

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460272

研究課題名(和文)インフラマソーム構成分子ASCによるがん細胞の転移制御機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the role of ASC as a regulator of metastatic phenotype

研究代表者

藤井 千文 (FUJII, Chifumi)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：10361982

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)：本研究代表者らは、これまでに種々のがんにおいて、インフラマソーム構成分子ASCの発現量が、がんの悪性度と相関して低下することを報告した。しかし、ASCとがんの悪性化を結びつける分子機構には不明な点が多い。本研究では、ASCの発現量低下が、がん細胞の形質に及ぼす影響について解析するため、マウスメラノーマ細胞株B16BL6を用いてASCノックダウン細胞を作成した。この細胞について種々の解析を行ったところ、転移能の亢進を認めた。さらに、この分子機構を詳細に解析し、がん細胞でのASCの発現量低下が、Src-カスパーゼ8経路の活性化を引き起こし、細胞運動能を亢進させるというASCの新たな側面を見出した。

研究成果の概要(英文)：Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) has been reported a pro-apoptotic molecule that is epigenetically silenced in several human cancers. However, the role of ASC in the regulation of tumor progression remains elusive. To determine the effect of ASC depletion in cancer cells, ASC was stably knocked down in B16BL6, a murine melanoma cell line. ASC suppression increased the motility of B16BL6 cells and augmented invasiveness. Invadopodia formation and Src phosphorylation level were enhanced in ASC-knockdown cells as well. Since caspase-8 has been reported to enhance cellular migration by Tyr380 phosphorylation via Src, we examined Tyr380 phosphorylation of caspase-8 in ASC-knockdown cells and found it to be elevated. Moreover, ASC ablation increased pulmonary metastasis in mice after intravenous injection of B16BL6 cells. Our findings indicate that ASC suppresses cancer metastasis via the modulation of the Src-caspase-8 signaling pathway.

研究分野：生化学 分子腫瘍学 細胞生物学

キーワード：細胞運動 浸潤突起

② ASC の発現量低下により引き起こされた転移能亢進の作用点を調べるため、細胞レベルでの解析を行った。がん細胞が転移巣を形成するには、接着、運動、細胞外基質の分解を伴い、浸潤が起こる。まず初めにマトリゲル浸潤アッセイにより、浸潤能の解析を行ったところ、ASC ノックダウン細胞では浸潤能が有意に亢進していた。そこでさらに、接着、運動、細胞外基質の分解の3要素について解析を行った。タイプ I コラーゲン、タイプ IV コラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチンの代用として FBS、ラミニン、への細胞の接着能を解析したところ、ASC ノックダウン細胞とコントロール細胞との間に有意な差は認められなかった。次に、傷つけアッセイを行い、細胞の運動能を解析したところ、ASC のノックダウンにより、細胞運動能の亢進が見られた (図 2)。また、GFP を発現させた ASC ノックダウン細胞とコントロール細胞とを混合培養した状態で傷つけアッセイを行った結果より、ASC の発現量低下による細胞運動能の亢進は、液性因子により引き起こされるのではなく、細胞自身の変化により起こるということも明らかになった。さらに、浸潤突起形成アッセイにより、細胞外基質の分解能と浸潤突起形成について解析を行ったところ、ASC ノックダウン細胞ではアクチンの集積部位での細胞外基質の分解能すなわち浸潤突起形成能が亢進していたことから、細胞外基質の分解能が高くなっていることが示唆された (図 3)。以上の結果より、ASC の発現量低下により、細胞運動能および浸潤突起形成能が亢進することにより、細胞の浸潤能が上昇していることが明らかになった。

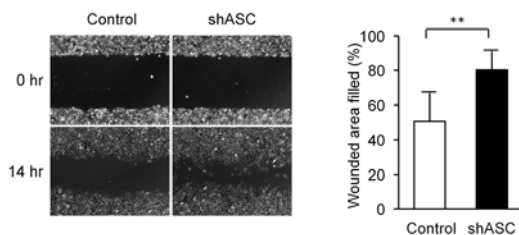


図 2. 傷つけアッセイによる細胞運動能の解析

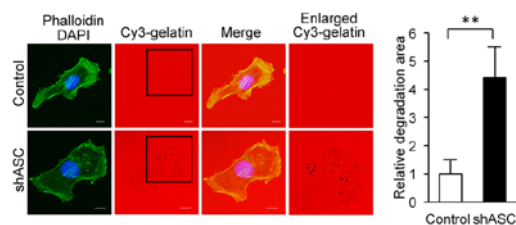


図 3. 浸潤突起形成能の解析

(2) ASC の発現量低下によるがん細胞の転移能亢進の分子メカニズムの解析

① 上述の様に、ASC ノックダウン細胞では、細胞運動能の亢進が認められた。また、細胞の形態変化が起こっていたことより、上皮間葉転換 (EMT) の関与を考え、EMT マーカー遺

