

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791171

研究課題名（和文）酸化ストレス応答性転写因子による腫瘍血管新生制御

研究課題名（英文）Tumor-angiogenesis of ATF3

研究代表者

増田 潤子（MASUDA JUNKO）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20424674

研究成果の概要：ドキシソルピシン存在下で ATF3 依存的な EphA1 発現上昇が起こることを明らかにした。さらに、EphA1 の細胞外領域はフィブロネクチン断片が結合すること、および EphA1 細胞内領域には ILK が結合することを明らかとした。ILK は細胞運動に重要な役割を示す分子であり、EphA1 に ephrin-A1 のシグナルが入ると ILK が抑制されることにより細胞接着が低下することを明らかとした。これらは、EphA1 が癌細胞の転移抑制に関わることを示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	360,000	3,260,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：(1)乳癌 (2) EphA1 (3)ATF3 (4)ephrinA1 (5)ILK (6)癌転移(7)細胞運動性

1. 研究開始当初の背景

エストロゲンは、乳癌および子宮内膜癌のリスクを上昇させることが知られている。これら女性特有の癌においても、腫瘍の増殖は血管新生依存性であり、血管内皮増殖因子(VEGF: vascular endothelial growthfactor) による血管新生が必須と考えられている。エストロゲンが VEGF の発現を上昇させていると報告があるが (*J Natl Cancer Inst.* 1995 Feb 1;87(3):213-9.)、エストロゲンによる VEGF 発現を抑制しても乳癌は発症する (*Cancer*

Res. 2002 Apr 1;62(7):1948-51.) ことから、VEGF 非依存性血管新生の存在があると考えられる。VEGF 以外の血管新生因子においては、受容体型チロシンキナーゼ群を活性化することが知られており、よく研究されているがその詳細は不明な点が多い。最近、酸化ストレス応答性転写因子 ATF3 依存性の血管新生 (*Mol Cell Biol.* 2006 Feb;26(3):1087-97)、および、*in vitro*、*in vivo* 双方において、エストロゲン応答性 ATF3 の活性化が報告された (*J Mol Endocrinol.* 2002 Oct;29(2):

175-92, *Pediatr Res.* 2005;58(6):1280-3, *Horm Res.* 2006;65(5):217-22.). ATF3 は、インターロイキン 6、インターロイキン 12b (*Nature.* 2006 11;441(7090):173-8.), 1型プラスミノゲン活性化因子阻害剤 (PAI-1; *Mol Cell Biol.* 2006 Feb;26(3):1087-97) などの遺伝子発現を制御するとして最近注目されている分子である。これらは、エストロゲン依存性の ATF3 発現による子宮内膜癌、および乳癌の血管新生の可能性を示唆する。

2. 研究の目的

そこで、エストロゲンによる ATF3 発現上昇に伴う内皮細胞の *in vitro* 血管新生の可能性を検討し、次にこれらが腫瘍血管において増殖、分化に及ぼす効果を解明し最終的にはここで得られた成果を癌治療へ応用する。

3. 研究の方法

- 1) ドキソルビシン依存性 ATF3 発現の確認をウエスタンブロット解析により確認し、ドキソルビシン存在下における ATF3 依存的血管新生の変化をインビトロ血管新生法で確認した。
- 2) EphA1 のプロモーター解析をルシフェラーゼ法にて解析した。
- 3) EphA1 の細胞外領域および細胞内領域に結合する分子の同定をイースト2ハイブリッド解析により行い、ウエスタンブロット、共焦点顕微鏡により確認した。
- 4) EphA1 の細胞内領域に結合する分子の存在下における EphA1 発現細胞の形態変化を確認した。

4. 研究成果

- 1) EphA1 は ATF3-依存的に発現亢進する

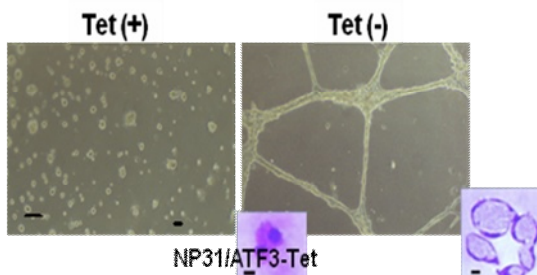


図1 マトリゲル上に撒いた NP31/ATF3-Tet 内皮細胞。培養上清からテトラサイクリンを抜くと管腔形成する。

NP31/ATF3-Tet 細胞はテトラサイクリン制御下において ATF3 を発現する。また、マトリゲル上に撒くとインビトロ血管新生をおこす細胞である (*Mol Cell Biol.* 2006 Feb;26(3):1087-97)。

