

博士論文

論文題目 がんの肺転移において複数の細胞種で
 働くASK1の機能解析

氏 名 神山 美樹

目次

序論	3
材料と方法	7
結果	17
考察	28
総括と展望	40
参考文献	41
謝辞	48
図表	50

【序論】

がん（悪性腫瘍）とは、正常な細胞が無秩序な増殖を起こして浸潤・転移能を獲得し、次第に全身へと転移していく形質を持ったものを指す。またがんの転移とは、がん細胞が原発巣とは別の場所に生着、増殖して二次的な腫瘍を形成することを指し、がんによる死亡の90%もの原因を担うと言われている（Hanahan and Weinberg, 2011）。がん治療には外科的手術による原発巣の除去に加えて、がん細胞増殖を抑制する一般的な抗がん剤を用いた化学療法や放射線療法、さらには分子標的治療薬を中心とした薬物療法の研究、開発も進められている。例えば慢性骨髄性白血病（CML）患者で見られるフィラデルフィア染色体（BCR-ABL）に対する分子標的治療薬のイマチニブは、CMLだけでなく他の白血病への使用も承認されており、分子標的治療薬の有用性が臨床の現場でも示されつつある（Strebhardt and Ullrich, 2008）。しかしがん転移の治療については、現在のところ明確な分子基盤に基づく治療法はほとんど存在せず、その開発は急務である。

生体は常に外界の様々な環境変化に曝されており、恒常的に多様な物理化学的、あるいは生物学的ストレスを受けている。細胞がこれらのストレス刺激を受容してアポトーシス、炎症反応、増殖、分化などの様々な生理的応答へと変換するメカニズム、すなわちストレスシグナル伝達機構を稼働させることで、生物はそれら多種多様な環境変化に適応している。従って、ストレスシグナル伝達機構の破綻は異常な細胞増殖や炎症、正常なアポトーシスや細胞分化からの逸脱などを引き起こす。これらの形質を獲得することで細胞は次第にがん化していき、浸潤・転移能を獲得することでその悪性度を増しながら、やがては周囲の組織に浸潤して遠隔臓器へと転移していく（Hanahan and Weinberg, 2011; Fig. 1）。がん細胞が浸潤、転移能を獲得するためには、細胞骨格や上皮間葉移行（EMT）を制御するシグナル伝達経路を活性化する必要があると言われ、さらにがん細胞が転移先臓器という、原発巣とは異なる環境下で生存するためには、細胞の生存を司るシグナル伝達経路の制御を介して細胞死から回避する必要があると考えられている（Hanahan and Weinberg, 2011）。これらの報告から、腫瘍形成やがん転移におけるストレスシグナル伝達機構の詳細な解析は、がんという病態の理解に必須であると言える。

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)経路は、酵母から哺乳類に至るまで、真核生物で高度に保存された細胞内ストレスシグナル伝達機構である。この経

路は、紫外線や活性酸素種、サイトカインなどのストレス性の刺激を受容すると上流の MAPK kinase kinase (MAP3K)が MAPK kinase (MAP2K)を、MAP2K が MAPK を順次リン酸化、活性化するキナーゼカスケードであり (Widmann C, 1999)、活性化した MAPK は核内の転写因子などをリン酸化することでその機能を制御して、多様な生命現象を司っている (Hayakawa et al., 2006; Murakami et al., 2007)。MAPK 経路は、細胞増殖、分化、生存、アポトーシスや炎症など、前述した発がんに関係の深い多様な細胞応答を担っているため、腫瘍形成の促進と抑制の両方向の制御に複雑に関与している (Kamiyama et al., 2015)。

当研究室で同定された Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1)は MAP3K ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼであり、MAP2K である MKK4 や MKK7 を介して MAPK である JNK を活性化する一方、同じく MAP2K である MKK3 や MKK4、MKK6 を介して MAPK である p38 を活性化する (Ichijo et al., 1997; Tobiume et al., 2001)。当研究室の以前の研究結果から、がんという病態において ASK1 は炎症反応を亢進させ腫瘍形成を促進することが判明している (Iriyama et al., 2009)。さらに近年の研究結果から、炎症は腫瘍形成だけでなくがん転移においても重要な役割を担うことが明らかになりつつある。例えば、炎症性サイトカインの 1 つである Tumor Necrosis Factor α (TNF α)の欠損によって、実験的肺転移モデルにおけるがん転移が顕著に低下することが明らかになっている (Kim et al., 2009)。その上、アスピリンなどの抗炎症剤が、同じく実験的肺転移モデルにおけるがん転移を抑制することが示された (Amano et al., 2009)。そこで前任者 (平成 24 年度細胞情報学教室卒 佐藤 剛裕 修士)は ASK1 が炎症を介してがん転移に関与する可能性があると考え、全身性 ASK1 欠損マウス (以下 ASK1^{-/-}マウス)を用いて、実験的肺転移モデルにおける ASK1 のがん転移への関与を検討した (平成 24 年度修士発表にて前任者が発表、Fig. 2)。肺への高転移性を示すルイス肺がん細胞にホタルルシフェラーゼを恒常的に発現させた細胞 (3LL-Luc2 細胞)を尾静注して 14 日後の肺を摘出すると、野生型マウス (WT マウス)では肺の表面に赤い水疱状の転移結節が多数観察されるのに対し、ASK1^{-/-}マウスの肺ではほとんど見られなかった (Fig. 2A)。また肺溶解液のルシフェラーゼ活性を測定すると、ASK1^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べて顕著にルシフェラーゼ活性が低下していた (Fig. 2B)。この結果から、実験的肺転移モデルにおいて、ASK1 欠損によってがん転移が著しく低下することが示唆された。しかし、多段階から成るがん転移のどの段階に ASK1 が関与している

か、またがん転移への ASK1 の寄与が炎症を介しているかについてはさらなる詳細な解析が必要であると考えられた。

がん転移は多段階から成り (Francia et al., 2011)、以下の連続的な 5 段階を経ると考えられる (Fig. 3)。即ち (i) 血流中の癌細胞の移動と移動中の生存、(ii) 毛細血管での捕捉 (塞栓形成)、(iii) 血管内皮細胞への接着、(iv) 血管内腔から肺組織への血管外遊出、(v) 肺組織における細胞増殖 (転移巣形成) である。また血行性のがん転移への関与が知られる細胞種は、自然免疫及び獲得免疫系細胞を含む白血球や血小板、血管内皮細胞などがある。これらの細胞種はがん細胞の血管への接着や血管外遊出、転移巣での増殖などの様々な段階で、がん転移を制御する役割が知られる (Hanahan and Coussens, 2012; Fig. 3)。そこでまず私は本学修士課程において ASK1^{-/-}マウスと 3LL-Luc2 細胞を用い、実験的肺転移モデルにおいて ASK1 ががん転移のどの段階に関与するかを検討した。その結果、ASK1^{-/-}マウスでは 3LL-Luc2 細胞を尾静注してから 3 時間後以降において、肺溶解液のルシフェラーゼ活性が低下していた (Fig. 4A, B)。一方、3LL-Luc2 細胞を肺に同所性移植した場合 (Fig. 5A) や、背中に皮下移植した場合 (Fig. 5B) など、がん転移後の増殖過程を模倣した場合の表現型は、野生型マウスと ASK1^{-/-}マウスで差がなかった。このことから ASK1 は多段階から成るがん転移の中でも、血中のがん細胞が血管外遊出を起こして増殖を開始する前の比較的早い段階に関与することが明らかになった。以上の結果から私は、ASK1 という 1 つの分子に着目し、多段階から成るがん転移の中で関与する段階を特定することで、がん転移の病態を分子基盤に基づいて理解するための足がかりを作ることができた。

そこで本学博士過程においてはこれらの結果に基づき、どの細胞種の ASK1 欠損ががんの肺転移の減弱に寄与するかを明らかにし、その関与の分子メカニズムについて解析することで、ASK1 のがんの肺転移における詳細な役割の解明を目指した。具体的には、ASK1 が関与する細胞種を特定するために細胞種特異的な ASK1 コンディショナルマウスを作出し、肺転移の表現型を解析することにした。また、ASK1 欠損によるがんの肺転移の減弱という現象が 3LL-Luc2 細胞以外のがん細胞によっても見られるかを検証するため、同じく肺への高転移性を示す悪性黒色腫にホタルルシフェラーゼを恒常的に発現させた細胞 (B16F10-luc-G5 細胞) を用いた表現型解析も進めることにした。

上記の解析を通して、ASK1 の阻害ががん転移の新規治療戦略となり得るか、

またより副作用の少ないがん転移阻害剤の開発を目指して、ASK1 阻害の標的とすべき細胞種を特定しようと考えた。

【材料と方法】

・マウス

以下に挙げるマウス及びWTマウス (C57BL/6J)は全て SPF 環境下で飼育された雌マウスのみを、8~14 週齢時に使用した。遺伝子型判断のための genotyping は、マウスの尾もしくは右脚小指のサンプルからゲノム DNA を抽出し、各プライマーによる PCR 法にて判断した。ゲノム DNA は 50 mM NaOH をサンプルに加えて 98°C で 10 分反応させ、さらに 1 M Tris-HCl pH 8.0 を加えて 4°C にて 13500 rpm で遠心し、抽出して得られた上清を genotyping の PCR に用いた。尚、全ての動物実験は東京大学動物実験実施規則に従って行った。

・ASK1^{-/-}マウス、ASK2^{-/-}マウス、ASK3^{-/-}マウス

ASK1^{-/-}マウス (Tobiome et al., 2001)、ASK2^{-/-}マウス (Iriyama et al., 2009)、ASK3^{-/-}マウス (Naguro et al., 2012)は当研究室で作製されたものを用いた。

・ASK1^{flx/flx}マウス (以降 ASK1^{F/F}マウス)

ASK1 遺伝子の kinase domain を含む Exon15 領域を、loxP サイト及びその内側を FRT 配列で挟んだネオマイシン (Neo)耐性カセットに置換されるように Targeting Vector を作製した (Fig. 6)。この Targeting Vector を C57BL/6 由来 ES 細胞株 (RENKA 株, Kanki, et al., 2006)に導入し、G418 耐性の ES 細胞コロニーから、PCR 法とサザンブロット法にて相同組み換えを起こしたクローンを選択して、遺伝子組み換えマウスを作製した (TransGenic Inc.)。得られたマウス (ASK1^{Neo/+}マウス)を CAG-FLPe マウス (Rodríguez et al., 2000)とかけあわせて Neo 耐性カセットを除いた ASK1^{flx/+}マウスを作出し、これを基に ASK1^{flx/flx}マウス (ASK1^{F/F}マウス)を得た。

genotyping には以下のプライマーを使用した。WT は 306 base pair (bp)、knock-in (KI)は 455 bp の PCR 産物が得られる。

(sense) 5'-AGTGGCTTCCAAAGCACGGAAGG-3'

(antisense) 5'-CCTGGGCTTTTTTTGGTTGGGAGAC-3'

・LysM-cre/+マウス、Pf4-cre/+マウス、Cdh5-cre/+マウス

LysM-cre/+マウス (B6.129P2-Ly2z<tm1(cre)Ifo>, No. 02302)は文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して、理研 BRC から得た。Pf4-cre/+マウス

ウス (C57BL/6-Tg(Pf4-icre)Q3Rsko/J, No. 008535)は The Jackson Laboratory から入手した。Cdh5-cre/+マウス (VE-cad-Cre, No. nbio132)は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 実験動物研究資源バンクより分譲を受けた。genotypingには以下のプライマーを使用した。

LysM-cre/+マウス: WT は sense と antisense-1 により 429 bp の、KI は sense と antisense-2 により 800 bp の PCR 産物が得られる。

(sense) 5'-GCATTGCAGACTAGCTAAAGGCAG-3'

(antisense-1) 5'-GTCGGCCAGGCTGACTCCATAG-3'

(antisense-2) 5'-CCCAGAAATGCCAGATTACG-3'

Pf4-cre/+マウス: WT ではPCRがかからず、KIは450 bpのPCR産物が得られる。

(sense) 5'-CCCATACAGCACACCTTTTG-3'

(antisense) 5'-TGCACAGTCAGCAGGTT-3'

Cdh5-cre/+マウス: WT ではPCRがかからず、KIは587 bpのPCR産物が得られる。

(sense) 5'-ACCGTAGGGCTTGCCTATC-3'

(antisense) 5'-CTAGAGCCTGTTTTGCAGGTTC-3'

・骨髄キメラマウスの作製

ASK1⁺マウス及び WT マウス各 5 匹の大腿骨を摘出し、24 G 注射針 (TERUMO)と 5 ml シリンジ (TERUMO)を用いて、3 % FBS/PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₃PO₄・12H₂O, 12 mM KH₂PO₄)を骨端より注入して骨髄細胞を取り出した。取り出した骨髄細胞を 40 μm フィルター (BD Biosciences)を通して濾過し、室温にて 1500 rpm で 5 分間遠心して得られた骨髄細胞のペレットに赤血球溶血液 (0.083 % NH₄Cl, 2.05 % Tris)を 2 ml 加え、1 分間室温で反応させた後、3 % FBS/PBS を 8 ml 加えて、室温にて 1500 rpm で 5 分間遠心した。ペレットを再度 3 % FBS/PBS で懸濁して 70 μm フィルター (BD Biosciences)を通し、濾過して室温にて 1500 rpm で 5 分間遠心し、得られたペレットを 3 % FBS/PBS で再懸濁した。

続いて ASK1⁺マウス及び WT マウス各 10 匹を、東京大学医学部 3 号館地下 1

階の放射線研究室領域 X 線照射室へ運搬し、パンタック (HF350) X 線照射装置 (SHIMADZU)を用いて 10 Gy の X 線をマウスへ照射した。その後できる限り早く、当研究室のクリーンベンチ内へマウスを搬入した。

懸濁しておいた骨髓細胞を再度室温にて 1500 rpm で 5 分間遠心し、PBS で懸濁して 8.5×10^7 cells/ml になるように希釈し、X 線照射を行ったマウスにマイジェクター 1 ml インスリン用シリンジ (27 G, TERUMO)を用いて 200 μ l/匹で尾静脈投与した (以降骨髓キメラマウスと呼ぶ)。骨髓キメラマウスは全てクリーンベンチ内で、ケージにペーパーキャップを二重に被せた状態で、抗生物質入りの湿潤滅菌済水道水 (50 mg/l neomycin sulfate, 10 mg/l polymixin B sulfate)を投与して 8 週間飼育した。

・細胞とその培養

B16F10-luc-G5 細胞 (Perkin Elmer)は国立がん研究センター研究所 竹下文隆先生より、また 3LL-Luc2 細胞 (Fushiki et al., 2009)は富山大学 早川芳弘先生より供与していただいた。B16F10-luc-G5 細胞は 10 % FBS (GIBCO), 100 units/ml Penicillin G (明治製菓ファルマ), 0.25 mg/ml zeocin (invitrogen)を含む DMEM-high glucose medium (sigma)中で、3LL-Luc2 細胞は 10 % FBS (GIBCO), 100 units/ml Penicillin G (明治製菓ファルマ)を含む RPMI-1640 medium (Sigma)中で、37°C、5 % CO₂条件下で培養した。継代数は 10~15 回程度を目安とし、1 ヶ月ごとに新しい細胞凍結ストックを起こして使用した。