伝子の発現解析を行った。その結果、Snail の一時的な発現上昇が見られたが、下流の E-カドヘリンには、差が認められなかった。また、その他のマーカー遺伝子である、Slug、SIP1、MMP-2、N-カドヘリン、ビメンチン、フィブロネクチンの発現量にも差は見られなかった。以上の結果より、ASC ノックダウンによる細胞の形態変化と細胞運動能の亢進には、EMT の関与はないものと考えられた。② 細胞運動や浸潤突起形成には、Src が関与していることが報告されているため、ASC ノックダウン細胞での Src のリン酸化状態をウェスタンブロットティングにより解析した。その結果、ASC のノックダウンにより、Src のリン酸化の亢進が見られた。さらに、Src シグナリング経路下流の FAK、Akt についてもリン酸化状態を解析したところ、いずれの分子についてもリン酸化の亢進が観察された (図 4A)。また、同じ細胞を用いて、MAP キナーゼのリン酸化状態について解析を行ったところ、Src シグナリング経路の下流に位置する Erk1/2 のリン酸化の上昇が見られた。これに対して、ストレスキナーゼである p38 MAPK、SAPK/JNK については、リン酸化は検出できなかった (図 4B)。以上の結果から、ASC の発現量低下により、Src シグナリング経路が活性化されていることが示唆された。

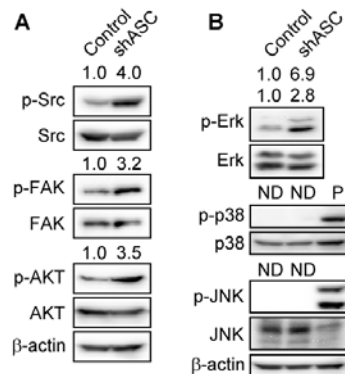


図 4 A. Src シグナリング経路分子、B. MAP キナーゼのリン酸化状態の解析

③ ASC のノックダウンにより Src シグナリング経路の活性化が見られたこと、Src は細胞運動、浸潤突起形成に重要な分子であることが報告されていることより、ASC の発現量低下時の細胞運動、浸潤突起形成能の亢進に Src が関与しているか否かを解析した。細胞運動への関与について解析するため、Src 阻害剤ダサチニブの存在下で傷つけアッセイを行ったところ、細胞運動能の著しい低下が見られた。また、この低下は、ASC ノックダウン細胞で、より顕著に観察された (図 5 左)。さらに、浸潤突起形成についても同様にダサチニブの存在下で解析を行ったところ、浸潤突起形成能の著しい低下が見られ、ASC ノックダウン細胞で、より顕著に低下していた (図 5 右)。以上の結果から、ASC の発現量低下により Src の活性化が起こり、その結果、細胞運動能の亢進および浸潤突起形成能の亢進が起こっていることが考えられた。