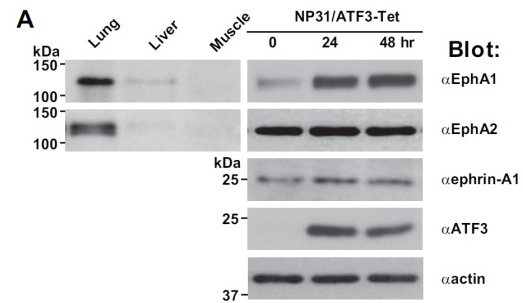


図2 NP31/ATF3-Tet 細胞における EphA1, EphA2 および ephrinA1 のタンパク質発現。テトラサイクリン非存在下における ATF3 発現において、EphA1 のみ発現上昇を認めた。

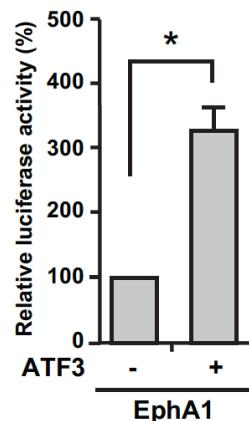


図3 ルシフェラーゼ法による EphA1 プロモーター解析。NP31/ATF3-Tet 細胞の培養上清からドキソルビシンを抜き、ATF3 を発現させた時の EphA1 のプロモーターの活性を調べた。

ATF3-依存的な血管新生に関連する分子を模索したところ、EphA1 の発現が約 5 倍上昇することを発見した。ATF3- 依存的に EphA1 遺伝子が上昇することを確認するため、EphA1 の 1109 base pairs (bp) 上流におけるプロモーター解析を行ったところ、ATF 発現に伴い、3.4 倍の上昇を認めた。これらの結果より、転写因子 ATF3 発現上昇に伴い、EphA1 の発現が起こることを、転写においてもタンパク発現においても明らかとした。

- 2) ドキソルビシン依存性 ATF3 発現とインビトロ血管新生

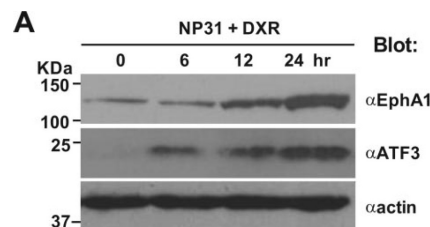


図4 ラット由来 NP31 内皮細胞におけるドキソルビシン (DXR) 添加による ATF3 発現とそれに伴う EphA1 発現のウエスタンブロット解析。

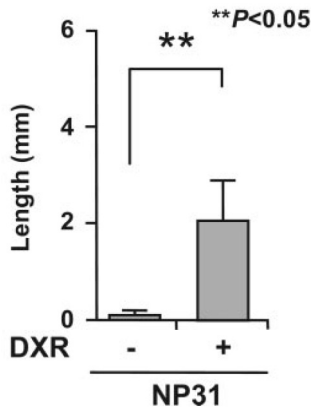


図5 ラット由来 NP31 内皮細胞のインビトロ血管新生。NP31 細胞にドキソルビシン(DXR)添加により ATF3 発現させ、マトリゲル上に撒いた。12 時間後に管腔形成を数値化した。

ドキソルビシンは、乳癌の治療薬として臨床において一般的に使用される薬物である。ドキソルビシンにより、内在性の転写因子 ATF3 発現が起こる。本研究では NP31 ラット内皮細胞においてもドキソルビシン添加により NP31 内皮細胞で ATF3 の上昇を確認した。またこの時、ATF3 発現上昇にともない、受容体チロシンキナーゼ EphA1 の発現が上昇することをウエスタンブロットにより確認した。それに伴いマトリゲル上でインビトロ血管新生が起こることを確認した。1) で用いた NP31/ATF3-Tet 細胞以外においても生理的な条件において ATF3 より EphA1 が発現誘導されることを確認した。

3) EphA1 は血管新生に重要な役割を示す

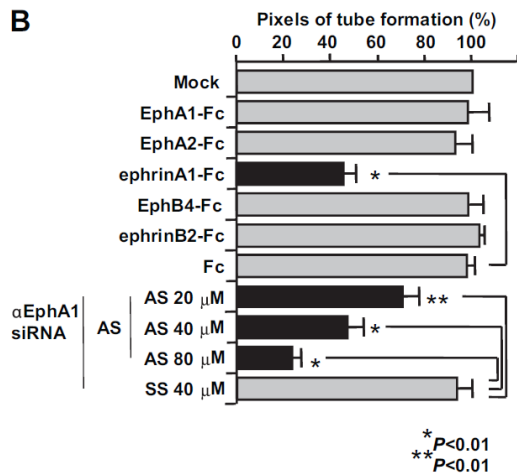


図6 NP31/ATF3-Tet 細胞を用いたインビトロ血管新生。マトリゲル上に撒いた同細胞に、様々な Eph 群、ephrin 群の可溶化タンパク質 (Fc 結合タンパク質) を培養上清に添加して 12 時間後に形成された管腔を数値化した。