・がん細胞の肺転移

・実験的肺転移モデル

B16F10-luc-G5 細胞及び 3LL-Luc2 細胞を遠心し、上清を除去した後、実験ごとに指定した細胞数 ($1 \sim 3 \times 10^6$ cells/ml)になるように PBS にて懸濁して、200 μ l/匹を尾静脈投与した。尾静脈投与には、マイジェクター 1 ml インスリン用シリンジ (27 G, TERUMO)を用いた。

・肺溶解液のルシフェラーゼ活性測定

Luciferase Culture Lysis 5 \times Reagent (Promega)を MilliQ で希釈し、麻酔によってマウスを安楽死させて単離した肺を PBS で軽く洗った後、希釈液 1 ml 中で電動ホモジェナイザーを用いて 1 分間破砕した。その後 4°C にて 13500 rpm で 15 分

間遠心した上清 20 μ l 中の Luciferase 活性を Luciferase Assay System (Promega) を用いて、Microplate Luminometer (BERTHOLD)、または Varioskan (Thermo Scientific) で duplicate または triplicate で測定した。

• ***in vivo* imaging system (IVIS)** (共同研究先の東京大学 宮園浩平先生の研究室にて行った)

3LL-Luc2 細胞を尾静注したマウスを共同研究先の東京大学 宮園浩平先生の研究室のマウス室へ移送し、以降の IVIS によるルシフェラーゼ活性の測定と飼育を行った。マウスの肺におけるルシフェラーゼ活性は、麻酔下でマウスの胸部の体毛をシェーバーで剃った上でルシフェリンを腹腔投与して測定した。IVIS のシグナル強度は units of photons per second で検出し、測定と検出は宮園浩平先生の研究室の江幡正悟先生、高橋恵生先生に行っていた。

• **3LL-Luc2 細胞尾静注後の肺の RNA 抽出、cDNA 調製、qRT-PCR**

3LL-Luc2 細胞または negative control として PBS を尾静注したマウスを 3 時間後に麻酔によって安楽死させて、単離した肺を PBS で軽く洗った後液体窒素にて瞬間凍結させたものを、1 ml の ISOGEN 中で電動ホモジェナイザーを用いて 1 分間破碎した。ここに 200 μ l のクロロホルムを添加して転倒混和した。4 $^{\circ}$ C にて 13500 rpm で 15 分間遠心して上清を別のチューブに取り、等量のイソプロパノールを加えて転倒混和し、4 $^{\circ}$ C にて 13500 rpm で 10 分間遠心した。上清を除去して 70 % エタノールを 1 ml 加え、4 $^{\circ}$ C にて 13500 rpm で 5 分間遠心して慎重に上清を除いた。その後 100 μ l の Nuclease-free water (TOYOBO) にてペレットを溶解し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて逆転写した。具体的には、RNA 2 μ g を Nuclease-free water で液量が 12 μ l になるよう調製し、4 \times DN Master Mix (with gDNA Remover) を 4 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させてすぐに氷上に置いた。続いて 5 \times RT Master Mix II を 4 μ l 添加し、37 $^{\circ}$ C で 15 分間、50 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させ、98 $^{\circ}$ C で 5 分間ボイルして反応を停止させて cDNA を調製した。

がん細胞が接着する際に血管内皮細胞などが発現する接着因子の転写レベルでの発現を調べるため、この cDNA に対して、*mRps18* (ribosomal protein S18、内部標準)、*mSele* (selectin, endothelial cell)、*mSelp* (selectin, platelet)、*mVcam1* (vascular cell adhesion molecule 1)、*mlcam1* (intercellular adhesion molecule 1)、

mPecam1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1)、*mAcr3* (atypical chemokine receptor 3)の転写レベルでの発現量を検証する qRT-PCR を行った。qRT-PCR には FastStart Essential DNA Green Master (Roche)を使用し、測定は LightCycler 96 System (Roche)で行った。各遺伝子の発現量は *mRps18* を内部標準とし、標準化を行った。用いたプライマーの配列は以下の通りで、一連の作業は当研究室 布施耕介さんに行っていた。

mRps18

(sense) 5'-TCCAGCACATTTTGCGAGTA-3'

(antisense) 5'-CAGTGATGGCGAAGGCTATT-3'

mSele

(sense) 5'-TCCTCTGGAGAGTGGAGTGC-3'

(antisense) 5'-GGTGGGTCAAAGCTTCACAT-3'

mSelp

(sense) 5'-ATGCCTGGCTACTGGACACT-3'

(antisense) 5'-GACTGAGCATAGGGGCACA-3'

mVcam1

(sense) 5'-TGGTGAAATGGAATCTGAACC-3'

(antisense) 5'-CCCAGATGGTGGTTTCCTT-3'

mIcam1

(sense) 5'-CCCACGCTACCTCTGCTC-3'

(antisense) 5'-GATGGATACCTGAGCATCACC-3'

mPecam1

(sense) 5'-CGGTGTTTCAGCGAGATCC-3'

(antisense) 5'-CGACAGGATGGAATCACAA-3'

mAcr3

(sense) 5'-CACCGTCAGGAAGGCAAA-3'

(antisense) 5'-CCAGGCTCTGCATAGTCAAA-3'

• 血小板機能解析 (*in vivo*)

• **Tail bleeding assay**

50 mg/kg weight のペントバルビタールの麻酔下でマウスを 37°C に保温した布にくるんで固定し、尾の先端から 5 mm の位置をカミソリで切断して、すぐに切断先端を 37°C の恒温槽で温めた PBS に浸し、出血時間の測定を開始した。30 秒より長く連続して出血が止まったことを確認できた場合にはその最初の時間を、600 秒間の測定時間の中で一度も出血が止まらなかった場合には 600 秒を、それぞれ各個体の出血時間とした。

• **塩化鉄誘導性血栓形成モデル** (共同研究先の山梨大学 尾崎由基男先生の研究室のご協力のもと行った)

麻酔下のマウスの右脚大腿動脈を 37°C に保温した実験台上で露出させ、10 % 塩化鉄 (III) 溶液に浸した 1 mm² のろ紙を上に乗せて血管を傷害し、継時的に血流量を測定した。血栓閉塞は血流量が 10 ml/min/100 g weight 以下の状態を 1 分間以上維持できた場合とし、血管傷害開始から血栓閉塞開始までの時間を血栓形成にかかった時間とした。測定は共同研究先の山梨大学 白井俊光先生に行っていた。

• 血液成分及び血小板解析 (*in vitro*)

• **血液成分解析** (共同研究先の山梨大学 尾崎由基男先生の研究室のご協力のもと行った)

マウス尾先端にカミソリで傷をつけて全血の液滴を回収し、25 mM EDTA/PBS で希釈して XE-2100 (Sysmex) で血液成分を解析した。測定は共同研究先の山梨大学 田村彰吾先生に行っていた。測定項目は、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット (血液中の血球が占める体積の割合)、血小板数、MCV (平均赤血球容積)、MCH (平均赤血球色素量)、MCHC (平均赤血球色素濃度) とした。

• **血小板の単離と凝集実験** (共同研究先の山梨大学 尾崎由基男先生の研究室のご協力のもと行った)

予め 1 ml シリンジに 100 μ l の acid citrate dextrose (ACD) (2.5 % sodium citrate, 2 % glucose, 1.5 % citric acid) をとり、2 ml チューブに 100 μ l の ACD と 900 μ l の calcium-free Tyrode's buffer (CFT) (NaCl 8.0 g, NaHCO₃ 1.0 g, NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.06 g, KCl 0.2 g, MgCl₂ · 6H₂O 0.224 g, glucose 1.0 g, up to 1 l by MilliQ, 用時に pH を 7.3 に合わせた) をとっておいた。麻酔によってマウスを安楽死させて、下大静脈より 23 G 注射針 (TERUMO) と、ACD の入った 1 ml シリンジを用いて採血して、ACD と CFT を加えておいた 2 ml チューブに入れた。100×g で 10 分間遠心して、血小板の含まれる上清を別の 2 ml チューブ(*1) に回収し、残りのチューブに ACD 100 μ l と CFT 900 μ l を加え、さらに 100×g で 10 分間遠心した。上清を (*1) のチューブに加えて Platelet Rich Plasma (PRP) を調製した。

Dimethyl sulfoxide [DMSO] (Sigma) に溶解した 1 mg/ml PGI₂ (Cayman Chemical) を PRP に 2 μ l 添加して転倒混和し、2300 rpm で 10 分間遠心して、血小板のペレットを得た。上清を捨てて CFT 500 μ l を加えて再懸濁し、このうち 20 μ l を CFT で 10 倍希釈して、XE-2100 (Sysmex) で血小板数を数えると同時に、赤血球や白血球などの他の血球系細胞の混入がないことを確認した。尚、全て遠心は室温で行った。

血小板凝集は MCM HEMA TRACER® 712 (MC MEDICAL) により 10 分間、アゴニストとして collagen (1 μ g/ μ l, Takeda)、Protease-activated receptor 4 (PAR-4, 50 μ M, Sigma)、rhodocytin (1 nM, Shin and Morita, 1998 に記載の通り精製した)、ADP (10 μ M, MC Medical) と thrombin (0.025 U/ml, Haematologic Technologies) を用いて測定した。

- ・ **血小板膜表面タンパク質の FACS による検出** (共同研究先の山梨大学 尾崎由基男先生の研究室のご協力のもと行った)

上記の方法で単離した PRP を以下の各抗体とインキュベートし、FACS Accuri C6 (BD Biosciences) で解析した。サンプルの調製及び解析は共同研究先の山梨大学 田村彰吾先生に行っていただいた。解析には、FITC 標識抗マウス CD41 抗体 (clone MWReg30, BD Biosciences)、FITC 標識抗 CD61 抗体 (clone Luc.H11, Emfret Analytics)、FITC 標識抗マウス GPVI 抗体 (clone JAQ-1, Emfret Analytics)、PE 標識抗マウス CD49 抗体 (clone HM α 2, BD Biosciences)、PE 標識抗マウス CD42b 抗体 (clone Xia.G5, Emfret Analytics) と Alexa Fluor 488 標識抗マウス CLEC-2 抗体 (clone 2A2B10, Cell Signaling を Alexa Fluor 488 antibody labeling kit,

Life Technologiesにて標識)を用いた。

・組織及び初代培養細胞のウエスタンブロット

・肺溶解液のウエスタンブロット用サンプル調製

「肺溶解液のルシフェラーゼ活性測定」の項目と同様の方法で肺溶解液の上清を調製し、15 μ l を 35 μ l の希釈液で希釈した後、2×Sample Buffer + DTT (4 % sodium dodecyl sulfate [SDS], 100 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 % bromophenol blue, 36 % glycerol, 10 mM dithiothreitol [DTT]) 50 μ l と混ぜて 98°C で 3 分間ボイルした後、アクリルアミドゲルでの SDS-PAGE に供した。ただし Fig. 29 については肺を溶解する際に、希釈液に 10×PhosSTOP (Roche) を加えたものを用いた。

・腹腔マクロファージのウエスタンブロット用サンプル調製

マウスに thioglycollate (3.85 mg/ml) を腹腔投与して腹膜炎を誘導し、4 日後に麻酔によってマウスを安楽死させて腹腔マクロファージを回収し、10 % FBS (GIBCO), 100 units/ml Penicillin G (明治製菓ファルマ) を含む RPMI-1640 medium (Sigma) 中で 37°C、5 % CO₂ 条件下で培養した。その後 ASK1 のタンパク質の発現を誘導するため、腹腔マクロファージに 1 μ g/ml LPS を 24 時間処置してから IP lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 0.5 % sodium deoxycholate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1 μ M leupeptin) で溶解し、4°C にて 13500 rpm で 10 分間遠心した後の上清を回収した。上清 50 μ l に 2×Sample Buffer + DTT 50 μ l を加えて混ぜ、98°C で 3 分間ボイルした後、アクリルアミドゲルでの SDS-PAGE に供した。

・血小板のウエスタンブロット用サンプル調製及び λ PPase 処置

予め 1 ml シリンジに 100 μ l の ACD をとり、1.5 ml チューブに 100 μ l の ACD と 100 μ l の CFT をとっておいた。麻酔によってマウスを安楽死させて、下大静脈より 24 G 注射針 (TERUMO) と、ACD の入った 1 ml シリンジを用いて採血して、ACD と CFT を加えておいた 1.5 ml チューブに入れた。100×g で 10 分間遠心して、血小板の含まれる上清を別の 1.5 ml チューブ(*2)に回収し、残りのチューブに ACD 60 μ l と CFT 340 μ l を加え、さらに 100×g で 9 分間遠心した。上清を (*2) のチューブに加え、残りのチューブに ACD 60 μ l と CFT 340 μ l を加え、さらに 100×g で 8 分間遠心した。上清を (*2) のチューブに加

え、(*2)のチューブに混入した赤血球を除くため、バケットローターで 1000 rpm、10 分間遠心した。上清を慎重に別の 1.5 ml チューブにとり、PRP を調製した。

DMSO に溶解した 1 mg/ml PGI₂ を PRP に 1 μl 添加して転倒混和し、3000 rpm で 10 分間遠心して、血小板のペレットを得た。上清を捨てて CFT 500 μl を加えて再懸濁し、このうち 10 μl を CFT で 5 倍希釈して、東京大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科の自動血球計数機 ERMAX-18 (Perkin Elmer) で、血小板数を数えると同時に、赤血球や白血球などの他の血球系細胞の混入がないことを確認した。尚、全て遠心は室温で行った。調製した血小板懸濁液 50 μl に 2×Sample Buffer + DTT 50 μl を加えて混ぜ、98°C で 3 分間ボイルした後、アクリルアミドゲルでの SDS-PAGE に供した。

λ PPase 処置を行う場合には先の 1 mg/ml PGI₂ を血小板懸濁液 400 μl に 1 μl 添加して転倒混和し、3000 rpm で 10 分間遠心して上清を捨てて再度ペレットを得た。このペレットを 180 μl の RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 % nonyl phenoxypolyethoxyethanol [NP-40], 0.5 % sodium deoxycholate [DOC], 0.1 % SDS, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 5 μg/ml leupeptin) に 25×Phosphatase Inhibitor Cocktail (8 mM NaF, 12 mM beta-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1.2 mM Na₂MoO₄, 5 μM Cantharidin, 2 mM Imidazole) を加えたもので溶解し、4°C で 15 分間攪拌してから、4°C にて 13500 rpm で 10 分間遠心した後の上清を回収した。上清 25 μl に対して PMP buffer 3.125 μl, MnCl₂ 3.125 μl, λ PPase 0.2 μl (全て BioLabs) を添加して 30°C にて 30 分間反応させた後、2×Sample Buffer + DTT 25 μl を加えて混ぜ、98°C で 3 分間ボイルして、アクリルアミドゲルでの SDS-PAGE に供した。尚、λ PPase (-) のサンプルは λ PPase のみ添加せず、30°C での反応は λ PPase (+) のサンプルと同様に行った。

