

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08300

研究課題名(和文)がん細胞のストレス応答と難治がん治療戦略の基盤研究

研究課題名(英文)Stress response of cancer cells and its research for intractable cancer therapy

研究代表者

北嶋 繁孝(KITAJIMA, Shigetaka)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：30186241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト大腸がんではWntシグナルは主な遺伝子変異である。さらに、がん抑制遺伝子p53は、ストレス応答遺伝子とともに抗がん剤治療への反応性を決めている。本研究では、ストレス応答転写因子ATF3とp53のダブルノックアウトモデル細胞のDNA損傷応答の解析から、p53依存性および非依存性のATF3標的遺伝子群の複数のクラスターを見出した。さらに、ヒト大腸がんHCT116細胞において、ATF3は、TCF4結合型の直接的な標的遺伝子であるが、がんの浸潤と遊走を抑制するWntシグナルの負に制御する因子であった。今回の成果は、ATF3がヒト大腸がんの発症と進展を抑制する治療ターゲットになりうることを示した。

研究成果の概要(英文)：Aberrant signaling of Wnt pathway and p53 inactivation is one of major genetic hallmarks of human colorectal cancer. At the same time, stress response to DNA damage is deeply involved in susceptibility of cancer cells to DNA damage. In this study, we performed system analysis of DNA damage response of double knockout MEF of p53 and stress response gene ATF3, and clearly identified gene clusters of p53 targets positively or negatively regulated by ATF3. We further showed that ATF3 gene contains atypical TCF4 binding motif at its very proximal promoter and is a direct target of b-catenin binding in human HCT116 colorectal cancer cells. Using genetically hemi-targeted HCT116 cells with wild or mutant b-catenin allele, we demonstrated that ATF3 plays role of suppressing cancer cell invasion and migration. ATF3 could be a target for chemotherapy and prevention of human colon cancer.

研究分野：遺伝子発現、ゲノム医学

キーワード：難治がん ストレス応答 Wnt p53 ATF3 がん遊走浸潤

## 1. 研究開始当初の背景

### ストレス応答転写因子 ATF3

CREB/ATF ファミリーに属する bZip 型転写因子 ATF3 は、細胞のストレスセンサーのハブとして働き (Kitajima S. et al. ATF3. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* June 2009. <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/ATF3ID719ch1q32.html>)、UV・DNA 損傷・酸化・低酸素などの刺激によって誘導される細胞死に関わる。我々は、ATF3 が、発がん遺伝子 c-myc の下流標的遺伝子として細胞増殖に必須であること (*EMBO J*, 2005)、p53 の転写を抑制すること (*JBC*, 2002) など ATF3 の発がん機能を見出した。事実、ヒト前立腺がん、ホジキンリンパ腫、乳がん、皮膚がんにおいて ATF3 の発がん機能が報告されており、ATF3 は、細胞死と細胞増殖を制御する。

### ATF3 コアネットワークと p53 との相互作用

我々は、ATF3 が「がん抑制遺伝子 p53」の直接の下流標的遺伝子であること (*BBRC 2002*)、抗がん剤や UV 刺激による細胞死 (*Blood 2000*, *Cancer Res 2006*, *Cell Death & Diff 2008*)、DNA 修復機構 (*Cell Death & Diff 2009*) に於ける ATF3 のがん抑制機能を報告してきた。また、p53/Atf3 のダブルノックアウトマウスを作製し、基盤 C (24~26 年度) と新学術システムがん (23~26 年度) において、DNA 傷害応答における ATF3 標的遺伝子の網羅的解析 (*PLoSOne 2011*, GEO 登録番号:GSE18457)、TRAIL 細胞死受容体 DR5 が ATF3 の標的遺伝子であることを見出した。 (*Oncogene 2012*)。

### 小胞体ストレス経路による抗がん作用への関わり

我々は、様々な還元ストレスが血管内皮の ATF3 を誘導し細胞死に関わることを報告したが (*Blood 2000*, *JBC2001*, *BBRC 2001*)、最近、Zerubone や選択的 Cox2 阻害剤 Celecoxib、さらには、SAHA を含む HDAC 阻害剤が小胞体 PERK-eIF2-ATF4-ATF3/CHOP 経路によって、p53 変異がん細胞で DR5 発現を誘導し TRAIL 依存性細胞死を惹起することを見出した (*JBC 2014*, *BBRC 2014*)。p53 変異を伴う難治進行がんの治療において、小胞体ストレスを応用することの意義を示唆した。

## 2. 研究の目的

転写因子 ATF3 は、p53 および ER ストレスの標的遺伝子であり細胞のストレスセンサーのハブ機能を有している。がん細胞は、正常細胞が増殖停止や細胞死を起こす環境に適応し正常細胞とは異なるストレス応答を有している。その特性を明らかにし、ストレス応答の特性に基づいた抗がん治療戦略の生物学的基盤を提示する。

## 3. 研究の方法

### 遺伝子改変 p53/ATF3 ノックアウトの個体発がんの解析とストレス応答ネットワーク構築

p53 と ATF3 のダブルノックアウト MEF の Doxorubicin 応答の時系列システムズ解析を完成させる。

### 正常細胞とがん細胞のストレス応答

ヒト正常細胞とがん細胞との ER ストレス含めた応答の違いを明らかにする。

### Wnt 標的遺伝子 ATF3 のがん浸潤、転移抑制機能

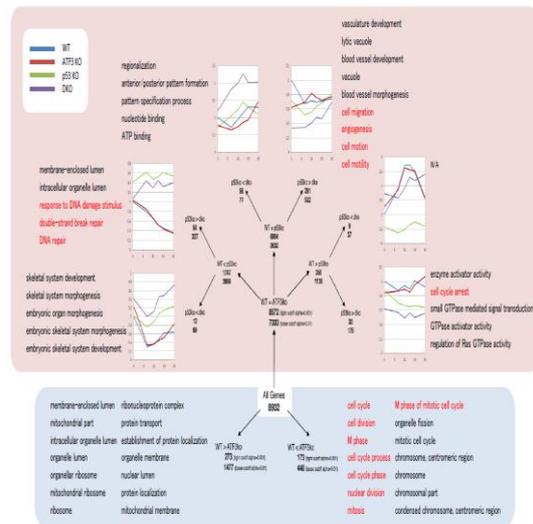
Wnt/b-catenin 変異を有するヒト大腸がん細胞 (HCT116 含む) を用いた機能解析を行う。

## 4. 研究成果

### ①遺伝子改変 p53/ATF3 ノックアウトのストレス応答ネットワーク構築

p53 と ATF3 のダブル KO 細胞の DNA 傷害応答の遺伝子変動を解析した。図 1 の下段 (グレー部分) は、ATF3KO で抑制 (図 1 下段左)、活性化 (図 1 下段右) される遺伝子数を示す。

図 1



細胞周期に関わる遺伝子群が ATF3 によって抑制されており、p53 存在下での ATF3 のがん抑制機能を示唆した。次に、ATF3KO で変動を示さない遺伝子 (上段) を、p53KO 効果によって左方、上方、右方に分類し、クラスター解析を行った (一番外側)。興味深いことに細胞遊走、血管新生、細胞運動関連遺伝子が ATF3 により活性化されることが見出された。これらのことから、p53 標的遺伝子 ATF3 は、p53 存在下ではがん抑制作用を示すが、非存在下ではむしろ発がんに関連する遺伝子の制御を行っていることが示された。