NP31/ATF3-Tet 細胞を用いて EphA1 細胞外領域可溶化分子 (EphA1-Fc) および EphA1 siRNA 存在下における血管新生を見たところ、ephrin-A1-Fc は血管新生を抑制した。EphA1 siRNA 特異的にインビトロ血管新生を抑制した。

4) EphA1 の細胞外領域および細胞内領域に結合する分子の同定

- フィブロネクチン I 型リピート (I10-12) は EphA1 と結合する -

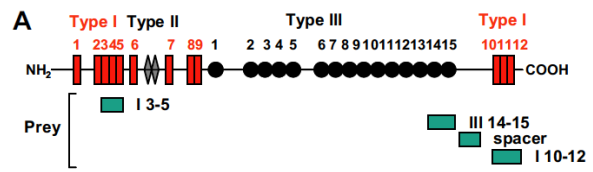


図7 フィブロネクチンの構造

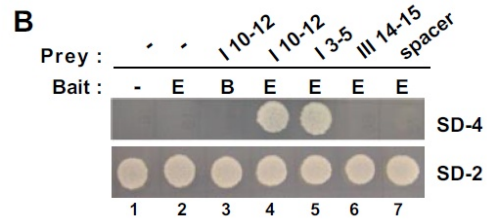


図8 イースト2ハイブリッドにおけるフィブロネクチンと EphA1 細胞外領域における結合試験。I10-12, I3-5, III 14-15 領域においては図7 参照。

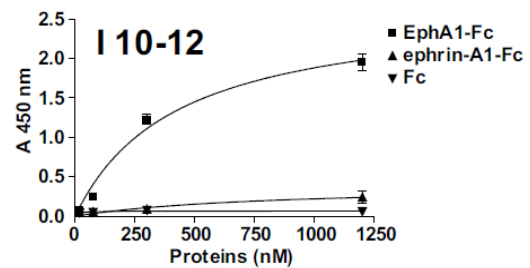


図9 ELISA プレートを用いた固層法による I10-12 と EphA1-Fc の結合試験

EphA1 の細胞外領域に結合する分子を探索するために、EphA1 の細胞外領域をベイトとし、ヒト胎盤 cDNA ライブラリーを用い、イースト

ト2ハイブリッド法を行ったところ、フィブロネクチン I 型リピートを含む配列が 4 つ候補として挙げられた。そのうち最も短いものは、アミノ酸 2094-2351 を含む I 型リピート (I10-12) であった。I10-12 を大腸菌において組み替えタンパク質を作成し ELISA プレートを用いた固層法による結合試験を行った。この方法においても、EphA1 は I10-12 と結合した。

4) EphA1-Fc と I 10-12 の共存在下では VEGF 依存的なインビガ血管新生を抑制する

A

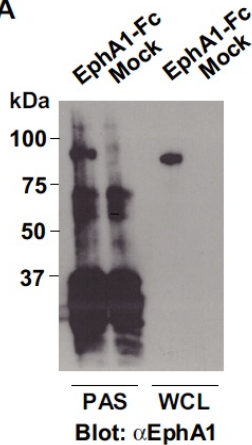


図 10 EphA1-Fc を過剰に発現する CHO 細胞 (EphA1-Fc/CHO) を作成し、培養上清を回収しプロテイン A セファロース (PAS) 結合物質を抗 EphA1 モノクローナル抗体で染色した。EphA1-Fc/CHO 細胞が EphA1-Fc を分泌することを確認した。

EphA1-Fc/CHO 細胞をヌードマウス背中に移植、形成された腫瘍から、EphA1-Fc に結合する分子を収集し、フィブロネクチン抗体を用いたウエスタンブロット法を行い、EphA1-Fc に結合する内在性フィブロネクチン断片の存在を確認した。

