

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14445

研究課題名(和文) ASKファミリー分子によるがん転移制御機構の解明

研究課題名(英文) The regulatory mechanisms of tumor metastasis via ASK family proteins

研究代表者

名黒 功 (Naguro, Isao)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授

研究者番号：80401222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ASK1ノックアウトマウスが顕著にがん転移に対して耐性になるという知見に基づき、ASK1ががん転移の際どのような細胞種で機能するかについて分子メカニズムを含めて解析した。組織特異的コンディショナルノックアウトマウスを用いて、ASK1が少なくとも血小板と内皮細胞という複数の“場”においてがん転移に寄与することを明らかにした。特に、血小板においては、ASK1欠損により複数のリン酸化シグナル伝達に不全が起こり、血小板機能が抑制されることを見出した。また、リン酸化シグナル不全の一部は、ADP受容体であるP2Y12の特異的なアミノ酸のリン酸化修飾が低下することに起因することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Based on our previous data that ASK1 knockout mice are highly resistant to tumor metastasis, we investigated in which cells ASK1 functions during metastasis with focusing on the molecular mechanisms. Using tissue-specific conditional knockout mice, we revealed that ASK1 in multiple cells, at least in the platelet and the endothelial cells, is involved in tumor metastasis. Furthermore, ASK1-knockout platelets showed deficiency in multiple kinase signal transductions, resulting in the defect in platelet functions. Also, we found that a phosphorylation site in an ADP receptor P2Y12 was attenuated in ASK1-deficient platelets, which is attributable to the defect of a kinase signal transduction.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん転移 ASK1 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

がんが致死的となる理由の一つに、がん細胞が転移により様々な部位に拡散してしまうことがある。がん転移は、がんに対する有効な治療法である外科的手術や放射線治療の対象からがんを逃がし、体内の様々な部位へがんを拡散させることで、病態を手の着けられない段階に移行させてしまう。転移能の高いがんほど予後が悪いことから、がんによる死亡率を下げるためにがん転移を阻止する治療法の開発が望まれている。これまでに多くの研究により、がん転移は、がん細胞自体の性質以外に宿主の正常細胞である免疫細胞、血小板、血管内皮細胞などが密接に関与し、複雑な相互作用から達成される多段階の現象であることが明らかにされている(図1)。

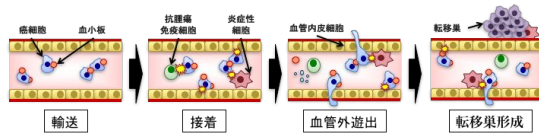


図1 がん転移の過程

このシステムの中では、細胞接着因子、炎症性サイトカイン、プロテアーゼなど様々な分子が転移を促進的、抑制的に制御していると報告されている。しかしながら、このように関与する細胞種、分子が明らかにされている状況においても、未だがん転移を阻止する治療法の確立には至っていない。この現状から、申請者はがん転移阻止のためには多段階に渡る各過程において個々の現象をターゲットにするよりも、包括的にがん転移の複数段階に関わるメカニズムを解明し、ターゲットにする必要があるのではないかと考えた。

申請者はこれまで、活性酸素種や炎症、浸透圧など様々なストレスに反応して活性化する Apoptosis signal-regulating kinase (ASK)ファミリーのシグナル伝達の研究に携わっており、ASKファミリーが発がん、高血圧症などの病態に関与することを明らかにしていた。がん転移の起こる環境においても、炎症や shear ストレスなど様々なストレスが関わることから、がん転移に ASKファミリーが関与する可能性を考えた。マウスの尾静脈からがん細胞を注射する肺転移モデルで検討を行ったところ、非常に興味深いことに、ASK1 ノックアウト(KO)マウスでは野生型(WT)マウスに比べ、著しくがんの肺転移が低下していた。さらに、骨髄キメラマウスの作製を行い、骨髄のみ、または骨髄以外のみでの ASK1 KO マウスについて検討すると、どちらのマウスでも WT マウスに比べがん転移が大きく低下しており、ASK1 は免疫細胞を含む骨髄由来細胞と、それ以外の細胞という複数の“場”でがん転移促進に働くことが示唆された。

2. 研究の目的

背景で記載した ASK1 が骨髄由来細胞とそれ以外の細胞の両方でがん転移に促進的に

働くという独自の知見に基づき、まず、ASK1 ががん転移過程のどのような“場”(細胞)で働か明らかにすることを目的とした。さらに、特定した細胞の中で ASK1 が制御するシグナル伝達経路や機能を検討することで、ASK1 ががん転移を制御する分子メカニズムを解明し、がん転移の複数の“場”で働く ASK1 をターゲットとした新たながん転移抑制の創薬基盤を提示することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ASK1 コンディショナルノックアウト(cKO)マウスによる ASK1 が働く細胞種の特定。

