様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成　22　年　6　月　4　日現在

研究種目：特定領域研究
研究期間：2005　～　2009
課題番号：17014013
研究課題名（和文）ストレス応答シグナルによるがん細胞の増殖・死の制御

研究課題名（英文）Regulation of cell proliferation and cell death by stress signaling in cancer

研究代表者
一條 秀憲（ICHIJO HIDENORI）
東京大学・大学院薬学系研究科・教授
研究者番号：00242206

研究成果の概要（和文）：本研究は、がん細胞における異常増殖ならびに細胞死耐性のメカニズムをストレス応答シグナル伝達経路の破綻という観点から解析することを目的として行った。具体的には、ストレス感受性 MAP キナーゼ系分子群としての ASK ファミリーの機能解析を軸に、ノックアウトマウスの作製ならびに発がん性の解析を行い、ストレス感受性 MAP キナーゼスーパーファミリーが、がんの発生・進展において果たす役割を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：This study aimed at analyzing the mechanisms by which cancer cells acquire abnormal proliferation and death-resistant phenotypes in the context of perturbation of stress signaling. By using ASK family knockout mice, we found that stress-activated MAP kinases play pivotal roles in development and expansion of human cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2005 年度	9,800,000	0	9,800,000
2006 年度	9,800,000	0	9,800,000
2007 年度	9,800,000	0	9,800,000
2008 年度	12,800,000	0	12,800,000
2009 年度	12,800,000	0	12,800,000
総　計	55,000,000	0	55,000,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：ASK1, ASK2, MAP キナーゼ, アポトーシス, ASK ファミリー

１．研究開始当初の背景

ASK ファミリーというオリジナルな分子基盤に基づくがん研究は､｢がん特性｣領域においても極めて独自性の高い分野であり、本領域の多面的な発展に大きく貢献できるものと期待された。また、本領域においては、主に細胞生物学的なアプローチを中心として多様な新規技術を導入しながら、発がんによって細胞・組織の統合的システムがどのような機構で破綻するかについての総合的解析が推進されることも期待された。さらに、本研究計画がシグナル伝達解析を中心に据えた戦略をとるという特質から、領域内における情報交換に基づく、細胞生物学的新規技術の習得ならびにがん生物学的情報のいち早い導入は、本研究計画を円滑且つ迅速に進めて行く上で極めて重要な要素であり、新たながん研究領域の発掘に繋がることが期待された。

２．研究の目的

本研究計画は、がん細胞における異常増殖ならびに細胞死耐性のメカニズムをストレス応答シグナル伝達経路の破綻という観点から解析することを目的とした。特にストレス感受性 MAP キナーゼスーパーファミリーによるストレスシグナルの解析を通して、がんの発生ならびに進展のメカニズムを明らかにすることを目標とした。具体的には、ストレス感受性 MAP キナーゼ系分子群としての ASK ファミリーの機能解析を軸に、ノックアウトマウスの作製ならびに発がん性の解析を行い、ストレス感受性 MAP キナーゼスーパーファミリーが、がんの発生・進展において果たす役割を総合的に明らかにすることを目指した。

３．研究の方法　ならびに　４．研究の成果

(1) <u>ASK ファミリー分子ノックアウトマウスを用いた発がん実験</u>

研究開始時にすでに作成済みであった ASK1 ノックアウトマウスを用い、DMBA-TPA による皮膚発がん系を用いてがんの発生・進展における ASK1 ノックアウトマウス役割の解析を行った。その結果 ASK1 欠損により、炎症性発がんが顕著に抑制されることが明らかになった。また ASK1 ノックアウトマウスへの同種がん細胞移植実験による宿主側での ASK1 の役割、ならびに ASK1 ノックアウト細胞を用いた *in vitro* ならびに *in vivo* 形質転換能の検討等を行うことにより、ASK1 とがんの関連性を明確に捉えることが可能となってきた。

(2) <u>ASK1-MAP キナーゼ系の活性制御機構</u>

これまでの酵母 Two-hybrid 法による結合タンパク質のスクリーニングに加え、pull-down 法による解析（質量分析装置を使用）を行い、ASK1 結合タンパク質の網羅的な解析により活性制御機構をさらに推進した。その結果、脱ユビキチン化酵素 USP9X が酸化ストレス下に ASK1 の不活性化を阻害することによって細胞死誘導に働くことを見出した。