次に、ストレス応答遺伝子変動の継時的な解析を行い、500クラスターの中から特徴的な以下の6つのクラスターを見出した(図2A)。

(A) A: activator, R: repressor

a) クラスター147: ATF3/p53 (A/R) ATF3のactivator機能はp53非存在下で強調。免疫応答関連遺伝子がクラスタリング。

b) クラスター193: ATF3/p53 (A/N)。ATF3はp53に無関係に活性化。

c) クラスター264: ATF3/p53 (A/N) クラスター193と似るが、ATF3の活性化機能はp53存在下で見られるが、p53非存在下では見られない。

d) クラスター345: ATF3/p53 (R/R)。p53存在下でATF3は抑制するが、p53非存在下では抑制機能がない。

e) クラスター379: ATF3/p53 (A/R)。ATF3のactivator機能はp53存在下で強い。

f) クラスター467: ATF3/p53 (A/A)。ATF3、p53がCo-activatorとして働く。

ATF3 TCF4WT	C T A T A A A A G G G G
ATF3 mTCF4-1	C T A T A A A A C C C G
ATF3 mTCF4-2	C T G C A A A A G G G G
ATF3 mTCF4-3	C T A T A A T A G G G G
MMP7	A C A T C A A A G T A G
cyclinD1	A G A T C A A A G C C C
HXB2.K03455	T C A A T A A A G C T T
HIV4C6LTR.L28911	T C A A T A A A G C T T

図3

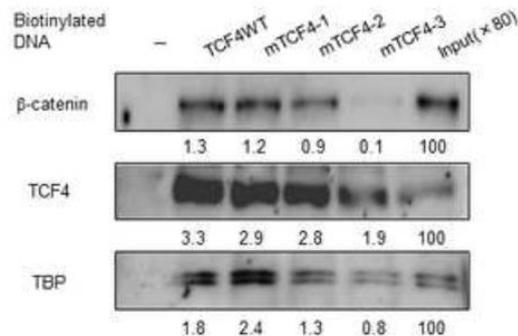


図4

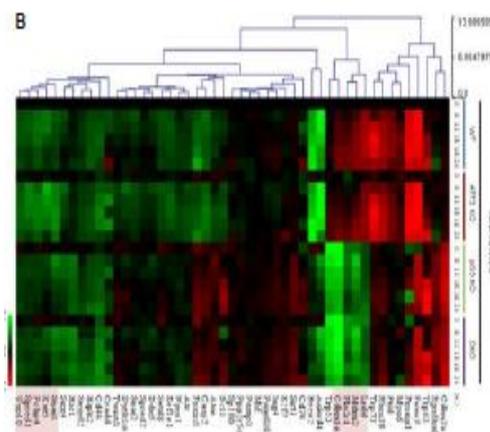
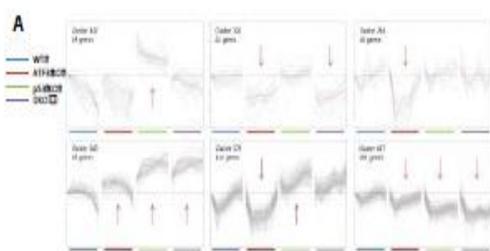


図2: 経時変化 (2A), ヒートマップ (2B)

多くのWnt標的遺伝子は、その発がん機能を担うことが多い。そこで、ATF3のがん遊走及び浸潤への影響を解析したところ、ATF3はこれらの抑制に関わることを見出した。以上より、ATF3は、ヒト大腸がんに見られる異常Wntシグナルの標的遺伝子であるが、がん細胞の遊走、浸潤に対して抑制的に働くネガティブな機能が示された(図5、図6)。

