

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590373

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いたATF3の発がんとかん抑制機能の研究

研究課題名(英文) Role of ATF3 in oncogenesis and tumor suppression of model mice

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞のストレス応答の解明は、有効な抗がん剤開発に必須である。本研究課題では、遺伝子改変マウスの作成により、ストレス応答遺伝子ATF3とp53のダブル欠損マウスは、p53単独よりも早期でかつ重篤な自然がん発症と生存率の低下を来し、両者が協調的ながん抑制機能を持つことを示した。ATF3複合体にTP53BP1が含まれ、両者の分子相互作用が示唆された。さらに、複数の抗がん剤が、ヒト大腸がん細胞表面の細胞死受容体DR5の発現を誘導し、ATF3がp53との協調作用以外に活性酸素・ERストレス経路で機能することを見出した。各種抗がん剤とDR5作動薬の併用療法の作用基盤を提示できた。

研究成果の概要(英文)：Stress response of cancer cells plays pivotal role in determining output of various anti-cancer therapy. In this project, we generated double KO mice of p53 and stress response gene ATF3 and demonstrated that DKO mice developed earlier and more severe cancers and resulted in lower survival than p53 KO. Mass spectrometry of ATF3 complex identified different sets of protein components between ATF3 tumor suppressor complex and oncogene complex. However, TP53BP1 was present in both complexes. It was also found that several anti-cancer agents activated the expression of death receptor 5 (DR5) on the surface of cancer cells, sensitizing them to TRAIL or DR5 agonist. This activity is mediated by p53-ATF3 or ROS-ER stress response, providing molecular basis for useful combined therapy of conventional anti-cancer agents and DR5 agonists.

研究分野：遺伝生化学

キーワード：ストレス応答 遺伝子改変マウス ATF3 p53 抗がん剤 細胞死受容体 DR5

1. 研究開始当初の背景

(1) ストレス応答転写因子 ATF3 は、UV、DNA damage、酸化・小胞体ストレスなどに速やかに応答して細胞運命決定に関わる。我々は、細胞障害性ストレス応答時の ATF3 機能についてオリジナルの知見を報告してきた (Blood 2000 BBRC 2000 2001 JBC 2001 2002 NAR 2002)。その成果として、ATF3 はがん抑制遺伝子 p53 の標的因子であること (BBRC 2002)、逆に、誘導された ATF3 は p53 転写を抑制する negative feedback loop 機能 (JBC 2002) を持つことを提唱してきた。

(2) 一方、ATF3 は発がん遺伝子 c-Myc の標的因子でもあり、血清刺激など増殖シグナルが活性化している状況では ATF3 は細胞増殖因子として機能する (EMBO 2005)。これ以降、ヒトがん と ATF3 に関わる報告が相次いだ。前立腺がん (J urol 2006、Cancer Res. 2006)、ホジキンリンパ腫 (Blood 2006)、乳がん (Oncogene 2008)、ATL で、ATF3 を定常的に高発現していることが示され、さらに実験的 ATF3 高発現トランスジェニックマウスでの皮膚や乳腺での易発がん性が報告された (Mol. Carcinogenesis 2007、BMC Cancer 2008)。さらに、臓器移植後免疫抑制剤投与患者における皮膚がんの多発は、cyclosporin による ATF3 誘導が p53 発現を抑制する結果であることが示され (Nature 2010)、「発がん」および「がん悪性化」において ATF3 が、組織特異的、コンテキスト依存的に Opposing role をもつことを明確に示している。

(3) 我々は、上述した報告に加え、ATF3 が抗がん剤・UV による細胞死経路および DNA 修復に関わる他 (Cancer Res. 2006、Cell Death and Diff. 2008、2009)、DNA topoisomerase 阻害剤 Camptothecin (CPT) によって誘導され、がん細胞表面の細胞死受容体 DR5 を p53 依存的に発現誘導する知見を得た。このことは、がん治療における CPT と TRAIL の併用療法の効果は ATF3 発現に依存するという知見と、その効果を推測するためのバイオマーカーとしての可能性を示唆したものである。

