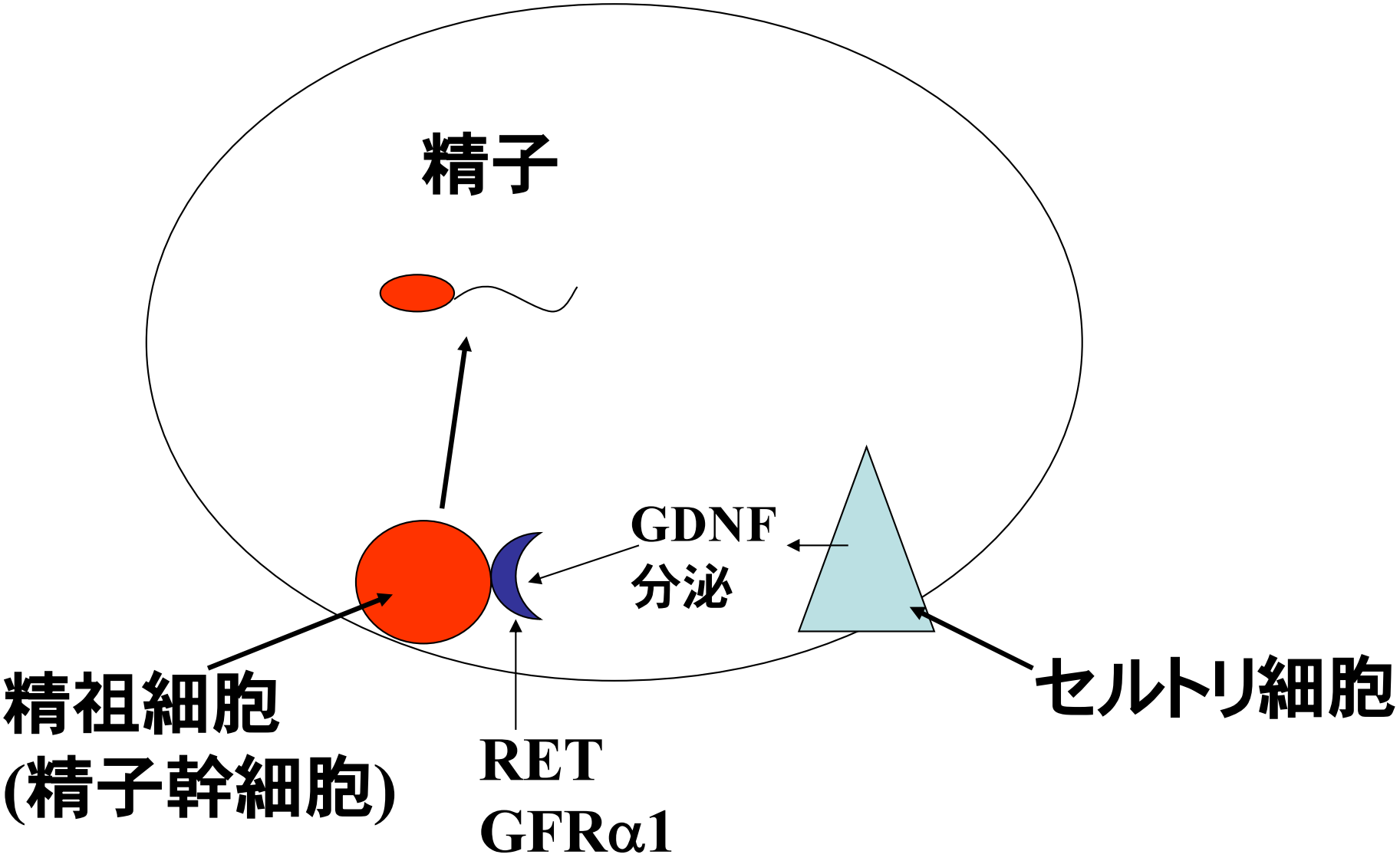




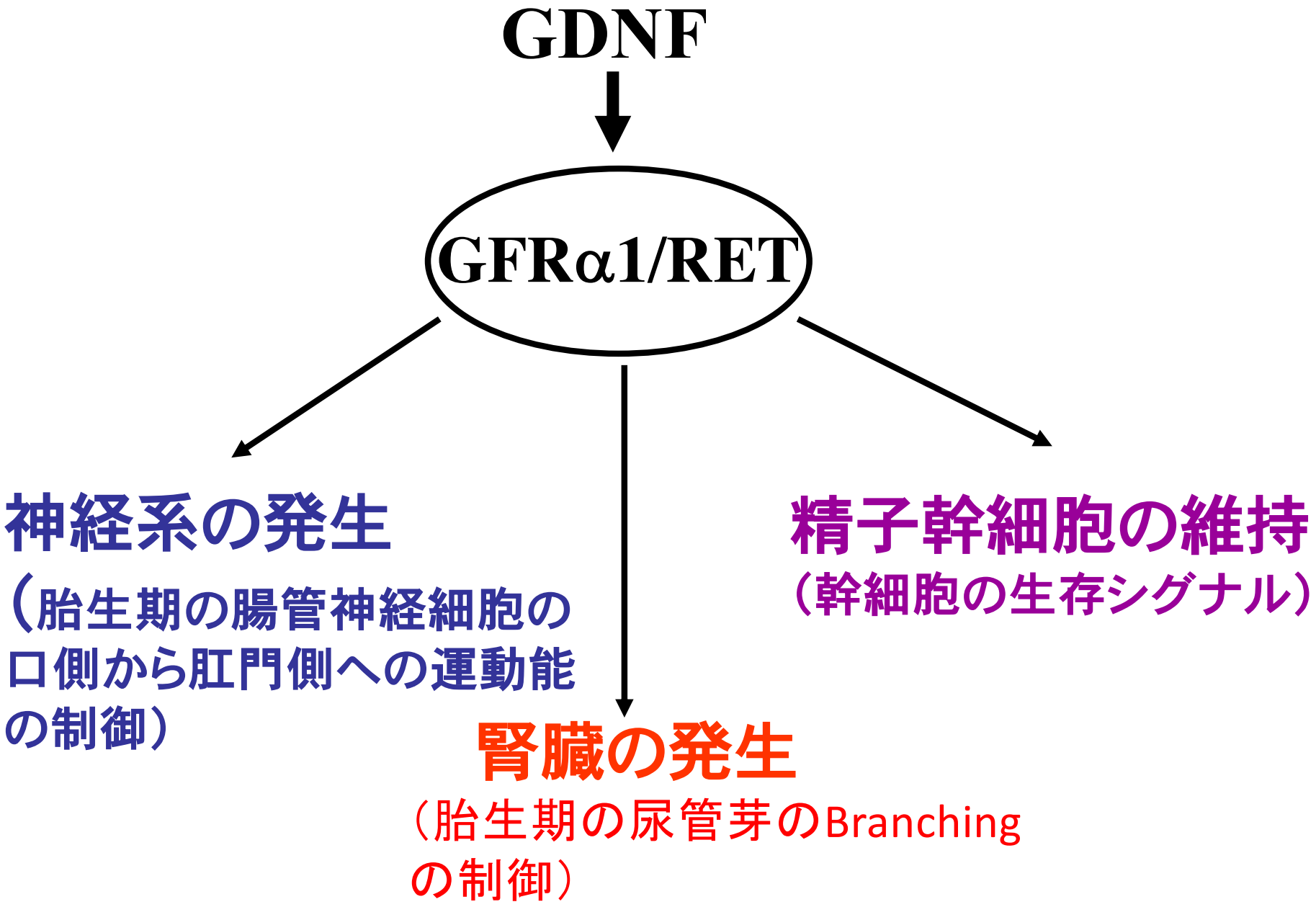
RET positive cells also express PLZF

Jijiwa, Kawai et al. Genes Cells (2008)

精子幹細胞の生存・維持にはセルトリ細胞から分泌されるGDNFが精子幹細胞に発現しているRETに作用することが必須である。



GDNF/GFRa1/RETシグナル伝達系の生理機能



*RET*遺伝子の変異によって発症する疾患

遺伝子再構成による活性化

甲状腺乳頭がん：5~30％（Cell, 1990年）

肺腺がん：1～2％（Nature Medicine, 2012年）

大腸がん、乳がん、唾液腺がん

点突然変異による活性化

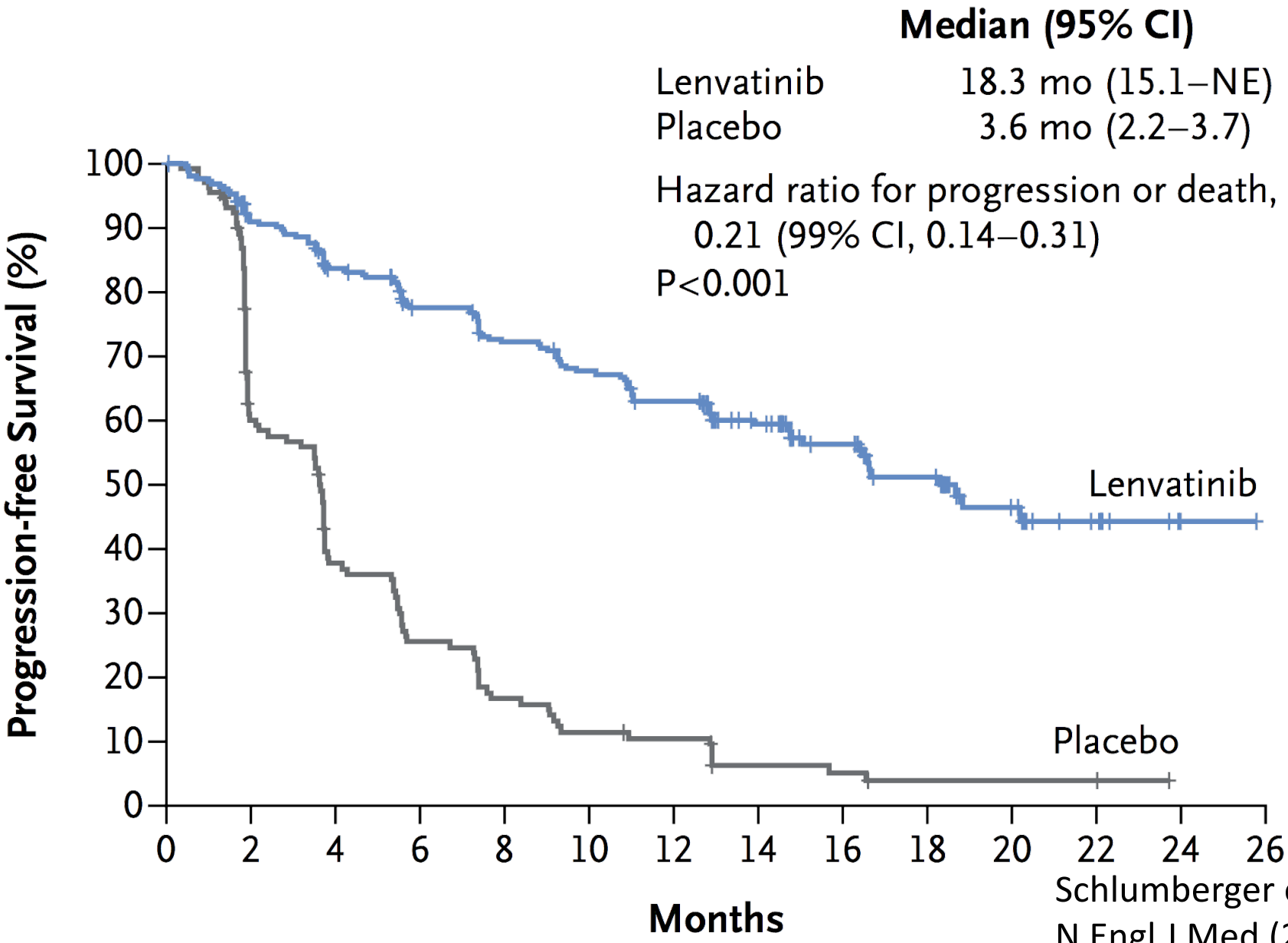
多発性内分泌腫瘍症2型（Nature, 1993,1994年）

散発性甲状腺髄様がん

点突然変異や遺伝子欠失などによる不活性化

Hirschsprung病（Natute, 1994年）

チロシンキナーゼ阻害剤による甲状腺がんの治療効果



Schlumberger et al.
N Engl J Med (2015)

「RETという遺伝子を見つけてくれた
先生に　ほんまにもう感謝ですよね」

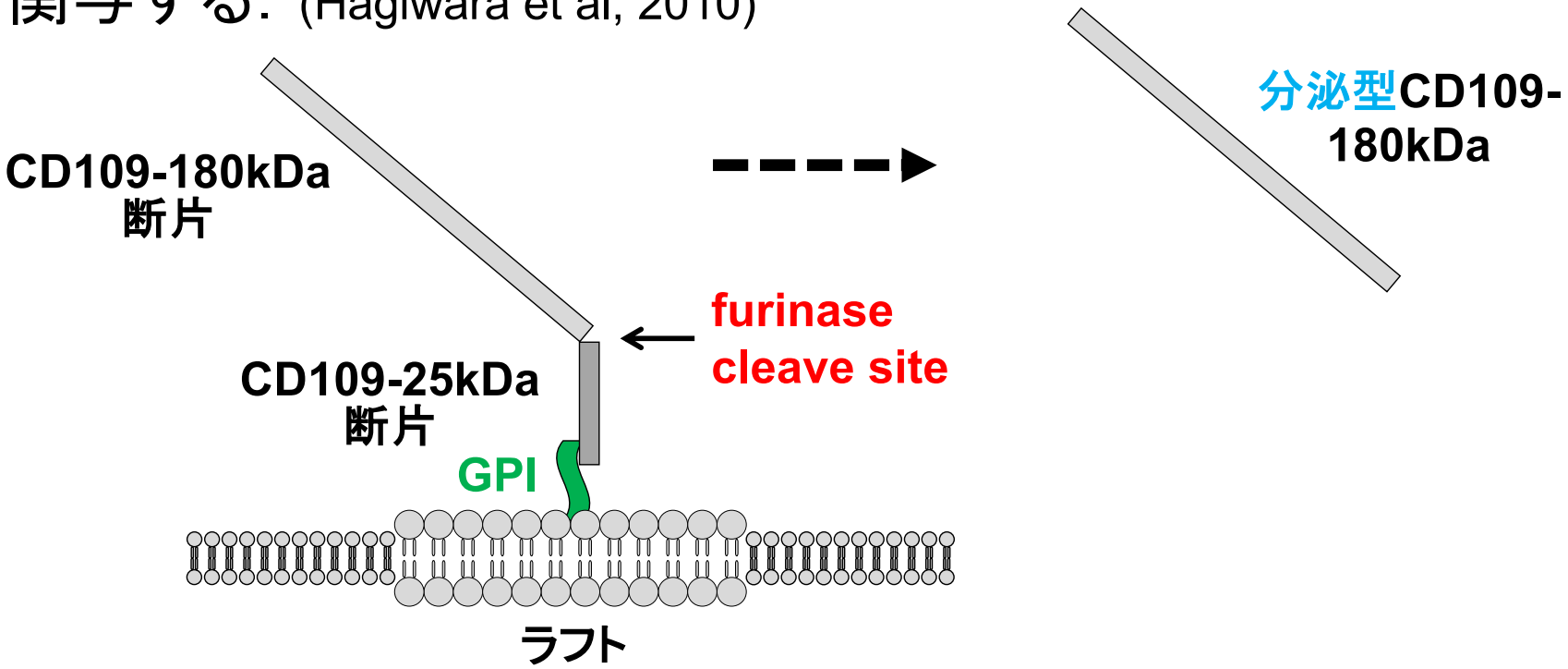
NHKスペシャル “がん治療革命”が始まった～プレシジョン・メディシンの衝撃～（2016年11月）

CD109タンパク質

- RETによって発現誘導される遺伝子の1つとして同定

  (Hashimoto et al. Oncogene 2004)