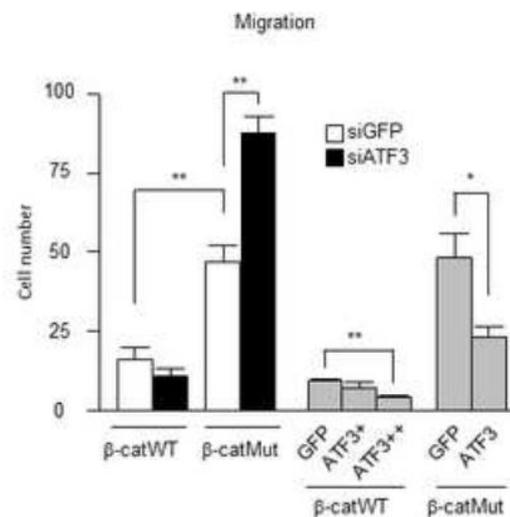


図5

## ②Wnt標的遺伝子 ATF3 のがん浸潤、転移抑制機能

ヒト大腸がん HCT116 細胞は Wnt のコンポネント β catenin のヘテロ変異体であるが、それぞれのヘミターゲット細胞株の ATF3 発現レベルを解析したところ、β catenin 変異体が野生型と比べ顕著に高いことを見出し、ヒト前立腺がん細胞で報告されたように、ATF3 遺伝子の近位プロモーター部位-34~-28 の TCF4 結合配列に TCF4/β catenin が結合することを見いだした(図3、図4)。

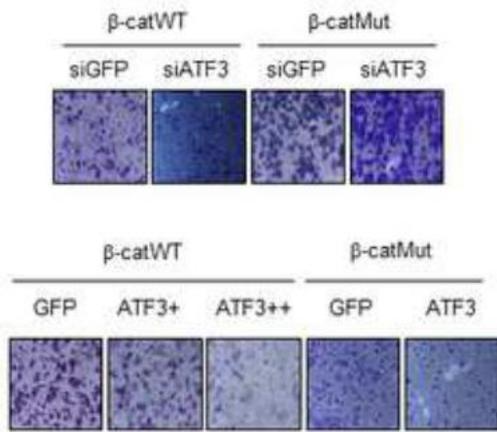


図 6

## 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 4 件 全て査読有)

- ① Inoue M, Uchida Y, Edagawa M, Hirata M, Mitamura J, Miyamoto D, Taketani K, Sekine S, Kawauchi J, Kitajima S. The stress response gene *ATF3* is a direct target of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and inhibits the invasion and migration of HCT116 human colorectal cancer cells. *PLoS ONE* 2018 doi: 10.1371/journal.pone.0194160
- ② Vikas S, Dhurjhoti S, Parashar D, Manish S, Utsav S, Kitajima S, Manjula K, Chowdhury S, Sudhanshu V. ATF3 hyper-induced during Japanese encephalitis virus infection negatively regulates the antiviral signalling in neuronal cells in the absence of type I interferons. *Sci Rep* 2017, 7(1):8789. doi: 10.1038/s41598-017-08584-9..
- ③ Fukasawa K, Iezaki T, Ozaki K, Onishi Y, Takahata Y, Yoneda Y, Takarada T, Kitajima S, Vacher J, Hinoi E. *ATF3* deficiency protects against RANKL-induced osteoporosis by suppressing proliferation of osteoclast precursors. *Sci Rep* 2016, 6:30918. doi: 10.1038/srep30918
- ④ Iezaki T, Ozaki K, Fukasawa K, Inoue M, Kitajima S, Muneta T, Takeda S, Fujita H, Onishi Y, Horie T, Yoneda Y, Takarada T, Hinoi E. ATF3 deficiency in chondrocytes alleviates osteoarthritis development *J Pathology* 2016 DOI: 10.1002/path.4739

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

:

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

東京医科歯科大学難治疾患研究所

[www.tmd.ac.jp/mri/bgen/message.html](http://www.tmd.ac.jp/mri/bgen/message.html)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

北嶋繁孝 (KITAJIMA, Shigetaka)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号: 30186241

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

川内潤也 (KAWAUCHI, Junya)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号: 20544498

(4) 研究協力者

井上允 (INOUE, Makoto) 東京医科歯科大学・  
医歯学総合大学院・大学院生

枝川真 (EDAGAWA, Makoto) 九州大学・医学  
研究院・大学院生

内田洋平 (UCHIDA, Yohei) 東京医科歯科大学・  
難治疾患研究所・研究補助員