

令和元年5月27日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15622

研究課題名(和文)細胞内足場タンパク質AKAP12の血管内皮活性化制御機構の解明と転移治療への応用

研究課題名(英文)Clarification of endothelium activating mechanism regulated by AKAP12 and therapeutic application for metastasis

研究代表者

村松 昌(Muramatsu, Masashi)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・助教

研究者番号：50568946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：血液中の癌細胞は転移先臓器の活性化した血管内皮細胞に接着して血管外へ浸潤する。AKAP12は様々なシグナル伝達分子との結合を介して時空間的に細胞内シグナル調節を行う。申請者はAKAP12欠損マウスや初代培養細胞を用いた実験によって、AKAP12による転移抑制機構の解明を試みた。その結果、AKAP12はがん遺伝子SrcとStat3の不活性化を介した線維芽細胞からの内皮活性化因子VEGFの分泌抑制と、内皮細胞における接着分子E-セレクトインの発現抑制を担っていることが解った。すなわち、AKAP12が欠損すると線維芽細胞と血管内皮細胞が活性化して転移を促進するというメカニズムが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移には血液中のがん細胞が活性化した血管内皮細胞に接着することが必須である。一方、AKAP12は時空間的に細胞内シグナルを調節する。本研究では、患者の転移組織において認められるAKAP12の発現低下と転移促進の関係を、様々な実験モデルを用いて検証した。その結果、AKAP12の欠損は「血管内皮細胞上の接着分子発現誘導」と「線維芽細胞の細胞老化性分泌による血管内皮細胞の活性化」を介して転移を促進することを明らかにした。これはAKAP12の転移先臓器における新規機能を明らかにしただけでなく、このメカニズムを標的とする新しい転移治療法の開発に繋がる基盤的研究成果になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：AKAP12 controls Src signaling through direct scaffolding activity. AKAP12 is downregulated in the metastases of many human cancer types, and AKAP12-null mice (KO) are metastasis-prone. Here, we show that lung metastasis formation by mouse melanoma cells is 9-fold higher in syngeneic KO compared to WT hosts. Although melanoma cells adhered equally to KO or WT lung fibroblasts (LF), co-injection of melanoma cells with KO-LF increased lung metastasis at foci of activated endothelium. Increased melanoma adhesion on KO lung endothelial cells (LEC) was facilitated by increased E-Selectin and enhanced by VEGF from KO-LF. Finally, the ability of AKAP12 to attenuate Stat3 activation in KO-LF required its Src-scaffolding domain. Taken together, these data suggest that AKAP12 normally suppresses metastatic colonization by attenuating the expression of Selectin in local endothelial cells and VEGF secreted by neighboring fibroblasts in an AKAP12-regulated, Src/Stat3-dependent manner.

研究分野：病態医化学

キーワード：転移抑制遺伝子 血行性転移 血管内皮細胞 接着分子発現機構 線維芽細胞 SASP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌が増殖すると近隣組織の血管内へ浸潤する。血管内へ浸潤した癌細胞は血液中を漂い、転移する臓器の血管内皮細胞に接着して血管外へ浸潤する。このことは、転移成立に至る重要なステップである。転移先となる遠隔臓器では、様々な外因性要因（放射線や加齢、発がん物質等の暴露など）による遺伝子発現の変化（欠損や変異）によって血管の恒常性が破綻し、転移促進性の微小環境が形成されるが、これには細胞内外からのシグナルによる血管内皮細胞の活性化が必須である。本研究の対象分子である AKAP12 は細胞内に存在する足場タンパク質であり、その分子内の様々なシグナル伝達分子との結合領域を介して時空間的な細胞内シグナルの調節を行う（図1）。AKAP12 欠損（KO）マウスは、前立腺の過形成や扁平上皮癌の発癌試験に対する高い感受性を示し、癌抑制遺伝子 Rb の前立腺特異的欠損マウスとの交配によって前立腺の異形成と鼠径リンパ節転移を生じることから、発癌・転移促進性の微小環境の解析に最適なモデルマウスである。我々は、KO マウスと野生型（WT）マウスそれぞれに癌細胞を静脈投与する肺転移モデルの解析によって、肺組織における AKAP12 の欠損が血管内皮細胞の活性化を誘導して転移を促進するという研究結果を得た。しかし、この研究成果を効果的な転移治療へ結び付けるためには、阻害標的となる特異的な分子や遺伝子の探索および同定が不可欠であり、AKAP12 による血管内皮細胞の活性化を介した転移促進性の微小環境形成の細胞内シグナル分子による制御調節機構の解明が期待されている。

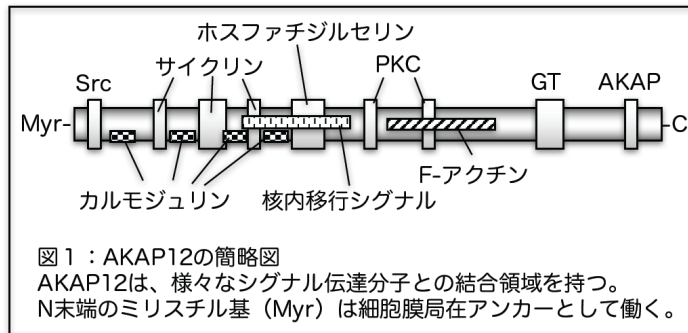


図1：AKAP12の簡略図
AKAP12は、様々なシグナル伝達分子との結合領域を持つ。
N末端のミリスチル基（Myr）は細胞膜局在アンカーとして働く。

2. 研究の目的

癌患者における血行性転移の成立は、血中の癌細胞が転移先臓器へ生着するステップに大きく依存する。癌細胞は血管内皮細胞上の接着分子を介して血管外浸潤・転移するが、これには血管内皮細胞の活性化が必須である。我々は、癌を取り巻く間質における細胞内足場タンパク質 AKAP12 の発現低下が「血管内皮細胞上の接着分子発現誘導」と「線維芽細胞の細胞老化性分泌による血管内皮細胞の活性化」を介して転移促進に寄与することを見出した。しかし、この転移制御機構を治療法開発へ応用するためには、その細胞内シグナルおよび転写レベルでの解明による標的分子の探索・同定が不可欠である。そこで本研究では、AKAP12 による血管内皮細胞の活性化を介した転移促進性の微小環境形成における分子メカニズムを解明し、この機構を阻害する新しい転移治療法の開発へ繋がる基盤的基礎研究の遂行を目的とする。

3. 研究の方法

本研究計画では、AKAP12 による血管内皮細胞活性化の分子機構を血管内皮細胞と線維芽細胞の視点から細胞内シグナル・転写レベルで明らかにし、転移治療標的の探索に繋げる。目的完遂のために、[1] AKAP12 による接着分子 E-セレクトインの発現を制御する細胞内シグナルの解明、[2] AKAP12 による線維芽細胞の細胞老化と血管内皮細胞活性化因子分泌メカニズムの解明、[3] 治療標的となり得るシグナル経路・分子の阻害による転移治療効果の検討、を行う計画である。in vitro および in vivo による実験系を用い、血管内皮細胞活性化による転移促進性の微小環境形成を標的とした転移治療へ展開できる基盤研究を目指す。

4. 研究成果

我々は AKAP12 欠損（KO）マウスにおける肺転移がどのような機序を介して亢進するのかを同定するために、2 種類の悪性黒色腫由来細胞（B16-F10 および SM1WT1）を用いて肺転移モデルを詳細に解析した。これらの細胞株はヒトの悪性黒色腫に見受けられる BRAF 遺伝子が野生型の細胞 B16-F10 と BRAF 遺伝子に変異のある細胞 SM1WT1 であり、これらを用いることによって悪性黒色腫のほぼ全般の挙動を把握することが期待できる。これらの細胞を尾静脈投与した後の経時的なサンプリングの結果、KO マウスでは癌細胞の肺への接着が亢進していることが示唆された（図2）。このことから、野生型（WT）マウスと KO マウスの肺から単離してきた血管内皮細胞上の細胞接着因子の発現を検討したと

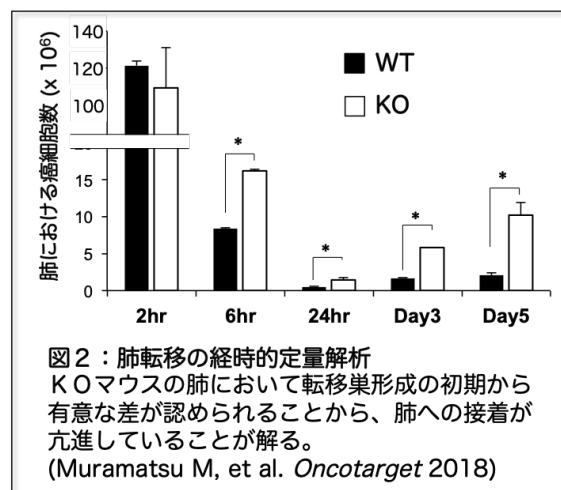


図2：肺転移の経時的定量解析
KOマウスの肺において転移巣形成の初期から有意な差が認められることから、肺への接着が亢進していることが解る。
(Muramatsu M, et al. *Oncotarget* 2018)

ころ、E-セレクトインの発現がKOマウス由来の肺内皮細胞（Lung Endothelial Cell: LEC）で亢進していることが明らかとなった。このことから、AKAP12が欠損している血管内皮細胞では、細胞接着因子のE-セレクトインが発現亢進し、転移促進性に寄与していることが解った。

また、肺の微小環境を構成するその他の細胞として線維芽細胞が考えられるため、WTマウスおよびKOマウスの肺由来線維芽細胞（Lung Fibroblast: LF）の転移への寄与を検討するために、WT-LFもしくはKO-LFを前移植する肺転移モデル系を確立し、転移の検討を行った（図3）。

その結果、KO-LFを前移植したマウスでは、転移の増加が認められた。そこでWT-LFとKO-LFの違いを炎症性シグナルの視点から検討すると、KO-LFにおいて転写因子のSTAT3の活性化と細胞老化の亢進が生じていることを見出した。細胞老化性分泌（Senescence-associated Secretory Phenotype: SASP）が起きると炎症性サイトカインや細胞活性化因子の分泌が亢進することが報告されていることからKO-LFからの分泌因子を探索したところ、代表的な血管新生因子であるVEGFの発現が増加していることも見出した。これらのことから、AKAP12の欠損によってSASPに陥ったKO-LFからVEGF等が分泌され、隣接する血管内皮を活性化しているという仮説を立てた。それを立証するためにLFとLECの

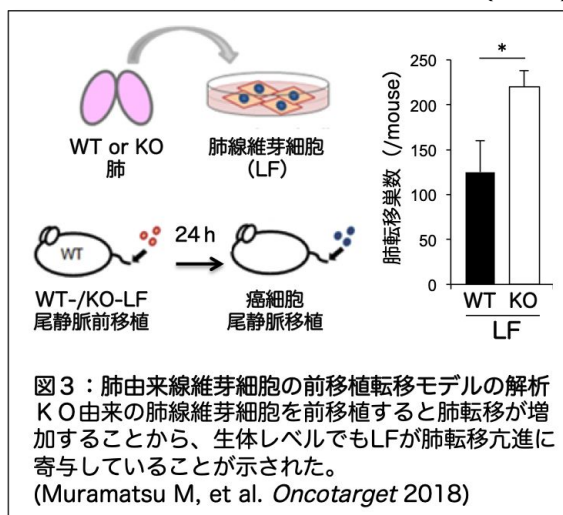


図3：肺由来線維芽細胞の前移植転移モデルの解析
KO由来の肺線維芽細胞を前移植すると肺転移が増加することから、生体レベルでもLFが肺転移亢進に寄与していることが示された。
(Muramatsu M, et al. *Oncotarget* 2018)

共培養実験を行った。その結果、KO-LFの馴化培地をLECに処理すると、LECにおけるE-セレクトインの発現が亢進することや、癌細胞の接着が増加することが示された。これはKO-LFとKO-LECの組み合わせで最も顕著に生じることが解った。更に、AKAP12による細胞内シグナル制御経路を検討するために、AKAP12分子内のシグナル伝達分子の結合領域を欠損した変異体を5種類作製してKO-LFに導入し、炎症性シグナルのSTAT3の活性化が生じるか、抑制されるかを検討した。その結果、癌遺伝子であるSrcとの結合領域を欠損したAKAP12変異体を導入したKO-LFのみでKO-LFと同様のSTAT3の活性化を認めた。このことから、AKAP12が欠損するとSrcの制御が不能になり、STAT3が活性化してVEGFの発現亢進し、近隣のLEC上のE-セレクトイン発現を上昇させることで肺転移巣の形成に寄与しているという新しい転移巣形成メカニズムが明らかとなった。これらの研究成果から、AKAP12の制御による転移抑制メカニズムが明らかとなったことで、このシグナル経路やその調節シグナル分子を標的とした新たな転移治療法開発の基盤となる基礎研究が達成できたと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は太字と下線で示す)

[雑誌論文](計5件)

- (1) Sato M, Miyata K, Tian Z, Kadomatsu T, Ujihara Y, Morinaga J, Horiguchi H, Endo M, Zhao J, Zhu S, Sugizaki T, Igata K, **Muramatsu M**, Minami T, Ito T, Bianchi ME, Mohri S, Araki K, Node K, Oike Y. Loss of Endogenous HMGB2 Promotes Cardiac Dysfunction and Pressure Overload-Induced Heart Failure in Mice. *Circ J*. 2019 Jan 25;83(2):368-378. doi: 10.1253/circj.CJ-18-0925. Epub 2018 Nov 27. (査読有り)
- (2) **Muramatsu M**, Akakura S, Gao L, Peresie J, Balderman B, Gelman IH. SSeCKS/Akap12 suppresses metastatic melanoma lung colonization by attenuating Src-mediated pre-metastatic niche crosstalk. *Oncotarget*. 2018 Sep 11;9(71):33515-33527. doi: 10.18632/oncotarget.26067. eCollection 2018 Sep 11. (査読有り)
- (3) Higaki S, **Muramatsu M**, Matsuda A, Matsumoto K, Satoh JI, Michikawa M, Niida S. Defensive effect of microRNA-200b/c against amyloid-beta peptide-induced toxicity in Alzheimer's disease models. *PLoS One*. 2018 May 8;13(5):e0196929. doi: 10.1371/journal.pone.0196929. eCollection 2018. (査読有り)
- (4) **Muramatsu M**, Gao L, Peresie j, Balderman B, Akakura S, Gelman HI., SSeCKS/AKAP12 scaffolding functions suppress B16F10-induced peritoneal metastasis by attenuating CXCL9/10 secretion by resident fibroblasts, *Oncotarget*, 2017, 8:70281-70298. (査読有り)
- (5) Yamamoto S, **Muramatsu M**, Azuma E, Ikutani M, Nagai Y, Sagara H, Koo BN, Kita S, O'Donnell E, Osawa T, Takahashi H, Takano KI, Dohmoto M, Sugimori M, Usui I, Watanabe Y, Hatakeyama N, Iwamoto T, Komuro I, Takatsu K, Tobe K, Niida S, Matsuda N, Shibuya M, Sasahara M, A subset of cerebrovascular pericytes originates from mature macrophages in the very early phase of vascular development in CNS, *Sci Rep.*, 2017, Jun 20;7(1):3855. (査読有り)

〔学会発表〕(計5件)

(研究代表者は太字と下線で示す)

- (1) **Muramatsu M**, NFAT-DSCR-1 signal regulates vascular integrity, 16th Korea-Japan Joint Symposium of Vascular Biology, 2018年9月14~15日
- (2) **村松昌**, Down Syndrome Critical Region (DSCR)-1 in endothelial cells controls tumor angiogenesis and pulmonary tumor metastasis, 第77回日本癌学会年会, 2018年9月27~29日
- (3) **Muramatsu M**, Double edge sword of the Down Syndrome Critical Region (DSCR)-1 function in Endothelial cells proliferation and maintenance, Gordon Research Conferences -Angiogenesis-, 2017年8月6日~8月11日
- (4) **Muramatsu M**, AKAP12 scaffolding functions suppress peritoneal metastasis by attenuating CXCL10 secretion by resident fibroblasts, 第76回日本癌学会学術総会, 2017年9月28日~9月30日
- (5) **村松昌**, UJA 留学のすすめ 2017 日本の科学技術を推進するネットワーク構築, 第40回分子生物学会学術総会, 2017年12月7日

〔その他〕

ホームページ等

- (1) 熊本大学生命資源研究・支援センター分子血管制御分野ホームページ
<http://irda-vascular.kuma-u.jp/>
- (2) 熊本大学薬学部/大学院薬学教育部ホームページ
http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/awards_activities/

6. 研究組織

- (1) 研究分担者