

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850182

研究課題名(和文)新規催炎症分子DAPK3による炎症性腸疾患制御機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of novel inflammatory molecule, DAPK3 on inflammatory bowel disease

研究代表者

臼井 達哉 (Usui, Tatsuya)

山口大学・共同獣医学部・助教

研究者番号：80727652

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、Death associated protein kinase (DAPK)3が消化管の炎症性反応誘導を介して炎症性腸疾患の進展やさまざまながんの進展に関わると仮説を立て、その制御メカニズムを検討した。DAPK3は腸間膜動脈血管平滑筋細胞においてPDGF-BBによる増殖および遊走をp38/HSP27シグナルの活性化を介して促進することを明らかにした。また、DAPK3はERK/c-Mycシグナルを介して非小細胞肺癌の進展を制御することや、乳がん細胞株MCF-7においてオートファジー促進因子Beclin 1のセリン90のリン酸化を制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we hypothesized death associated protein kinase 3 (DAPK3) regulates the development of inflammatory bowel disease through gastrointestinal inflammation and various types of cancer. And we examined the mechanism. DAPK3 promoted cell proliferation and migration of mesenteric arterial smooth muscle cells through activation of p38/HSP27 signals. It was also shown that DAPK3 mediates the development of non-small lung cancer through ERK/c-Myc signal. In addition, DAPK3 regulates autophagy responses through phosphorylation of Beclin 1 at Ser90 in breast cell lines, MCF-7 cells.

研究分野：農学

キーワード：炎症 DAPK3 オートファジー がん 腸

1. 研究開始当初の背景

Death associated protein kinase (DAPK)ファミリー蛋白質は主に細胞死や転写調節シグナルを制御するセリン・スレオニンキナーゼである。DAPKファミリー蛋白質は DAPK1, DAPK2, DAPK3, DAPK-related apoptosis-inducing protein kinase (DRAK)1 そして DRAK2 の5つからなり、DAPK1, DAPK2, DAPK3 はいずれもマウスやラットにおいて様々な組織に広く発現している。DAPKファミリー蛋白質の中で DAPK1 はアポトーシスやオートファジー制御に重要な役割を果たすことが広く知られている。その一方で、DAPK3 についてはほとんど生理的・病態生理的機能に関する研究がなされていなかった。

我々はこれまでに自然発症高血圧ラット (SHR) の腸間膜動脈において DAPK3 蛋白質発現が特異的に亢進すること (Usui et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2011) や DAPK3 が TNF- α による血管炎症性反応を介して高血圧症の進展を促進することを初めて明らかにした (Usui et al., *Hypertension*, 2012)。

腸粘膜上皮細胞は異物の侵入を食い止める防御機能だけでなく、炎症性反応にも深く関わっており、炎症性腸疾患を制御する。最近、DAPK1 がヒトの潰瘍性大腸炎組織の粘膜上皮細胞において発現が亢進し、その病態制御に関わる可能性が示された (Chakilam et al., *Am J Pathol*, 2013)。しかしながら、腸組織を構成する粘膜上皮細胞及び間質(線維芽細胞、血管細胞)における DAPK3 の機能や炎症性腸疾患進展に及ぼす影響については全く検討されていない。また、炎症性腸疾患は大腸がんのリスクを増加させることが知られているが、がん細胞における DAPK3 の役割についてもほとんど検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では腸上皮細胞および腸間膜動脈平滑筋細胞における DAPK3 の炎症制御メカニズムおよびさまざまながん細胞における DAPK3 の機能を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス小腸上皮細胞株 aMOC1 を用いて炎症性サイトカイン IL-1 β 誘導性あるいはがん遺伝子 HRasV12 誘導性の炎症性反応に対する DAPK3 阻害薬および DAPK3 遺伝子ノックダウンの影響を検討した。また、ラット腸間膜動脈平滑筋細胞における DAPK3 の増殖、遊走に及ぼす影響を検討した。

(2) 肺がん細胞株 A549, Lu99, Lu139, EBC-1, PC9 を用いて DAPK3 遺伝子を安定的にノックダウンした DAPK3 shRNA 導入細胞を作製し、細胞増殖、遊走、浸潤、コロニー形成能および腫瘍形成能に及ぼす影響を検討した。

(3) 乳がん細胞株 MCF7 および HeLa を用いて飢餓刺激時の DAPK3 によるオートファジー促進因子 Beclin 1 のリン酸化制御メカニズムを検討した。