骨髄由来とそれ以外の細胞で ASK1 ががん転移に働く細胞を特定するために、既に所持していた ASK1 flox マウスを用いて、ASK1 を組織特異的にノックアウトした ASK1 cKO マウスを作成してがん転移実験を行った。具体的に検討した細胞種としては、単球・マクロファージ・顆粒球(LysM-cre)、血小板(Pf4-cre)、血管およびリンパ管内皮細胞(VE-cadherin-cre)の3種類である。一般的にがん転移は非常に稀な現象であり、マウスの尾静脈からがん細胞を注入したとしてもその中の0.01%程度しか転移巣を形成しない。従って、がん注入後、早い段階のがん細胞の生着についても時間を追って解析するため、我々は注入するがん細胞として恒常的にルシフェラーゼを発現する細胞株(3LL-Luc2細胞およびB16F10-luc-G5細胞)を使用した。がん注入後、様々なタイムポイントで転移先臓器としての肺を取り出し、肺溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定することで、目視では検出できない少量のがん細胞の存在を検出し、ASK1 cKO マウスのがん転移の程度を解析した。

(2) がん転移を起こした WT および ASK1 KO マウスの肺における DNA マイクロアレイ解析
がん細胞を尾静脈から注入した WT と ASK1 KO マウスにおいて、肺に存在するがん細胞の数に差が出るのは注入後約3時間の時点からである。そこで、この時点におけるそれぞれのマウスの肺から RNA を抽出し、その cDNA に対する DNA マイクロアレイにより解析することで、がん転移が起こっている臓器内環境に差がないか、発現遺伝子の面から解析した。

(3) ASK1 が働く細胞におけるシグナル伝達経路の解析

(1)(2)の解析から明らかになった ASK1 が働く細胞内において、特に血小板に注目して ASK1 がどのようなシグナル伝達経路や機能を介してがん転移に関与するのかについて、単離細胞、培養細胞を用いて生化学的、分子生物学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) LysM-cre、Pf4-cre、VE-cadherin-cre

マウスを用いて、各 ASK1 cKO マウスを作成し、尾静脈からがん細胞を注入する肺転移モデルの検討を行ったところ、LysM-cre ではコントロールマウスと同程度のがん転移が観察されたのに対して、Pf4-cre、VE-cadherin-cre では全身の ASK1 KO マウスよりは比較的程度は弱い有意ながん転移の減弱が認められた。この結果から、骨髄由来細胞については少なくとも血小板において、骨髄由来以外の細胞については少なくとも血管内皮細胞において ASK1 が機能し、がん転移の促進に関与することが明らかになった。この結果は、骨髄キメラマウスの結果から当初予想された通り ASK1 が複数の細胞種においてがん転移に関与することを示しただけでなく、ASK1 はがん転移においてがん細胞と血管壁との相互作用に関与することを示唆する結果でもある。

(2) がん転移を起こした肺の cDNA に対する DNA マイクロアレイの結果についてバイオインフォマティクスを用いて解析したところ、ASK1 KO マウスの肺では、免疫応答に関与する遺伝子やがん免疫に関わるサイトカインなどの発現量が大きく変化していることが明らかになった。実際に、real-time PCR によってもこれらの遺伝子の発現変化が確認された。この解析の中で発現量が変化していた特定のサイトカインについては、Pf4-cre、VE-cadherin-cre により作成した ASK1 cKO マウスでは全身 ASK1 KO マウスと異なり発現に差がなかったことから、(1) で明らかにした血小板および血管内皮細胞以外に存在する ASK1 がサイトカイン発現に関与することが示唆された。この結果は、ASK1 ががん転移において働く“第3の場”が存在することを示唆しており、サイトカイン産生を担う免疫系の細胞でも ASK1 が関与する可能性が考えられた。

(3) ASK1 cKO マウスでがん転移抑制が観察されたことから、次に個々の“場”での ASK1 の担うシグナル伝達や役割について解析を進めた。まず、Pf4-cre により関与が明らかになった血小板における ASK1 の役割を解析するために、全身 ASK1 KO マウスおよび、血小板の ASK1 cKO マウスから血小板を単離し、ASK1 の下流で働く JNK および、p38 の活性化を検討した。その結果、血小板における JNK、p38 のリン酸化は ASK1 の全身および血小板 cKO マウスで著しく低下しており、活性が低下していることが明らかになった。また、JNK、p38 とともに、血小板の凝集反応において重要な役割を担う Akt のリン酸化についても検討したところ、こちらも ASK1 KO マウスの血小板において低下しており、Akt の活性も低下していることが明らかになった。これまで ASK1 と Akt は相互に抑制的に働くことが報告されていたが、今回の結果は ASK1 が Akt の活性を促進的に制御する場合があることを