(3) <u>ASK1-MAP キナーゼ系の下流標的分子の探索</u>

ショウジョウバエの遺伝学的解析法導入によって ASK1-MAP キナーゼ系の新たな標的分子を解析した。その結果、NR4A2 という転写因子が ASK1-p38 経路の下流で働くことが明らかになった。

(4) <u>ASK2 ノックアウトマウスの作成と発がん実験</u>

ASK2 ノックアウトマウスを作成し、ASK1 とのダブルノックアウトマウスも作成した。ASK1 ノックアウトマウスでの発がん実験の経験を元に ASK2 ノックアウトマウスならびに ASK1･ASK2 ダブルノックアウトマウスにおいて同様の発がん実験を行い、ASK2KO マウスにおいては，野生型マウスに比べて形成された腫瘍数が明らかに多く，また発生時期も比較的早いことが明らかとなった。また、

ASK2KO マウスにおいてアポトーシス細胞が減少していることが確かめられた。ダブルノックアウトマウスにおいては、ASK1 依存性炎症の減弱により、ASK2 のがん抑制因子としての効果がキャンセルされることを見出した。

(5) ASK2、ASK3 の機能解析

ASK2 ならびに ASK3 の活性制御機構解析を主に酵母 Two-hybrid 法ならびに pull-down 法によるによる結合タンパク質のスクリーニングを軸に検討した。特にがんとの関連性が深いと考えられる重要な分子についてはノックアウトマウスも作成し、現在も検討を行っている。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 **73** 件）

1. Maruyama, T., Kadowaki, H., Okamoto, N., Nagai, A., Naguro, I., Matsuzawa, A., Shibuya, H., Tanaka, K., Murata, S., Takeda, K., Nishitoh, H. and Ichijo, H. CHIP-dependent termination of MEKK2 regulates temporal ERK activation required for proper hyperosmotic response. ***EMBO J.***, in press.
2. Seong, H.A., Jung, H., Ichijo, H. and Ha, H. Reciprocal negative regulation of PDK1 and ASK1 signaling by direct interaction and phosphorylation. ***J. Biol. Chem***., 285, 2397-2414 (2010).
3. Cekic, C., Casella, C.R., Eaves, C.A., Matsuzawa, A., Ichijo, H. and Mitchell, T.C. Selective activation of the p38 MAPK pathway by synthetic monophosphoryl lipid A. ***J. Biol. Chem***., 284, 31982-31991 (2009).
4. Nagai, H,, Noguchi, T., Homma, K., Katagiri, K., Takeda, K., Matsuzawa, A. and Ichijo, H. Ubiquitin-like sequence in ASK1 plays critical roles in the recognition and stabilization by USP9X and oxidative stress-induced cell death. ***Mol. Cell***, 36, 805-818 (2009).
5. Kundu M, Pathak SK, Kumawat K, Basu S, Chatterjee G, Pathak S, Noguchi T, Takeda K, Ichijo, H, Thien CB, Langdon WY, Basu J. A TNF- and c-Cbl-dependent FLIP(S)-degradation pathway and its function in Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage apoptosis. ***Nat. Immunol.***, 10, 918-926 (2009).
6. Takeda, K., Komuro, Y., Hayakawa, T., Oguchi, H., Ishida, Y., Murakami, S., Noguchi, T., Kinoshita, H., Sekine, Y., Iemura, S., Natsume, T., and Ichijo, H. Mitochondrial Phosphoglycerate mutase 5 uses alternate catalytic activity as a protein serine/threonine phosphatase to activate ASK1. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.***, 106, 12301-12305 (2009).
7. Zhou, J., Shao, Z., Kerkela, R., Ichijo, H., Muslin, A., Pombo, C., Force, T. Serine 58 of 14-3-3{zeta} is a molecular switch regulating ASK1 and oxidant stress-induced cell death. ***Mol. Cell. Biol.***, 29, 4167-4176 (2009).
8. Waak, J., Weber, S. S., Görner, K., Schall, C., Ichijo, H., Stehle, T. and Kahle, P. J. Oxidizable residues mediating protein stability and cytoprotective interaction of DJ-1 with apoptosis signal-regulating kinase 1. ***J. Biol. Chem***., 284, 14245-14257 (2009).
9. Iriyama, T., Takeda, K., Nakamura, H., Morimoto, Y., Kuroiwa, T., Mizukami, J., Umeda, T., Noguchi, T., Naguro, I., Nishitoh, H., Saegusa, K., Tobiume, K., Homma, T., Shimada, Y., Tsuda, H., Aiko, S., Imoto, I., Inazawa, J., Chida, K., Kamei, Y., Kozuma, S., Taketani, Y., Matsuzawa, A. and Ichijo, H. ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis. ***EMBO J.***, 28, 843-853 (2009).
10. Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Takeda, K. and Ichijo, H. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. ***Genes Dev.***, 22, 1451-1464 (2008).
11. Noguchi, T., Ishii, K., Fukutomi, H., Naguro, I., Matsuzawa, A., Takeda, K. and Ichijo, H. Requirement of reactive oxygen species-dependent activation of ASK1-p38 MAP kinase pathway for extracelluler ATP-induced apoptosis in macrophage. ***J. Biol. Chem***., 283, 7657-7665 (2008).
12. Fujino, G., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Yamauchi, S., Saitoh, M., Takeda, K. and Ichijo, H. Thioredoxin and TRAF family proteins regulate ROS-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. ***Mol. Cell. Biol.***, 27, 8152-8163 (2007).
13. Osaka, N., Takahashi, T., Murakami, S., Matsuzawa, A., Noguchi, T., Fujiwara, T., Aburatani, H., Moriyama, K., Takeda, K. and Ichijo, H. ASK1-dependent recruitment and activation of macrophages induce hair growth in skin wounds. ***J. Cell Biol.***, 176, 903-909 (2007).

14. Takeda, K., Shimozono, R., Noguchi, T., Umeda, T., Morimoto, Y., Naguro, I., Tobiume, K., Saitoh, M., Matsuzawa, A. and Ichijo, H. Apoptosis signal-regulating kinase 2 (ASK2) functions as a MAP3K in a heteromeric complex with ASK1. ***J. Biol. Chem.***, 282, 7522-7531 (2007).
15. Kitagawa, D., Kajiho, H., Negishi, T., Ura, S., Watanabe, T., Wada, T., Ichijo, H., Katada, T. and Nishina, H. Release of RASSF1C from the nucleus by Daxx degradation links DNA damage and SAPK/JNK activation. ***EMBO J.***, 25, 3286-3297 (2006).
16. Chiang, E., Dang, O., Anderson, K., Matsuzawa, A., Ichijo, H. and David, M. Apoptosis- regulating signal kinase 1 is required for reactive oxygen species-mediated activation of IFN regulatory factor 3 by lipopolysaccharide. ***J. Immunol***., 176, 5720-5724 (2006).
17. Liu, Q., Wilkins, B.J., Lee, Y.J., Ichijo, H. and Molkentin, J.D. Direct interaction and reciprocal regulation between ASK1 and calcineurin-NFAT control cardiomyocyte death and growth. ***Mol. Cell. Biol.***, 26, 3785-3797 (2006).
18. Noguchi, T., Takeda, K., Matsuzawa, A., Saegusa, K., Nakano, H., Gohda, J., Inoue, J. and Ichijo, H. Recruitment of TRAF family proteins to the ASK1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. ***J. Biol. Chem.***, 280, 37033-37040 (2005).
19. Junn, E., Taniguchi, H., Jeong, B.S., Zhao, X., Ichijo, H. and Mouradian, M.,M. Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits ASK1 activity and cell death. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.***, 102, 9691-9696 (2005).
20. Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K. and Ichijo, H. ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR-4 mediated innate immunity. ***Nature Immunol.***, 6, 587-592 (2005).

〔学会発表〕(計 **323** 件)

1. Hidenori Ichijo: ASK family kinases in stress response and disease,The 55th Fall Conference of The Korean Association of Immunobiologists, 2007.11.8-9, Korea.
2. Hidenori Ichijo: ASK family proteins in stress-induced apoptosis and disease, FASEB Summer Research Conferences - From unfolded proteins in the endoplasmic reticulum to disease, 2007.7.28-8.2, USA.
3. Hidenori Ichijo: ASK family proteins in stress response and disease,The International Conference on Free Radicals in Biosystems, 2007.3.18-21, Kuwait.
4. Hidrnoi Ichijo: ASK family proteins in stress response and disease,20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006.5.25-26, Kyoto.
5. Hidenori Ichijo:ASK family proteins in stress response and disease,63rd KSBMB Annual Meeting in 2006, 2006.5.25, Korea.
6. Hidenori Ichijo: Redox controls of ASK1-MAP kinase signaling pathway in apoptosis and immunity, 2005.9.9, Italy.

６．研究組織

(1)研究代表者

一條　秀憲（ICHIJO HIDENORI）

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：00242206