・ SDS-PAGE、ウエスタンブロット

SDS-PAGE にてタンパク質を分離した後、2 時間 blotting して FluoroTrans PVDF 膜 (Pall) へとタンパク質を転写し、転写膜に対して 5 % skim milk (森永製菓) / TBS-T (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 % Tween 20) で 2 時間、室温で blocking を行い、1 次抗体を 4°C O/N でインキュベートした。HRP-linked の 2 次抗体は、TBS-T で転写膜を洗った後室温で 2 時間インキュベートし、再度 TBS-T により 1 時間洗ってから、enhanced chemiluminescence (ECL) システム、または ECL plus システム (共に GE Healthcare) で検出した。1 次抗体として、抗

リン酸化 ASK [p-ASK]抗体 (2PNS, rabbit, lab-made)、抗 ASK1 抗体 (EP553Y, rabbit, abcam)、抗マウス ASK2 抗体 (TC126, rat, lab-made)、抗リン酸化 JNK Thr183/Tyr185 [p-JNK]抗体 (rabbit, Cell Signaling)、抗 JNK 抗体 (JNK FL, rabbit, Santa Cruz)、抗リン酸化 p38 Thr180/Tyr182 [p-p38]抗体 (rabbit, Cell Signaling)、抗 p38 抗体 (p38 L53F8, mouse, Cell Signaling)、抗リン酸化 Akt Thr308 [p-Akt Thr308]抗体 (rabbit, Cell Signaling)、抗リン酸化 Akt Ser473 [p-Akt Ser473]抗体 (rabbit, Cell Signaling)、抗 Akt 抗体 (11E7, rabbit, Cell Signaling)、抗 P2Y12 抗体 (APR-012, rabbit, Alomone Labs)、抗 actin 抗体 (Actin C-2, mouse, Santa Cruz)を用いた。2次抗体として、いずれも HRP 標識された、抗 mouse IgG 抗体、抗 rabbit IgG 抗体、抗 rat IgG 抗体 (全て Cell Signaling)を用いた。抗体の希釈は、1次抗体の場合は 1st antibody dilution buffer (5 % bovine serum albumin, 0.1 % NaN₃)で、2次抗体の場合は 5 % skim-milk/TBS-T で行った。

・統計学的解析

box-and-whisker plot with max and minimum values または median with interquartile range にて表記されている 2 群間の検定には Mann Whitney test を、マウス個体の生存比較の検定には Gehan-Breslow-Wilcoxon test を、骨髄キメラマウスの表現型の検定には One-way ANOVA の後に Ryan's method を、上記以外の 2 群間の比較検定には unpaired Student's t-test または unpaired t test with Welch's correction を用いた。

【結果】

1. B16F10-luc-G5 細胞による肺転移も ASK1^{-/-}マウスで減弱する

序論でも述べた通り、ASK1 欠損によるがんの肺転移の減弱という現象が肺がん由来の 3LL-Luc2 細胞以外のがん細胞によっても見られるかを検証するため、肺への高転移性を示す悪性黒色腫にホタルルシフェラーゼを恒常的に発現させた細胞 (B16F10-luc-G5 細胞)による肺転移について、ASK1^{-/-}マウスでの表現型を解析した。すると 3LL-Luc2 細胞による肺転移と同様、ASK1^{-/-}マウスでは WT マウスに比べて肺溶解液のルシフェラーゼ活性が顕著に低下していた (Fig. 7)。よって、3LL-Luc2 細胞だけではなく B16F10-luc-G5 細胞による肺転移も ASK1^{-/-}マウスで減弱しており、ASK1 欠損によるがんの肺転移の減弱は複数のがん細胞で観察されることがわかった。

2. ASK1^{-/-} マウスにおけるがんの肺転移減弱は、同一個体内での経時的な解析でも観察される

本学修士課程における研究結果から、ASK1^{-/-}マウスでは 3LL-Luc2 細胞を尾静注してから 14 日後までのタイムコースにおいて、3 時間以降での肺転移の減弱が認められた (Fig. 4A, B)。しかし解析のためには各時点でマウスを殺す必要があるため、同一個体内で経時的な変化を追跡することができなかった。また解析は野生型マウスと ASK1^{-/-}マウスのどちらでも個体死が起きていない 14 日後までしか行っておらず、その後のがんの進行具合やマウス個体の生存に対する影響が検討できていなかった。そこで共同研究において *in vivo* imaging system を用い、尾静注した 3LL-Luc2 細胞が肺へ転移して増殖する様子を同一個体内で経時的に追跡した。すると、ASK1^{-/-}マウスの肺で検出される 3LL-Luc2 細胞のシグナル強度が WT マウスよりも大きく低下している様子が観察され (Fig. 8A, B, C)、この実験系においても ASK1^{-/-}マウスでの肺転移の減弱を確かめることができた。さらに 3LL-Luc2 細胞を尾静注したマウスの生存を追跡したところ、ASK1^{-/-}マウスの死亡率が劇的に低下していた (Fig. 9)。以上の結果から、ASK1 の欠損ががんの肺転移を減弱させ、個体死をも低下させることが示唆された。

3. 骨髄キメラマウスにおいて donor、recipient 双方の細胞種の ASK1 が 3LL-Luc2 細胞の肺転移に関与する

本研究の目的である、どの細胞種の ASK1 欠損ががんの肺転移の減弱に寄与

するかを解明するため、骨髄キメラマウスを作出して肺転移の表現型を解析することにした。recipient マウスに骨髄死を引き起こす線量の X 線を照射し、別個体の donor マウスから骨髄細胞を単離して移植し、生着させると、X 線感受性の骨髄由来の細胞種のみを donor の遺伝子型に置換したマウスを作出できる (Fig. 10A)。この骨髄キメラマウスにおいてまず、donor と recipient が共に WT マウスの場合 (WT - WT マウス、donor - recipient の順で表記) では、donor と recipient が共に ASK1^{-/-}マウスの場合 (ASK1^{-/-} - ASK1^{-/-}マウス) に比べて肺溶解液のルシフェラーゼ活性が有意に高かったことから (Fig. 10B)、骨髄移植の操作を加えていない野生型マウスと ASK1^{-/-}マウスを用いた場合と同様の結果が得られており、実験系の妥当性が確認できた。この時、donor と recipient のどちらかでも ASK1 を欠損すると (WT - ASK1^{-/-}マウス、ASK1^{-/-} - WT マウス)、3LL-Luc2 細胞のがん転移が有意に減弱していた (Fig. 10B)。よって、donor 骨髄に由来する細胞種、及びそれ以外の recipient に由来する細胞種の双方における ASK1 が 3LL-Luc2 細胞の肺転移に関与することが示唆された。そこで私はまず donor 骨髄に由来する細胞種に着目して解析を始めることにした。donor 骨髄に由来する細胞種には自然免疫や獲得免疫を司る炎症性細胞や血小板が含まれ、様々なメカニズムを介してがん転移を制御することが知られている (Hanahan and Coussens, 2012; Quail and Joyce, 2013)。私は donor 骨髄に由来する細胞種の中でどの細胞種における ASK1 ががんの肺転移に関与するかを検証するため、細胞種特異的な ASK1 コンディショナルノックアウトマウスの作出に取り組んだ。

4. 骨髄由来の細胞種の中でも、単球、マクロファージ及び顆粒球における ASK1 欠損が 3LL-Luc2 細胞の肺転移に与える影響は小さい

まず、骨髄由来の細胞種の中でも、単球とマクロファージ、顆粒球特異的に ASK1 を欠損するコンディショナルノックアウトマウス (LysM-cre/+; ASK1^{FF} マウス) を作出することにした (Clausen, et al., 1999)。単球やマクロファージは貪食によりがん細胞を除去する役割を担う場合もある一方、サイトカインやケモカインの放出を通して、がん細胞の生存や血管新生能、増殖能を促進する、あるいは抗腫瘍性免疫細胞を抑制する役割をも持つことが知られ、がん転移を様々なメカニズムにより促進性にも抑制性にも制御することが知られる (Hanahan and Coussens, 2012; Quail and Joyce, 2013)。また顆粒球の中でも好中球については解析が進められており、単球やマクロファージと同様の役割を果た

すことで、がん転移の促進と抑制の両方に寄与することが示唆されている (Hanahan and Coussens, 2012)。そこで私はこれらの細胞種における ASK1 ががん転移を制御し得るのではないかと予想し、LysM-cre/+; ASK1^{FF} マウスにおける 3LL-Luc2 細胞の肺転移の表現型を解析した。このマウスにおいて ASK1 のタンパク質が、腹腔マクロファージでは欠損していた一方で (Fig. 11A)、肺では WT マウスや+/+; ASK1^{FF} マウスと遜色ない発現を示した (Fig. 11B)ことから目的の細胞種特異的なノックアウトが確認された。しかしながら、LysM-cre/+; ASK1^{FF} マウスでは対照マウスである+/+; ASK1^{FF} マウスに比べて 3LL-Luc2 細胞の肺転移の減弱は見られなかった (Fig. 12)。よって、単球、マクロファージ及び顆粒球における ASK1 欠損が 3LL-Luc2 細胞の肺転移に与える影響は小さく、骨髄由来の細胞種の中でもこれら以外の細胞種における ASK1 が 3LL-Luc2 細胞の肺転移に関与していると考えられた。骨髄由来の細胞種のうち LysM-cre/+; ASK1^{FF} マウスでは原理的に ASK1 が欠損しない細胞種は具体的に、T 細胞、B 細胞、肥満細胞、NK 細胞、血小板などが挙げられる (Clemens et al., 2007; Morgan et al., 2010)。ここで ASK1^{-/-}マウスでは 3LL-Luc2 細胞を尾静注してから 3 時間後、つまり血中のがん細胞が血管外遊出を起こして増殖を開始する前の比較的早い段階から肺転移が減弱していること (Fig. 4A) から、私は次に血小板に着目した。というのも実験的肺転移モデルにおいて、血小板とがん細胞の相互作用は、がん細胞尾静注 1~3 時間後に最大となることが知られているためである (Sindelar et al., 1975)。私は血小板における ASK1 が血小板とがん細胞との相互作用に影響を与えるなどのメカニズムでがんの肺転移に関与するのではないかと考え、検証することにした。

5. ASK1^{-/-}マウスは血液学パラメーターが正常である一方、血小板における JNK、p38 及び Akt のリン酸化レベルが減弱している

血小板は巨核球の細胞質がちぎれて放出される不定形で核を持たない細胞種であり、血管内のがん細胞を取り囲み、がん細胞の生存維持、免疫監視からの保護やがん細胞の血管内皮細胞への接着支持などの、がん転移を促進する役割を担うことが知られている (Gay and Felding-Haberman, 2011)。また血小板のがん転移促進作用には、その数と機能が重要であり、いずれの低下によっても血行性のがん転移が低下することがわかっている (Gay and Felding-Haberman, 2011)。私はまず、ASK1^{-/-}マウスで見られるがん転移の低下が、血小板数の低下によっ

て引き起こされるかを検証した。しかし ASK1^{-/-}マウスは定常状態において血小板数、並びに血小板数以外の血液学パラメーターにおいて WT マウスと差がなく、正常値を示した (Table 1A)。

そこで ASK1 欠損マウスの血小板の機能が低下している可能性を考え、血小板の凝集時にシグナル受容や血小板同士の架橋形成に重要な膜表面受容体である CD41 (フィブリノゲンなどの受容体)、CD61 (フィブリノゲンなどの受容体)、GPVI (コラーゲン受容体)、CD49 (コラーゲンなどの受容体)、CD42b (von Willebrand 因子受容体)、CLEC-2 (Podoplanin 受容体)の細胞膜表面での発現をフローサイトメーターで解析した。ところがこれらの細胞膜表面での発現についても、ASK1^{-/-}マウスと WT マウスで差は見られなかった (Fig. 13)。

しかしながらウエスタンブロットによる解析から、ASK1^{-/-}マウスの血小板では JNK や p38 及び Akt のリン酸化レベルが著しく減弱していることを見いだした (Fig. 14)。JNK や p38 は ASK1 のシグナル伝達経路の既知の下流分子であり (Ichijo et al., 1997; Tobiume et al., 2001)、Akt も含めて血小板の活性化や凝集に重要であることが報告されている (Adam et al., 2008; Woulfe, 2010)。またこれらの分子を遺伝学的に欠損したり、阻害剤によってその活性を低下させると血小板凝集が減弱することも既に多く報告されており (Adam et al, 2010; Chen et al, 2010; Woulfe et al, 2004; O'Brien et al, 2011)、血小板機能制御における重要性が伺える。私は ASK1 がこれらのシグナル伝達分子と同様に血小板機能を制御している可能性を考え、さらに解析を進めることにした。

6. ASK1^{-/-}マウス は *in vivo* において出血傾向、並びに血栓形成遅延の表現型を呈する

JNK や p38 及び Akt の血小板機能制御における重要性は、以下に挙げる各遺伝子の欠損マウスにおいて *in vivo* でも既に示されている。血小板機能を *in vivo* で評価する実験系として、マウスの尾の切断先端からの出血時間を計測する Tail bleeding assay という手法が確立されており、出血時間が延長した場合には止血応答の低下が疑われる。このモデルにおいて、JNK1^{-/-}マウス (Adam et al, 2010) や Akt1^{-/-}マウス (Chen et al, 2010)では出血時間の延長が報告されている。またもう一つ、人為的に血栓形成を惹起する塩化鉄誘導性血栓形成モデルも評価系として確立されており、血栓形成が遅延した場合には同じく止血応答の低下が疑われる。このモデルにおいては、JNK1^{-/-}マウス (Adam et al, 2010)や Akt2^{-/-}マウス

(Woulfe et al, 2004)、Akt3^{-/-}マウス (O'Brien et al, 2011)で血栓形成の遅延が観察され、血小板が機能低下を起こしていることが示唆されている。私は ASK1 がこれらシグナル伝達分子の上流因子として血小板機能を制御している可能性を考え、この2つの実験系を用いて *in vivo* での ASK1^{-/-}マウスの表現型を調べることにした。まず Tail bleeding assay において、ASK1^{-/-}マウスは WT マウスに比べて出血時間が有意に延長していた (Fig. 15A)。さらに塩化鉄誘導性血栓形成モデルにおいても、ASK1^{-/-}マウスでは血栓形成の遅延が見られた (Fig. 15B)。以上の結果から、ASK1^{-/-}マウスは *in vivo* で止血応答低下の症状を呈することが示された。

7. ASK1^{-/-}マウスの血小板は ADP 依存的なアゴニストへの応答性が低い

次に ASK1 の欠損が血小板機能に与える影響を詳細に検討するため、ASK1^{-/-}マウスの単離血小板を *in vitro* で様々なアゴニストを用いて凝集させ、その程度を WT マウスと比較した。すると凝集を起こす際に ADP への依存性が高いことが知られる低用量 collagen (Fig. 16A)、低用量 PAR-4 (Fig. 16B)、低用量 rhodocytin (Fig. 16C)の複数のアゴニストによる血小板凝集、並びに ADP による血小板凝集 (Fig. 16D)が、ASK1^{-/-}マウスの血小板で低下していた。一方 ADP への依存性が低いアゴニストである thrombin による血小板凝集には ASK1^{-/-}マウスと WT マウスの血小板で差が見られなかった (Fig. 16E)。よって、ASK1^{-/-}マウスの血小板は ADP への応答性が低下していることが示唆された。