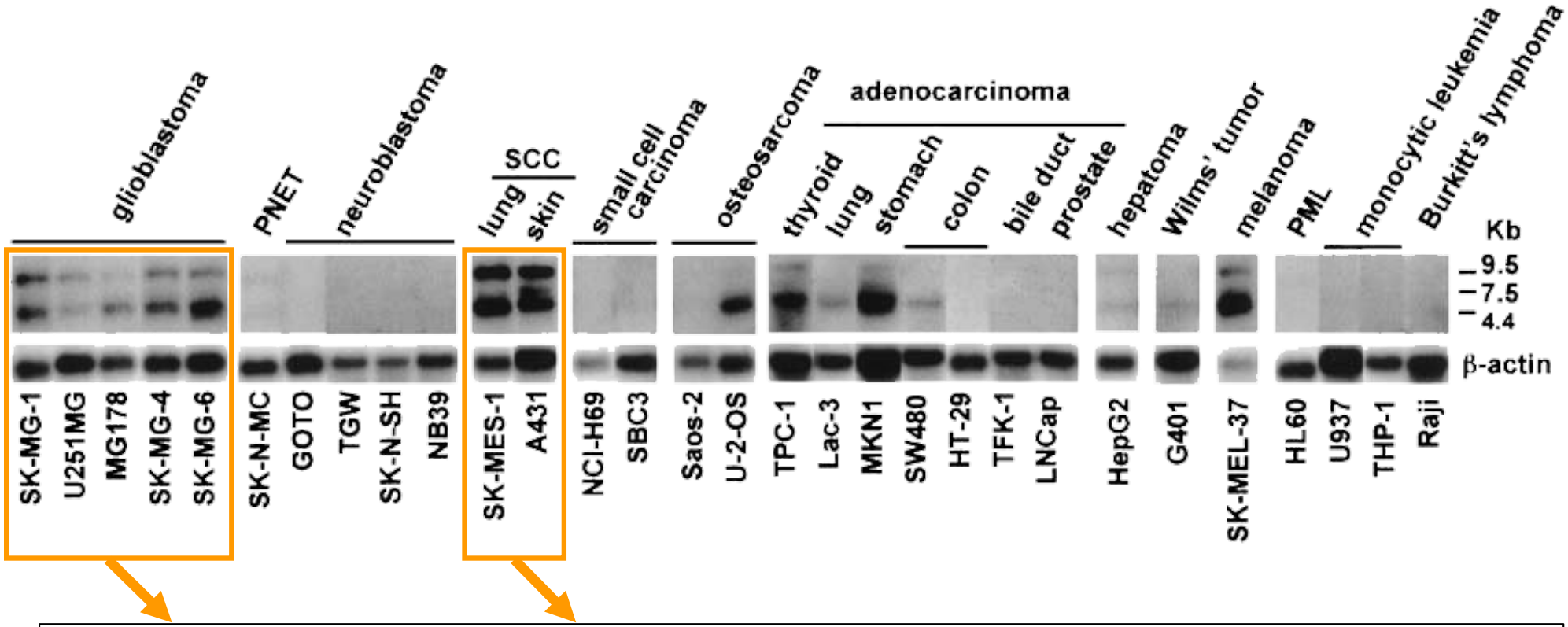
- α_2-マクログロブリン/C3,C4,C5ファミリーに属するGPIアンカー型膜タンパク質. (Lin et al, 2002; Solomon et al, 2004)
- ヒトCD109はfurinaseにより180kDaと25kDaのタンパクに切断され，分泌型CD109がTGF-βシグナルの制御に関与する. (Hagiwara et al, 2010)



ヒト腫瘍細胞株におけるCD109の発現

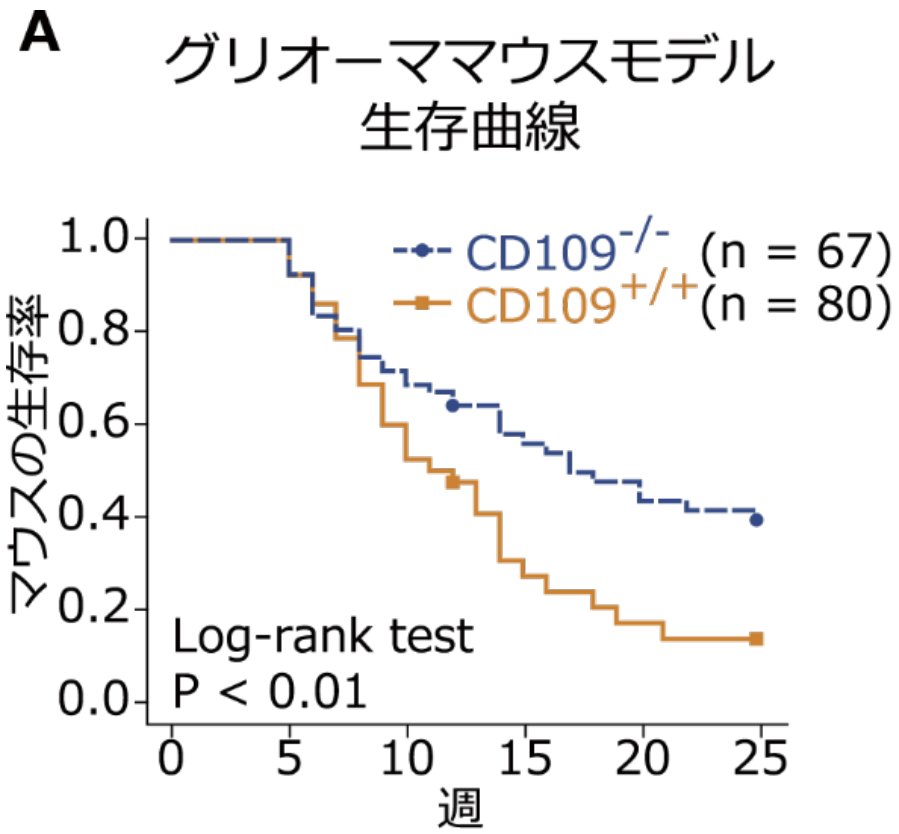
CD109遺伝子は種々のヒト由来細胞株に発現している.

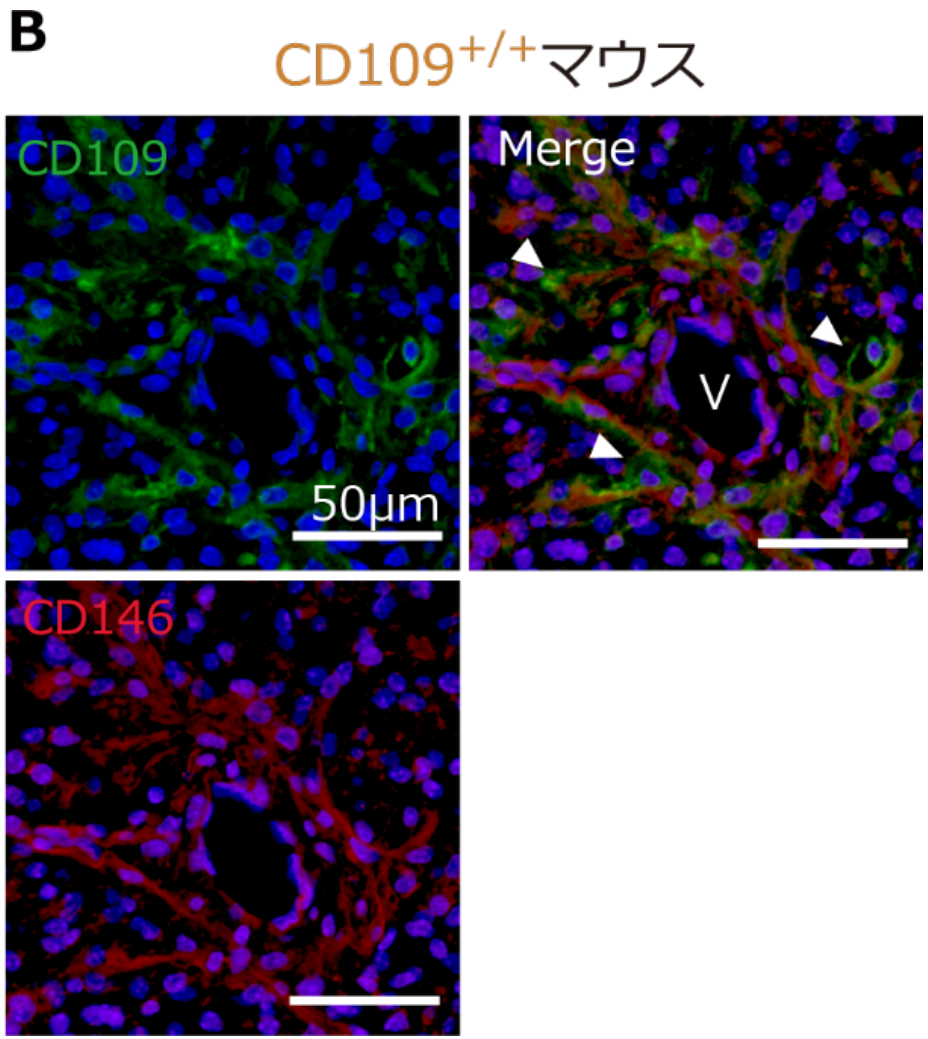
(Hashimoto et al, Oncogene 2004)



グリオブラストーマおよび扁平上皮癌由来細胞株で特に強く発現している.

グリオーママウスモデルにおけるCD109の意義

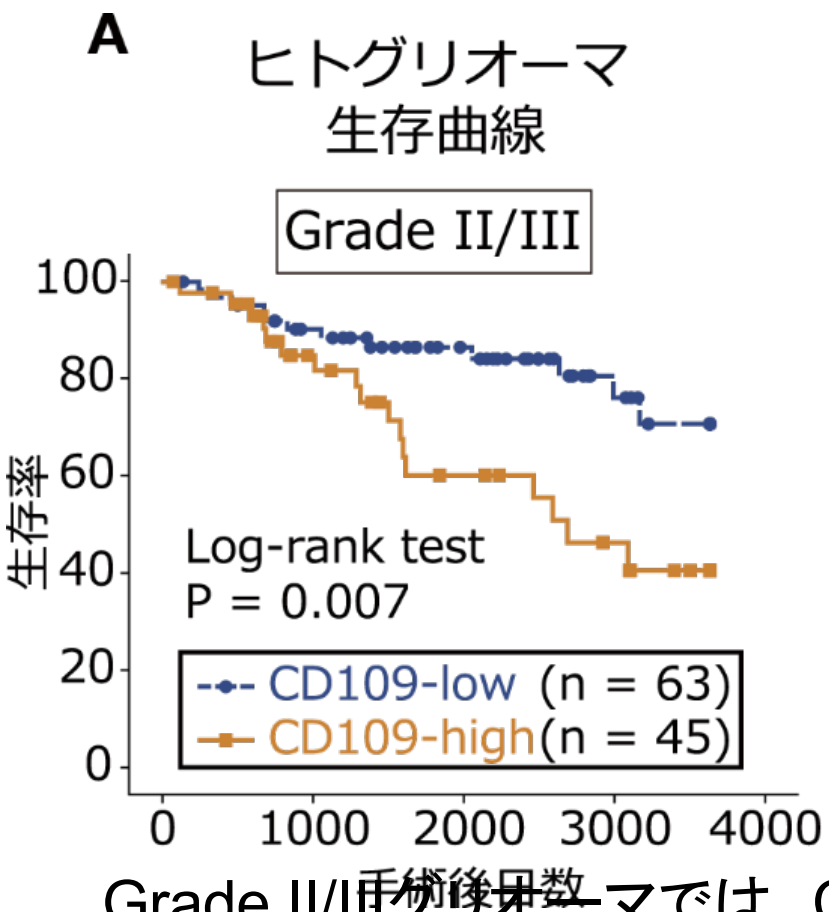


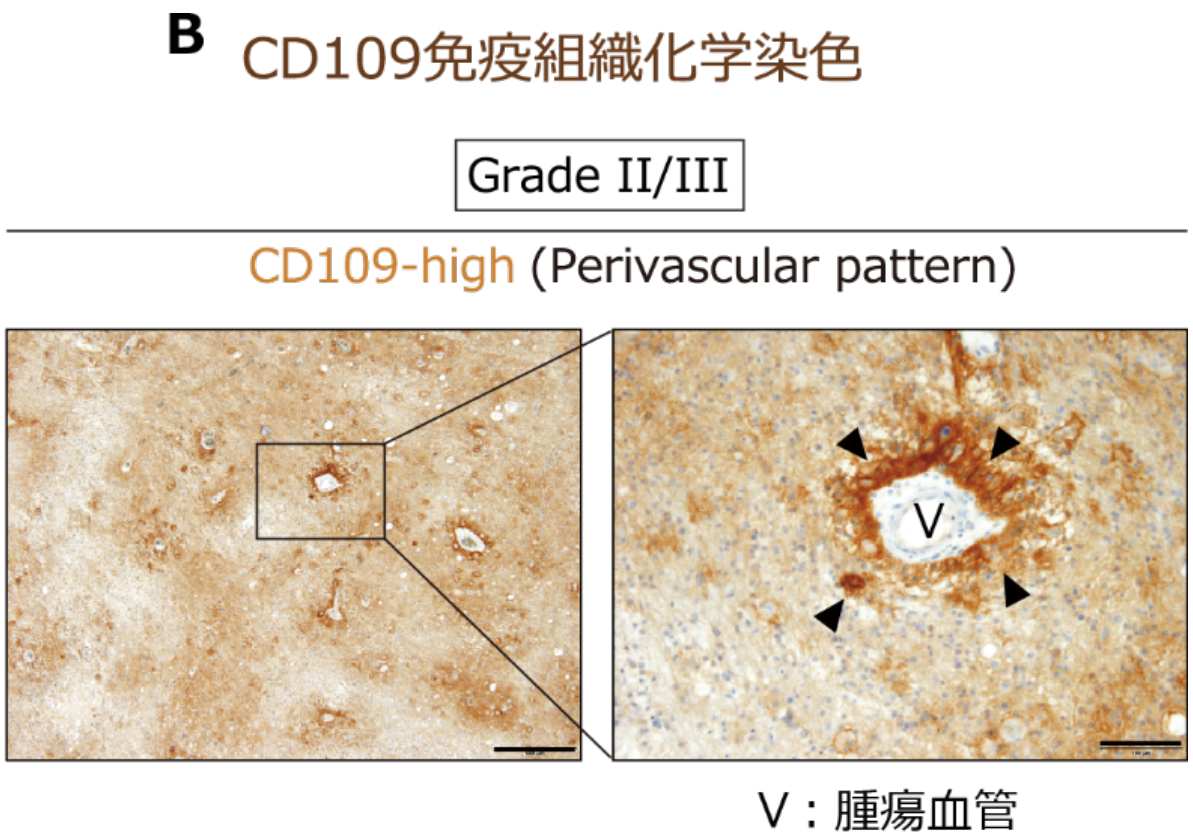


野生型マウスはCD109ノックアウトマウスに比べ予後不良であり(A), CD109は血管周囲に局在している(B).

Shiraki, Mii et al. J. Pathol (2017)

ヒトグリオーマ組織におけるCD109の意義

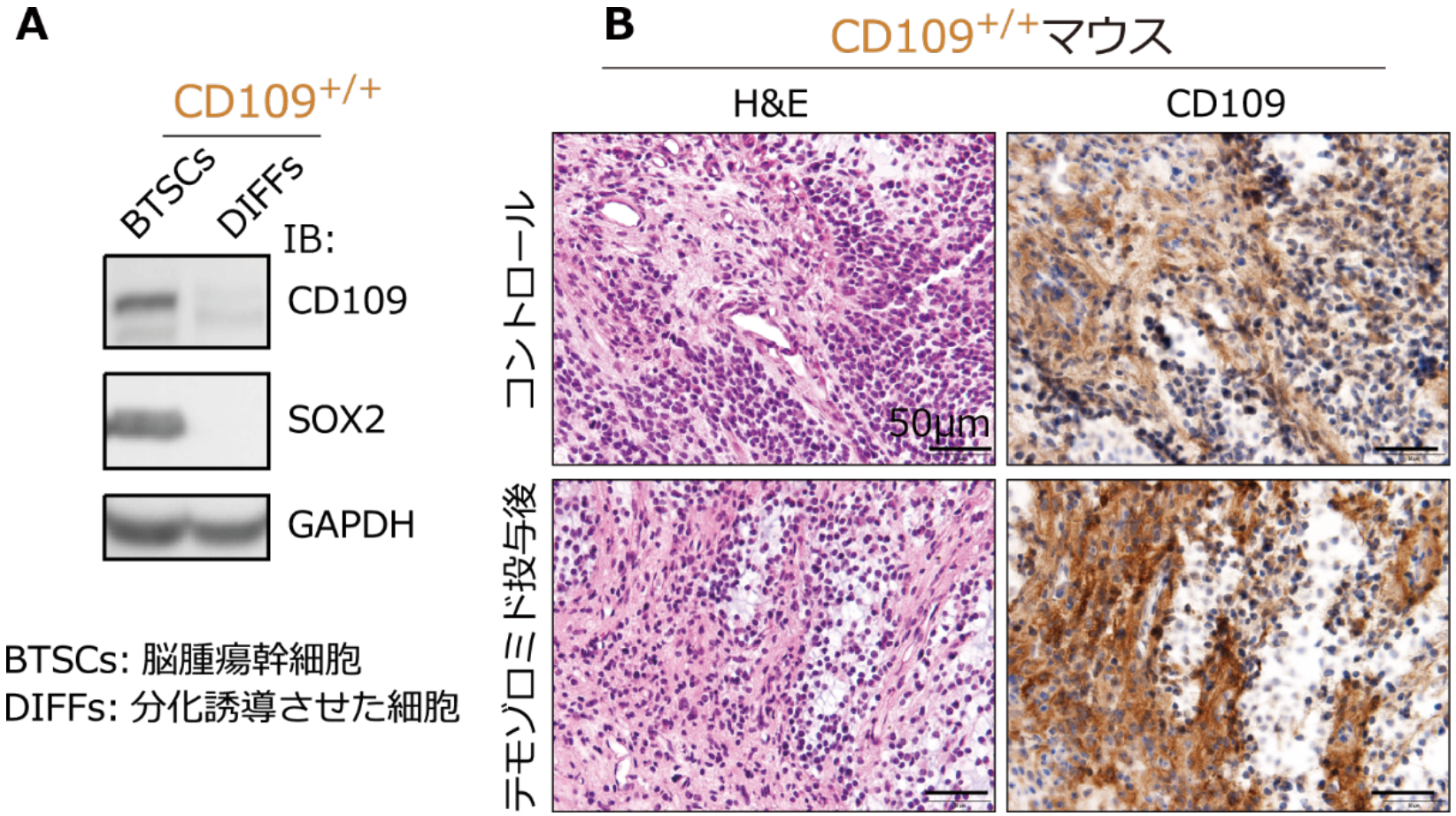




Grade II/IIIグリオーマでは、CD109高発現群は低発現群に比べ予後不良であり(A), ヒト組織においてもCD109は血管周囲に局在する(B).