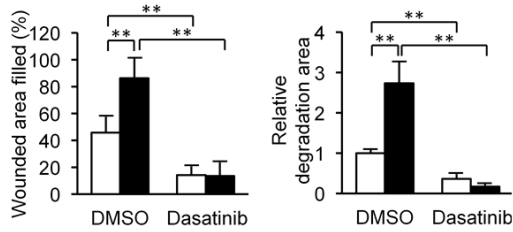


図5. Src 阻害剤ダサチニブの細胞運動、浸潤突起形成への影響

④ ASC は、カスパーゼ 8 と death effector domain (DED) を介して結合することが報告されている (Masumoto ら; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303, p69, 2003, Vajjhala ら; *J. Biol. Chem.*, 290, p29217, 2015)。カスパーゼ 8 はアポトーシスシグナルに応答して活性型となり、下流のカスパーゼを切断することによりアポトーシスを誘導することが主要な働きとして知られている。一方で、Src 活性化シグナルに応答してカスパーゼ 8 の DED に Src が結合し、活性部位の 380 位のチロシン (Tyr380) をリン酸化することにより、カスパーゼ 8 はカスパーゼ活性を失い、細胞運動を亢進するアダプター分子として働くことが報告されている (Frisch; *Cancer Res.*, 68, p4491, 2008)。ASC と Src のカスパーゼ 8 への結合ドメインが同じであることから、ASC が Src とカスパーゼ 8 との結合を阻害しているとの仮説を立て、ASC ノックダウン細胞での Tyr380 のリン酸化状態について解析を行った。フィブロネクチンコートをした培養器に細胞を接着させることにより Src シグナリング経路を活性化させた細胞を用いて、ウエスタンブロッティングにより Tyr380 のリン酸化状態を解析したところ、ASC ノックダウン細胞では、リン酸化の上昇が見られた。また、カスパーゼ 8 の活性部位に結合する全カスパーゼ阻害剤 z-VAD-fmk、カスパーゼ 8 特異的阻害剤 z-IETD-fmk 存在下で同様の実験を行ったところ、Tyr380 のリン酸化の抑制が認められた (図 6)。さらに、これら阻害剤の存在下で傷つけアッセイを行い、細胞運動への影響を解析したところ、どちらの阻害剤を用いた場合でも ASC ノックダウン細胞での細胞運動が抑制された (図 7)。以上の結果から、ASC の発現量低下により、細胞内へ Src 活性化シグナルが伝えられた際に Src がカスパーゼ 8 に結合しやすい状態となり、Tyr380 のリン酸化が促進され、細胞運動能が

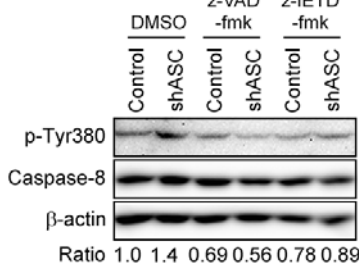


図6. カスパーゼ 8 の 380 位チロシン残基のリン酸化解析

亢進したと考えられた。

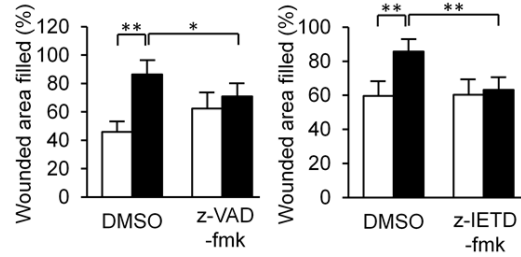


図7. 全カスパーゼ阻害剤 z-VAD-fmk、カスパーゼ 8 阻害剤 z-IETD-fmk の細胞運動への影響

⑤ これまでに、ヒトメラノーマ細胞株での ASC ノックダウンにより、NF κ B 活性が変化することが報告されている。原発巣から樹立された転移能の低い細胞株では、ASC ノックダウンにより NF κ B 活性が亢進し、逆に転移巣から樹立された転移能の高い細胞株では NF κ B 活性が抑制される (Liu ら; *J. Invest. Dermatol.*, 133, p518, 2013)。そこで、今回樹立した B16BL6 の ASC ノックダウン細胞における NF κ B 活性の変化について、レポーターアッセイにより解析した。その結果、ノックダウン細胞とコントロール細胞との間に NF κ B 活性の有意な差は認められなかったが、TNF- α による刺激を与えると、ノックダウン細胞の NF κ B 活性の上昇がコントロール細胞に比べて高いという結果が得られた (図 8 右)。そこで、ウエスタンブロッティングによって NF κ B 活性シグナリングに関与する分子の発現量およびリン酸化状態について解析したところ、ASC ノックダウン細胞では NF κ B p65 の発現量が増加していた (図 8 左)。以上の結果より、B16BL6 細胞では、ASC の発現量低下により NF κ B p65 の発現量が増加した結果、NF κ B シグナルが伝達されやすくなっていることが示唆された。また、このことにより生体内での細胞の生存率が上がったことが、転移能の亢進に繋がっていると考えられた。

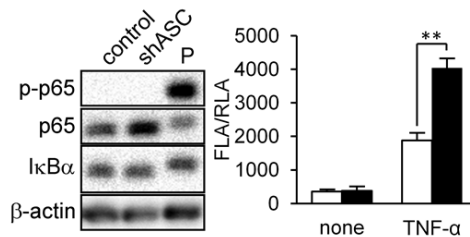


図8. NF κ B 活性シグナリングに関与する分子の発現量およびリン酸化状態 (左) と NF κ B 活性 (右) 白:コントロール細胞、黒:ASC ノックダウン細胞

(3) まとめ・今後の課題

本研究により、がん細胞における ASC の発現量低下は、細胞運動能、浸潤突起形成能を亢進させ、細胞の浸潤能が上昇した結果、転移能が亢進することが明らかになった。また、この分子メカニズムとして、ASC の発現量低下により Src-カスパーゼ 8 経路の活性化が起こり、細胞運動能が亢進すること、Src の活性化により浸潤突起形成能が亢進すること、