4. 研究成果

(1) 腸上皮および間質細胞の炎症、増殖、遊走における DAPK3 の役割

aMOC1 において DAPK3 ノックダウンあるいは DAPK3 阻害薬は IL-1 β による炎症性反応に影響を及ぼさなかった。同様に、HRasV12 誘導性の炎症性反応、細胞老化に対しても影響を及ぼさなかった。血管平滑筋細胞において DAPK3 ノックダウンは PDGF による増殖、遊走を抑制し p38 および HSP27 のリン酸化を特異的に抑制した。また、マウス頸動脈障害モデルにおいても DAPK3 阻害薬処置は内膜新生を抑制した。以上の結果から DAPK3 は腸上皮細胞における炎症には関与しなかったが、PDGF-BB による p38/HSP27 シグナルの活性化を介して腸間膜血管平滑筋細胞の増殖と遊走を促進することが明らかとなった (Usui et al., *Clinical Science*, 2014)。

(2) 肺がん進展における DAPK3 の役割

DAPK3 ノックダウンは非小細胞肺がん細胞株 A549 および Lu99 の細胞増殖および cyclin D1 発現、ERK および c-Myc のリン酸化

化を抑制した。さらに、A549において DAPK3 ノックダウンは細胞の遊走、浸潤およびコロニー形成を抑制した。また、DAPK3 ノックダウン細胞を免疫不全マウスに移植し、腫瘍形成能に及ぼす影響を検討したところ DAPK3 ノックダウンはマウス体内での腫瘍形成を抑制した。以上の結果から、DAPK3 は ERK/c-Myc シグナルの制御を介して非小細胞肺癌の進展を促進する可能性が明らかとなった(第 38 回日本分子生物学会年会にて発表, Usui et al., Plos One, submitted)。

(3) 乳がん細胞における DAPK3 のオートファジー制御メカニズム

乳がん細胞株 MCF-7 において DAPK3 ノックダウンは飢餓刺激によるオートファジー促進因子 Beclin 1 のリン酸化を抑制した。一方で、DAPK1 ノックダウンは Beclin 1 のリン酸化に影響を及ぼさなかった。同様に DAPK3 リコンビナント処置は Beclin 1 のリン酸化を誘導した。さらに DAPK3 阻害薬は PP2A 阻害薬オカダ酸による Beclin 1 のリン酸化を抑制した。以上の結果から DAPK3 が Beclin 1 のリン酸化制御を介して乳がんにおけるオートファジーを制御することが明らかになった(Fujiwara et al., *J Biol Chem*, 2016)。

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 2 件)

(1) Fujiwara N, Usui T, Ohama T, Sato K. 2016. Regulation of Beclin 1 Protein Phosphorylation and Autophagy by Protein Phosphatase 2A (PP2A) and Death-associated Protein Kinase 3 (DAPK3). *J Biol Chem*. 291:10858-10866.

(2) Usui T, Sakatsume T, Nijima R, Otani K, Kazama K, Morita T, Kameshima S, Okada M,

Yamawaki H. 2014. Death-associated protein kinase3 mediates vascular structural remodeling via stimulating smooth muscle cell proliferation and migration. *Clinical Science (Lond)*. 127:539-548.

[学会発表] (計 3 件)

(1) 臼井達哉、大浜剛、山脇英之、佐藤晃一. Death-associated protein kinase 3 promotes proliferation and migration of A549 human lung cancer cells via activating the ERK/c-Myc signaling. 第 88 回日本薬理学会年会. 2015 年 3 月 19 日. 愛知県名古屋市 名古屋国際会議場.

(2) Fujiwara N, Usui T, Sato K, Ohama T. Regulation of Beclin 1 association with Atg14L and autophagy by PP2A and DAPK3. Europhosphatase 2015. 2015 年 6 月 25 日. Turku, Finland.

(3) 臼井達哉、大浜剛、山脇英之、佐藤晃一. Mechanisms of death-associated protein kinase3 to regulate the development of lung cancer. 第 38 回日本分子生物学会年会. 2015 年 12 月 2 日. 兵庫県神戸市神戸ポートアイランド.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

山口大学獣医薬理・毒性学研究室ホームページ

(<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~vetpharm/index.html>)、研究成果を公開し情報発信している。

6. 研究組織

(1) 研究代表者 白井 達哉 (Tatsuya Usui)

山口大学・共同獣医学部・助教

研究者番号：80727652