Shiraki, Mii et al. J. Pathol (2017)

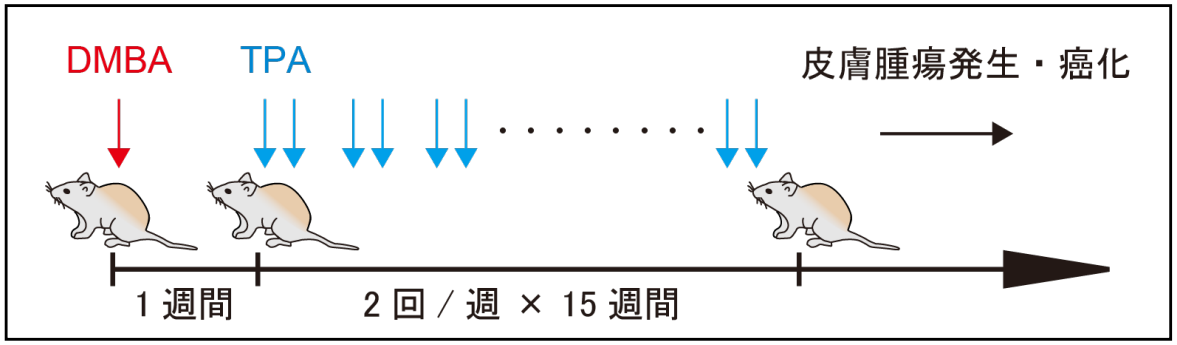
脳腫瘍幹細胞におけるCD109の発現



分化誘導させた細胞に比べ，脳腫瘍幹細胞はCD109を高発現し(A)，テモゾロミドを投与したマウス組織では，CD109陽性腫瘍細胞が残存していた(B).

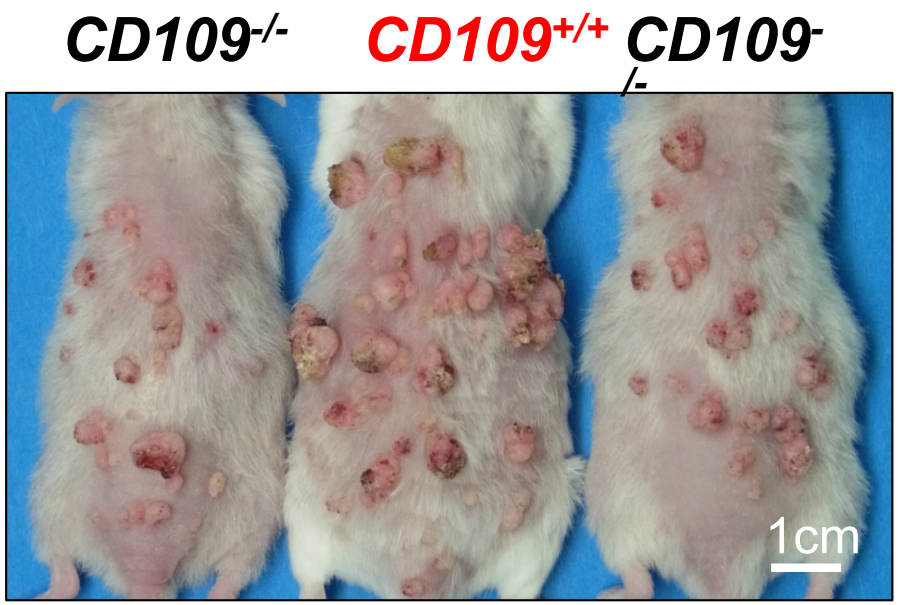
➡ **脳腫瘍幹細胞はCD109陽性であり治療抵抗性を示すと考えられる.**

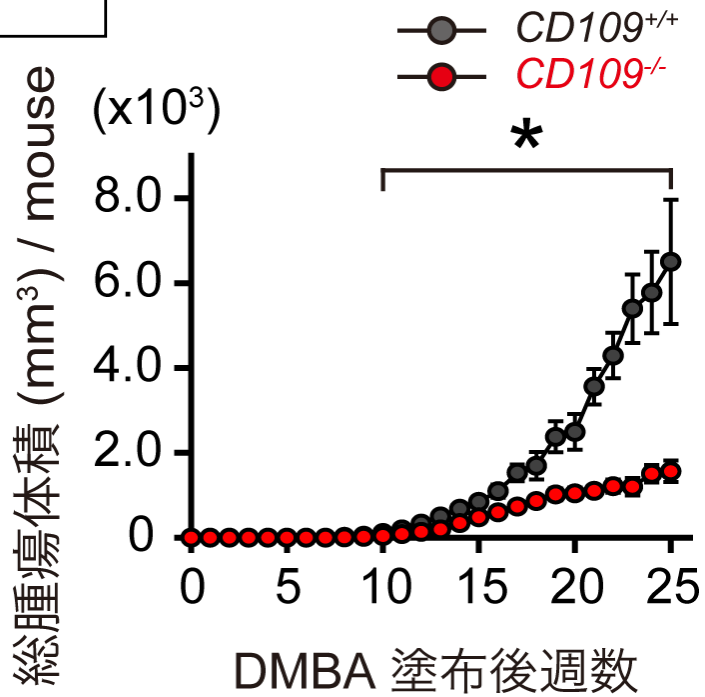
マウス皮膚二段階発癌モデル



Sunagawa, Mii et al.
Oncotarget (2016)

n = 9
* P < 0.05





CD109が欠損することで皮膚腫瘍の出現が遅れ，腫瘍体積も低下した.
しかし、乳頭腫から扁平上皮癌への悪性化率には変化が見られなかった。

細胞運動
(Cell migration)

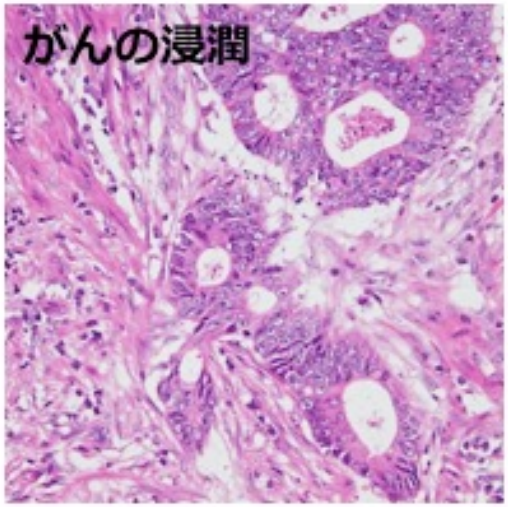
発生における細胞移動

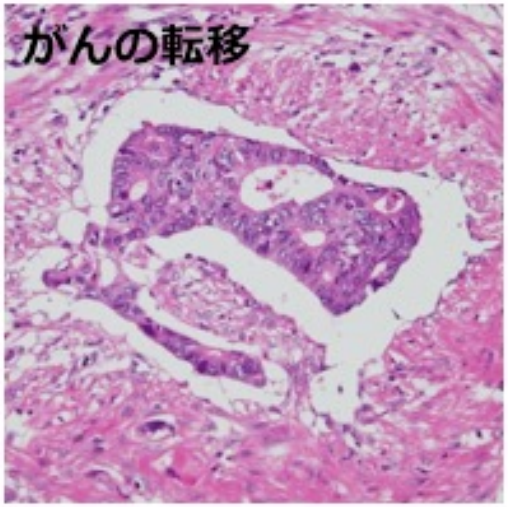
著作権等の都合により、ここに挿入されていた画像を削除しました。

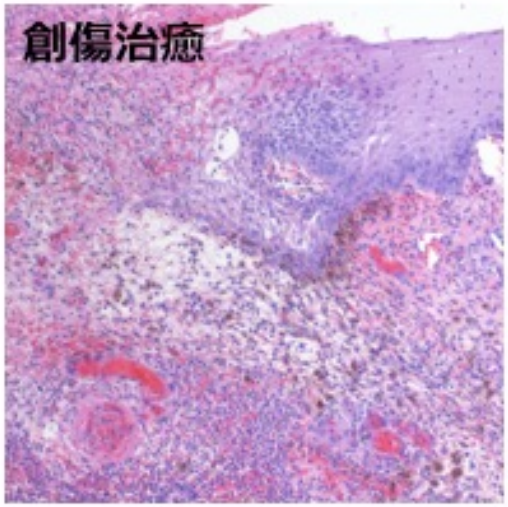
神経堤細胞の移動

https://www.mc.vanderbilt.edu/lens/article/?id=192&pg=999 2020/5/27

生後あるいは成体における細胞運動



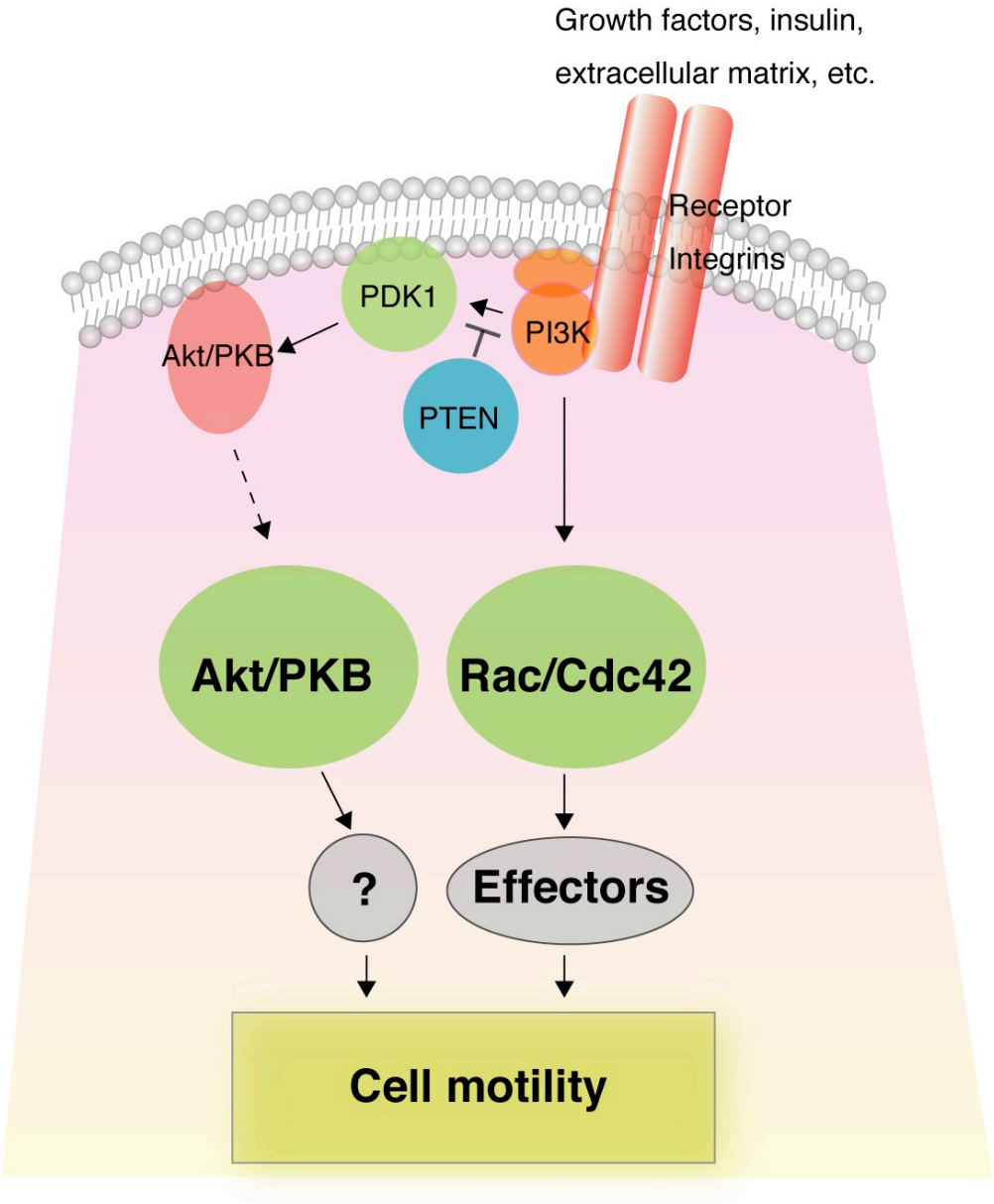




著作権等の都合により、ここに挿入されていた画像を削除しました。

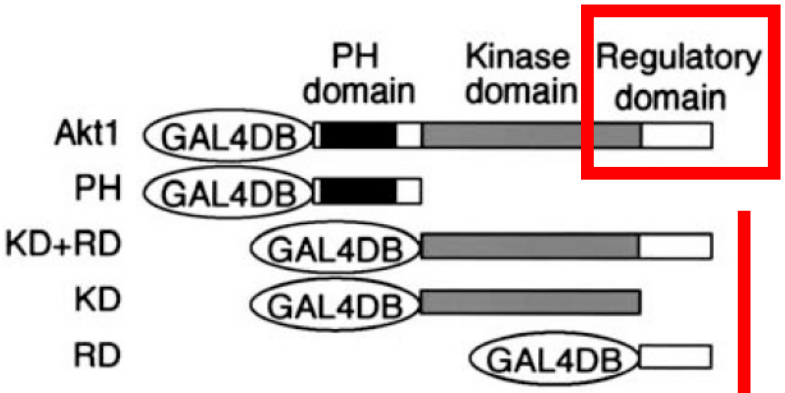
白血球の遊走

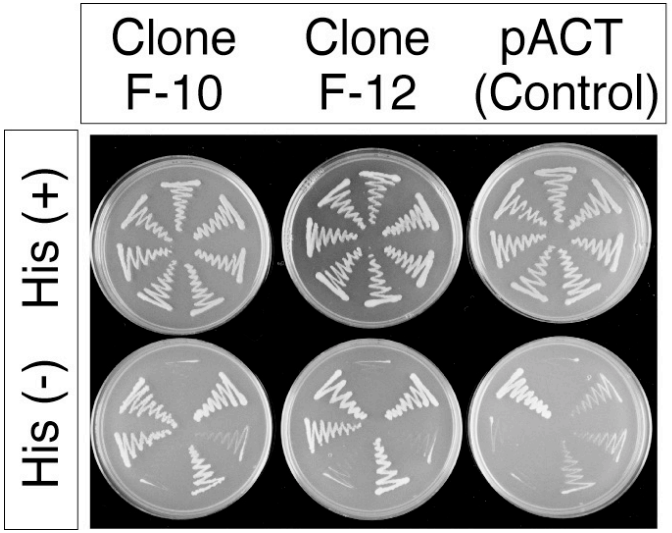
Aktキナーゼはどのように細胞運動を制御するか

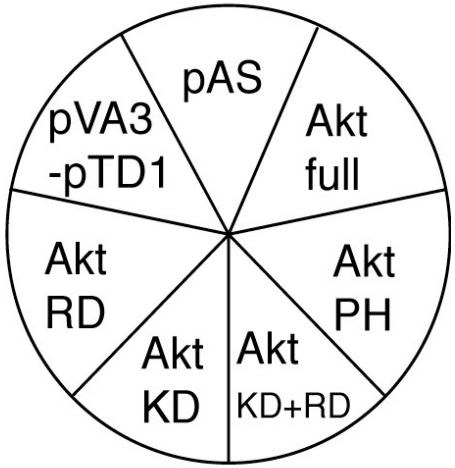


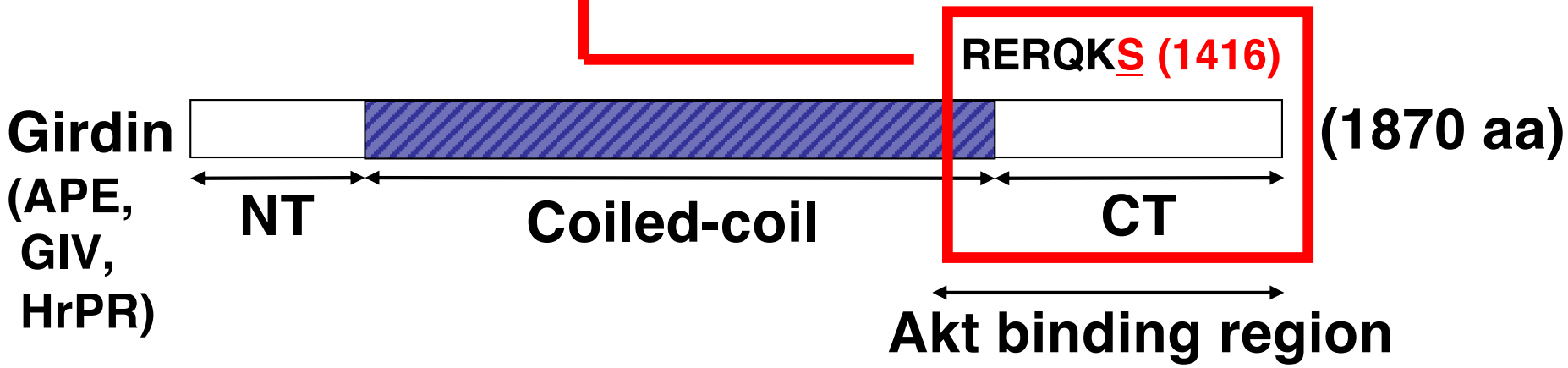
新規Akt結合タンパクとしてのGirdinの発見

(Yeast two-hybrid screening)



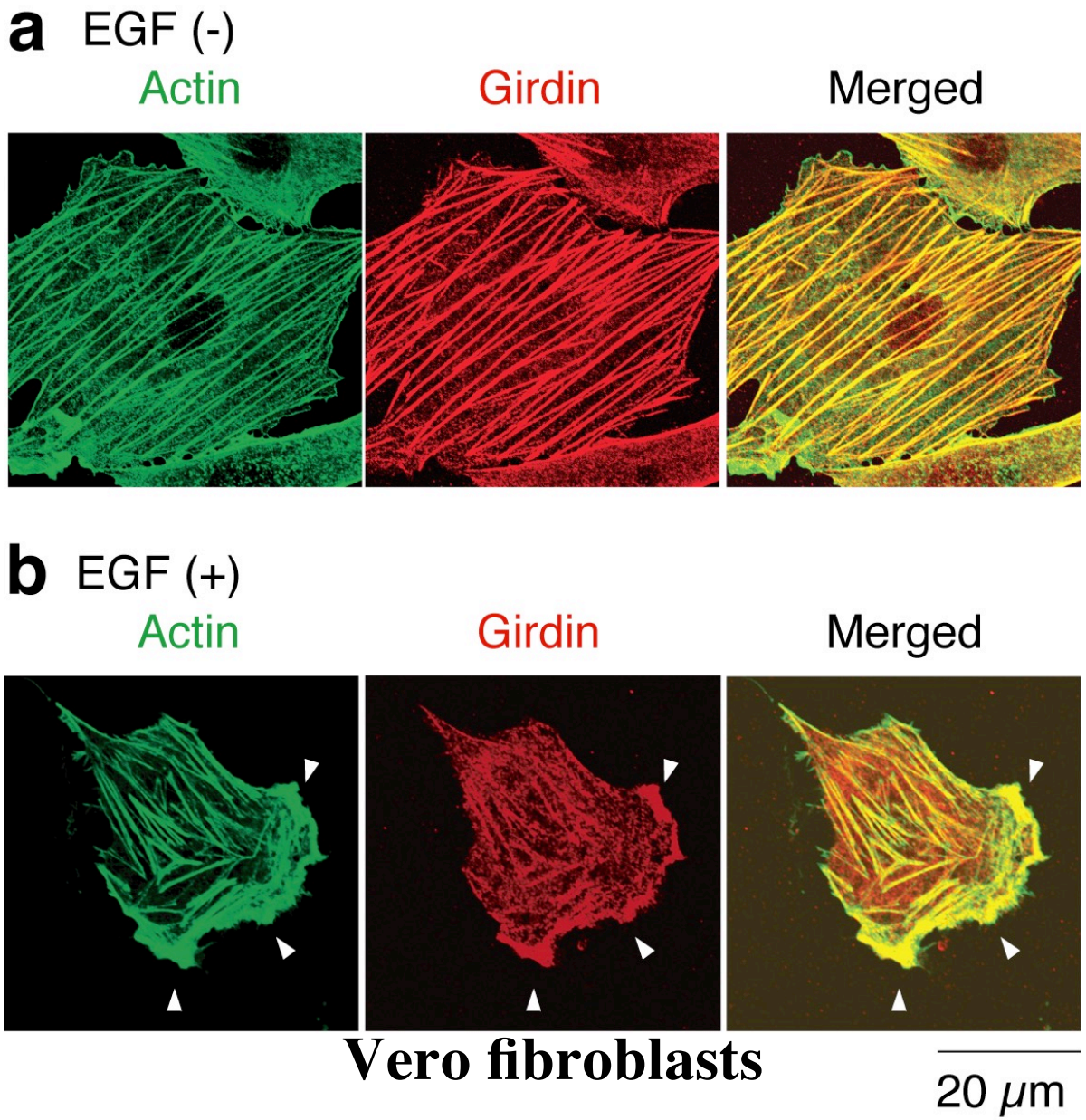






Enomoto, Murakami et al. Dev. Cell (2005)

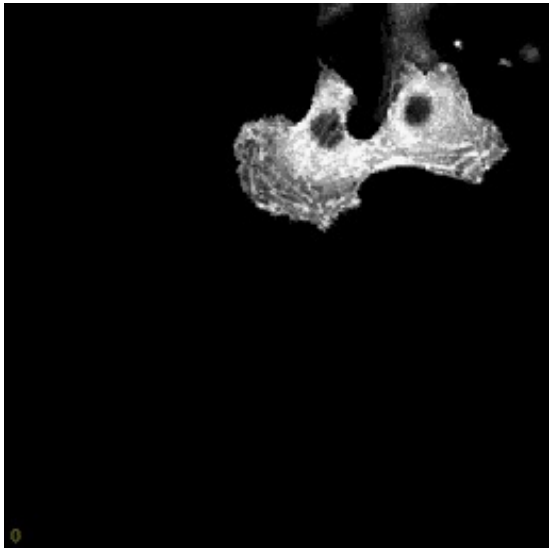
Girdinはアクチン結合タンパクであり、運動する細胞の先導端のラメリポディア形成に重要な役割を果たす



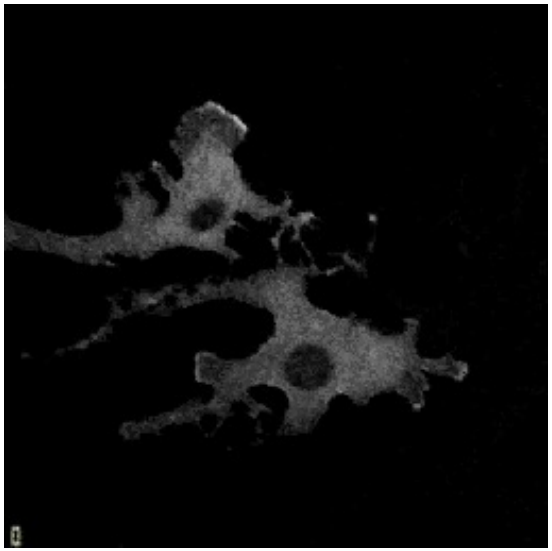
◀ 矢頭
ラメリポディア

Girdinの発現のノックダウンによる細胞運動障害

Control siRNA + GFP-actin

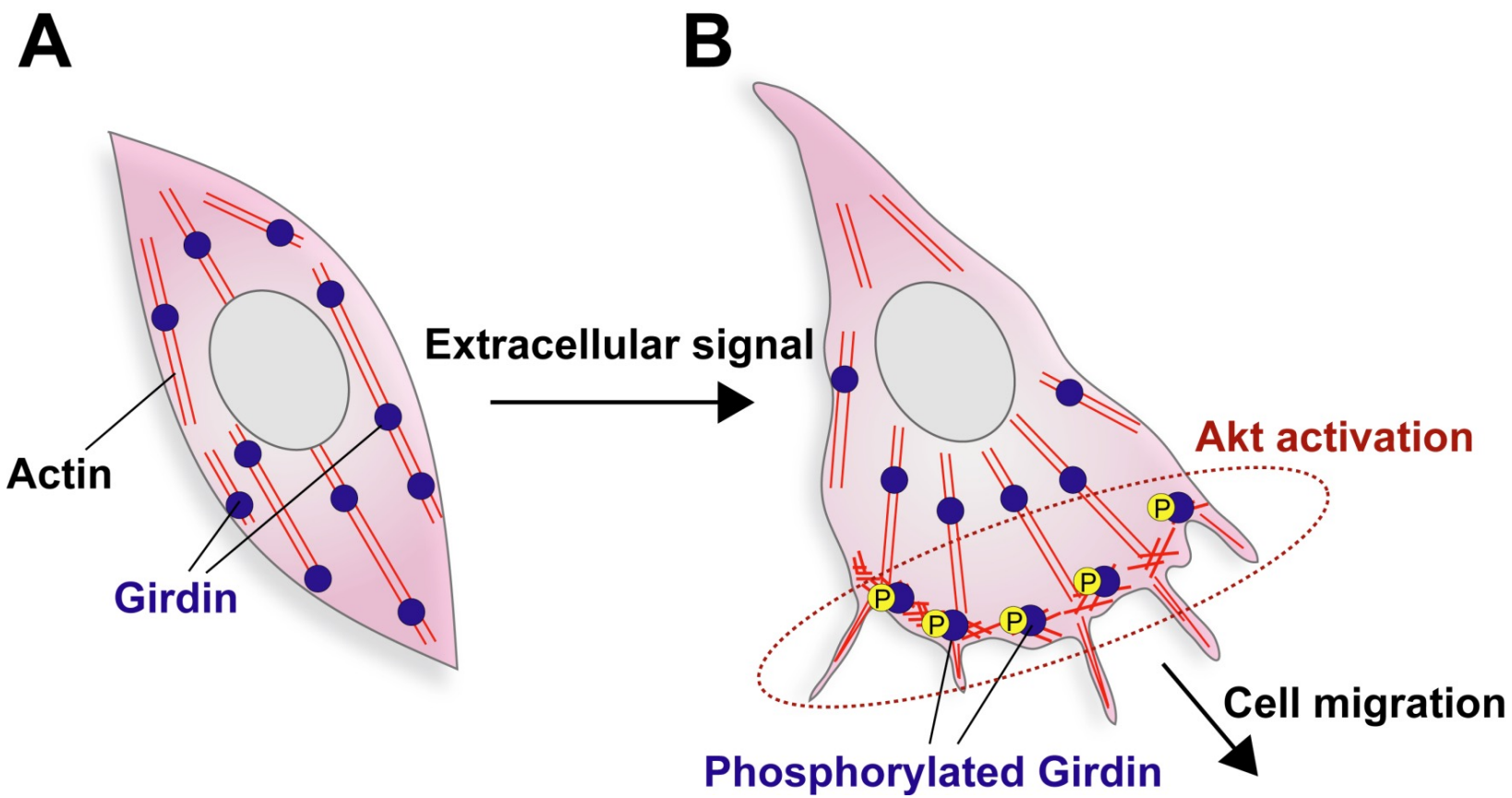


Girdin siRNA + GFP-actin

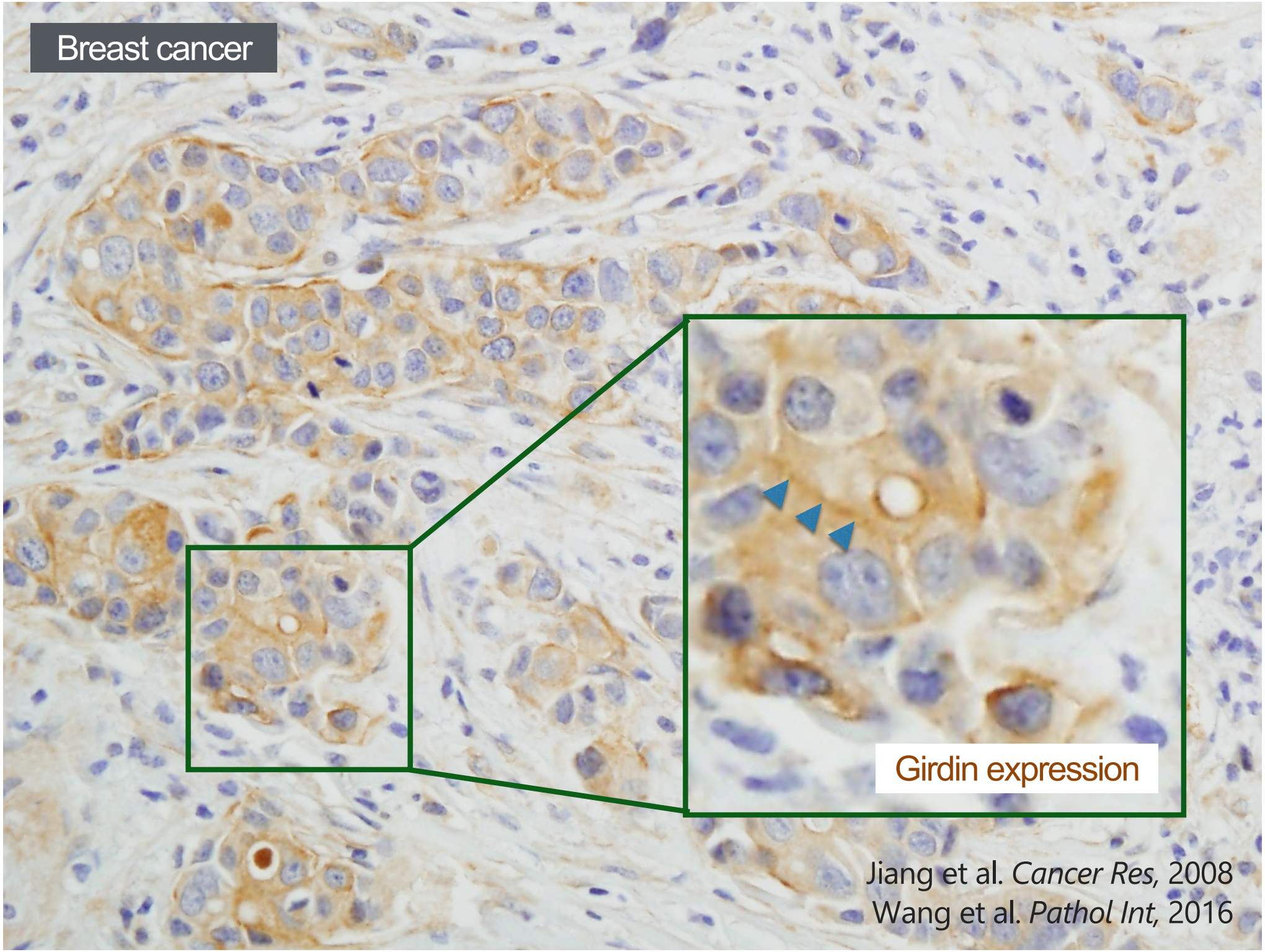


Vero Fibroblast

AktによるGirdinのリン酸化は運動する細胞の先導端における細胞骨格の再構成により、ラメリポディア形成に関与する

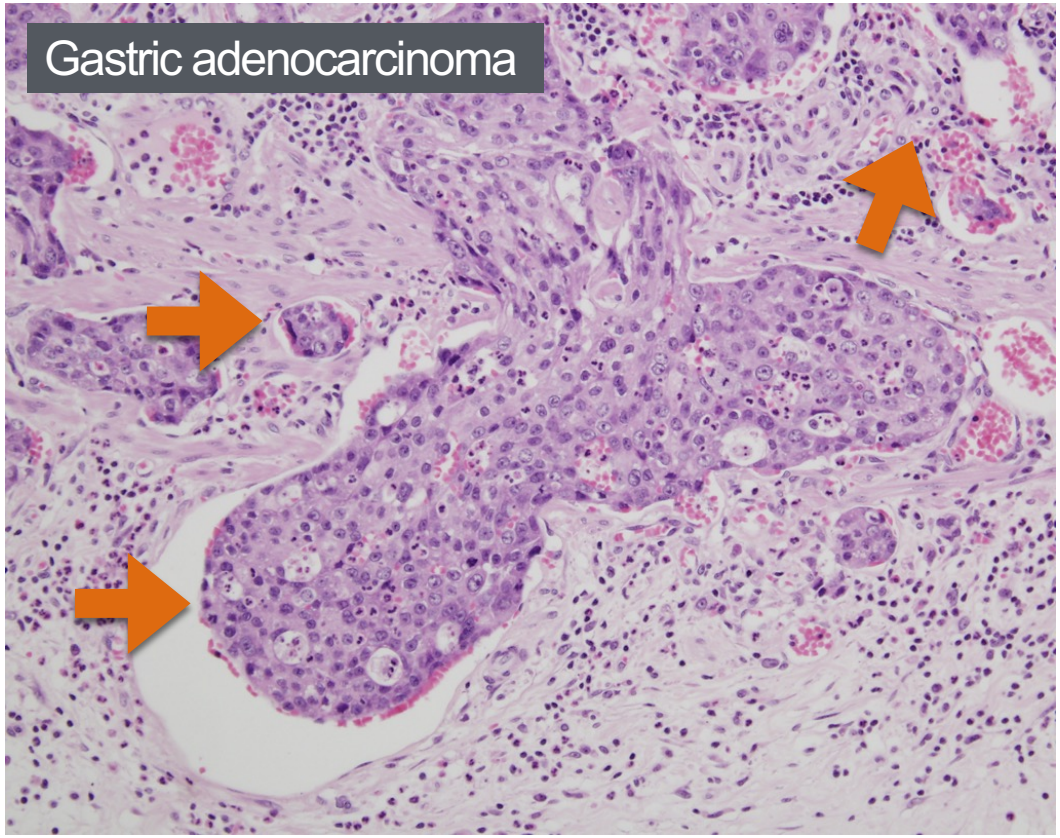


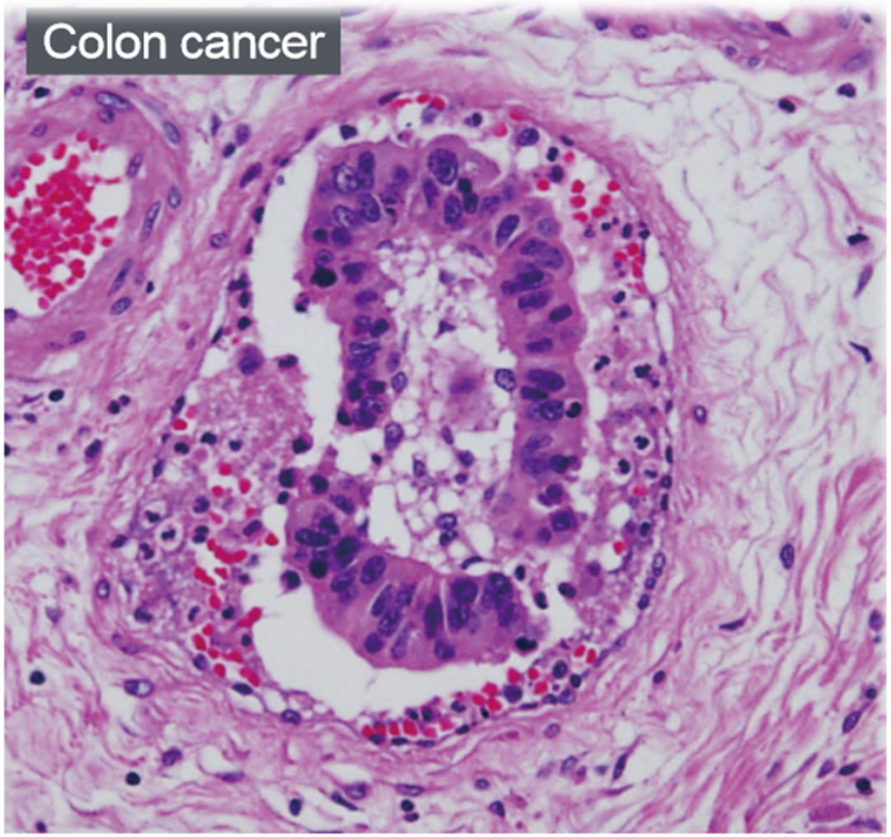
Enomoto et al. Dev. Cell (2005)


Breast cancer
Girdin expression
Jiang et al. *Cancer Res*, 2008
Wang et al. *Pathol Int*, 2016

がん細胞の集団的浸潤

リンパ管浸潤像





自然界の集団(的)移動

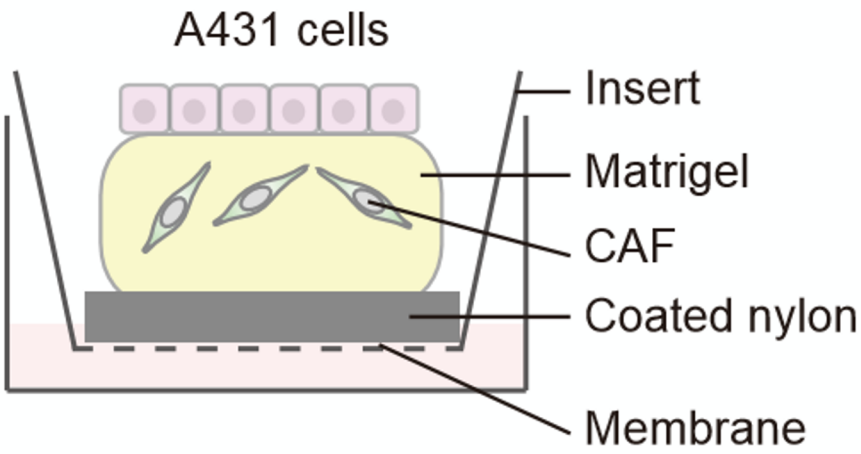
Single migration

Collective migration

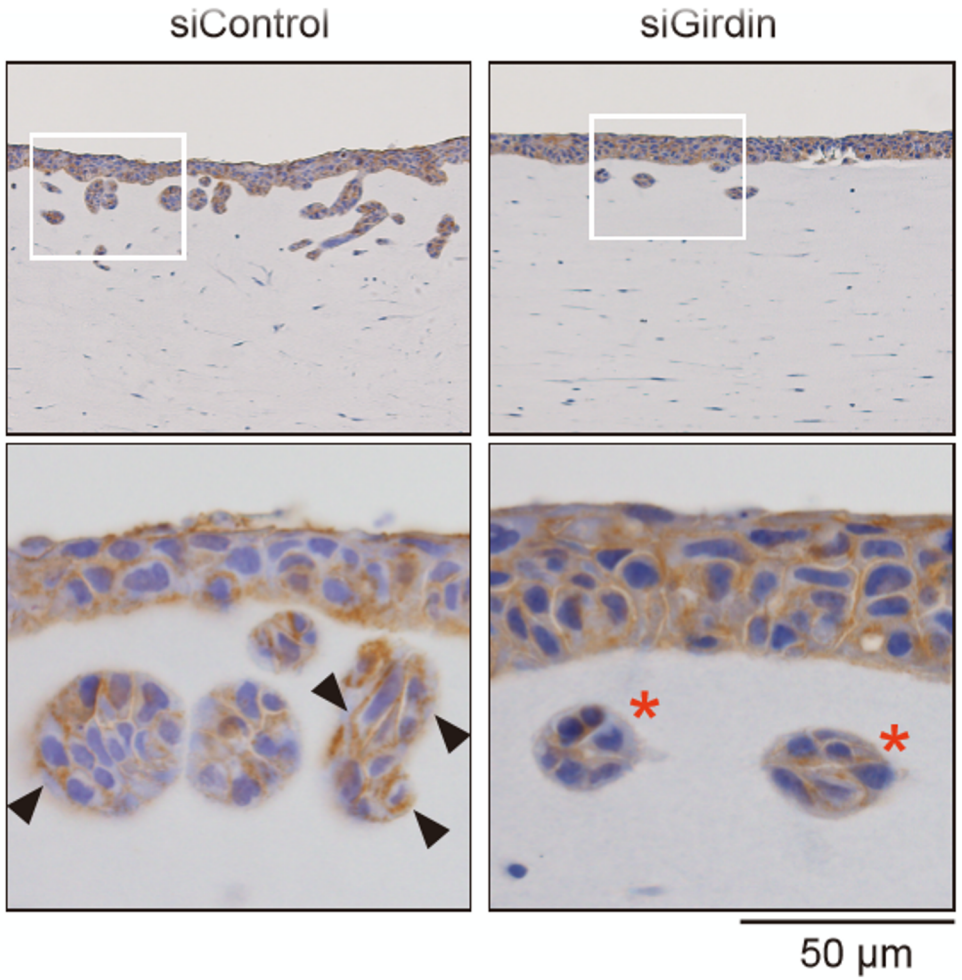
www.wired.com/2013/03/powers-of-swarms/

Girdinは癌細胞の集団的移動に関与する

Organotypic culture model



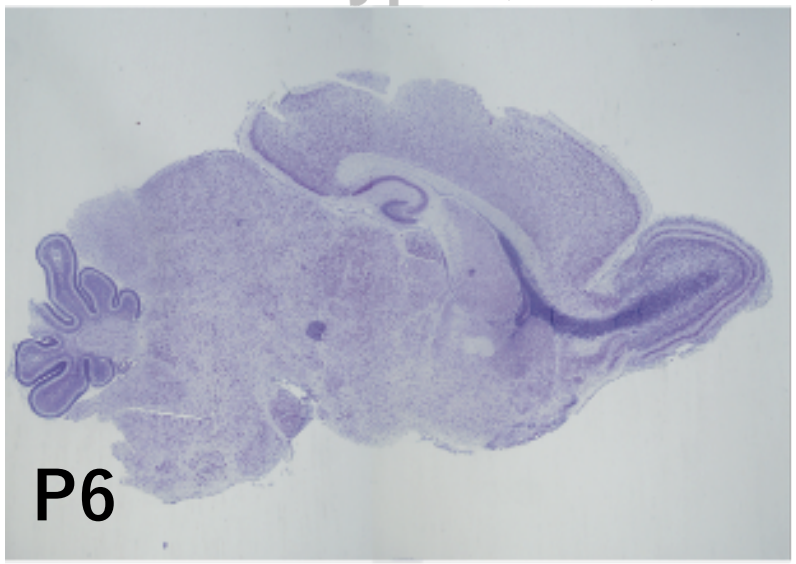
CAF: がん関連線維芽細胞



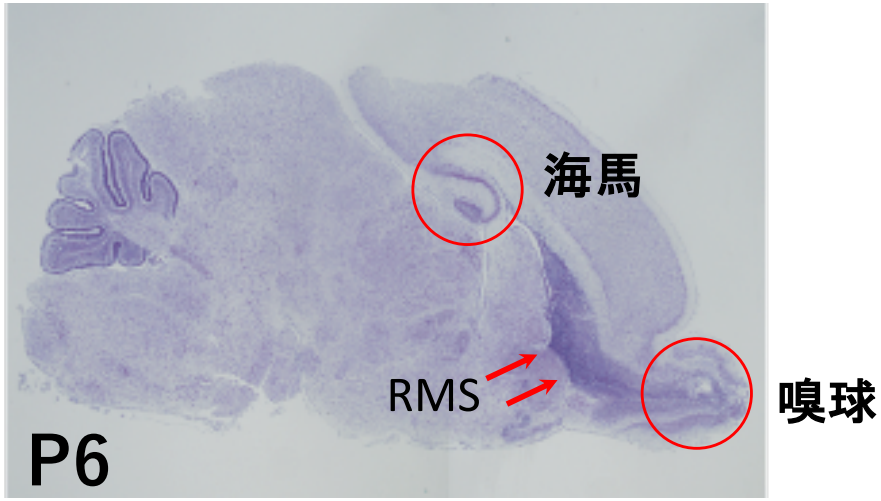
Wang et al. Cancer Sci. （2018）

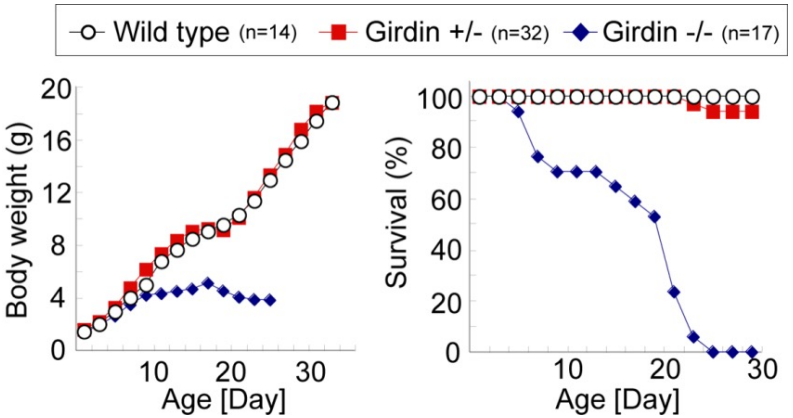
Girdin KOマウスにおける海馬および嗅球の構造異常

Wild-type (+/+) mice



Knockout (-/-) mice

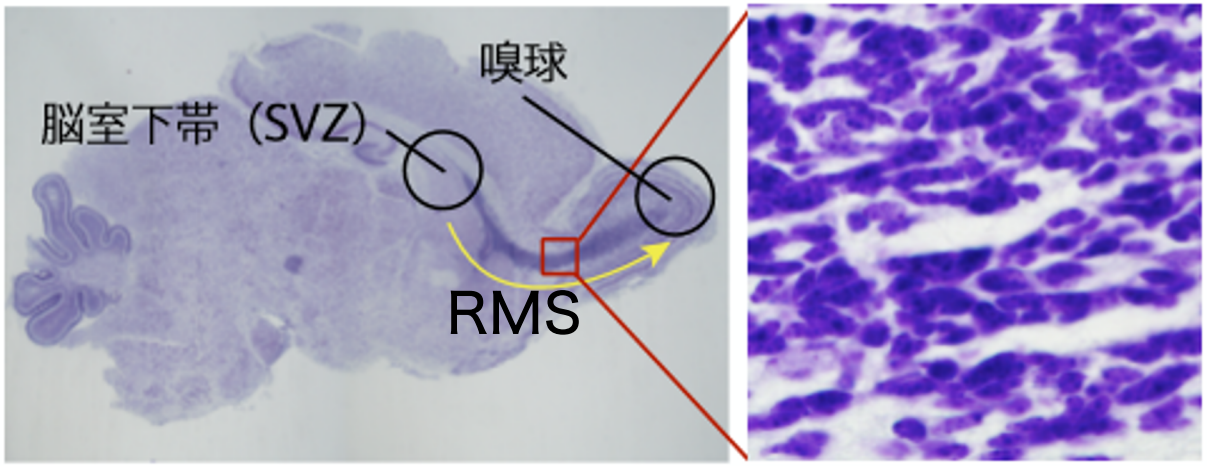




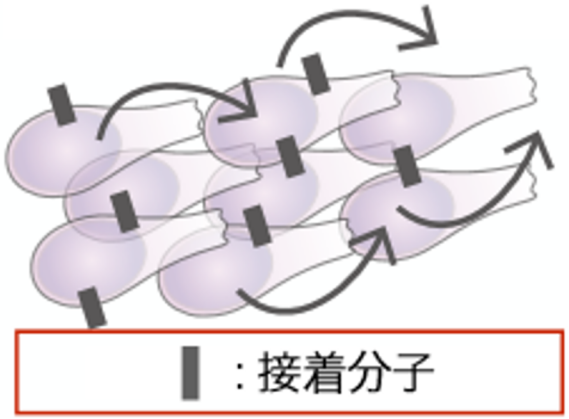
Enomoto et al. Neuron (2009), Wang et al. J Neurosci (2011)

Girdin：神経芽細胞の集団的移動の制御因子

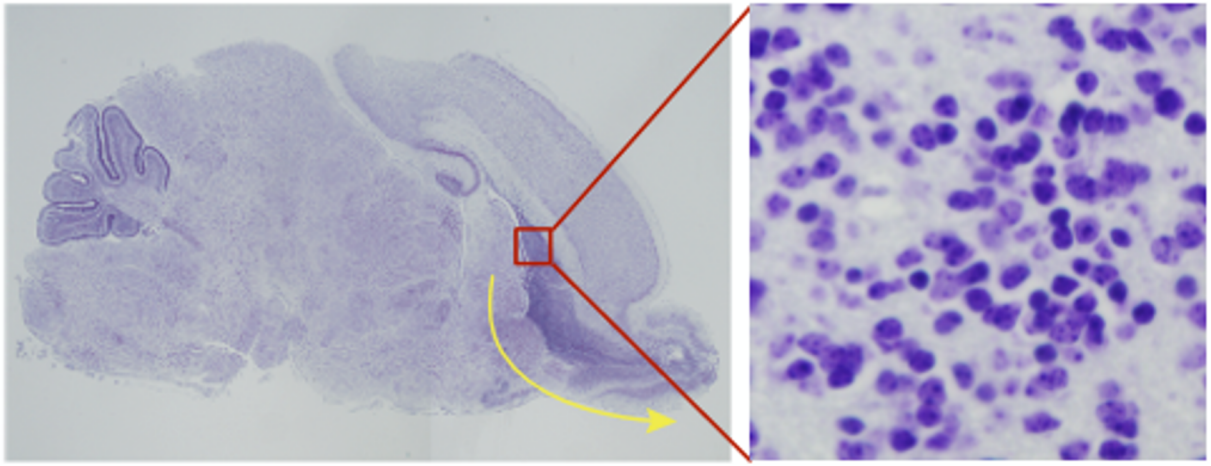
野生型 (P6)

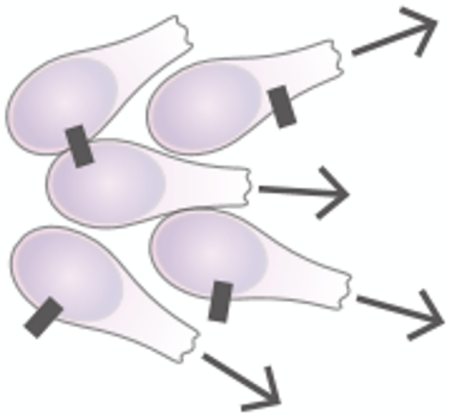


神経芽細胞の“Chain migration”



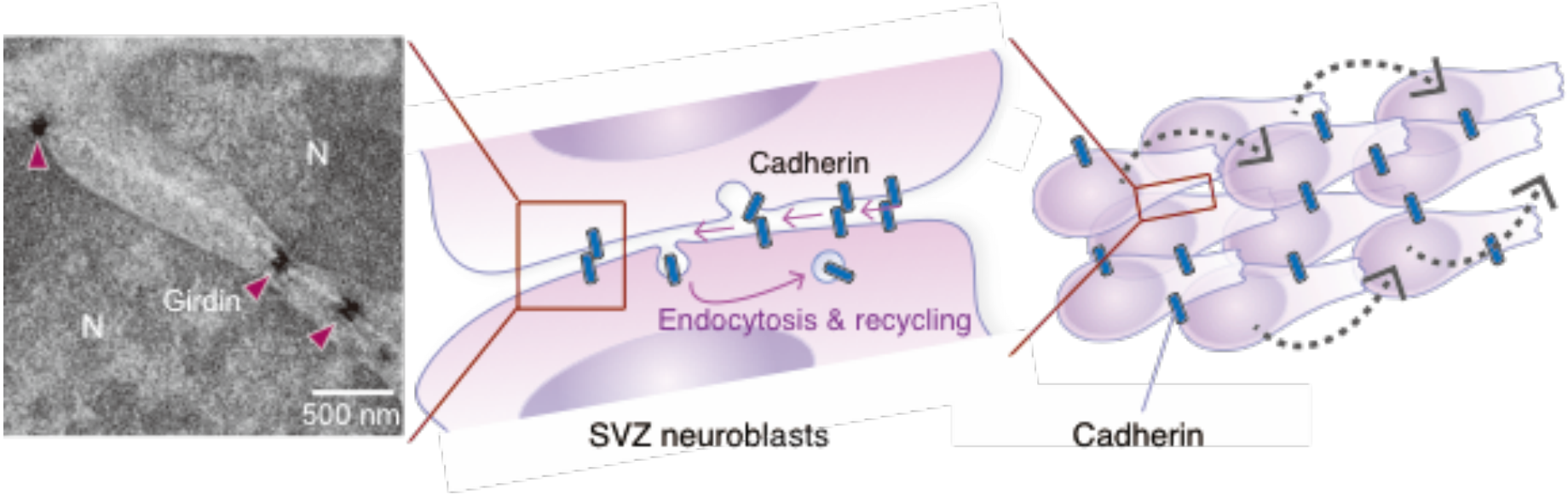
Girdinノックアウト(P6)

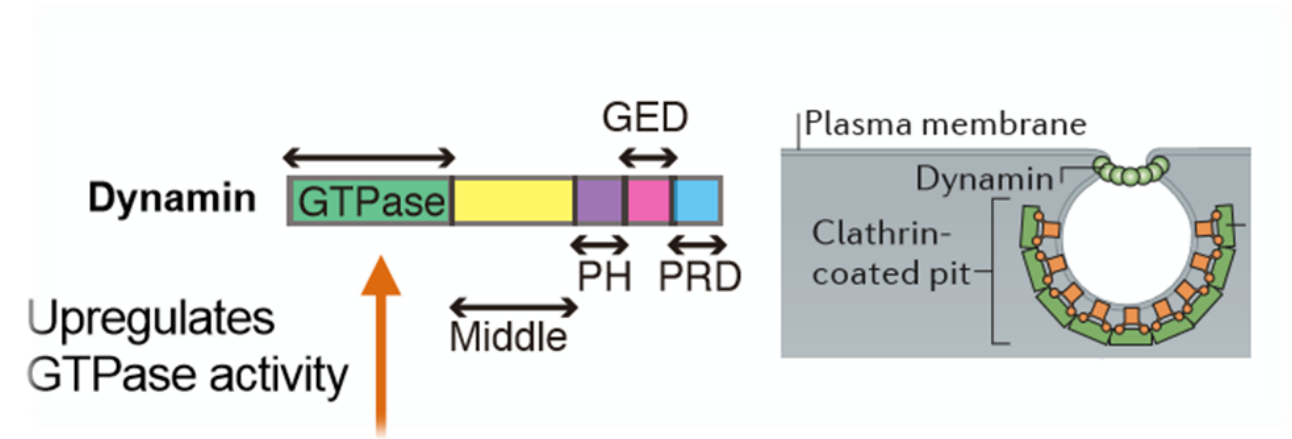


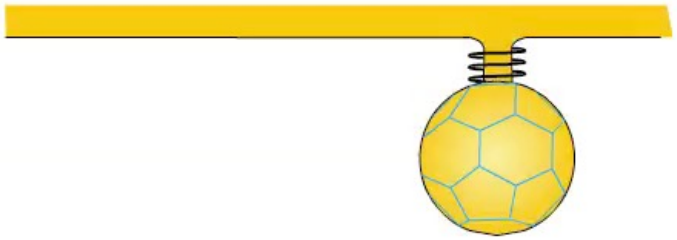


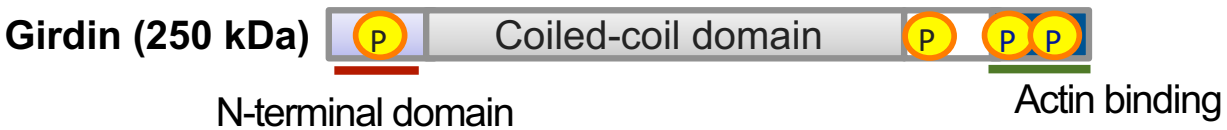
Enomoto et al. *Neuron*, 2009;　Wang et al. *J Neurosci*, 2011

GirdinはDynaminと結合し、Cadherinのエンドサイトーシスに関与する







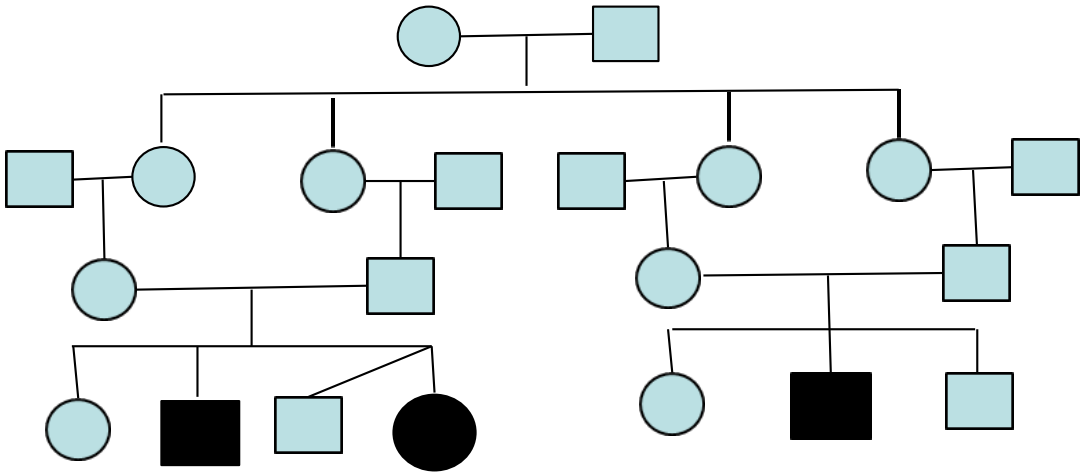


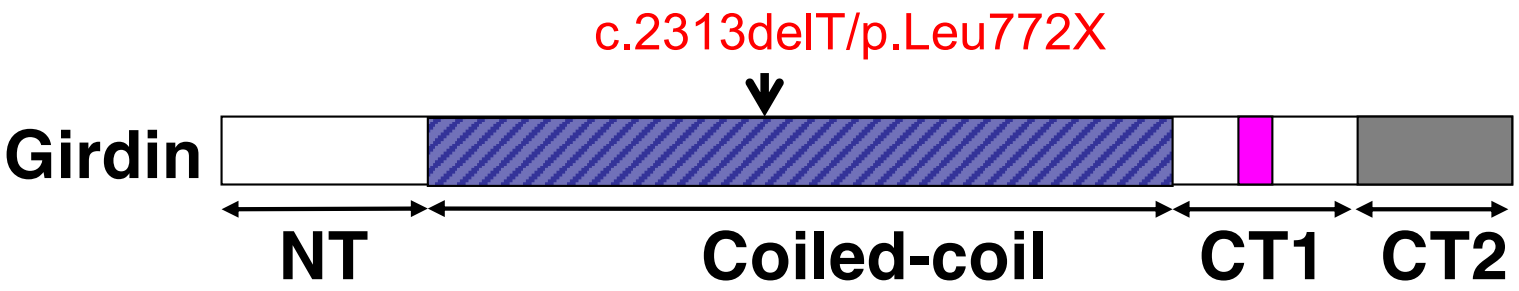
Weng et al. EMBO J. (2014)

PEHO症候群におけるGirdin遺伝子変異

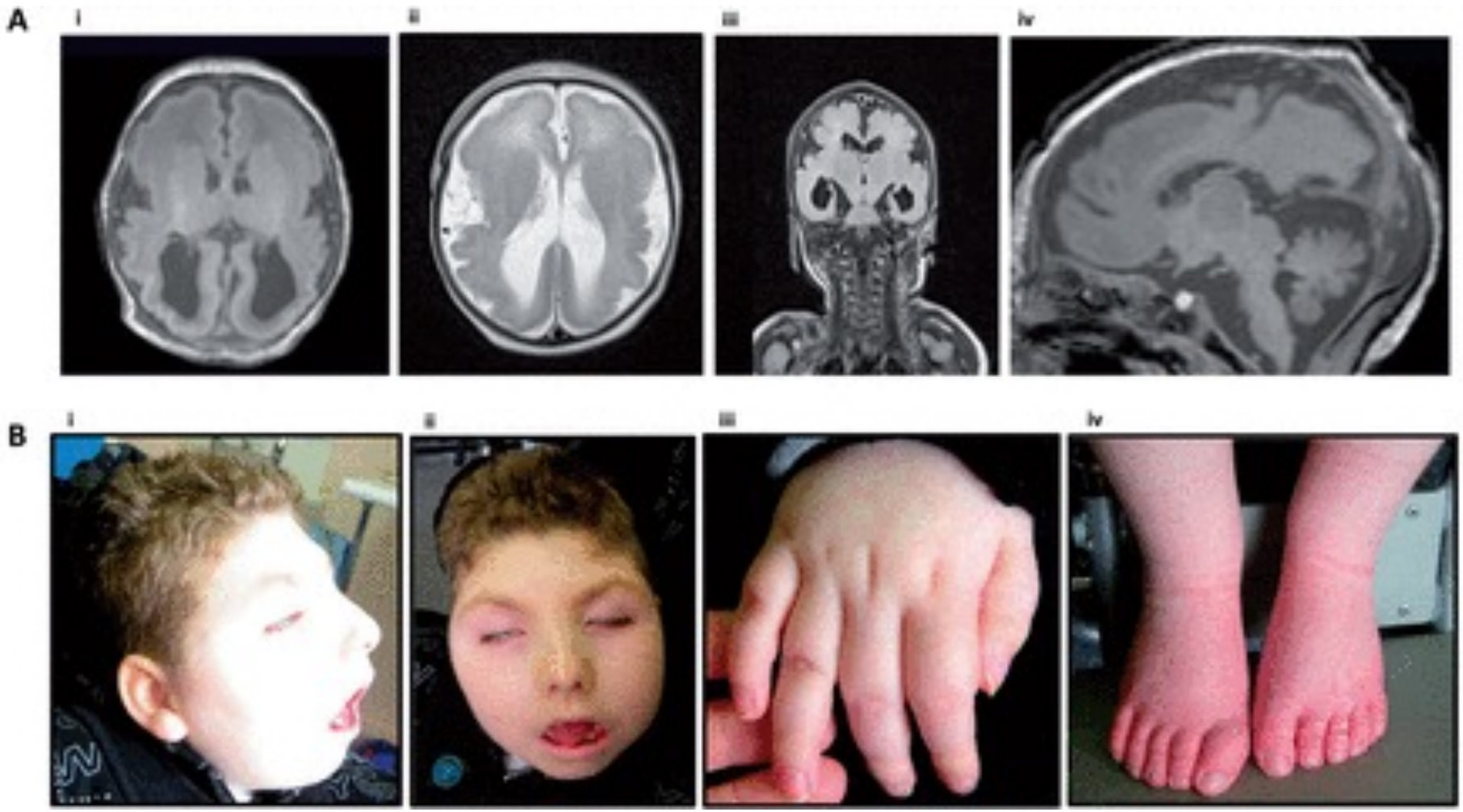
Progressive encephalopathy with oedema, hypsarrhythmia and optic atrophy (PEHO) syndrome:

A rare Mendelian (autosomal recessive) phenotype comprising severe retardation, early onset epileptic seizures, optic nerve/cerebellar atrophy, pedal oedema, and early death.





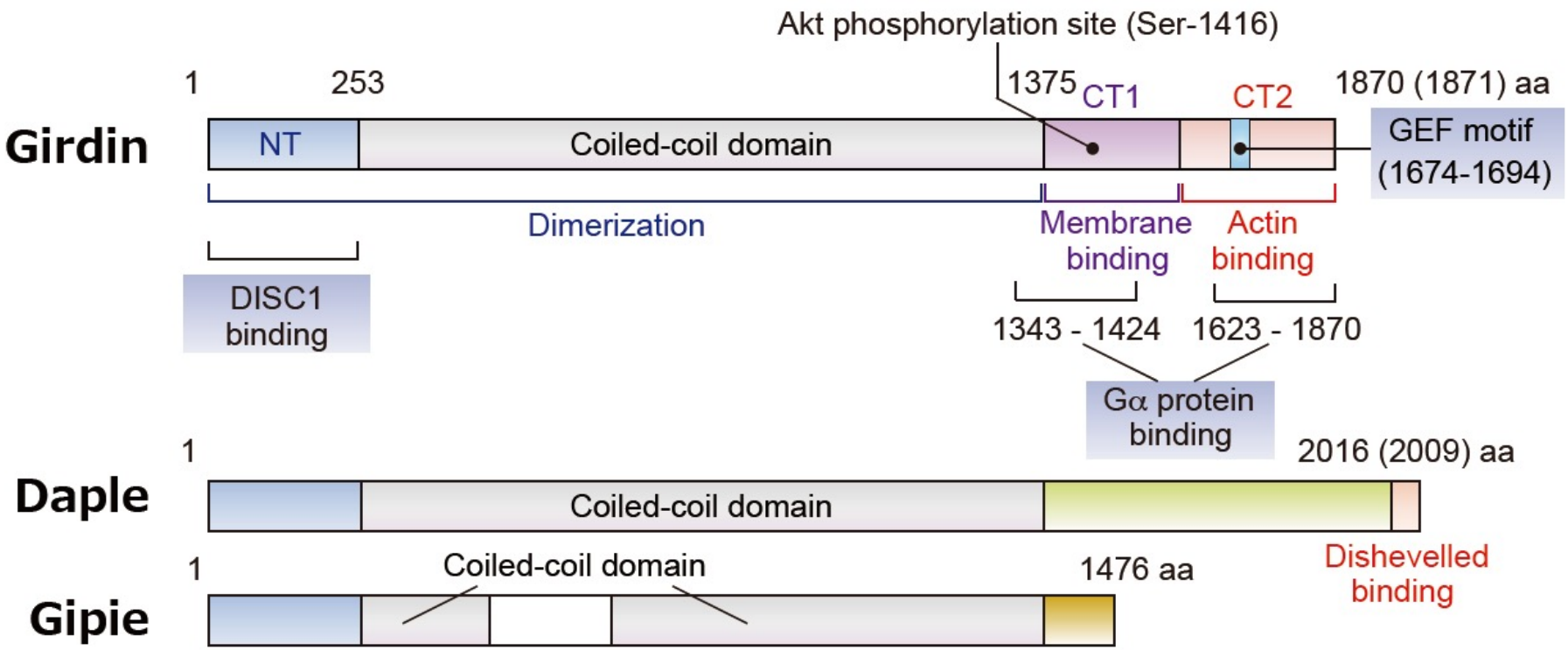
Girdinの変異によって発症するPEHO症候群の臨床像



A, small cerebrum and cerebellum, pachygyria/lissencephaly,
thin corpus callosum
B, microcephaly, edema of the maxillary region and dorsum of hand and foot

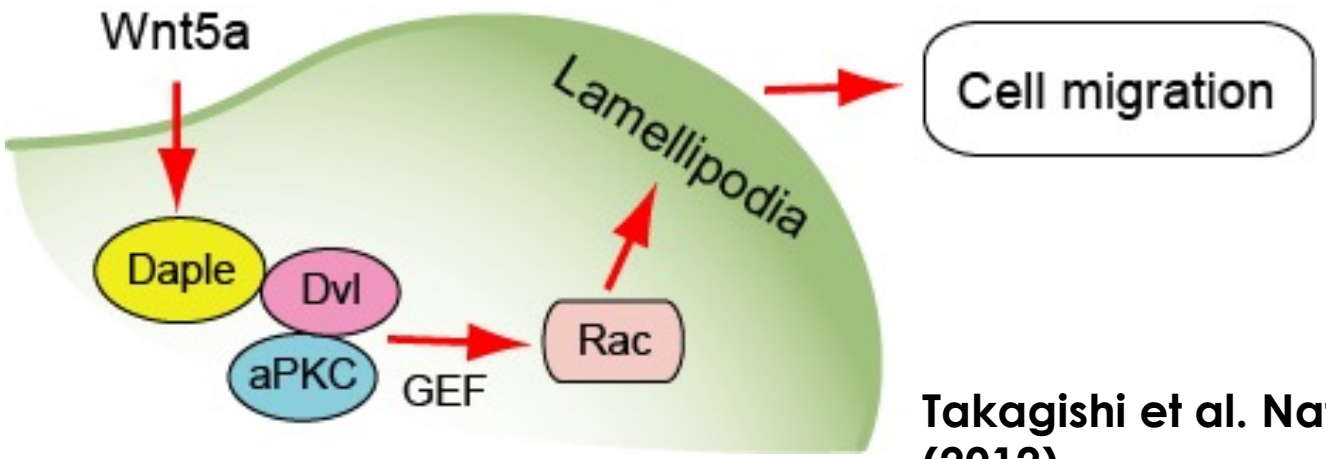
Nahroski et al. Brain (2016)

Girdinファミリー分子



DapleはWntシグナルによる細胞運動に関与する

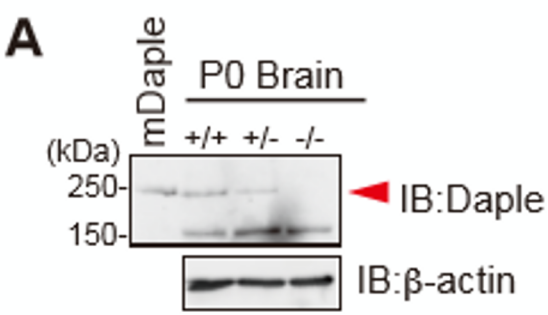
- Daple is involved in the non-canonical Wnt/Rac pathway leading to cell migration.
- Daple increases the Dvl/aPKC interaction to activate Rac.

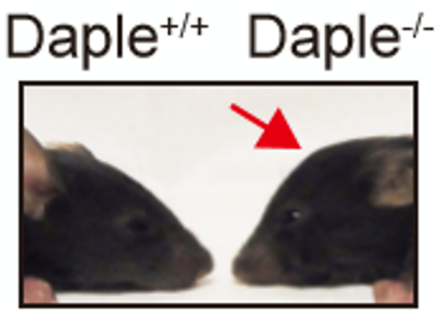


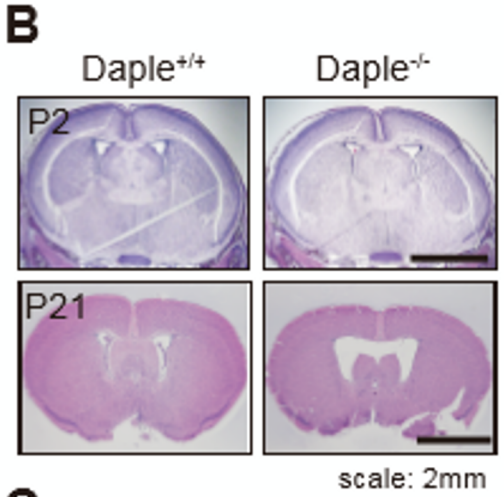
Takagishi et al. Nat. Commun. (2012)

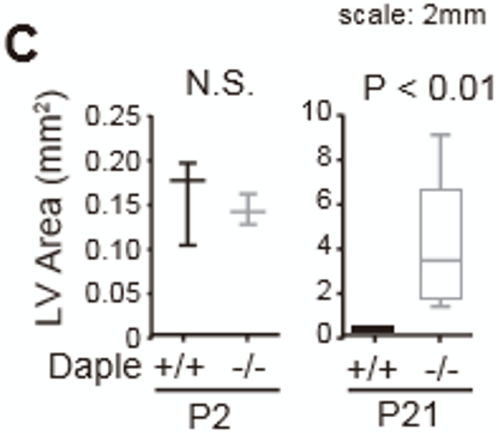
Daple knockout mouse

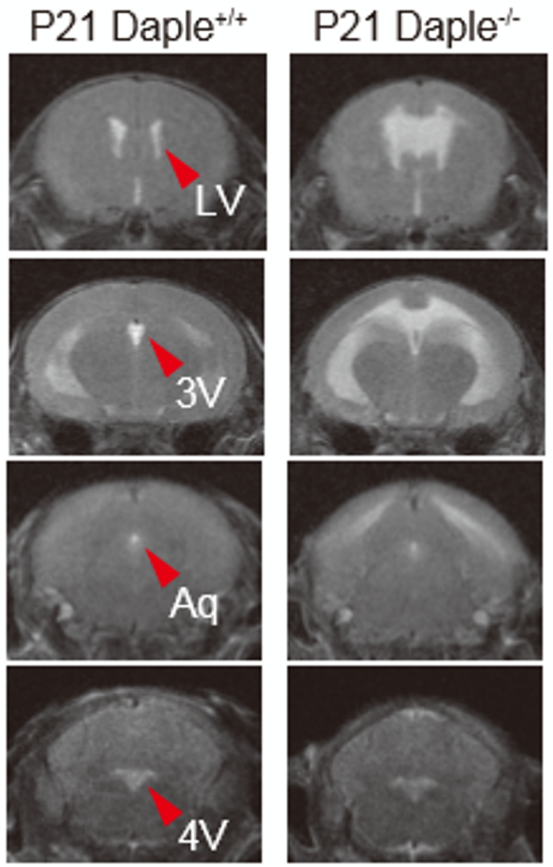
ES cell clones from KOMP



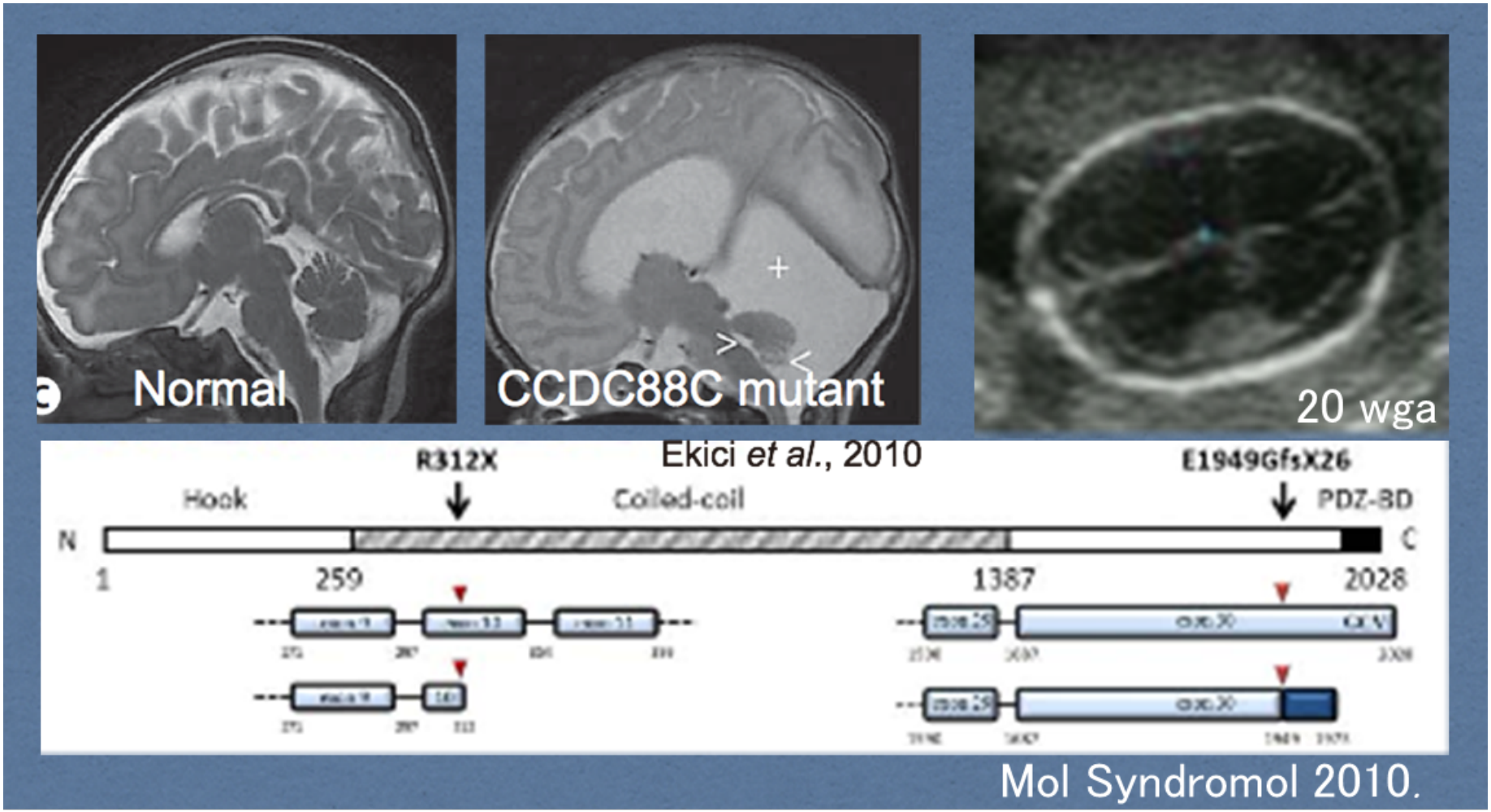








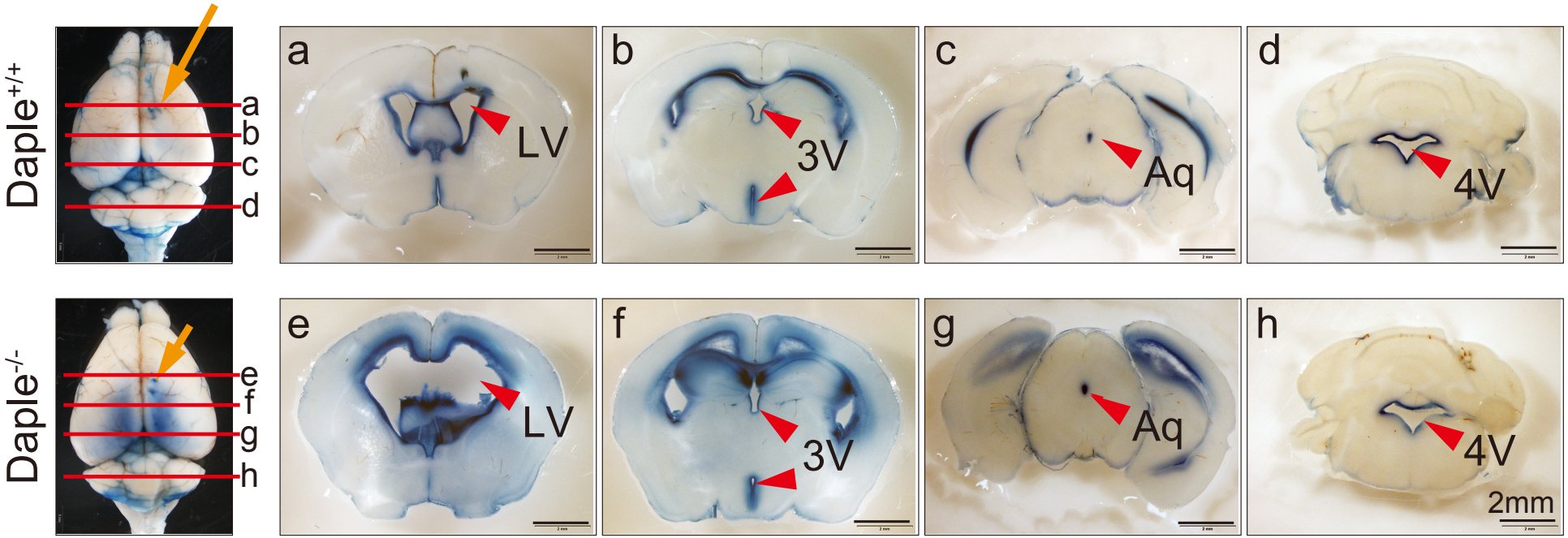
Daple遺伝子の変異はヒトの水頭症を発症する



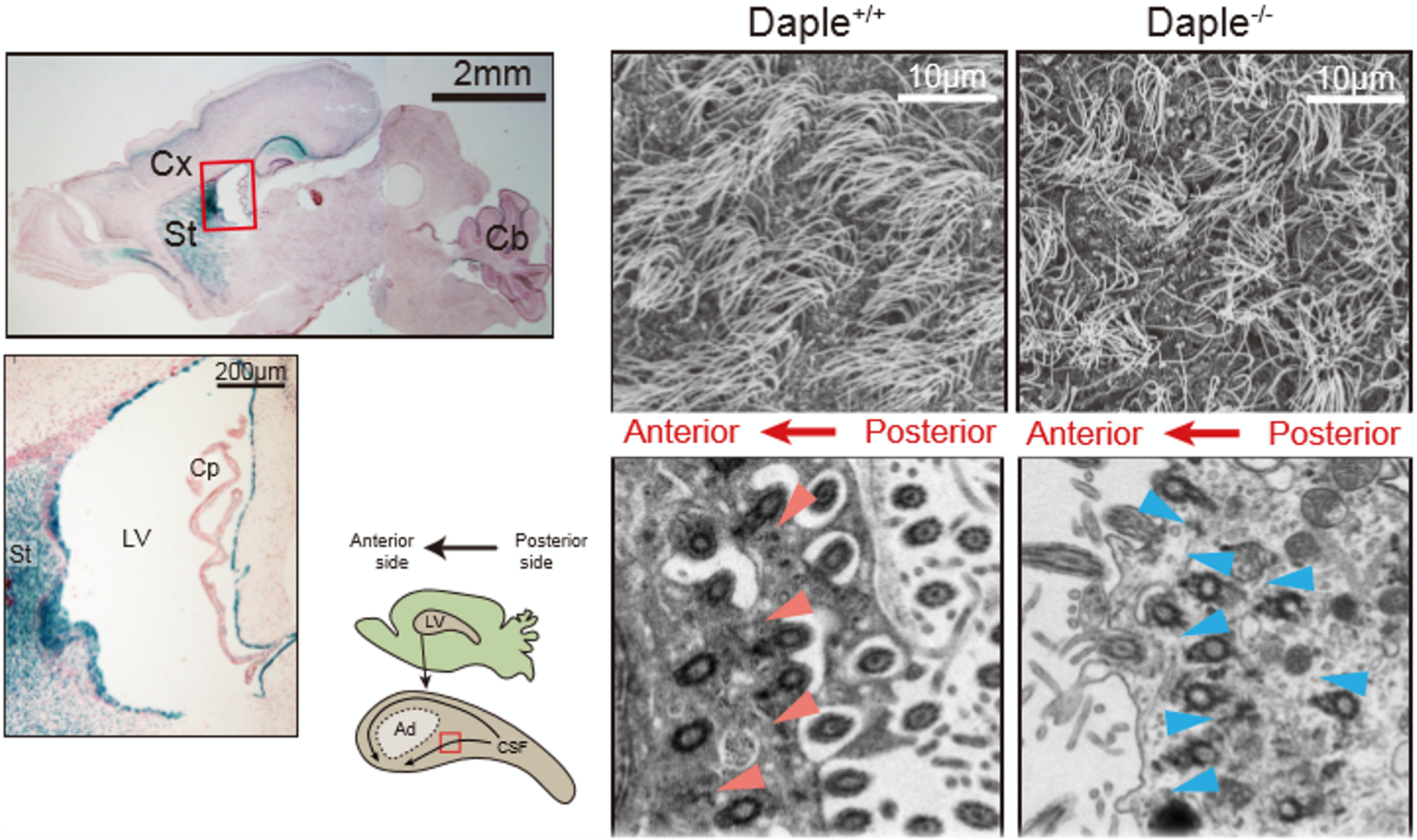
Human DAPLE/CCDC88C
mutations cause hydrocephalus
(Ekici et al. 2010).

Daple KO マウスでは脳室内の狭窄、閉塞などは認めない

麻酔下にてEvans Blueを右側脳室へ注入し1分後に解剖



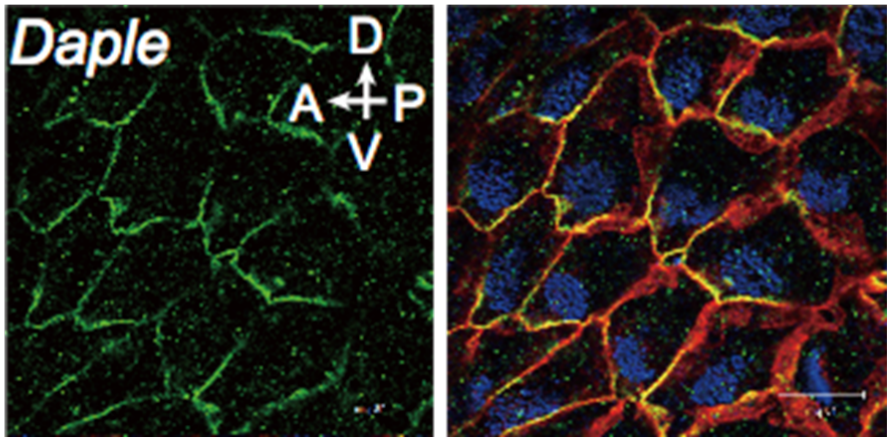
Daple KOマウスにおける脳室上衣細胞の繊毛運動異常

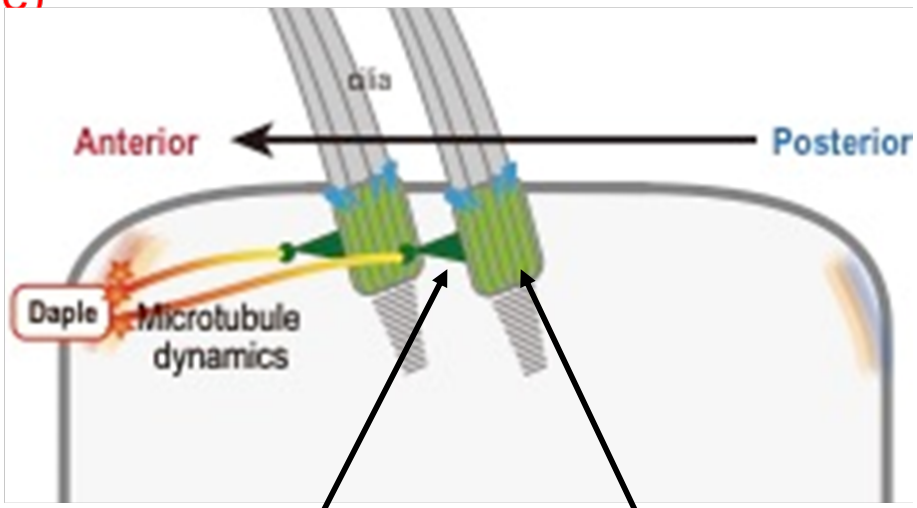


Basal Body, Basal Footの配列異常

Dapleは微小管と繊毛基部のBasal Body, Basal Footの極性に関与する

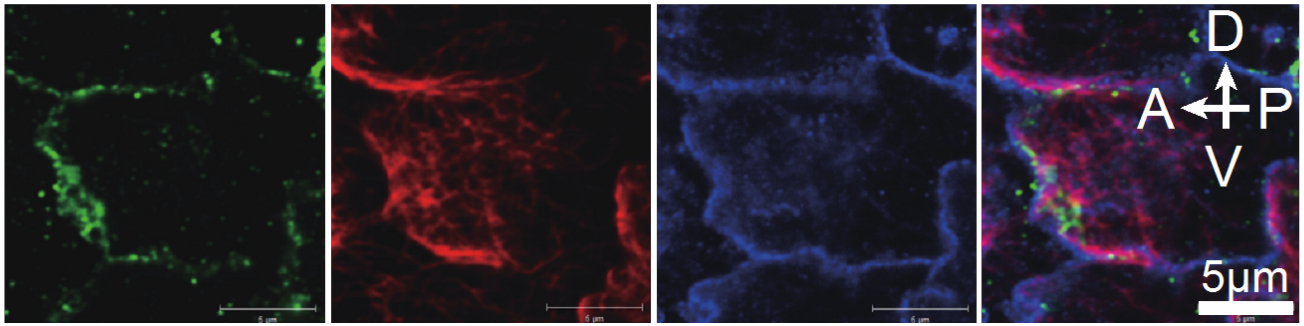
Daple/γ-tubulin(cilia base)/β-catenin(membrane)





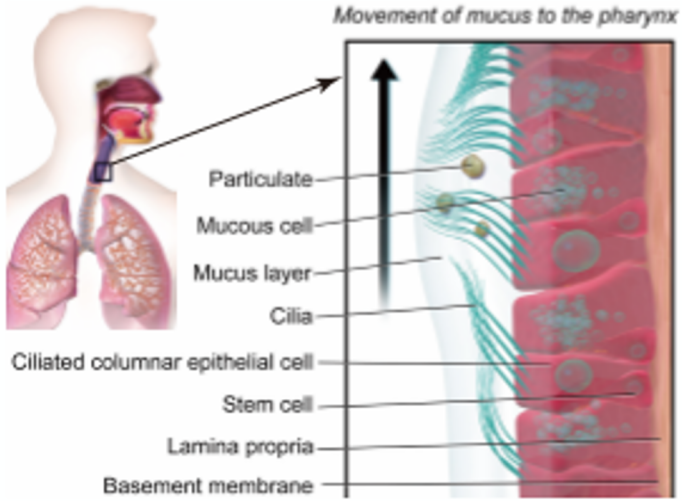
Basal Foot Basal body

Daple tyr-tubulin γ-tubulin+ β-catenin Merged

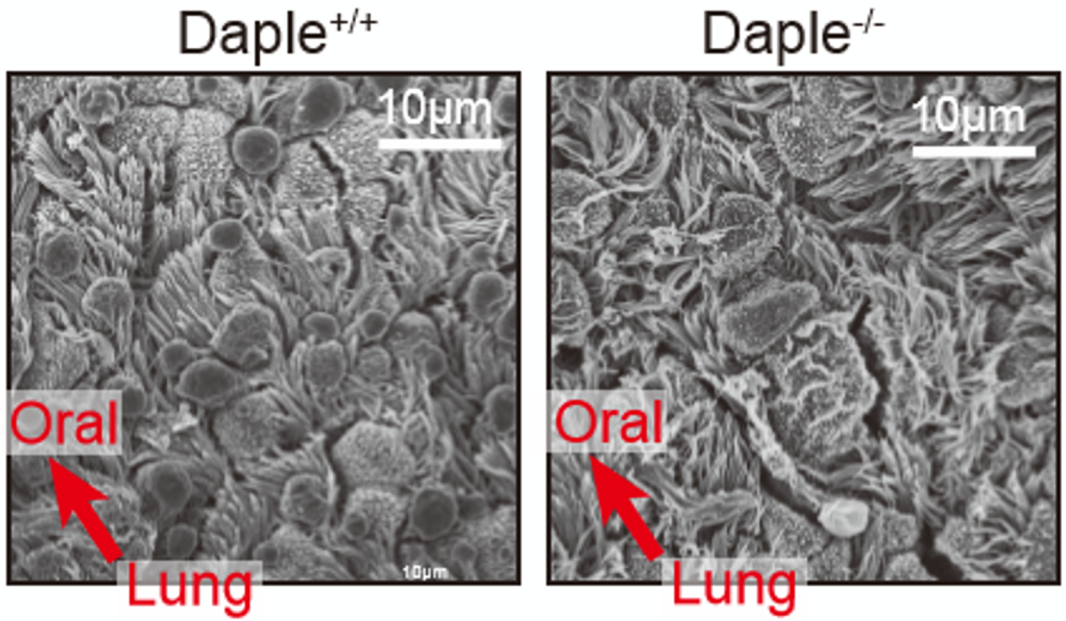


Daple KOマウスでは気管、内耳の繊毛異常を伴う

Trachea cilia

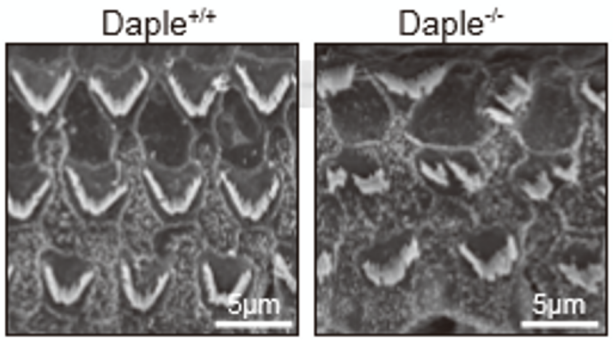


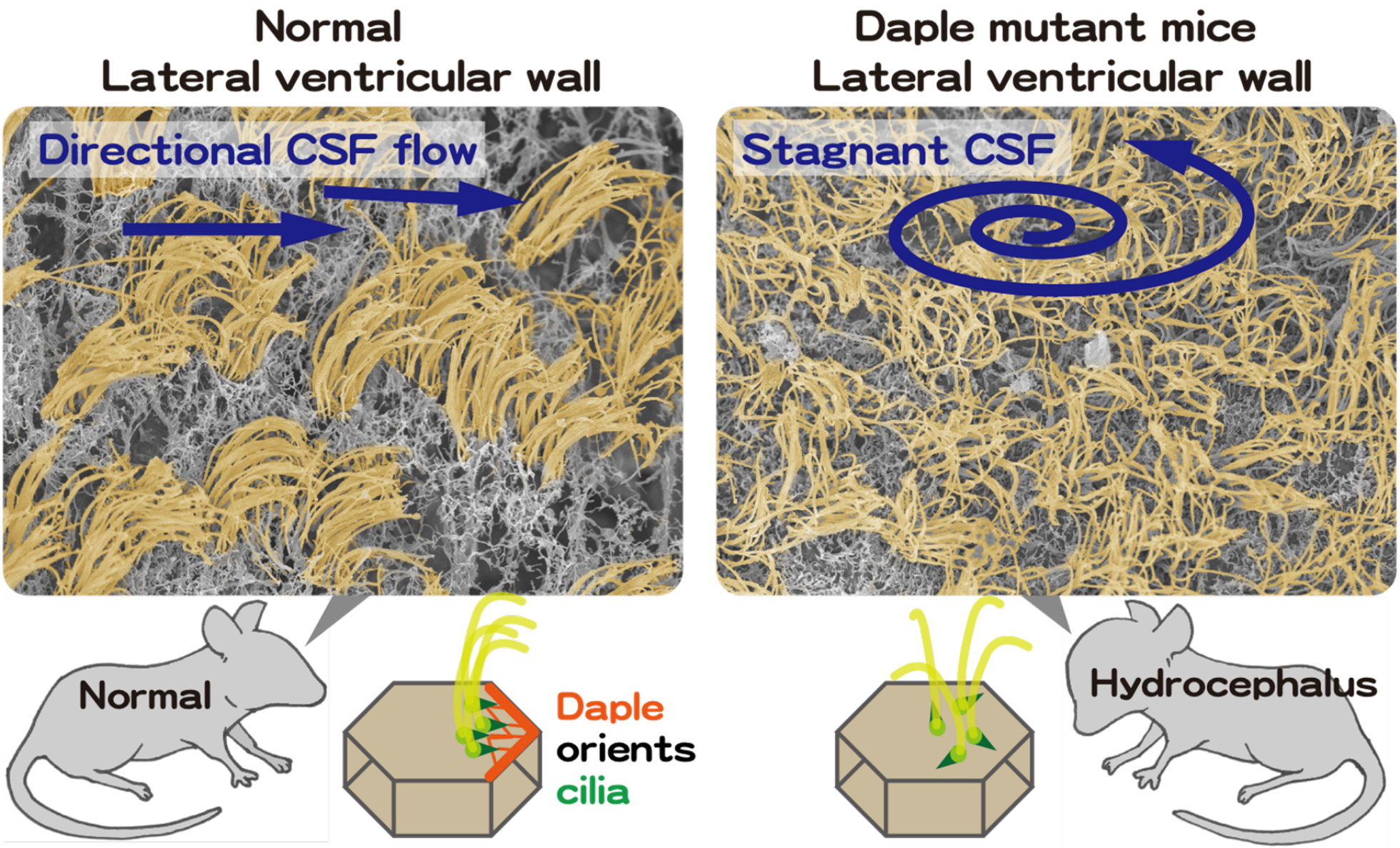
https://www.wikiwand.com/en/Mucus 2020/5/27



Inner ear hair cell

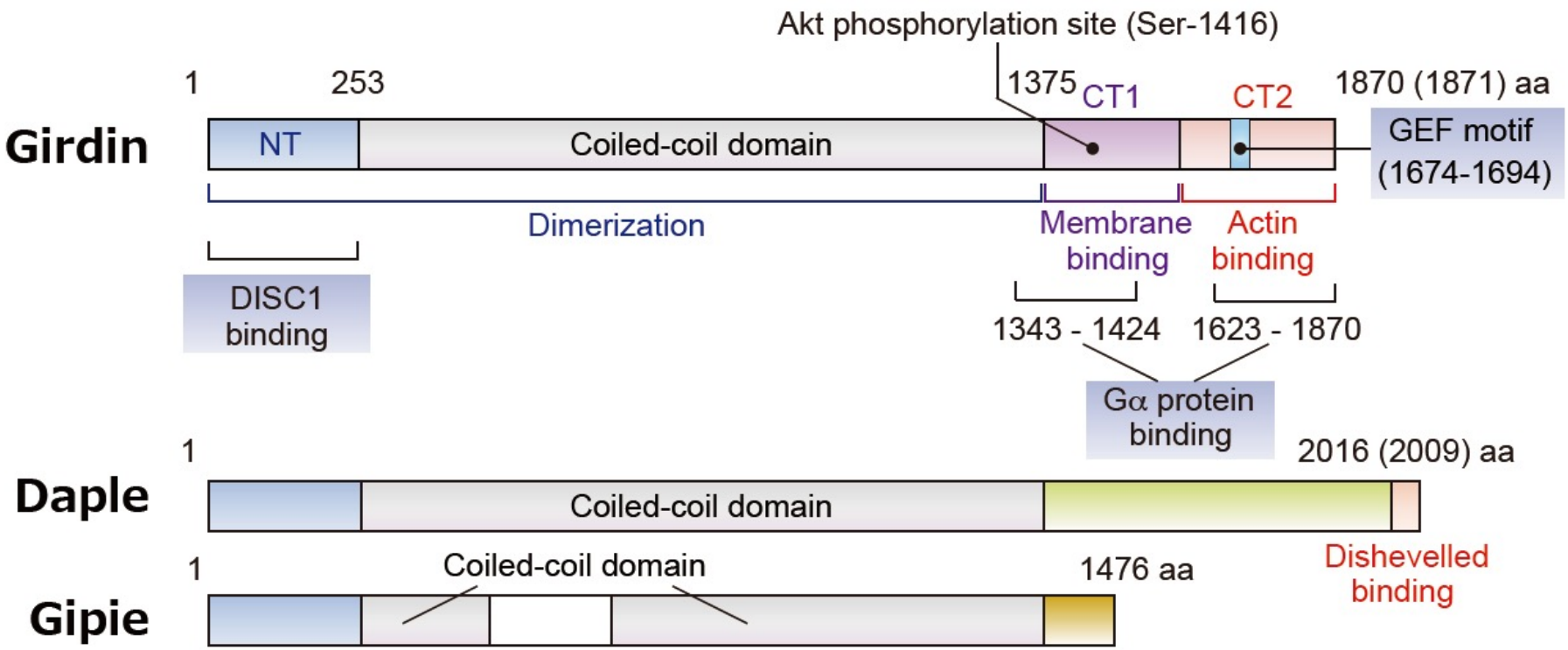
著作権等の都合により、ここに挿入されていた画像は削除しました。





Cell Rep. Takagishi et al. (2017)

Girdinファミリー分子



RET
癌遺伝子として機能
甲状腺がん
肺がん
MEN2A, MEN2B

GDNF
RETのリガンド
腸管神経系の発生
腎臓の発生
精子幹細胞の維持

GZF1
GDNFによる
誘導遺伝子

AKT, MAPK, DOK, FRS2
RET下流の細胞内シグナル
伝達系の解析

CD109
RETによる誘導遺伝子
扁平上皮がん、肺腺がん
グリオブラストーマの増殖・
悪性化に関与
毛の発生、骨代謝に関与

TRIM27
RETとの遺伝子再構成
転写抑制因子
細胞の集団移動に関与

?

Girdin Family
Girdinの細胞の増殖因子依存性の細胞集団移動
における機能、PEHO症候群
DapleのWnt依存性の細胞平面極性における機能
水頭症の原因遺伝子

Meflin
Cell-Cell接触により発現
誘導されるタンパク
間葉系幹細胞における
機能、CAFにおける機能

小さな発見を自身の手で大切に育てる

分子病理学・腫瘍病理学教室（旧第二病理学） 学位取得者

谷口　雅彦
磯村　毅
宮崎　貢一
浅井　直也
村雲　芳樹
和田　応樹
坂田　慶太
飯田　健一
丸山　彰一
岩下　寿秀
伊藤　信二
大岩　幹直
長谷川　央
岩田　洋介
中山　誠子
村上　秀樹
斉藤　充尋
浅井　昌美
石黒　義浩
野崎　千佳

川井　久美
黒川　景
下野　洋平
林　泰仁
根東　順子
林　裕倫
TEZEL GAYE
福田　敏史
渡邉　剛
河尻　愛恵
西川　美紀子
下山　芳江
福田　直行
橋本　瑞生
児玉　良典
時々輪　真由美
前田　健吾
金　毅
松浦　哲生
森永　貴理

下野　圭子
内田　真由実
檀原　敦
井戸　智景
北村　倫也
佐藤　朋子
長谷川　正規
姜　平
塚本　裕久
萩原　純孝
加藤　琢哉
長谷川　太作
黒土　愛
萩倉　美奈子
齋藤　尚二
松下　悦史
王　芸
岩越　朱里
高岸　麻紀
堀尾　麻衣子

三井　伸二
小原　圭
新美　薫
宮地　紘樹
坂倉　寛紀
翁　良
山村　由美子
大森　健治
村松　彩
ARA HOSNE
服部　行紀
前田　啓子
韓　一芃
砂川　真輝
陸　大輔
白木　之浩
SHANIYA ABUDUREYIMU
王　暁澤
原　昭壽
水谷　泰之

ご清聴ありがとうございました