が考えられた。これまでの研究では、ASC が、がんの悪性度に伴って発現量が低下していること、ASC のメチル化とリンパ節転移に相関性が見られること、等の報告はあったが、その細胞生物学的意義や分子メカニズムについては不明であった。今回の結果は、ASC のがん抑制遺伝子としての新たな側面として捉えることができる。また、ASC の発現量低下を機能的に補うことができれば、新しいがん転移の予防法に繋がると考えられる。例えば、今回の結果を基にすると、カスパーゼ 8 の DED と ASC との結合を模倣するような低分子化合物を治療薬として用いる、等の手法が考えられる。

今回の結果から、ASC の発現量低下により、Src の活性化が起こることが明らかになった。しかしながら、ASC と Src の活性化を直接結び付ける証拠はまだない。本研究においても、ASC ノックダウン細胞での Src 上流の因子を解析したが、差が認められるものを見出すことはできなかった。また、ASC と Src が直接結合し、Src の活性化を阻害している可能性を考え、免疫沈降法により検討したが、相互作用は検出できなかった。現在考えられるメカニズムとしては、ASC の発現量低下により Src によるカスパーゼ 8 のリン酸化が促進され、細胞運動能が上昇した結果のフィードバックとして Src のリン酸化が亢進した、という可能性である。しかしながら、ASC の発現量低下による Src 活性化のメカニズムの解明は今後の課題の一つである。

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 3 件)

① Masato Kitazawa, Shigeaki Hida, Chifumi Fujii, Shun'ichiro Taniguchi, Kensuke Ito, Tomio Matsumura, Nagisa Okada, Takashi Sakaizawa, Akira Kobayashi, Michiko Takeoka, Shin-ichi Miyagawa, ASC Induces Apoptosis via Activation of Caspase-9 by Enhancing Gap Junction-Mediated Intercellular Communication, PLoS One, 査読有、12 巻、2017、e0169340

DOI: 10.1371/journal.pone.0169340

② Nagisa Okada¹, Chifumi Fujii^{1,2}, Tomio Matsumura, Masato Kitazawa, Ryuhei Okuyama, Shun'ichiro Taniguchi, Shigeaki Hida. (1: Contributed equally, 2: Corresponding author), Novel role of ASC as a regulator of metastatic phenotype, Cancer Medicine, 査読有、5 巻、2016、2487-2500

DOI: 10.1002/cam4.800

③ Yugen Zhang, Shigenari Hashimoto, Chifumi Fujii, Shigeaki Hida, Kensuke Ito,

Tomio Matsumura, Takao Sakaizawa, Mayuko Morikawa, Shizue Masuki, Hiroshi Nose, Keiichi Higuchi, Kouki Nakajima, Shun'ichiro Taniguchi, NF κ B2 gene as a novel candidate that epigenetically responds to interval walking training, International Journal of Sports Medicine, 査読有、36 巻、2015、769-775

DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1547221>

[学会発表] (計 5 件)

① 岡田なぎさ、藤井千文、松村富穂、北沢将人、谷口俊一郎、肥田重明、宇原久、奥山隆平、Novel role of ASC as a metastatic phenotype、第 41 回研究皮膚科学会年次学術大会、2016 年 12 月、仙台国際センター (宮城県・仙台市)

② 藤井千文、松村富穂、肥田重明、岡田なぎさ、谷口俊一郎、インフラマソーム構成因子 ASC の細胞運動における役割、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

③ 境澤隆夫、松村富穂、藤井千文、肥田重明、谷口俊一郎、ヒト肺癌の悪性形質獲得における ASC の役割、第 24 回日本がん転移学会学術集会・総会、2015 年 7 月、シティプラザ大阪 (大阪府・大阪市)

④ 藤井千文、松村富穂、肥田重明、谷口俊一郎、ASC によるがん細胞の転移能の制御機構の解析、第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会、2014 年 7 月、金沢市文化ホール (石川県・金沢市)

⑤ Chifumi Fujii, Tomio Matsumura, Takao Sakaizawa, Shigeaki Hida, Shun'ichiro Taniguchi, The roles of ASC in cancer cell metastasis, 15th International Biennial Congress Metastasis Research Society, 2014 年 6 月、ハイデルベルグ (ドイツ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 千文 (FUJII, Chifumi)
信州大学・学術研究院医学系・助教
研究者番号: 10361982

(2) 連携研究者

谷口 俊一郎 (TANIGUCHI, Shun'ichiro)
信州大学・医学部・特任教授
研究者番号: 60117166

肥田 重明 (HIDA, Shigeaki)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 10345762