2. 研究の目的

(1) p53 の標的遺伝子の bZIP 型転写因子 ATF3 はストレス応答遺伝子として、細胞増殖と細胞死という相反する細胞運命を制御し

ており、ヒトがんにおいて、「がん抑制」と「がん化」という正反対の働きを持つことが明らかにされつつある。

(2) 本研究課題では、遺伝子改変マウスの生物学的手法と生化学的手法を用いて、我々がこれまで明らかにしてきた ATF3-p53 相互作用の生物機能およびその分子メカニズムを解析し、その結果、ヒトがんにおける新たな治療戦略を提案する基盤成果を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 個体レベルでの p53-ATF3 機能解析
遺伝子改変マウスを作製し、がん発症とその治療薬スクリーニングを行う。

(2) ATF3 複合体の解析
抗 ATF3 モノクローナル抗体を作製し、核抽出タンパクの免疫沈降を行い、ATF3 複合体の解析を質量分析を用いて行う。

(3) ストレス応答を応用した新規がん治療戦略基盤の解析
がん細胞表面の TRAIL 受容体は、細胞死受容体としてがん治療への応用が期待されているが、各ストレス刺激がその発現レベルを誘導することを見出しているため、その作用機構の分子生物学的解析を行う。

4. 研究成果

(1) 個体レベルでの p53-ATF3 機能解析
我々は、図 1 に示す方法により遺伝子改変を行い Atf3-lox マウスを作製している。このマウスと EII-Cre マウスとの交配によって Germline Atf3 KO マウスを作製し、さらに p53 KO マウスとの交配によってダブルノックアウト (DKO) を作製した。P53 KO マウスは自然発症のがんによって生存率が短縮しているが、p53/Atf3 DKO マウスでは、p53 単独より早期に自然がん発症率が高く生存率も低かった (図 3)。このことは、ATF3 は p53 の下流で働くがん抑制遺伝子であること、その働きは p53 と協調的であることが強く示唆された。

図 1 : Atf3 遺伝子改変法とゲノム PCR

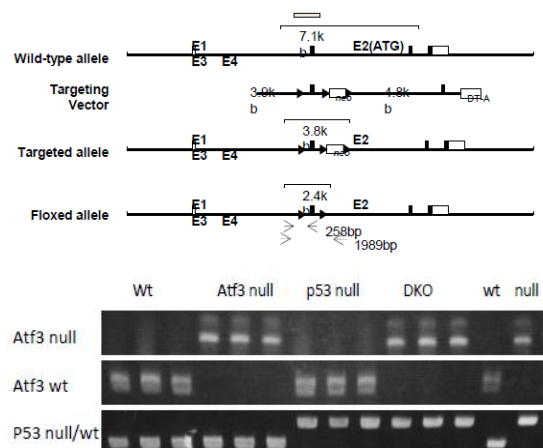
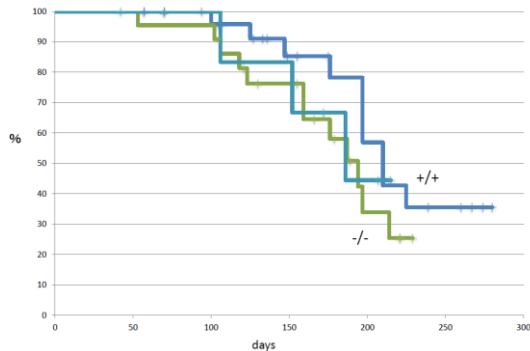


図2 : DKO マウスにおける自然発生胸腺腫



p53/Atf3 double KOマウスに出来た
早期巨大胸腺腫

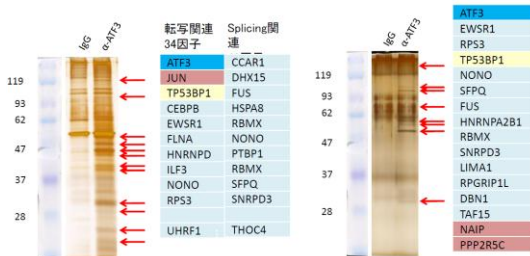
図3 : p53/Atf3 マウスの Kaplan-Meier 曲線



(2) ATF3 複合体の解析

ATF3 は、DNA 傷害時や大腸がんにおいては「がん抑制」作用を示すが、前立腺がん、乳がん、ホジキン病などでは「発がん」機能を持つと報告されている。相反する機能はその複合体にあると予測される。そこで、我々は、抗 ATF3 モノクローナル抗体を作製し、HCT116 ヒト大腸がんの DNA 傷害ストレス応答（下左図）とヒトホジキン細胞（下右図）の ATF3 免疫沈降の質量分析を行った。その結果、異なった細胞コンテキスト間で TP53BP1 が共通して含まれ、その他は大きく異なっており、ATF3 複合体の差が、がん抑制と発がんの機能の違いを説明するものと思われた。ATF3 と結合すると報告されている p53 は同定されなかったものの、TP53BP1 が共通して含まれていることの生物機能は不明だが、大変興味深い。

図4 ATF3 免疫沈降の質量分析



(3) ストレス応答を応用した新規がん治療戦略基盤の解析

発がんの過程では、がん細胞は、細胞が本来持っているストレス反応を変えて、正常な細

胞であれば増殖停止や細胞死を起こす環境に適応しており、このようながん細胞の特性は、抗がん剤などに対する治療抵抗性の基盤となっていると考えられる。分子標的薬は、がん特異的なパスウェイを阻害する薬剤であるが、その多くは早期に耐性となる例が多い。従って、がん細胞のストレス反応の性質を明らかにしてその特性を利用したがん治療法は有意義であるはずである。

我々は、がん細胞のストレス応答のシステムズ解析から、抗がん剤に対するストレス応答によって、がん細胞表面に細胞死受容体 DR5 発現が誘導されることを見出した。本研究では、分子生物学的手法を用いて、ヒト大腸がん治療薬 Camptothecin (CPT)、自然物質 Zerumbone、選択的 Cox2 阻害薬 (Celecox)、複数の HDAC 阻害薬作用のメカニズムを解析した。CPT は、p53 野生型がん細胞において、DNA 傷害による p53 と ATF3 とを誘導し、この両転写因子は DR5 遺伝子プロモーター上で物理的に結合し転写を促進することが明らかとなった (図5)。Zerumbone, Celecox、さらには HDAC 阻害剤である SAHA は、がん細胞内に活性酸素種の産生とそれに続く小胞体ストレス (ER ストレス) を介した転写制御であることが分かった (図6, 7)。

図5 CPT による p53, ATF3 誘導と結合

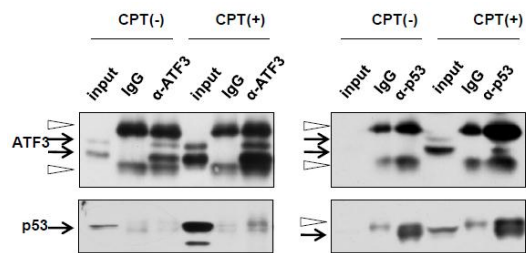


図6 Zerumbone, Celecox による ER ストレス活性化と細胞表面 DR5 の発現誘導

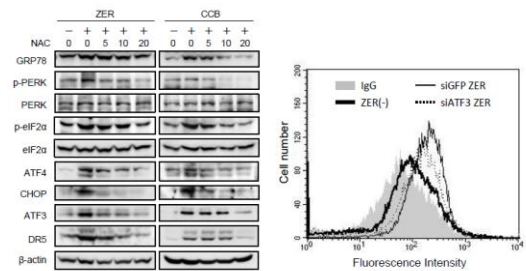
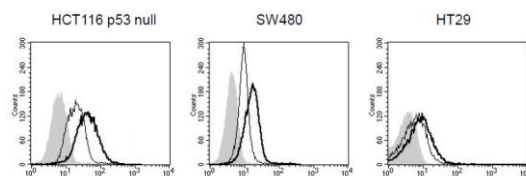
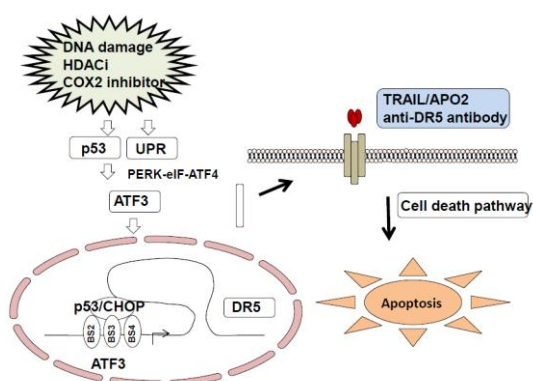


図7 HDAC 阻害剤 SAHA によるヒト大腸がん細胞表面の DR5 誘導



以上、作用機序が異なる複数の抗がん剤は、そのストレス応答を介してがん細胞表面の細胞死受容体 DR5 を誘導することが明らかとなった。これらの抗がん剤は、DR5 のリガンドである TRAIL あるいはアゴニスト作用薬としてのモノクローナル抗体とを組み合わせることで、単独よりもさらに強いがん細胞死を誘導できた。この併用療法は、p53 変異がんなど難治性あるいは治療抵抗性の進行がん、再発性がんに対して新たな治療戦略となることが期待できる。

図8 がん併用療法のモデル図



p53 野生型がんにおいては、CPT などの DNA damage の下流で p53-ATF3 の経路を介して DR5 が誘導される。一方、p53 変異の難治がんでは、Zerumbone などの natural product、選択的 Cox2 阻害剤、さらには複数の HDAC 阻害剤は ROS-ER ストレスを介して細胞死受容体 DR5 を誘導する。TRAIL あるいはアゴニスト抗体はがん細胞死を惹起する。

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 6 件)

- ① Liu J, Edagawa M, Goshima H, Inoue M, Yagita H, Liu Z, Kitajima S. Role of ATF3 in synergistic cancer cell killing by a combination of HDAC inhibitors and agonistic anti-DR5 antibody through ER stress in human colon cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 査読有 445(2):320-6. 2014 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.184.
- ② Edagawa M, Kawauchi J, Hirata M, Goshima H, M Inoue M, Okamoto T, A Murakami A, Maehara Y, Kitajima S. Role of ATF3 for ER stress-induced sensitization of p53-deficient human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis through upregulation of DR5 by zerumbone and celecoxib. **J Biol**

Chem. 査読有 289(31):21544-61. 2014 doi: 10.1074/jbc.M114.558890.

- ③ Lee YS, Sasaki T, Kobayashi M, Kikuchi O, Kim HJ, Yokota-Hashimoto H, Shimpuku M, Susanti VY, Ido-Kitamura Y, Kimura K, Inoue H, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Miyoshi J, Ohya S, Tanaka Y, Kitajima S, Kitamura T. Hypothalamic ATF3 is involved in regulating glucose and energy metabolism in mice. **Diabetologia**. 査読有 2013 Jun;56(6):1383-93. doi: 10.1007/s00125-013-2879-z.
- ④ Kawauchi J, Kitajima S. "Mechanism of Transcriptional Termination" in **Encyclopedia of Systems Biology** 査読無 chapter 1408 (W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K. Cho & H. Yokota (eds.), DOI 10.1007/978-1-4419-9863-7, Springer Science+Business Media LLC 2012
- ⑤ Taketani K, Kawauchi J, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Tanaka Y, Sakai T, Miyoshi J, Y Maehara Y, Kitajima S. Key role of ATF3 in p53 dependent DR5 induction upon DNA damage of human colon cancer cells. **Oncogene** 査読有 2012 Apr 26;31(17):2210-21. doi: 10.1038/onc.2011.397.
- ⑥ Gurzov EN, Barthson J, Marhfour I, Ortis F, Naamane N, Estevel I, Gysemans C, Mathieu C, Kitajima S, Marchetti P, Orntoft T, Bakiri L, Wagner EF, Eiziril DL. Pancreatic b-cells activate a JunB/ATF3-dependent survival pathway during inflammation. **Oncogene** 査読有 2012 Mar 29;31(13):1723-32. doi: 10.1038/onc.2011

[学会発表] (計 13 件)

- ① 井上允, 藤沢晃久, 新井菜月, 川内潤也, 関根茂樹, 北嶋繁孝. ヒト大腸がんにおける Wnt 標的遺伝子 ATF3 の遊走、浸潤、転移の抑制機能. 平成 26 年 9 月、蓼科、平成 26 年度がん若手研究者ワークショップ.
- ② 新井菜月, 井上允, 藤沢晃久, 川内潤也, 関根茂樹, 北嶋繁孝. ヒト大腸がんにおける Wnt 標的遺伝子 ATF3 の遊走、浸潤、転移抑制機能. 平成 26 年 11 月、横浜、第 37 回日本分子生物学会.
- ③ 藤沢晃久, 井上允, 新井菜月, 川内潤也, 関根茂樹, 北嶋繁孝. ヒト大腸がん細胞

株における Wnt/b-catenin 経路依存的 ATF3 発現制御. 平成 26 年 11 月、横浜、第 37 回日本分子生物学会.

- ④ 内田洋平, 川内潤也, 福本悟史, Paul Sheridan, 山口類, 井元清哉, 宮野悟, 北嶋繁孝. p53 非存在下での ATF3 の機能. 平成 26 年 11 月、横浜、第 37 回日本分子生物学会.
- ⑤ 井上允 1, Jia Liu, 枝川真, 五嶋大統, 八木田秀雄, Zhonghui Liu, 北嶋繁孝. HDAC 阻害剤は ER ストレスを介して Death receptor5 (DR5) 誘導し、抗 DR5 抗体 DJR2-2 依存性に難治性ヒト大腸がん細胞死を促進する. 平成 26 年 11 月、横浜、第 37 回日本分子生物学会.
- ⑥ 井上允、藤沢晃久、枝川真、川内潤也、関根茂樹、北嶋繁孝 ヒト大腸がん細胞における Wnt-ATF3 の同定と機能解析. 平成 25 年 12 月、神戸 第 36 回日本分子生物学会
- ⑦ 枝川真、五嶋大統、新井菜月、川内潤也、前原喜彦、北嶋繁孝 p53 非依存性ストレス応答による Death Receptor (DR)5 発現誘導における ATF3 の役割. 平成 25 年 12 月、神戸 第 36 回日本分子生物学会
- ⑧ Kitajima S. Stress code of p53-ATF3 axis in cancer and anti-cancer treatment. -Deciphering stress code and role of *ATF3* in cancer- 2013 SNUCRI Cancer symposium, Island of Jeju, South Korea. May 2, 2013
- ⑨ 五嶋 大統、川内 潤也、枝川 真、平田 学、宮城 知香、井上 允、北嶋 繁孝 : p 53 非依存性 Death receptor pathway (DR5) 発現誘導における ATF3 の機能. 平成 24 年 12 月、福岡 第 35 回日本分子生物学会
- ⑩ 枝川 真、川内 潤也、井上 允、内田洋平、田中裕二郎、Paul Sheridan、山口 類、井元 清哉、宮野 悟、前原 喜彦、北嶋 繁孝: ストレス応答における P53-ATF3 間の機能的相互作用とその働き. 平成 24 年 12 月、福岡 第 35 回日本分子生物学会
- ⑪ 川内潤也、山口類、井元清哉、宮野悟、北嶋繁孝 : ストレス誘導性転写因子 ATF3 と p53 の機能的相互作用 平成 24 年 9 月、札幌、第 7 1 回日本癌学会学術総会
- ⑫ Kawauchi J. Functional interaction between stress response gene ATF3 and p53. 14th June, 2012, Sendai, 第 7 回研

究所ネットワーク国際シンポジウム

- ⑬ Kitajima S. Stress Code of P53-Atf3 Axis in Cancer and Anti-cancer Treatment. BIT' s 5th Annual World Congress of Cancer. Beijing International Covention Center (BICC), Beijing, China. May 18-20, 2012

[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]

<http://www.tmd.ac.jp/mri/bgen/open.html>
北嶋繁孝：知の拠点シンポジウム：全国共同利用・共同研究拠点シンポジウム「ゲノム情報の読み取りから難治疾患に挑む」平成 2 4 年 8 月 2 4 日、京都大学オフィス、品川 <http://www.yomiuri.co.jp/science>

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

該当なし

(3) 連携研究者

田中 裕二郎 (TANAKA Yujiro)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
研究者番号：00311613

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