示唆するものである。JNK、p38、Akt は全て血小板の凝集反応に重要なシグナル伝達分子であることが報告されていたため、全身および血小板における ASK1 cKO マウスから血小板を単離して *in vitro* において、種々のアゴニストによる凝集実験を行った。その結果、ASK1 欠損によりコラーゲンや ADP による刺激に対する血小板の凝集が減弱していることが明らかになった。さらに、*in vivo* のレベルでも、全身および血小板における ASK1 cKO マウスでは止血にかかる時間の延長など血小板機能の低下が観察された。以上の結果から、ASK1 の欠損は血小板内のシグナル伝達経路の不全から血小板の凝集能を低下させることが明らかになった。血小板の接着性・凝集能はがんとの相互作用を介してがん転移に対して促進的に働くことが知られているため、血小板の ASK1 は血小板の接着性・凝集能の制御によりがん転移に関与していると考えられる。

(3) 本研究で新たに見出された ASK1 による Akt の活性促進メカニズムについて、解析を行った。Akt は血小板内において ADP などの刺激の際に P2Y₁₂ 等の受容体を介して活性化される。ASK1 KO マウスの血小板において P2Y₁₂ を詳細に解析したところ、WT マウスでは観察されるリン酸化が著しく低下していることを見出した。このリン酸化部位を Ala に変異させ非リン酸化変異体を作成し、培養細胞に発現させ ADP 刺激を行ったところ、WT の P2Y₁₂ に比べて Akt の活性化の持続時間が短縮しており、この部位のリン酸化が P2Y₁₂ を介した Akt 活性化に重要であることが示唆された。以上の結果から、ASK1 は Akt の上流で働く P2Y₁₂ のリン酸化制御を介して Akt の活性促進に働くと考えられた。

(4) 本研究によって、がん転移において大きな影響を与える ASK1 は、少なくとも血小板、血管内皮細胞で機能することを明らかにした。さらに、DNA マイクロアレイの結果からこれら以外の細胞種において働くことでがん免疫にも関与することが示唆された。上述のとおり、血小板における ASK1 の役割については分子メカニズムを含めて新たな知見が得られた。一方で、血管内皮細胞や免疫系での関与については今後詳細に解析する必要がある。本研究での血小板における解析を好例として、がん転移において ASK1 が機能する具体的な細胞種とそこでの機能を解明することで、がん転移のより深いメカニズムの理解とその治療に貢献できると考えられる。特に、がん転移の複数の“場”で機能する ASK1 に対する阻害剤を利用した治療法は魅力的なアプローチと考えられ、本研究でも明らかにした ASK1 の作用点に注目しつつ解析することで、将来的に有効ながん転移抑制法につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ryuno, H., Naguro, I. and Kamiyama, M.
ASK family and cancer. Adv. Biol. Regul.
In press (査読有)

Kamiyama, M., Naguro, I. and Ichijo, H.
In vivo gene manipulation reveals the
impact of stress-responsive MAPK
pathway on tumor progression. Cancer
Sci. Vol.106, pp785-796, 2015 (査読有)
DOI:10.1111/cas.12676

〔学会発表〕(計 10 件)

Kamiyama, M., Fuse, K., Naguro, I. and
Ichijo, H. ASK1-JNK/p38 axis regulates
tumor lung metastasis and platelet
functions through phosphorylation of
ADP receptor P2Y₁₂. KEYSTONE SYMPOSIA
on Kinases: next-generation insights
and approaches. 2017 年 3 月 5-9 日、
Colorado (USA)

Kamiyama, M., Naguro, I. and Ichijo, H.
Stress signaling in tumorigenesis and
tumor metastasis. 第 75 回日本癌学会学
術総会、2016 年 10 月 6 日、パシフィコ
横浜 (神奈川県・横浜市)

神山 美樹、名黒 功、一條 秀憲、血
小板と血管内皮細胞における ASK1 が協
調的に肺へのがん転移を制御する、第 39
回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 2
日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Kamiyama, M., Naguro, I. and Ichijo, H.
ASK1 regulates tumor lung metastasis
and platelet functions through ADP
signaling. KEYSTONE SYMPOSIA on
Purinergic Signaling. 2016 年 1 月 24-28
日、Vancouver (Canada)
他

〔図書〕(計 1 件)

Machida, T., Ichijo, H. and Naguro, I.
Regulation of cellular signaling by
thioredoxin. In Louro, R. and
Diaz-Moreno, I. (eds.) Redox proteins
in supercomplexes and signalosomes,
Chapter 11, 255-274, CRC Press, 2015

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~toxicol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

名黒 功 (NAGURO, Isao)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授
研究者番号：80401222

(2) 研究協力者

神山 美樹 (KAMIYAMA, Miki)