C

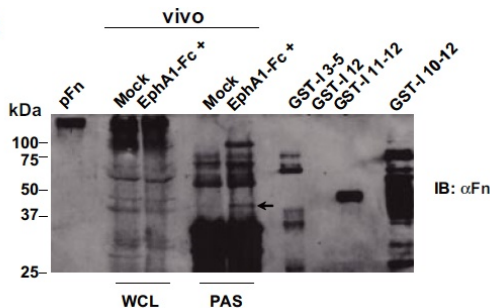


図 11 EphA1 細胞外領域はヌードマウス内在性フィブロネクチン断片と結合している (矢印)。

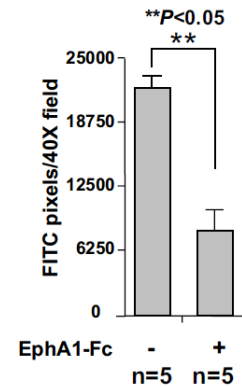
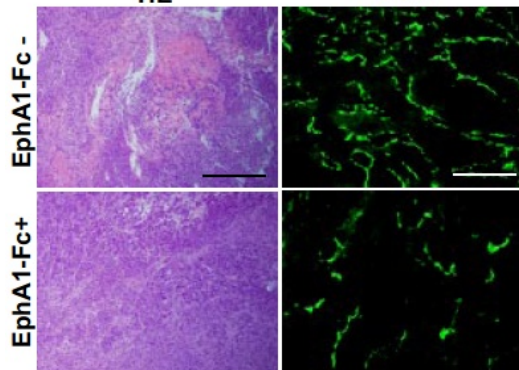
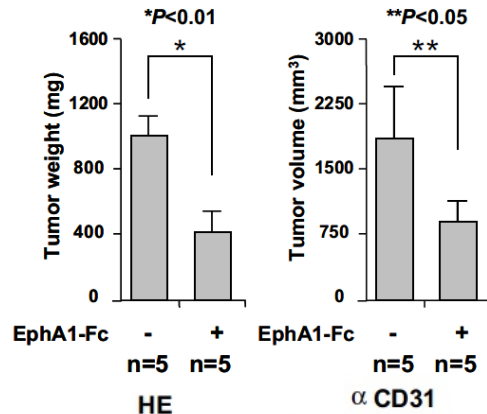


図 12 (上)EphA1/CHO の腫瘍とコントロール腫瘍 (CHO) 腫瘍の重さおよび体積の測定 (中) 腫瘍組織の CD31 染色 (下) CD31 染色の数値化

EphA1-Fc と フィブロネクチンがインビガでも結合するかを確認するため、EphA1-Fc を過剰発現する CHO 細胞を作成し、ヌードマウスに移植したところ、ヌードマウスの腫瘍内においてプロテイン A-セファロースに結合する EphA1-Fc タンパク質には約 40 kDa のフィブロネクチンが含まれることを確認した。また、EphA1-Fc の発現癌細胞 EphA1/CHO はコントロールである CHO 癌細胞に比べ、重さ、体積ともに減少していることから、腫瘍形成を抑制することを確認した。また、血管内皮マーカーである CD31 染色による、腫瘍組織の染色を行ったところ、EphA1-Fc は腫瘍内における血管新生も抑制していることも明ら

かとなった。

結論

これらのことより、ドキシソルピシン存在下で ATF3 依存的な EphA1 発現上昇が起こることを明らかにした。さらに、EphA1 の細胞外領域はフィブロネクチン断片が結合することが明らかとなった。また、ephrin-A1-Fc ではなく、EphA1-Fc が in vivo の血管新生を抑制した。このことは内皮細胞とフィブロネクチンの結合が EphA1 存在下における in vivo 血管新生の抑制を補助する働きがあるためである可能性が示唆された (*J Biol Chem.* 2008;283(19):13148-55)。

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)

増田潤子、山崎研、大森勉、秋山ひと美、白井亮介、丸義朗：EphA1 interacts with integrin-linked kinase and regulates cell morphology and motility、*J Cell Sci.* 誌 122 巻、243-55 ページ、査読有、2009 年

増田潤子、白井亮介、丸義朗：EphA1 interacts with integrin-linked kinase and regulates cell morphology and motility、*J Biol Chem.* 誌 283(19)巻、13148-55 ページ 査読有、2008 年

[学会発表](計3件)

増田潤子：EphA1 interacts with integrin-linked kinase and regulates cell morphology and motility、第31回日本分子生物学会、2008年12月10日、神戸ポートアイランド

増田潤子：EphA1 has kinase-dependent and -independent functions、第67回日本癌学会、2008年10月29日、名古屋国際会議場

増田潤子：EphA1 has kinase-dependent and -independent functions、第1回 Eph/Ephrin meeting、2008年6月25日、アメリカ・スコティッシュ州 Hawthorne 会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者

増田 潤子 (MASUDA JUNKO)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：20424674

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし