

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007 -2008
 課題番号：19390470
 研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌に関わる新規ストレス応答キナーゼ ASK2 の機能解析
 研究課題名(英文) Functional analysis of ASK2, a novel stress-responsive kinase, in carcinogenesis of oral squamous cell carcinomas.
 研究代表者
 武田 弘資 (TAKEDA KOHSUKE)
 東京大学・大学院薬学系研究科・准教授
 研究者番号：10313230

研究成果の概要：

口腔領域の悪性腫瘍の大半を占める口腔扁平上皮癌については、診断ならびに治療法が着実に進歩しているものの、癌細胞の悪性度や抗癌剤に対する感受性などの多様性がいまだに治療の大きな障壁となっている。また、発癌機構についても不明な点が多く残されている。われわれは本研究において、ノックアウトマウスならびにマウス由来培養細胞を用いた解析により、新規ストレス応答キナーゼ ASK2 が癌の抑制に働く機構を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2008 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生化学

1. 研究開始当初の背景

口腔領域の悪性腫瘍の大半を占める口腔扁平上皮癌については、診断ならびに治療法が着実に進歩しているものの、癌細胞の悪性度や抗癌剤に対する感受性などの多様性がいまだに治療の大きな障壁となっている。また、発癌機構についても不明な点が多く残されている。われわれは、新規ストレス応答キナーゼ ASK2 を同定し、その機能解析を進める過程で、

(1) ASK2 が様々なストレスによって活性化され、ストレス応答に重要なシグナルを伝達すること、

(2) 皮膚発癌モデルを用いた解析から、ASK2 が腫瘍形成に対して抑制的に機能すること、

(3) 一部の口腔扁平上皮癌細胞株において ASK2 遺伝子の著しい発現低下が認められること
 を見いだした。このような知見に基づき、ASK2 が口腔扁平上皮癌の発癌過程に関与し、個々の症例における癌細胞の何らかの生物学的性状を規定しうる分子であるとの仮説を立て、本研究を立案した。

2. 研究の目的

MAP (Mitogen-Activated Protein)キナーゼ経路は、細胞内での情報伝達を担っており、哺乳類においては3つの主要な経路から構成されている。これらのうちの2つの経路に属するJNKならびにp38は、いわゆる「ストレスキナーゼ」としてさまざまなストレス刺激によって活性化され、細胞死の制御をはじめとする多彩な生理活性を發揮し、ストレスに対する細胞の応答を調節する。

われわれは、これらのJNKならびにp38経路の活性制御分子として、Apoptosis Signal-regulating Kinase (ASK) 1という分子について詳細な解析を進めてきた。最近、酵母 two-hybrid 法を用いた ASK1 結合分子のスクリーニングの結果、ASK1 と非常に相同性の高い分子、ASK2 を同定した。ASK2 は、単独でのキナーゼ活性は弱いものの、ASK1 と複合体を形成することで様々な刺激に応答し、ASK1 と同様に JNK ならびに p38 経路を制御する活性をもつことが明らかとなった。

ASK2 に対するモノクローナル抗体を作製し、成体マウスにおける ASK2 の発現組織を検討したところ、皮膚や消化管などの上皮組織に発現が高い傾向が認められた。続いて ASK2 ノックアウト(KO)マウスを作製したところ、形態や行動の異常は認められず、野生型マウスとの差異は認められなかった。しかし、二段階皮膚腫瘍形成モデルを用いて ASK2 KO マウスにおける造腫瘍性を検討したところ、野生型マウスと比較して明らかに腫瘍形成が亢進していた。この結果から ASK2 は癌抑制因子として機能することが示唆された。さらに、いくつかのヒト口腔扁平上皮癌細胞株において、mRNA 発現の著しく低下していることが確認された。

以上の結果は、ASK2 が口腔扁平上皮癌の発癌過程に深く関与することを示唆しており、ASK2 がどのような機構で腫瘍形成を抑制しているかを検討する意義はきわめて大きい。また、ASK2 は ASK1 と同様にアポトーシスを誘導する活性をもつことから、口腔扁平上皮癌における ASK2 の発現の有無ないしは多寡が、抗癌剤に対する感受性に大きな影響を与えている可能性もあり、癌治療の面でも非常に興味深い研究対象であると考えられる。よって本研究では、ASK2 がどのような機構で腫瘍形成を抑制しているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)二段階皮膚腫瘍形成モデル

マウスの皮膚に発がん性物質 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) をイニシエーターとして塗布した後、炎症誘発物質 12-O-tetradecanoylphorbol-13-

acetate (TPA)をプロモーターとして連続塗布して皮膚腫瘍形成を誘導した。

(2)ASK2 の発現解析

マウス表皮における ASK2 mRNA の発現は in site hybridization 法により検出した。各種ヒト癌細胞株における ASK2 mRNA の発現は、TaqMan プローブを用いた定量的 PCR 法により解析した。ヒト癌組織における ASK2 タンパク質発現の検討のため、ヒト ASK2 を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、ヒト食道癌組織の免疫組織化学染色を防衛医科大・津田均博士との共同研究として行った。

(3)マウス皮膚ならびに培養細胞における細胞死の解析

培養細胞レベルでの細胞死は、ToxCount キットならびに Cell Death Detection ELISAPLUS キットを用いた。皮膚組織におけるアポトーシスの検出には、TUNEL 法ならびに抗活性化型 Caspase3 抗体による免疫組織化学染色を用いた。

(4)マウス皮膚におけるサイトカイン産生の測定

マウス皮膚より RNA を抽出し、TNF α ならびに IL-6 の mRNA 発現量を定量的 PCR 法によって測定した。

4. 研究成果

マウスの各組織における ASK2 のタンパク質レベルでの発現分布を調べてみると、興味深いことに、皮膚をはじめ、食道、胃、大腸などの消化管や肺といった外界と直接接する上皮をもつ組織に多く発現している傾向が認められた。そこで皮膚に注目して ASK2 の発現をさらに詳しく観察してみると、皮膚の最表層である表皮層に高い発現が確認され、皮膚表皮層由来の培養角化細胞では、マクロファージや線維芽細胞など他の組織系由来の細胞に比べて明らかに ASK2 が多く発現していることが分かった。

そこで、マウスの皮膚に発がん性物質 DMBA をイニシエーターとして塗布した後、炎症誘発物質 TPA をプロモーターとしての連続塗布して腫瘍形成を誘導する二段階皮膚腫瘍形成モデルを用い、ASK2 KO マウスの皮膚腫瘍の形成について検討した。その結果 ASK2 KO マウスにおいては、表皮角化細胞の DMBA に対するアポトーシスが減弱しており、野生型マウスに比べて形成された腫瘍数が明らかに多いことが明らかとなった。よって ASK2 は、DMBA によって損傷を受けた細胞をアポトーシスによって排除することで、腫瘍の形成を抑制する働きをもつと考えられる。

このような機能がヒトにおいても保存されているならば、ASK2 は発癌や癌の進行の抑制に働く分子、すなわち「癌抑制遺伝子」

の範疇に属することになる。そこで、ヒトの様々な癌組織から樹立した細胞株における ASK2 mRNA の発現を調べたところ、口腔癌、食道癌、胃癌、大腸癌の細胞株の多くが、対照として用いた正常組織と比較して明らかに ASK2 の発現レベルが低下していた。その傾向は食道癌細胞株において特に顕著であった。そこで、ヒト ASK2 を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、約 100 例の食道癌原発巣における ASK2 のタンパク質発現レベルを検討したところ、約半数において周囲正常組織と比較して ASK2 の発現が明らかに低下していることが明らかとなった。この結果から、ASK2 がマウスモデルだけではなく、ヒトにおいても癌抑制遺伝子として機能していることが強く示唆される。

一方で、ASK1 も腫瘍形成において何らかの役割を担っているかの検討を進めた。以前のわれわれの研究結果より、ASK2 が安定して発現し、機能するためには ASK1 が必要であることが明らかとなっており、実際、ASK1 KO マウスにおいては ASK2 の発現が著しく低下している。そのため、ASK1 KO マウスにおいても ASK2 KO マウスと同様に二段階皮膚腫瘍形成モデルにおける腫瘍形成が亢進することが予想された。しかし、実際には ASK1 KO マウスでは腫瘍形成は亢進せず、野生型マウスと同程度の腫瘍形成が認められただけであった。同様に、ASK1/ASK2 二重欠損(DKO)マウスも腫瘍形成の亢進を示さなかった。このような結果から、ASK1 は腫瘍形成をむしろ促進する活性をもち、その活性によって ASK2 KO マウスの腫瘍形成が促進されていると考えられた。

ASK1 がそのような活性を示す機構を明らかにするため、二段階皮膚腫瘍形成モデルで用いる 2 つの薬剤それぞれに対する ASK1 KO マウスの応答を検討してみた。まず、ASK1 KO マウスの表皮角化細胞においては、ASK2 KO マウスと同様、DMBA によるアポトーシスが減弱していた。よって少なくとも表皮角化細胞においては、ASK1 は ASK2 と協調的に働き、アポトーシスを誘導することで DMBA によって障害を受けた細胞を排除し、腫瘍形成を抑制するものと考えられる。一方、ASK1 KO マウスにおいては、野生型マウスや ASK2 KO マウスと比較して TPA による炎症性サイトカインの産生などの炎症応答が著しく減弱していることが明らかとなった。興味深いことに、野生型マウスより培養マクロファージを調製して ASK1 と ASK2 の発現レベルを調べてみると、ASK1 は比較的多く発現しているのに対し、ASK2 は非常に低いレベルの発現しか検出できない。よって、炎症応答にかかわる炎症性細胞においては ASK1 が優位に発現し、ASK1 独自の機能として炎症応答を増強することで腫瘍形成

を促進していると考えられる。

以上の結果から、表皮角化細胞においては ASK2 が ASK1 と協調的に働き、アポトーシスを誘導することで発癌性物質によって損傷を受けた細胞を排除し、腫瘍形成を抑制すること、その一方で ASK1 はマクロファージなどの炎症性細胞において炎症性サイトカインの産生を亢進させることで慢性炎症を助長し、アポトーシスを起こさずに残存した損傷細胞の腫瘍化を促進することが明らかとなった。よって、ASK2 ならびに ASK1 によるアポトーシスと炎症の制御機構のさらなる解明が、発癌機構ならびに癌の病態を理解する上での非常に重要な研究課題となるであろう。

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 15 件) 全て査読有

1. Maruyama, J., Naguro, I., Takeda, K., and Ichijo, H. Stress-activated MAP kinase cascades in cellular senescence.

Curr. Med. Chem. (review article) 16, 1229-1235 (2009).

2. Hatanaka, R., Sekine, Y., Hayakawa, T., Takeda, K., and Ichijo, H. Signaling pathways in invertebrate immune and stress response.

Invertebrate Survival Journal (review article) 6, 32-43 (2009).

3. 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).

4. Nagai, A., Kadowaki, H., Maruyama, T., Takeda, K., Nishitoh, H., and Ichijo, H. USP14 inhibits ER-associated degradation via interaction with IRE α .

Biochem. Biophys. Res. Commun. 379, 995-1000 (2009).

5. 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).

6. 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 extracellular ATP-induced apoptosis in macrophage.

J. Biol. Chem. 283, 7657-7665 (2008).

7. Takeda, K., Noguchi, T., Naguro, I., and Ichijo, H. Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response.

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. (review article) 48, 199-225 (2008).

8. 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).

9. Fujisawa, T., Takeda, K., and Ichijo, H. ASK family proteins in stress response and disease.

Mol. Biotechnol. (review article) 37, 13-18 (2007).

10. Murakami, S., Noguchi, T., Takeda, K., and Ichijo, H. Stress signaling in cancer.

Cancer Sci. (review article) 98, 1521-1527 (2007).

11. Kani, S., Nakayama, E., Yoda, A., Onishi, N., Sougawa, N., Hazaka, Y., Umeda, T., Takeda, K., Ichijo, H., Hamada, Y., and Minami, Y. Chk2 kinase is required for methylglyoxal-induced G₂/M cell-cycle checkpoint arrest: implication of cell-cycle checkpoint regulation in diabetic oxidative stress signaling.

Genes Cells 12, 919-928 (2007).

12. 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).

13. Takeda, K., Shimozone, 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).

14. Ito, G., Okai, T., Fujino, G., Takeda, K., Ichijo, H., Katada, T., and Iwatsubo, T. GTP binding is essential to the protein kinase activity of LRRK2, a causative gene product for familial Parkinson's disease.

Biochemistry 46, 1380-1388 (2007).

15. Nagai, H., Noguchi, T., Takeda, K., and Ichijo, H. Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways.

J. Biochem. Mol. Biol. (review article) 40, 1-6 (2007).

〔学会発表〕(計7件)

国際学会

1. Takeda, K. et al. Roles of NSY-1, a *C. elegans* ortholog of ASK family kinases, in anoxic response. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, 2009.3/22-27, Canada

2. Takeda, K. et al. PGAM5 is a novel serine/threonine protein phosphatase that activates ASK1. 8th International Conference on Protein Phosphatases, 2008.11/12-14, Gunma, Japan

3. Takeda, K. et al. PGAM5 is a novel serine/threonine protein phosphatase that activates ASK1. FASEB Summer Research Conferences –Protein Phosphatases–, 2008.7/13-18, Colorado, USA

4. Takeda, K. et al. Stress response by the ASK family kinases and their roles in tumorigenesis. CNU symposium on Microbiology and Molecular Genetics, 2008.2.14-15, Korea

5. Takeda, K. et al. Roles of apoptosis signal-regulating kinase 2 (ASK2) in skin tumorigenesis. FASEB Summer Research Conferences –Protein Kinases and Protein Phosphorylation–, 2007.7.7-12, California, USA

国内学会(シンポジウム)

1. 武田弘資, 一條秀憲. ASK1の活性と機能の新たな制御機構. BMB2008 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008.12/9-12, 神戸

2. 武田弘資. ASKファミリー分子によるストレス応答と発癌機構. 2007.8.29-31, 札幌

〔図書〕(計1件)

武田弘資, 一條秀憲 細胞死とアポトーシス制御機構. 尾崎登喜雄(編、監)「口腔内科学」飛鳥出版室(2008)

6. 研究組織

(1)研究代表者

武田 弘資 (TAKEDA KOHSUKE)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号: 10313230

(2)研究分担者

野口 拓也 (NOGUCHI TAKUYA)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号: 20431893

(3)連携研究者

なし