8. 血小板特異的な ASK1 欠損マウスは ASK1^{-/-}マウスと同様、*in vivo* において血小板機能低下の表現型を呈する

続いて ASK1^{-/-}マウスで観察された *in vivo* での止血応答の低下が血小板における ASK1 に起因するかを検証することにした。というのも Kindlin-2^{-/-}マウスのように (Pluskota et al., 2013)、血管内皮細胞で発現する CD73 などの血小板凝集抑制因子の発現亢進によって *in vivo* で止血応答が低下する可能性があるため、止血応答の低下は必ずしも血小板内の変化に起因する表現型だとは限らないからである。そこで血小板、並びに血小板の前駆体である巨核球特異的に ASK1 を欠損するコンディショナルノックアウトマウス (Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウス)を作出し (Tiedt et al., 2007)、その表現型を解析した。このマウスにおいて ASK1 のタンパク質が、血小板では欠損していた一方で (Fig. 17A)、肺では WT マウスや+/+; ASK1^{F/F} マウスと遜色ない発現を示した (Fig. 17B)。Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウスは

ASK1^{-/-}マウスと同様に、定常状態の血小板数を含めた血液学パラメーター (Table 1B) や血小板の膜表面受容体の発現 (Fig. 18)は正常である一方、血小板における JNK や p38 のリン酸化レベルは減弱していた (Fig. 17A)。

そして *in vivo* での Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウスの表現型を解析すると ASK1^{-/-}マウスと同様、Tail bleeding assay においては出血傾向を (Fig. 19A)、塩化鉄誘導性血栓形成モデルにおいては血栓形成遅延の表現型を (Fig. 19B)示した。よって、ASK1^{-/-}マウスで見られた *in vivo* の止血応答低下の表現型には、血小板における ASK1 が寄与していることが明らかになった。つまり血小板における ASK1 欠損が血小板機能低下を引き起こし、*in vivo* において止血応答を低下させることが示唆された。

9. 血小板特異的な ASK1 欠損マウスの血小板も ASK1^{-/-}マウスと同様、ADP 依存的なアゴニストへの応答性が低い

8.に引き続き、ASK1^{-/-}マウスで観察された *in vitro* の単離血小板での ADP 応答性低下が、血小板における ASK1 に起因するかを検証した。すると ASK1^{-/-}マウスと同様、Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウスの単離血小板では低用量 collagen (Fig. 20A) 並びに ADP による血小板凝集 (Fig. 20B)が低下していた一方で、thrombin による血小板凝集には差が見られなかった (Fig. 20C)。以上の結果から、ASK1^{-/-}マウスの *in vivo* での止血応答低下の表現型と *in vitro* での血小板の ADP 応答性低下の表現型は、血小板特異的な ASK1 欠損によっても再現できることが示された。

10. 血小板単独の ASK1 欠損は B16F10-luc-G5 細胞の肺転移を減弱させるが、3LL-Luc2 細胞の肺転移には大きな影響を与えない

続いて、ASK1 欠損による血小板の機能低下ががんの肺転移減弱を引き起こすかを検討するため、Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウスのがんの肺転移の表現型を検討した。すると B16F10-luc-G5 細胞による肺転移が有意に減弱していたことから (Fig. 21A)、血小板における ASK1 欠損が血小板の機能低下を引き起こし、その結果がん細胞の肺転移を減弱させることが示唆された。一方で 3LL-Luc2 細胞による肺転移は低下傾向にあるものの有意な減弱ではなかったことから (Fig. 21B)、血小板単独の ASK1 欠損が 3LL-Luc2 細胞の肺転移に与える影響は大きくないと考えられた。よって以上の結果から、血小板の ASK1 が血小板機能及び一部のがんの肺転移を制御することが明らかになった。私は ASK1 を欠損した

血小板が ADP 応答性低下の表現型を示したことに着目し、ASK1 の ADP シグナル制御メカニズムの解明に焦点を当てて解析を進めた。

11. 血小板において ASK1 は ADP 受容体 P2Y₁₂ のリン酸化を制御する

血小板において、ADP は 2 つのプリン作動性 P2Y 受容体、P2Y₁ と P2Y₁₂ に結合してシグナルを下流へと流し、最終的に血小板凝集を引き起こすことが知られている (Dorsam and Kunapuli, 2004)。P2Y₁ と P2Y₁₂ はいずれも G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、P2Y₁ は G_q に、P2Y₁₂ は G_i に共役している。P2Y₁ は Phospholipase C- β (PLC β) の活性化を介して細胞質内のカルシウムイオン濃度亢進、そして Protein kinase C (PKC) の活性化を引き起こすことにより、一方 P2Y₁₂ はアデニレートシクラーゼの抑制、Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) と下流の RAS related protein 1b (Rap1b) や Akt の活性化、そして一部のカリウムチャネルの活性化を引き起こすことにより、それぞれ血小板凝集に寄与することが示されている (Dorsam and Kunapuli, 2004)。ここで Akt のリン酸化には P2Y₁₂ が大きく寄与していること (Kim et al., 2004)、並びに先の解析結果から、ASK1^{-/-}マウスの血小板で Akt のリン酸化レベルが減弱していることに着目し (Fig. 14)、まず ASK1 と P2Y₁₂ の関連性を検証することにした。

P2Y₁₂ が血小板の機能制御に与える影響は P2Y₁₂^{-/-}マウス (André et al., 2003) や、恒常的活性化体の P2Y₁₂ を血小板特異的に発現するトランスジェニックマウス (cP2Y₁₂-Tg マウス; Zhang et al., 2012) において既に報告されている。P2Y₁₂^{-/-}マウスは ASK1^{-/-}マウスと同様、Tail bleeding assay において出血傾向を、塩化鉄誘導性血栓形成モデルにおいては血栓形成遅延の表現型を呈し、P2Y₁₂^{-/-}マウスの単離血小板は ADP や ADP 依存性の高いアゴニストへの応答性が低下することが示されている (André et al., 2003)。一方 cP2Y₁₂-Tg マウスは P2Y₁₂^{-/-}マウスと逆の表現型を示すことから (Zhang et al., 2012)、止血応答や血小板凝集における P2Y₁₂ の必要十分性が示唆されていると言える。さらに血小板の機能制御に加えて、P2Y₁₂ はがんの肺転移への関与も示唆されており、P2Y₁₂^{-/-}マウスでは実験的肺転移モデルにおける B16F10 細胞の肺転移が減弱することが報告されている (Wang et al., 2013)。また最近、虚血性心疾患などに対して抗血小板剤として臨床でも使用されている Clopidogrel や Ticagrelor といった P2Y₁₂ 阻害剤によって、実験的肺転移モデルにおける B16F10 細胞の肺転移が減弱することも明らかになった (Gebremeskel, 2015)。これらの報告は P2Y₁₂ の血小板機能制御やがん転移に

おける重要性を示唆するものであり、私は欠損マウスの表現型の類似性から、ASK1 が P2Y₁₂ の上流あるいは下流因子として機能するのではないかと考えた。そこでまず ASK1^{-/-}マウスの単離血小板での P2Y₁₂ のタンパク質の発現を調べた。

ウエスタンブロットによる解析において、ASK1^{-/-}マウス及び Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウスの単離血小板では、WT マウスや+/+; ASK1^{F/F} マウスに比べて P2Y₁₂ のタンパク質の発現レベルには大きな差は見られなかった。しかし興味深いことに、そのバンドの泳動度が低分子側にシフトしていることが観察された (Fig. 22A)。P2Y₁₂ はこれまでの研究結果から、転写翻訳後に N 型の糖鎖修飾とリン酸化修飾を受けることがわかっている (Cattaneo, 2011)。ここで λ PPase によって全てのリン酸化部位の脱リン酸化を引き起こすと、WT マウスと ASK1^{-/-}マウスの血小板で見られた P2Y₁₂ のバンドシフトが消失したことから (Fig. 22B)、このバンドシフトがリン酸化に由来しており、血小板で ASK1 が P2Y₁₂ のリン酸化を制御することが示唆された。ASK1 による P2Y₁₂ の具体的なリン酸化部位や機能に対する影響、また、がんの肺転移との関連性は本研究で明らかにすることができなかったが、考察で述べるように今後解析を進める予定である。

12. 血小板機能低下及びがんの肺転移減弱には、ASK ファミリー分子の中でも主に ASK1 が起因する

哺乳類の ASK ファミリー分子としては ASK1 の他に、ASK2 と ASK3 の 2 つが同定、解析されている (Takeda et al., 2007; Naguro et al., 2012)。ASK1 と同様に ASK2 と ASK3 も MAP3K ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼであり、タンパク質の一次構造上 ASK1 と全体で順に約 45%と約 55%、特にキナーゼドメインにおいては順に約 79%、約 87%の相同性を有する。全身に普遍的に発現する ASK1 とは異なり、ASK3 は胃や腎臓などの浸透圧ストレスに曝される組織に多く発現することがわかっており、浸透圧ストレスに対してそのリン酸化レベルが両方向性に变化することが知られている (Naguro et al., 2012)。一方 ASK2 は非常に不安定なタンパク質で、ASK1 と複合体を形成することで初めて分解を免れて安定化し、MAP3K として機能することが明らかになっている (Takeda et al., 2007)。すなわち、ASK1^{-/-}マウスでは ASK1 のタンパク質の発現が欠損しているだけでなく、ASK2 のタンパク質の発現も低下していると考えられる。実際に私が行った血小板サンプルのウエスタンブロットにおいても、WT マウスの血小板では ASK2 のタンパク質が検出されるのに対し、ASK1^{-/-}マウスの

血小板では検出限界以下の発現しか認められなかった (Fig. 14)。よって、ASK1^{-/-}マウスにおいて観察される表現型は、ASK1 と ASK2 の両方のタンパク質が欠損もしくは低下した影響を受けていると考えるべきである。ここで ASK2^{-/-}マウスでは ASK2 のタンパク質が欠損しているが、少なくとも角化細胞では ASK1 のタンパク質の発現が WT マウスと同等であることは既に確認されている (Iriyama et al., 2009)。そこでまず、ASK2^{-/-}マウスの血小板のウェスタンブロットにおいて ASK1 が WT マウスと同等の発現を示すかどうか、また JNK や p38 のリン酸化レベルを検証した。すると ASK2^{-/-}マウスの血小板では WT マウスと同等に ASK1 のタンパク質が発現しており、この時 ASK1^{-/-}マウスの血小板とは異なり、JNK や p38 のリン酸化レベルは WT マウスと同程度だった (Fig. 23)。よって、ASK1^{-/-}マウスの血小板で見られた JNK や p38 のリン酸化レベルの減弱 (Fig. 14) は ASK2 ではなく ASK1 の欠損に起因しており、血小板において JNK や p38 のリン酸化を制御しているのは ASK2 ではなく主に ASK1 だと考えられる。

一方 ASK3 については WT マウスでも検出限界以下の発現しか認められなかったが (data not shown)、血小板において ASK3 が発現していないのか、あるいは発現していて何らかの機能を有するかは不明である。また ASK2 についても、血小板での JNK や p38 のリン酸化制御への関与は否定されたが (Fig. 23)、他のシグナル伝達経路の制御を介して血小板機能制御を担う可能性は十分にある。そこで ASK2 と ASK3 の血小板機能への影響を検証するため、それぞれの欠損マウスで血小板機能低下が見られるかを検証しようと考え、Tail bleeding assay における *in vivo* での表現型を解析することにした。その結果、ASK2^{-/-}マウス (Fig. 24A)、ASK3^{-/-}マウス (Fig. 24B) 共に WT マウスに比べて出血時間が延長しなかったことから、*in vivo* での血小板機能制御を担う ASK1 の機能は、ASK ファミリー分子の中でも ASK1 特異的であると考えられる。

さらに実験的肺転移モデルにおける ASK1^{-/-}マウスのがんの肺転移低下に ASK2 が与える影響を調べるため、ASK2^{-/-}マウス及び WT マウスに 3LL-Luc2 細胞を尾静注して、14 日後の肺溶解液のルシフェラーゼ活性を測定した。すると、ASK2^{-/-}マウスでも肺溶解液のルシフェラーゼ活性が低下する傾向にあった (Fig. 25A)。さらに 3LL-Luc2 細胞を尾静注したマウスの生存を追跡したところ、ASK2^{-/-}マウスの生存率は微弱ながらも有意に延長していた (Fig. 25B)。以上の結果から、ASK1 だけでなく ASK2 も、実験的肺転移モデルにおけるがんの肺転移に関与している可能性が示唆された。ただし、いずれの表現型も WT マウスと

の差が小さく、ASK1^{-/-}マウスほどの劇的な表現型の違いではなかったことから、ASK1^{-/-}マウスにおけるがんの肺転移低下の表現型に対して ASK2 の欠損が与える影響は比較的小さく、主に ASK1 が欠損することに起因することが示唆される。

13. 血管内皮細胞特異的な ASK1 欠損は B16F10-luc-G5 細胞及び 3LL-Luc2 の肺転移を減弱させる

ASK1 の欠損ががん転移に与える影響について、血小板という観点から目を転じると、3.の結果から、骨髄キメラマウスにおいて、donor と recipient のどちらからでも ASK1 を欠損すると 3LL-Luc2 細胞の肺転移が減弱することがわかっている (Fig. 10B)。これを踏まえて私は、これまで検証を進めてきた donor 骨髄に由来する細胞種以外の、recipient に由来する細胞種の 1 つである血管内皮細胞にも着目した。がん細胞は血行性のがん転移において、血管内皮細胞への接着、そして引き続く強固な結合の形成を介して血管外遊出を起こすことで転移先臓器に到達できる (Reymond et al., 2013) (Fig. 3)。これら一連の過程は、炎症時に白血球が炎症部位まで遊走するシステムをがん細胞が悪用することで達成される可能性が提示されており、炎症などの際に血管内皮細胞が発現する接着因子や血管外遊出を補助するサイトカインやケモカインの欠損によって、がん転移が減弱する例が報告されている。例えば、がん細胞由来の chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)が受容体である chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2)を発現する血管内皮細胞を活性化することで、血管透過性及び血管外遊出が亢進し、がん転移が誘導されることが示されている (Wolf et al., 2012)。またがん細胞の中には血管外遊出の際に、血管内皮細胞のアポトーシスを誘導するものがあるという報告もあり (Shaheen et al., 1999; Mierke, 2008)、血管内皮細胞ががん転移の”防護壁”として機能する可能性が提唱されている。そこで私は血管内皮細胞の ASK1 ががんの肺転移に関与する可能性を考え、解析することにした。

血管内皮細胞特異的に ASK1 を欠損するコンディショナルノックアウトマウス (Cdh5-cre/+; ASK1^{FF} マウス; Kogata et al., 2006)を作出して、がんの肺転移の表現型を解析した。すると、Cdh5-cre/+; ASK1^{FF} マウスでは B16F10-luc-G5 細胞 (Fig. 26A)、3LL-Luc2 細胞 (Fig. 26B)の双方の肺転移が有意に減弱していた。よって血管内皮細胞における ASK1 の欠損も、血小板と並行して何らかのメカニズムを介してがんの肺転移を減弱させると考えられた。

14. がん転移に関連するいくつかの接着因子の発現は、3LL-Luc2 細胞尾静注後の ASK1^{-/-}マウスの肺において減弱しない

血管内皮細胞における ASK1 欠損ががんの肺転移を減弱させるメカニズムとして、がん細胞の接着に対する影響をまず検討しようと考えた。ここで私は ASK1^{-/-}マウスでがん転移減弱が観察され始める、3LL-Luc2 細胞尾静注 3 時間後 (Fig. 4A) という時点に着目した。というのも実験的肺転移モデルにおいて、血管内皮細胞ががん細胞と接着する際に転写翻訳を誘導して細胞膜表面に発現させることが知られる E-selectin などの接着因子の発現が、がん細胞尾静注から数時間の範囲で大きく上昇することが知られているためである (Läubli and Borsig, 2010)。そこでがん転移と炎症時の白血球遊走において血管内皮細胞が発現を亢進させる接着因子である (Vestweber, 2015)、E-selectin (*Sele*)、P-selectin (*Selp*)、Vcam1 (*Vcam1*)、Icam1 (*Icam1*)、Pecam1 (*Pecam1*) と Cxcr7 (*Ackr3*) の転写レベルでの発現量を、3LL-Luc2 細胞尾静注 3 時間後の肺サンプルにて検証した。すると PBS を尾静注した negative control 群に比べて 3LL-Luc2 細胞を尾静注した群で発現上昇が見られたことから (Fig. 27A-F)、確かにがん細胞依存的に接着因子の発現亢進が起きていると考えられる。しかし WT マウスと ASK1^{-/-}マウスでその発現亢進の程度に差は見られなかったことから (Fig. 27A-F)、少なくとも ASK1^{-/-}マウスで見られるがんの肺転移減弱は、これらの接着因子の発現変動に起因しないと考えられる。

【考察】

本研究の結果を踏まえて、まず結果に対する考察を加えるとともに、今後の解析について考察することとしたい。

<結果に対する考察>

4. 骨髄由来の細胞種の中でも、単球、マクロファージ及び顆粒球における ASK1 欠損が 3LL-Luc2 細胞の肺転移に与える影響は小さい

LysM-cre/+; ASK1^{FF} マウスでは 3LL-Luc2 細胞の肺転移の減弱は見られなかったことから (Fig. 12)、単球、マクロファージ及び顆粒球における ASK1 欠損が 3LL-Luc2 細胞の肺転移に与える影響は小さく、骨髄由来の細胞種の中でもこれら以外の細胞種における ASK1 が 3LL-Luc2 細胞の肺転移に関与していると考えられた。しかし腹腔マクロファージでの ASK1 のタンパク質の発現をウエスタンブロットで検出すると、LysM-cre/+; ASK1^{FF} マウスでも検出限界以上の発現が認められた (Fig. 11A)。つまり LysM-cre/+; ASK1^{FF} マウスの単球、マクロファージ及び顆粒球における ASK1 の欠損効率が十分でなく、残存している ASK1 によって機能が補完された結果、3LL-Luc2 細胞の肺転移の減弱が見られなかった可能性は拭いきれない。あるいはこれらの細胞種ががん転移を促進性にも抑制性にも制御し得るため、ASK1 が欠損することでこれらの細胞種のがん転移に対する作用に影響は出るものの、個体のがんの肺転移の表現型としては相殺された可能性も考えられる。よってこれらの細胞種における ASK1 の関与を詳細に検証するためには、例えばマクロファージの場合には clodronate を用いてマクロファージを特異的に欠損させたマウスを用いて、がんの肺転移の表現型を解析することが有用だと考えられる。または促進性や抑制性の制御を担う subpopulation を単離して解析する必要もあるだろう。

一方 LysM-cre/+; ASK1^{FF} マウスにおける B16F10-luc-G5 細胞による肺転移の表現型は未だ解析できておらず、今後明らかにしたい。その結果次第では、がん細胞種によっては単球、マクロファージ及び顆粒球における ASK1 ががんの肺転移に関与し得ると考えることができるだろう。

8. 血小板特異的な ASK1 欠損マウスは ASK1^{-/-}マウスと同様、*in vivo* において血小板機能低下の表現型を呈する

Pf4-cre/+; ASK1^{FF} マウスは ASK1^{-/-}マウスと同様、Tail bleeding assay において

は出血傾向を (Fig. 19A)、塩化鉄誘導性血栓形成モデルにおいては血栓形成遅延の表現型を (Fig. 19B)示したため、ASK1^{-/-}マウスで見られた *in vivo* の止血応答低下の表現型には、血小板における ASK1 が寄与していることがわかった。しかしながらこの結果は例に挙げた Kindlin-2^{+/-}マウスのように (Pluskota et al., 2013)、血管内皮細胞の機能変化によって引き起こされる可能性を否定するものではなく、血管内皮細胞における ASK1 欠損が *in vivo* の止血応答低下に寄与する可能性は依然残っている。今後 Cdh5-cre/+; ASK1^{F/F} マウスの Tail bleeding assay や塩化鉄誘導性血栓形成モデルにおける表現型を解析することで、上記の可能性を判断したい。その結果次第では、血小板と血管内皮細胞の双方における ASK1 が相乗的に止血応答を制御していることも考えられよう。

10. 血小板単独の ASK1 欠損は B16F10-luc-G5 細胞の肺転移を減弱させるが、3LL-Luc2 細胞の肺転移には大きな影響を与えない

- **B16F10-luc-G5 細胞と 3LL-Luc2 細胞の肺転移で Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウスの表現型が異なる理由**

B16F10 細胞と 3LL 細胞はともに肺への高転移性を示すことは知られているが、その肺転移メカニズムの詳細や、特に両者の肺転移メカニズムに差異があるかについては解析されていなかった。Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウスで両者の肺転移の表現型が異なるという結果 (Fig. 21A, B)は大変興味深く、その理由を考察したい。

既に紹介した報告において、P2Y₁₂^{-/-}マウスで B16F10 細胞の肺転移が減弱するメカニズムが解析されている (Wang et al., 2013)。Wang らはがん細胞によって血小板凝集を引き起こす実験系において、WT マウスの血小板が B16F10 細胞によって凝集する一方で 3LL 細胞によっては凝集しないこと、及び P2Y₁₂^{-/-}マウスの血小板は B16F10 細胞による凝集が減弱することを示している。このことから私は、B16F10 細胞の方が 3LL 細胞よりも血小板凝集誘導能が高く、肺へ転移する際により血小板に依存している一方で、3LL 細胞は血小板凝集誘導能が低く、肺へ転移する際に血小板に依存せずとも転移できてしまうのではないかと考えている。つまり ASK1 欠損によって血小板が機能低下した場合に、B16F10 細胞の肺への転移能は低下する一方、3LL 細胞の肺への転移能は比較的大きな影響を受けない可能性を想定している。Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウスでの肺転移の表現型の違いを血小板凝集能の違いによって説明できるかを検証するためにも、

Wang らの示した、B16F10 細胞と 3LL 細胞が異なる血小板凝集誘導能を持つことを確かめた上で、B16F10 細胞が ASK1^{-/-}マウスの血小板の凝集を引き起こせなくなるなどの表現型の違いが見られるかどうかを検討したい。

- **血小板での ASK1 によるがんの肺転移制御は ADP シグナルを介するか**
ASK1^{-/-}マウスや Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウスを用いた解析から、血小板における ASK1 の欠損が単離血小板の ADP 応答性を低下させ、*in vivo* において止血応答低下、そして B16F10-luc-G5 細胞の肺転移を減弱させることが明らかになった (Fig. 15-21)。ここで ADP 応答性低下はがん転移減弱を引き起こし得るのかを考えてみたい。血小板は凝集刺激を受容した際にさらに凝集を増幅させるための ADP や thrombin などを、自身の細胞質内の顆粒内に保持している。血小板から放出される ADP は血小板同士の架橋形成だけでなく、がん細胞の周囲への血小板の接着を支持することが知られ、例えばがん細胞と ADP を同時に尾静注すると、がん細胞を単独で尾静注した場合よりもがん転移が促進されることが知られている (Yoshikawa et al., 2009)。そのため ASK1 が他のシグナル経路を介してがんの肺転移を制御している可能性は残るものの、ASK1 の欠損によって血小板の ADP 応答性が低下すると、がん細胞へと接着する血小板数が低下するため、がん細胞の転移能が減弱し得ると考えられる。ADP シグナル制御への依存性がどの程度なのかについては、上で紹介した報告のように、ADP とがん細胞を同時に Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウスに尾静注した場合にがん転移の亢進が見られるかどうかの一つの判断材料となるだろう。

- **巨核球における ASK1 の関与の可能性**

血小板での ASK1 欠損の影響を見るために作製した Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウスでは、巨核球においても ASK1 が欠損すると想定される。そのため巨核球における ASK1 の欠損ががん転移の表現型に影響を与える可能性も考えられるため、巨核球の段階で ASK1 が欠損していることと、巨核球から放出された後の血小板で ASK1 が欠損していることのどちらが表現型に寄与するのかを区別できていない。ここで一般的に、巨核球は骨髄から外（血中など）には出てこないと考えられているので、巨核球が直接がん細胞と相互作用する可能性は、少なくともこの実験的肺転移モデルにおいてはないただろうと思われる。ただし巨核球の段階で ASK1 が欠損していることが、産生される血小板の機能低下を引き起こ

す可能性は十分あると考えられるため、間接的にはがん転移に関与し得ると予想される。そしてそのメカニズムは、ASK1^{-/-}マウスや Pf4-cre/+; ASK1^{FF} マウスの血小板数が正常であることを鑑み (Table 1A, B)、少なくとも産生する血小板数には影響を与えないものだと考えられる。

11. 血小板において ASK1 は ADP 受容体 P2Y₁₂ のリン酸化を制御する

P2Y₁₂ は N 型糖鎖修飾を受けることで正常なシグナル伝達機能を有することが示唆されている (Zhong et al., 2004)。その一方でリン酸化修飾については、修飾を受けること自体はわかっているものの、その具体的なリン酸化部位や機能に対する影響は詳細には解析されていない。また GPCR は一般的に GPCR キナーゼ (GRK) によって直接的にリン酸化されると考えられているが (Ritter and Hall, 2009)、実際に P2Y₁₂ のリン酸化を直接的に担うキナーゼの同定には至っていない。

P2Y₁₂ は Gi に共役しており、細胞に P2Y₁₂ を過剰発現させると Forskolin 刺激による細胞内の cAMP 濃度上昇を、ADP 同時処置時に抑制することができる。この性質を P2Y₁₂ の機能を示す指標とし、P2Y₁₂ のリン酸化制御を担うキナーゼの探索や出血傾向を持つヒト患者で検出された P2Y₁₂ 変異体の表現型解析が進められてきた (Hardy et al., 2005; Nisar, et al., 2011)。Hardy らは GRK の中で GRK2 と GRK6 に着目し、siRNA を用いてこれらの分子をノックダウンした場合の cAMP 濃度抑制能への影響を検討した。すると GRK2 と GRK6 の単独ノックダウンで部分的に、そして両者のノックダウン併用でほぼ完全に抑制能が失われたことから、P2Y₁₂ のリン酸化は GRK2 と GRK6 が相乗的に担うことが示唆されている (Hardy et al., 2005)。しかしこの報告では GRK2 や GRK6 が P2Y₁₂ を直接的にリン酸化していることを示してはいなかった。GRK が一般的に GPCR を直接的にリン酸化すると言われていたことから (Ritter and Hall, 2009)、両者が P2Y₁₂ を直接的にリン酸化すると予想はされるが、*in vitro* kinase assay などの実験系によって実際に示す必要があると言える。また GRK2 や GRK6 が P2Y₁₂ のどの部位のリン酸化制御を担うのかは未だ不明であり、今後の解明が待たれる。一方 Nisar らは出血傾向のヒト患者で見つかった変異体を細胞に過剰発現させる実験系にて解析し、P2Y₁₂ の脱感作や再感作異常が引き起こす P2Y₁₂ のリサイクリング低下が、P2Y₁₂ の ADP への応答性低下につながる可能性を提示した (Nisar et al., 2011)。実際にこれらの変異体が *in vivo* での止血応答や *in vitro* での

単離血小板の ADP 応答性を低下させるかを検証するには変異体の KI マウスを作製する必要があるとはいえ、P2Y₁₂ の遺伝子変異がリサイクリング低下を引き起こし、P2Y₁₂ の ADP への応答性を低下させ得ることを示唆していることは、注目に価すると言えよう。

本研究の結果は GRK 以外のキナーゼが P2Y₁₂ のリン酸化を制御することを明らかにした点で大変興味深い。ASK1 が P2Y₁₂ のリン酸化をどのように制御しているのか、具体的には GRK2 や GRK6 の制御を介して間接的に、あるいは ASK1 が直接的に、P2Y₁₂ をリン酸化している可能性が考えられる。そしてそのリン酸化部位についても、GRK2 や GRK6 と ASK1 が同じ部位のリン酸化を担う場合も、異なる部位のリン酸化を制御して P2Y₁₂ の機能に異なる影響を与える場合も想定することができる。さらには ASK1^{-/-}マウスの血小板で同じくキナーゼである JNK や p38 及び Akt のリン酸化レベルが減弱していたことから (Fig. 14)、これらのシグナル伝達分子の下流で P2Y₁₂ のリン酸化が制御される可能性さえ考えられる。また ASK1 が P2Y₁₂ 特異的なリン酸化に影響を与えるのか、P2Y₁₂ 以外の GPCR のリン酸化制御を担うのかについても解析したいと考えている。

本研究では明らかにできなかったが、WT マウスと ASK1^{-/-}マウスの血小板に対してリン酸化 Mass Spectrometry を用いた解析を予定しており、ASK1 が担う P2Y₁₂ のリン酸化部位の同定を進める予定である。またリン酸化部位が同定された場合に、リン酸化が欠失する変異体の機能解析を進めるための、cAMP 濃度を測定する実験系を確立しつつあり、ASK1 が P2Y₁₂ のどの部位のリン酸化を制御しているのか、また P2Y₁₂ のどのような機能に影響を与えているのかを今後明らかにしたいと考えている。加えて ASK1 による P2Y₁₂ のリン酸化制御が血小板特異的に起きるかどうかも着目したい。P2Y₁₂ は主に血小板に発現しているが、脳の一部や血管平滑筋細胞、さらには樹状細胞などの白血球でもその発現が確認されている (Cattaneo, 2015)。これら血小板以外の細胞種においても ASK1 が P2Y₁₂ のリン酸化を制御する場合には、その細胞種においてどのような機能に影響を与えるのか、また血小板特異的な現象である場合にはその特異性が生じるメカニズムを解明したい。

12. 血小板機能低下及びがんの肺転移減弱には、ASK ファミリー分子の中でも主に ASK1 が起因する

結論で述べた通り、ASK 2^{-/-}マウス (Fig. 27A) と ASK 3^{-/-}マウス (Fig. 27B) では

共に WT マウスに比べて出血時間が延長しなかったことから、*in vivo* での血小板機能制御を担う ASK1 の機能は、ASK ファミリー分子の中でも ASK1 特異的であると考えられる。互いに相同性の高い ASK ファミリー分子の中でなぜ ASK1 特異的なのかは現時点で未解明なため、今後その特異性に寄与するメカニズムにも注目して解析していきたい。

一方 ASK1^{-/-}マウスにおけるがんの肺転移低下の表現型に対して ASK2 の欠損が与える影響は比較的小さく (Fig. 25A, B)、主に ASK1 が欠損することに起因することが示唆されたが、ASK3^{-/-}マウスのがんの肺転移における表現型は明らかになっていない。もし ASK3^{-/-}マウスでがんの肺転移減弱が見られる場合には、ASK1^{-/-}マウスのように血小板機能の制御を介したメカニズムではなく他のメカニズムを介すると考えられるため、血管内皮細胞や他の細胞種に着目して解析を進めていきたい。

14. がん転移に関連するいくつかの接着因子の発現は、3LL-Luc2 細胞尾静注後の ASK1^{-/-}マウスの肺において減弱しない

3LL-Luc2 細胞尾静注 3 時間後の肺サンプルにおいて、E-selectin (*Sele*)、P-selectin (*Selp*)、Vcam1 (*Vcam1*)、Icam1 (*Icam1*)、Pecam1 (*Pecam1*) と Cxcr7 (*Ackr3*) の転写レベルでの発現量を比較した場合には、WT マウスと ASK1^{-/-}マウスでその発現に差は見られなかった (Fig. 27A-F)。ただしこの実験に用いたサンプルが、肺を構成する血管内皮細胞以外における発現変動を反映している可能性を否定できないため、これらの接着因子の血管内皮細胞における発現に変化がないことを示すデータではない。また、未だ検証できていない他の接着因子の発現制御によって ASK1 ががんの肺転移を制御している可能性は十分あることから、それらの接着因子についても発現変動を検証していきたいと考えている。今後は ASK1 を欠損したりノックダウンにより発現が減弱した血管内皮細胞において、がん細胞と共培養した場合の接着因子の発現変動を解析することで、肺全体ではなく血管内皮細胞での変動を特異的に検出してさらなる検証を進めたい。また並行して、血管内皮細胞での ASK1 の欠損やノックダウンががん細胞の接着や血管外遊出、がん細胞による血管内皮細胞のアポトーシス誘導に与える影響を、血管内皮細胞とがん細胞の共培養実験系において詳細に解析したいと考えている。

<今後の解析に向けての考察>

もう1つの既知のADP受容体であるP2Y₁とASK1の関連性について

本研究ではASK1とP2Y₁₂の関連性に着目して解析を進めたが、ASK1のP2Y₁への関与を否定するデータは現時点で持ち合わせていない。P2Y₁^{-/-}マウスはP2Y₁₂^{-/-}マウスやASK1^{-/-}マウスと同様、Tail bleeding assayにおいて出血傾向を示すことや、collagenやADPなどで血栓形成を*in vivo*で惹起する実験系において、マウス個体の死亡率低下が報告されている (Fabre et al., 1999; Léon et al., 1999)。またP2Y₁^{-/-}マウスの単離血小板は、ADPやADP依存性の高い低用量collagenによる血小板凝集が減弱することに加えて、ASK1^{-/-}マウスとは異なり、thrombinによる血小板凝集も減弱することが示されている (Léon et al., 1999)。このデータだけを根拠にASK1とP2Y₁の関連性を否定するわけではないが、欠損マウスの単離血小板の表現型が異なることは留意すべき事項であろう。今後はP2Y₁がPLCβの活性化を介して細胞質内のカルシウムイオン濃度亢進やPKC活性化を引き起こすことに着目し (Dorsam and Kunapuli, 2004)、ASK1^{-/-}マウスの血小板でこれらのシグナル伝達分子の挙動や細胞質内のカルシウムイオン濃度を検証することで、ASK1がADPシグナルを制御する際にP2Y₁に対しても影響を与えているのかを検討していきたい。

他の細胞種におけるASK1のがんの肺転移への関与について

- ・ **donor 骨髄に由来する細胞種におけるASK1の、3LL-Luc2細胞の肺転移への関与について**

3LL-Luc2細胞の肺転移はCdh5-cre/+; ASK1^{FF}マウスで有意に減弱していたが (Fig. 26B)、Pf4-cre/+; ASK1^{FF}マウス (Fig. 21B)やLysM-cre/+; ASK1^{FF}マウス (Fig. 12)では有意な減弱が認められなかった。その一方で骨髄キメラマウスにおいては、donorとrecipientのどちらかでもASK1を欠損すると、3LL-Luc2細胞のがん転移が有意に減弱していた (Fig. 10)。つまり本研究においては、donor骨髄に由来する細胞種におけるASK1が3LL-Luc2細胞の肺転移に関与することは明らかになったものの、その中でどの細胞種におけるASK1が必要なのかは不明なままである。ここで血小板単独、あるいは単球、マクロファージ、顆粒球のみでASK1を欠損しても3LL-Luc2細胞の肺転移が有意に減弱しないことが、これらの細胞種におけるASK1の関与を否定するものではないことに留意したい。つまりこれらの細胞種におけるASK1が協調的に働くことで3LL-Luc2細胞

の肺転移に関与する可能性は拭いきれず、例えばこれらの細胞種を全て欠損した、LysM-cre/Pf4-cre; ASK1^{FF} マウスにおける 3LL-Luc2 細胞の肺転移の表現型解析がその可能性の検証には有用であろう。ただし勿論、donor 骨髄に由来する細胞種の中で検証できていない、T 細胞、B 細胞、肥満細胞、NK 細胞における ASK1 が 3LL-Luc2 細胞の肺転移を制御する可能性があり、今後細胞種特異的な ASK1 のコンディショナルノックアウトマウスを用いた検証や、単離した初代培養細胞での実験を進めていきたい。現在 3LL-Luc2 細胞を尾静注してから 3 時間後、24 時間後、72 時間後と、PBS を尾静注した negative control の肺サンプルに対する Microarray 解析を進めており、主に上記細胞種が発現するマーカーやサイトカイン、ケモカインに着目する予定である。この解析を、関連細胞種における ASK1 ががんの肺転移に関与するかを判断する 1 つの手がかりとしたい。

- **ASK1⁺マウスでがんの肺転移減弱が観察され始める、3LL-Luc2 細胞尾静注 3 時間後において機能する細胞種について**

私は本学修士課程において、ASK1⁺マウスでは 3LL-Luc2 細胞を尾静注してから 3 時間後で既に、がんの肺転移が減弱することを明らかにしていた (Fig. 4A)。そこで本研究では、作製した細胞種特異的な ASK1 のコンディショナルノックアウトマウスで 3LL-Luc2 細胞を尾静注してから 3 時間後の表現型を解析した。すると少なくとも Pf4-cre/+; ASK1^{FF} マウス (Fig. 28A) と Cdh5-cre/+; ASK1^{FF} マウス (Fig. 28B) では、3LL-Luc2 細胞の肺転移減弱は見られなかった。特に Cdh5-cre/+; ASK1^{FF} マウスでは 3LL-Luc2 細胞の尾静注 14 日後においては有意な肺転移の減弱が見られることから (Fig. 26B)、血管内皮細胞単独における ASK1 欠損は、3LL-Luc2 細胞の尾静注 3 時間後の肺転移には大きな影響を与えることなく尾静注 14 日後の肺転移を低下させることが示唆される。つまり血小板や血管内皮細胞の ASK1 は、それぞれ単独では 3LL-Luc2 細胞の尾静注 3 時間後の肺転移に影響を与えないと考えられる。よって想定される可能性としては、血小板と血管内皮細胞の ASK1 が相乗的に作用して 3LL-Luc2 細胞の尾静注 3 時間後の肺転移を制御すること、あるいはこの 2 つの細胞種以外における ASK1 の関与が挙げられるだろう。前者については、この 2 つの細胞種で ASK1 を欠損した Cdh5-cre/Pf4-cre; ASK1^{FF} マウスを用いて、3LL-Luc2 細胞の尾静注 3 時間後の肺転移の表現型を解析することで検証できると考えられる。後者については前項の「donor 骨髄に由来する細胞種における ASK1 の、3LL-Luc2 細胞の肺

転移への関与について」で挙げた細胞種が具体的な候補として予想されるため、それら候補の細胞種特異的な ASK1 のコンディショナルノックアウトマウスを作出し、3LL-Luc2 細胞の尾静注 3 時間後の肺転移の表現型を解析することが有用であろう。尚、本研究では LysM-cre/+; ASK1^{FF} マウスにおける、3LL-Luc2 細胞の尾静注 3 時間後の肺転移の表現型を解析できていないが、尾静注 14 日後において肺転移減弱が見られなかったことから (Fig. 12)、3 時間後においても肺転移は減弱しないのではないかと想定している。

がんの肺転移制御における ASK1 のキナーゼ活性の必要性について

ASK1 の血小板機能制御やがんの肺転移への関与を明らかにした本研究では、ASK1 をマウスの全身あるいは細胞種特異的に欠損したマウスを用いていたことから、その機能制御において ASK1 のキナーゼ活性の喪失と ASK1 のタンパク質の欠損のどちらが重要なのかは不明である。血小板機能制御については直接的に示すデータがないものの、ASK1 が P2Y₁₂ のリン酸化制御を担うことから恐らくキナーゼ活性が重要なのではないかと考えられる。一方がんの肺転移制御については、私が修士課程において示したデータを参考にしたい。というのも私は既に、3LL-Luc2 細胞を尾静注してから 1 時間後の WT マウスの肺では PBS を尾静注した **negative control** に比べて ASK のリン酸化レベルが亢進していること、またそのリン酸化が ASK1^{-/-} マウスではほぼ消失していることを明らかにしており (Fig. 29)、宿主の ASK1 の活性ががん転移に関与している可能性を提示していた。尚、本実験では肺全体の溶解液を解析しているため、宿主の肺の ASK1 活性だけでなく 3LL-Luc2 細胞の ASK1 活性も反映し得るが、尾静注した 6×10⁵ 個の細胞数の 3LL-Luc2 細胞だけを解析しても、リン酸化された ASK1 も ASK1 のタンパク質自体もウエスタンブロットでは検出限界以下であった (**data not shown**) ことと、野生型マウスで観察された ASK1 活性がもし 3LL-Luc2 細胞由来であれば、がん細胞がほぼ同数いる (Fig. 4B) ASK1^{-/-} マウスの肺でも同程度の活性が観察されるはずであることから、結果で得られた ASK1 活性は宿主由来であると考えられる。但し、野生型マウスの宿主の何らかの細胞種 (血管内皮細胞などが考えられる) とがん細胞が接触した場合にのみ、がん細胞の ASK1 のリン酸化レベルが亢進し、それがウエスタンブロットで検出された可能性は除外できていない。この ASK1 のリン酸化レベル亢進がどの細胞種に由来するのかは未だ不明ではあるが、この結果から ASK1 のキナーゼ活性の関与が示唆されて

おり、ASK1 のキナーゼ活性を標的とした阻害剤によってがんの肺転移を低下させ得ると考えている。

私はこれまで ASK1 のキナーゼ阻害剤投与によるがんの肺転移減弱が見られるかを、複数の阻害剤を様々な投与方法で WT マウスに投与して検証してきたが、いずれの場合もがんの肺転移は減弱しなかった (data not shown)。しかし、このとき同時に、単離した肺サンプルをウェスタンブロットに供して ASK のリン酸化レベルを検証すると、阻害剤投与による低下が見られなかった (data not shown)。よってこれまで試した阻害剤でがんの肺転移減弱が見られなかった理由として、阻害剤が活性を保持したまま十分量肺に到達できていなかったことが原因である可能性が高いと考えている。本研究において血小板や血管内皮細胞における ASK1 の欠損ががんの肺転移を有意に減弱させることが示されたため (Fig. 21A, 26A, B)、これらの細胞種を標的としたキャリアーに ASK1 阻害剤を組み込んだものを投与する方法などを新たに試したいと考えている。血小板を標的にすると、ASK1 阻害によって止血応答低下を引き起こしてしまう危険性を孕んでおり、従来のがん剤と同様に出血傾向の副作用を生じさせる恐れがあるため、標的として不適切である可能性がある。一方血管内皮細胞を特異的に標的とする手法については、例えば血管内皮細胞特異的な膜表面タンパク質である CD105 に対する改変抗体を発現するレンチウイルスを全身投与する方法が報告されている (Abel et al., 2013)。報告通りに血管内皮細胞を標的とすることができれば、このレンチウイルスに ASK1 をノックダウンするベクターを組み込んでマウスに投与すると、がんの肺転移が低下するのではないかと予想される。Abel らはがん巣の血管内皮細胞だけでなく主に正常な肝臓内皮細胞や動脈血管内皮細胞にもこのレンチウイルスが取り込まれることを示しているため、正常な血管内皮細胞において ASK1 の発現が低下することによる副作用を検証する必要はあるものの、試す価値は十分あると考えている。

他の臓器へのがん転移に ASK1 が関与するか

本研究では実験的肺転移モデルを用いて、肺へのがん転移における ASK1 の機能解析を進めてきた。実験的ながん転移モデルは他にも存在し、がん細胞の種類を選べば様々な臓器へのがん転移を引き起こすことができる。例えば乳がん細胞を心臓へ打ち込むと肺や骨、肝臓やリンパ節への転移が、結腸がん細胞を脾臓または門脈内に打ち込むと肝臓への転移が、悪性黒色腫を足裏に打ち込

むと鼠径リンパ節への転移が起きることが知られている (Francia et al., 2011)。本研究によって、実験的肺転移モデルを用いた場合には血小板と血管内皮細胞における ASK1 ががんの肺転移に関与することが明らかになったため (Fig. 21A, B, 26A, B)、ASK1 が他臓器へのがん転移に関与するかを、これら 2 つの細胞種の他臓器へのがん転移における役割に着目して推察したい。

がんの肝転移については、肝臓へと流れ込む門脈の血流の流速が全身循環の血流の流速に比べて緩やかであることや、肝類洞内皮細胞が強固な基底膜による裏打ちを欠いていることにより、がん細胞が転移する際の血小板への依存性が比較的低いとされている (Obenauf and Massagué, 2015)。即ちがん細胞は血小板による、生存維持や免疫監視からの保護、血管内皮細胞への接着支持などのがん転移促進作用を受けずとも転移できると考えられており、血小板を中和抗体で除去すると B16F1 悪性黒色腫細胞株の肺へのがん転移は減弱する一方で肝臓への転移が減弱しないことが報告されている (Coupland et al., 2012)。無論がん細胞の種類によって結果は異なるだろうが同様の事象が起きるようであれば、血小板における ASK1 の欠損は、例えば B16F10 細胞の肺転移を減弱させる一方で肝転移には影響を与えない可能性が考えられる。一方 Coupland らは血管内皮細胞で発現する P-selectin の重要性を欠損マウスを用いて示しており、B16F1 細胞の肺と肝臓の両方への転移が P-selectin^{-/-}マウスで減弱することを明らかにしている (Coupland et al., 2012)。この結果に基づいて考えると、血管内皮細胞における ASK1 はがんの肺転移と同様、肝臓への転移をも減弱させる可能性が考えられる。

がんの骨転移については、骨を破壊して骨の再構成を担う破骨細胞ががん細胞から放出されるサイトカイン等によって活性化して骨を破壊し、これにより骨から放出される Transforming Growth Factor (TGF)- β ががん細胞の EMT を誘導して浸潤能を亢進させ、悪性度をさらに高くするという悪循環が成立すると考えられている (Kang et al., 2005)。Labelle らは血小板が TGF- β を豊富に蓄えていることに着目し、血小板から放出される TGF- β ががん細胞の EMT 誘導、浸潤能亢進を引き起こすことを明らかにした (Labelle et al., 2011)。この結果は血小板が持つがん転移促進作用における新たなメカニズムを提示しており、上で挙げた骨転移における悪循環を考慮すれば、血小板ががんの骨転移を制御し得ることを示唆している。がん転移ではないがアルドステロン誘導性の心臓炎症において、ASK1 が TGF- β の発現を正に制御することが報告されており (Nakamura

et al., 2009)、血小板における ASK1 が同様に TGF- β の発現を正に制御することでがんの骨転移に関与する可能性はあると考えられる。またこの血小板によるがん細胞の EMT 誘導、浸潤能亢進の作用はがんの肺転移にも寄与することが知られているため (Labelle et al., 2011)、Pf4-cre/+; ASK1^{FF} マウスで見られた B16F10-luc-G5 細胞の肺転移減弱 (Fig. 21A)に、血小板での ASK1 欠損による TGF- β 発現低下が寄与している可能性すら考えられる。一方、血管内皮細胞のがんの骨転移への関与については、血管内皮細胞が骨環境においてがん転移促進性の骨髄由来細胞の遊走促進能や (Obenauf and Massagué, 2015)、白血病細胞の維持に重要なニッチ形成能 (Pitt et al., 2015)を有することが報告されており、その重要性が明らかになりつつある。よってこれらのメカニズムを介して、血管内皮細胞における ASK1 ががんの骨転移にも関与する可能性はあると考えられる。

最後にリンパ節へのがんのリンパ行性転移については、リンパ管を介して起きると考えられるため、血小板における ASK1 の寄与は小さいと予想される。一方がんのリンパ行性転移にはがん細胞によるリンパ管新生促進、即ちリンパ管内皮細胞の増殖亢進が重要であることがわかっており (Rinderknecht and Detmar, 2008)、リンパ管内皮細胞の重要性が示唆されている。リンパ管内皮細胞はその性質において血管内皮細胞との類似点もあり、血管新生促進性の成長因子として著名な Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A は血管新生だけでなくリンパ管新生、そしてリンパ行性転移を促進することが報告されている (Hirakawa et al., 2005)。血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞で ASK1 が同様ながん転移促進作用を担うかは検証してみないとわからないが、血管内皮細胞だけでなくリンパ管内皮細胞でも ASK1 ががん転移に寄与しており、がんのリンパ行性転移をも制御する可能性はあると考えられる。

以上の考察から、血小板あるいは血管内皮細胞における ASK1 が他の臓器へのがん転移に関与する可能性は十分に考えられる。また今後の解析を通して他の細胞種における ASK1 ががんの肺転移に関与することが明らかになれば、新たに関与が同定された細胞種における ASK1 が上記 2 つの細胞種とは異なるメカニズムを介して、他の臓器へのがん転移に寄与することも考えられよう。それぞれの臓器への実験的ながん転移モデルでの ASK1^{-/-}マウスの表現型を解析することで、ASK1 の他の臓器へのがん転移における寄与を今後検証していきたい。

【総括と展望】

私は本研究において以下のことを明らかにした。

1. ASK1^{-/-}マウスでは実験的肺転移モデルにおいて B16F10-luc-G5 細胞及び 3LL-Luc2 細胞の肺転移が減弱する
2. 骨髄キメラマウスにおいて、donor 骨髄に由来する細胞と recipient に由来する細胞種のどちらかでも ASK1 を欠損すると肺転移が減弱する
3. 血小板での ASK1 欠損が ADP 依存的なアゴニストへの応答性を低下させ、*in vivo* において血小板の機能低下を引き起こし、B16F10-luc-G5 細胞の肺転移を減弱させる
4. 血小板において ASK1 は P2Y₁₂ のリン酸化を制御する
5. 血管内皮細胞での ASK1 欠損が B16F10-luc-G5 細胞と 3LL-Luc2 細胞双方の肺転移を減弱させる

血小板の機能低下によっては、がん細胞と血小板の相互作用が低下し、がん細胞の生存が低下する、あるいは抗腫瘍性免疫によって検出されて貪食、除去されやすくなると予想される。一方血管内皮細胞の ASK1 欠損により、がん細胞が血管内皮細胞に接着できない、あるいは血管内皮細胞のアポトーシスを誘導できないために、血管外遊出できずに血中で細胞死を起こす可能性や、抗腫瘍性免疫による攻撃に晒されることで転移先臓器に生着できない可能性が考えられる (Fig. 30)。ASK1 がどの細胞種においてがんの肺転移に関与するかを明らかにした本研究は、阻害すべき ASK1 の細胞種を特定していることから、がんの肺転移の治療戦略においてそれらの細胞種を標的として ASK1 を阻害または発現低下させることの有用性を示唆している。今後は、血小板における ASK1 の ADP シグナル経路制御のメカニズムの解明に加えて、血管内皮細胞における ASK1 欠損ががんの肺転移を減弱させるメカニズムの解明を、がん細胞の接着や血管外遊出、血管内皮細胞のアポトーシス誘導に関連する因子に主に着目して進めていきたいと考えている。これらの解析を通して、がん転移の病態をより分子基盤に基づいて理解することを目指したい。またその知見から、がん転移の新たな治療法にもつなげることができると考え、ASK1 の阻害ががん転移の新規治療戦略となり得るかを検討したい。

【参考文献】

- Abel T, Filali EE, Waern J, Schneider IC, Yuan Q, Münch RC, et al. Specific gene delivery to liver sinusoidal and artery endothelial cells. *Blood*. 2013 Sep 19;122(12):2030–8.
- Adam F, Kauskot A, Rosa J-P, Bryckaert M. Mitogen-activated protein kinases in hemostasis and thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008 Spring;6(12):2007–16.
- Adam F, Kauskot A, Nurden P, Sulpice E, Hoylaerts MF, Davis RJ, et al. Platelet JNK1 is involved in secretion and thrombus formation. *Blood*. 2010 May 20;115(20):4083–92.
- Amano H, Ito Y, Suzuki T, Kato S, Matsui Y, Ogawa F, et al. Roles of a prostaglandin E-type receptor, EP3, in upregulation of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor during enhancement of tumor metastasis. *Cancer Science*. 2009 Aug 25;100(12):2318–24.
- André P, Delaney SM, LaRocca T, Vincent D, DeGuzman F, Jurek M, et al. P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *Journal of Clinical Investigation*. 2003 Aug 1;112(3):398–406.
- Cattaneo M. P2Y12 receptors: structure and function. *J Thromb Haemost*. 2015 Spring;13:S10–6.
- Cattaneo M. The platelet P2Y12 receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood*. 2011 Feb 17;117(7):2102–12.
- Chen J, De S, Damron DS, Chen WS, Hay N, Byzova TV. Impaired platelet responses to thrombin and collagen in AKT-1-deficient mice. *Blood*. 2004 Sep 15;104(6):1703–10.
- Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Förster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res*. 1999 Aug;8(4):265–77.

- Clemens RA, Lenox LE, Kambayashi T, Bezman N, Maltzman JS, Nichols KE, et al. Loss of SLP-76 Expression within Myeloid Cells Confers Resistance to Neutrophil-Mediated Tissue Damage while Maintaining Effective Bacterial Killing. *J Immunol*. 2007 Apr 1;178(7):4606–14.
- Coupland LA, Chong BH, Parish CR. Platelets and P-Selectin Control Tumor Cell Metastasis in an Organ-Specific Manner and Independently of NK Cells. *Cancer Res*. 2012 Sep 15;72(18):4662–71.
- Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *Journal of Clinical Investigation*. 2004 Feb 1;113(3):340–5.
- Fabre J-E, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM, et al. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat Med*. 1999;5(10):1199–202.
- Francia G, Cruz-Munoz W, Man S, Xu P, Kerbel RS. Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(2):135–41.
- Fushiki H, Kanoh-Azuma T, Katoh M, Kawabata K, Jiang J, Tsuchiya N, et al. Quantification of mouse pulmonary cancer models by microcomputed tomography imaging. *Cancer Science*. 2009;100(8):1544–9.
- Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(2):123–34.
- Gebremeskel S, LeVatte T, Liwski RS, Johnston B, Bezuhyly M. The reversible P2Y12 inhibitor ticagrelor inhibits metastasis and improves survival in mouse models of cancer. *Int J Cancer*. 2015 Spring;136(1):234–40.
- Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 2012 20;21(3):309–22.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.

- Hardy AR, Conley PB, Luo J, Benovic JL, Poole AW, Mundell SJ. P2Y1 and P2Y12 receptors for ADP desensitize by distinct kinase-dependent mechanisms. *Blood*. 2005 May 1;105(9):3552–60.
- Hayakawa T, Matsuzawa A, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H. The ASK1-MAP kinase pathways in immune and stress responses. *Microbes Infect*. 2006 Apr;8(4):1098–107.
- Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med*. 2005 Apr 4;201(7):1089–99.
- Ichijo H, Nishida E, Irie K, Dijke P ten, Saitoh M, Moriguchi T, et al. Induction of Apoptosis by ASK1, a Mammalian MAPKKK That Activates SAPK/JNK and p38 Signaling Pathways. *Science*. 1997 Jan 3;275(5296):90–4.
- Iriyama T, Takeda K, Nakamura H, Morimoto Y, Kuroiwa T, Mizukami J, et al. ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis. *EMBO J*. 2009 Apr 8;28(7):843–53.
- Kamiyama M, Naguro I, Ichijo H. *In vivo* gene manipulation reveals the impact of stress-responsive MAPK pathways on tumor progression. *Cancer Sci*. 2015 Spring;106(7):785–96.
- Kang Y, He W, Tulley S, Gupta GP, Serganova I, Chen C-R, et al. Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. *PNAS*. 2005 Sep 27;102(39):13909–14.
- Kanki H, Suzuki H, Itohara S. High-efficiency *CAG-FLPe* Deleter Mice in C57BL/6J Background. *Experimental Animals*. 2006;55(2):137–41.
- Kim S, Jin J, Kunapuli SP. Akt Activation in Platelets Depends on Gi Signaling Pathways. *J Biol Chem*. 2004 Feb 6;279(6):4186–95.
- Kim S, Takahashi H, Lin W-W, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate

metastasis. *Nature*. 2009 Jan 1;457(7225):102–6.

- Kogata N, Arai Y, Pearson JT, Hashimoto K, Hidaka K, Koyama T, et al. Cardiac Ischemia Activates Vascular Endothelial Cadherin Promoter in Both Preexisting Vascular Cells and Bone Marrow Cells Involved in Neovascularization. *Circulation Research*. 2006 Apr 14;98(7):897–904.
- Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell*. 2011 15;20(5):576–90.
- Läubli H, Borsig L. Selectins as Mediators of Lung Metastasis. *Cancer Microenviron*. 2010 Feb 27;3(1):97–105.
- Léon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, et al. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y1 receptor-null mice. *Journal of Clinical Investigation*. 1999 Dec 15;104(12):1731–7.
- Mierke CT. Role of the Endothelium during Tumor Cell Metastasis: Is the Endothelium a Barrier or a Promoter for Cell Invasion and Metastasis? *Journal of Biophysics*. 2009 Mar 5;2008:e183516.
- Morgan EA, Schneider JG, Baroni TE, Uluçkan Ö, Heller E, Hurchla MA, et al. Dissection of platelet and myeloid cell defects by conditional targeting of the β 3-integrin subunit. *FASEB J*. 2010 Apr 1;24(4):1117–27.
- Murakami S, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H. Stress signaling in cancer. *Cancer Sci*. 2007 Oct;98(10):1521–7.
- Naguro I, Umeda T, Kobayashi Y, Maruyama J, Hattori K, Shimizu Y, et al. ASK3 responds to osmotic stress and regulates blood pressure by suppressing WNK1-SPAK/OSR1 signaling in the kidney. *Nature Communications*. 2012 Dec 18;3:1285.
- Nakamura T, Kataoka K, Fukuda M, Nako H, Tokutomi Y, Dong Y-F, et al.

Critical Role of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 in Aldosterone/Salt-Induced Cardiac Inflammation and Fibrosis. *Hypertension*. 2009 Sep 1;54(3):544–51.

- Nisar S, Daly ME, Federici AB, Artoni A, Mumford AD, Watson SP, et al. An intact PDZ motif is essential for correct P2Y₁₂ purinoceptor traffic in human platelets. *Blood*. 2011 Nov 17;118(20):5641–51.
- Obenauf AC, Massagué J. Surviving at a Distance: Organ-Specific Metastasis. *Trends in Cancer*. 2015 Jan 9;1(1):76–91.
- O’Brien KA, Stojanovic-Terpo A, Hay N, Du X. An important role for Akt3 in platelet activation and thrombosis. *Blood*. 2011 Oct 13;118(15):4215–23.
- Pitt LA, Tikhonova AN, Hu H, Trimarchi T, King B, Gong Y, et al. CXCL12-Producing Vascular Endothelial Niches Control Acute T Cell Leukemia Maintenance. *Cancer Cell*. 2015 8;27(6):755–68.
- Pluskota E, Ma Y, Bledzka KM, Bialkowska K, Soloviev DA, Szpak D, et al. Kindlin-2 regulates hemostasis by controlling endothelial cell–surface expression of ADP/AMP catabolic enzymes via a clathrin-dependent mechanism. *Blood*. 2013 Oct 3;122(14):2491–9.
- Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19(11):1423–37.
- Reymond N, d’Água BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(12):858–70.
- Rinderknecht M, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis and melanoma metastasis. *J Cell Physiol*. 2008 Spring;216(2):347–54.
- Ritter SL, Hall RA. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(12):819–30.
- Rodríguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, et al. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet*. 2000;25(2):139–40.

- Shaheen RM, Davis DW, Liu W, Zebrowski BK, Wilson MR, Bucana CD, et al. Antiangiogenic Therapy Targeting the Tyrosine Kinase Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Inhibits the Growth of Colon Cancer Liver Metastasis and Induces Tumor and Endothelial Cell Apoptosis. *Cancer Res.* 1999 Nov 1;59(21):5412–6.
- Shin Y, Morita T. Rhodocytin, a Functional Novel Platelet Agonist Belonging to the Heterodimeric C-Type Lectin Family, Induces Platelet Aggregation Independently of Glycoprotein Ib. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1998 28;245(3):741–5.
- Sindelar WF, Tralka TS, Ketcham AS. Electron microscopic observations on formation of pulmonary metastases. *Journal of Surgical Research.* 1975;18(2):137–61.
- Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich’s magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(6):473–80.
- Takeda K, Shimosono R, Noguchi T, Umeda T, Morimoto Y, Naguro I, et al. Apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 2 functions as a mitogen-activated protein kinase kinase kinase in a heteromeric complex with ASK1. *J Biol Chem.* 2007 Mar 9;282(10):7522–31.
- Tiedt R, Schomber T, Hao-Shen H, Skoda RC. Pf4-Cre Transgenic Mice Allow the Generation of Lineage-Restricted Gene Knockouts for Studying Megakaryocyte and Platelet Function in Vivo. *Blood.* 2007 Feb 15;109(4):1503–6.
- Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, et al. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.* 2001 Mar;2(3):222–8.
- Vestweber D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(11):692–704.
- Wang Y, Sun Y, Li D, Zhang L, Wang K, Zuo Y, et al. Platelet P2Y12 Is Involved in Murine Pulmonary Metastasis. *PLoS ONE.* 2013 13;8(11):e80780.

- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 1999 Jan;79(1):143–80.
- Wolf MJ, Hoos A, Bauer J, Boettcher S, Knust M, Weber A, et al. Endothelial CCR2 Signaling Induced by Colon Carcinoma Cells Enables Extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK Pathway. *Cancer Cell.* 2012 Jul 10;22(1):91–105.
- Woulfe D, Jiang H, Morgans A, Monks R, Birnbaum M, Brass LF. Defects in secretion, aggregation, and thrombus formation in platelets from mice lacking Akt2. *Journal of Clinical Investigation.* 2004 Feb 1;113(3):441–50.
- Woulfe DS. Akt signaling in platelets and thrombosis. *Expert Rev Hematol.* 2010 Feb;3(1):81–91.
- Yoshikawa N, Kunitomo M, Kagota S, Shinozuka K, Nakamura K. Inhibitory Effect of Cordycepin on Hematogenic Metastasis of B16-F1 Mouse Melanoma Cells Accelerated by Adenosine-5'-diphosphate. *Anticancer Res.* 2009 Oct 1;29(10):3857–60.
- Zhang Y, Ye J, Hu L, Zhang S, Zhang SH, Li Y, et al. Increased platelet activation and thrombosis in transgenic mice expressing constitutively active P2Y12. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2012 Spring;10(10):2149–57.
- Zhong X, Kriz R, Seehra J, Kumar R. N-linked glycosylation of platelet P2Y12 ADP receptor is essential for signal transduction but not for ligand binding or cell surface expression. *FEBS Letters.* 2004 26;562(1–3):111–7.

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました、
東京大学大学院 薬学系研究科 細胞情報学教室
一條 秀憲 教授
に謹んで感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、ご協力及びご助言いただきました、
東京大学大学院 医学系研究科 病因・病理学専攻 分子病理学分野
宮園 浩平 教授
江幡 正悟 特任講師 (GPLLI)
高橋 恵生 先生
山梨大学大学院 医学工学総合研究部 臨床検査医学講座
尾崎 由基男 教授
井上 (鈴木) 克枝 准教授
田村 彰吾 学振特別研究員
白井 俊光 助手
富山大学 和漢医薬学総合研究所 病態制御部門 病態生化学分野
早川 芳弘 准教授
東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 硬組織病態生化学分野
渡部 徹郎 教授
国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野
竹下 文隆 先生
東京大学大学院 薬学系研究科 細胞情報学教室
布施 耕介 さん
に謹んで感謝申し上げます。

本研究のあらゆる面においてご指導、ご助言いただきました
長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 細胞制御学分野
武田 弘資 教授
東京大学大学院 薬学系研究科 細胞情報学教室
名黒 功 講師
に謹んで感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、数多くのご助言を下さりました、

宮崎大学 医学部 機能制御学講座 機能生化学分野

西頭 英起 教授

東北大学大学院 薬学研究科 衛生化学分野

松沢 厚 教授

University of Cambridge, United Kingdom

関根 悠介 研究員

Whitehead Institute for Biomedical Research (MIT), United States of America

丸山 剛 研究員

University of Oxford, United Kingdom

藤澤 貴央 研究員

東京医科歯科大学 病態代謝解析学分野

丸山 順一 助教

東京大学大学院 薬学系研究科 細胞情報学教室

関根 (村上) 史織 助教

服部 一輝 特任助教

本間 謙吾 特任助教

渡邊 謙吾 学振特別研究員 (PD)

東京大学大学院 薬学系研究科 ワンストップ創薬共用ファシリティセンター

渡辺 順子 特任研究員

に謹んで感謝申し上げます。

また、研究生生活の様々な面でご協力下さりました、

東京大学大学院 薬学系研究科 細胞情報学教室の皆様へ深く感謝致します。

特に、互いに切磋琢磨しながら研究を進めてきた同期の、

金丸 雄祐 さん

曾我 真弓 さん

圓谷 奈保美 さん

に深く感謝致します。

最後に、研究生生活を送る上で常に支えて下さった家族の皆様へ深く感謝致します。

图表

A

Analyzed items [unit]	WT mice	ASK1 ^{-/-} mice
Leukocyte [$10^3/\mu\text{l}$]	1.19 ± 0.31	1.36 ± 0.13
Erythrocyte [$10^4/\mu\text{l}$]	1.07 ± 0.05	1.00 ± 0.03
hemoglobin [g/dl]	1.50 ± 0.12	1.40 ± 0.06
hematocrit [%]	5.00 ± 0.26	4.73 ± 0.15
Platelet [$10^3/\mu\text{l}$]	92.3 ± 4.37	89.7 ± 4.48
MCV [fl]	46.5 ± 0.44	47.3 ± 0.22
MCH [pg]	14.0 ± 0.50	14.0 ± 0.24
MCHC [g/dl]	29.9 ± 0.82	29.6 ± 0.34

B

Analyzed items [unit]	+/+; ASK1 ^{F/F} mice	Pf4-cre/+; ASK1 ^{F/F} mice
Leukocyte [$10^3/\mu\text{l}$]	1.48 ± 0.04	1.41 ± 0.36
Erythrocyte [$10^4/\mu\text{l}$]	1.04 ± 0.04	0.98 ± 0.02
hemoglobin [g/dl]	1.53 ± 0.03	1.43 ± 0.03
hematocrit [%]	4.90 ± 0.21	4.70 ± 0.12
Platelet [$10^3/\mu\text{l}$]	109.7 ± 8.65	105.0 ± 6.51
MCV [fl]	47.2 ± 0.37	47.8 ± 0.35
MCH [pg]	14.8 ± 0.23	14.6 ± 0.24
MCHC [g/dl]	31.4 ± 0.69	30.5 ± 0.38

Table 1 各マウスの血液成分解析

A: Hematological parameters of WT and ASK1^{-/-} mice (n= 3) were evaluated with hematoanalyzer.

B: Hematological parameters of +/+; ASK1^{F/F} and Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} mice (n= 3) were evaluated with hematoanalyzer.

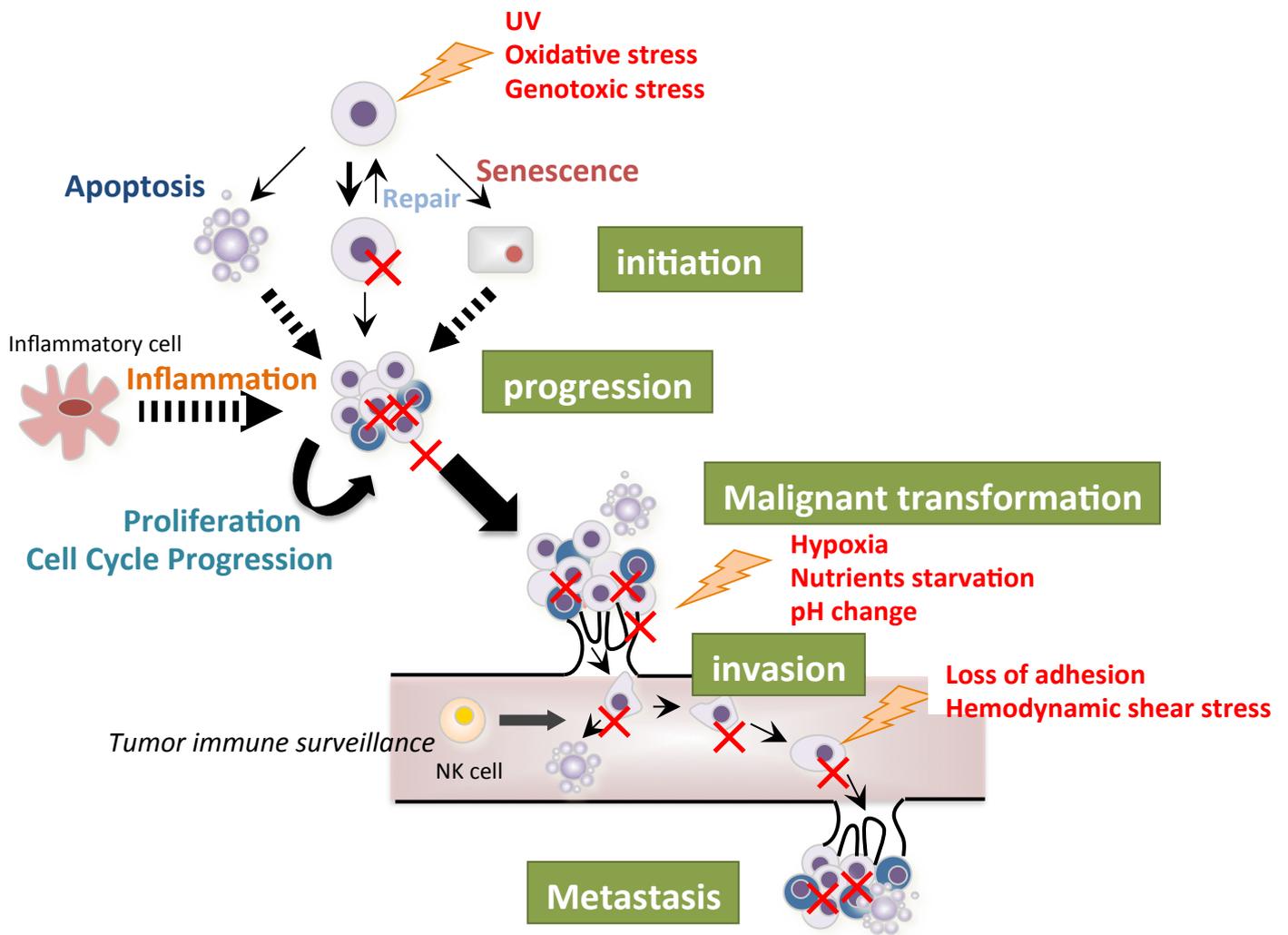
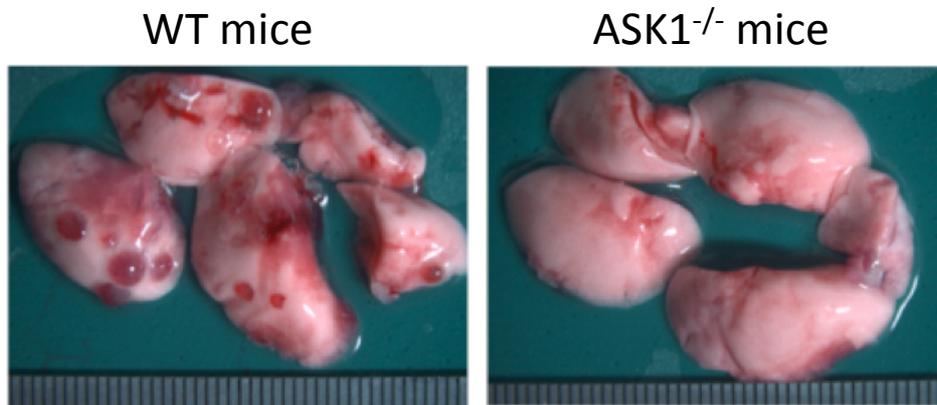


Fig. 1 ストレスとがんの進行

A



B

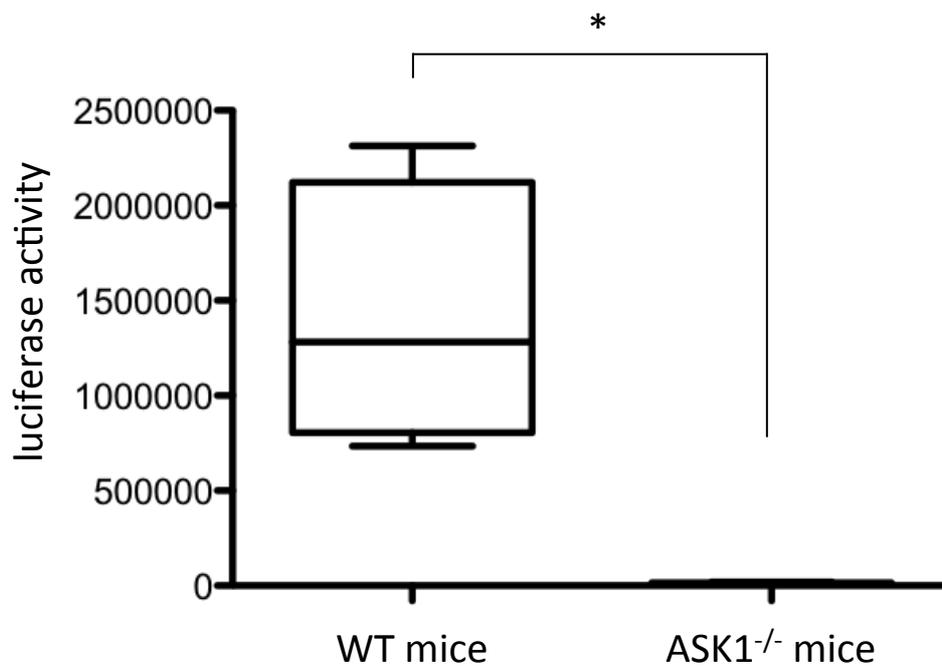


Fig. 2 3LL-Luc2細胞尾静注14日後のASK1^{-/-}マウスの肺転移の表現型

A: Typical macroscopic views of metastatic pulmonary foci observed 14 days after intravenous injection of 3LL-Luc2 cells.

B: Luciferase activity of the lung lysates 2 weeks after tail vein injection of 3LL-Luc2 cells was analyzed. Data are shown as box-and-whisker plot with maximum and minimum values and statistically analyzed by Mann Whitney test [*p<0.05]. (WT mice: n=4, ASK1^{-/-} mice: n=4)

Data by Takehiro Sato

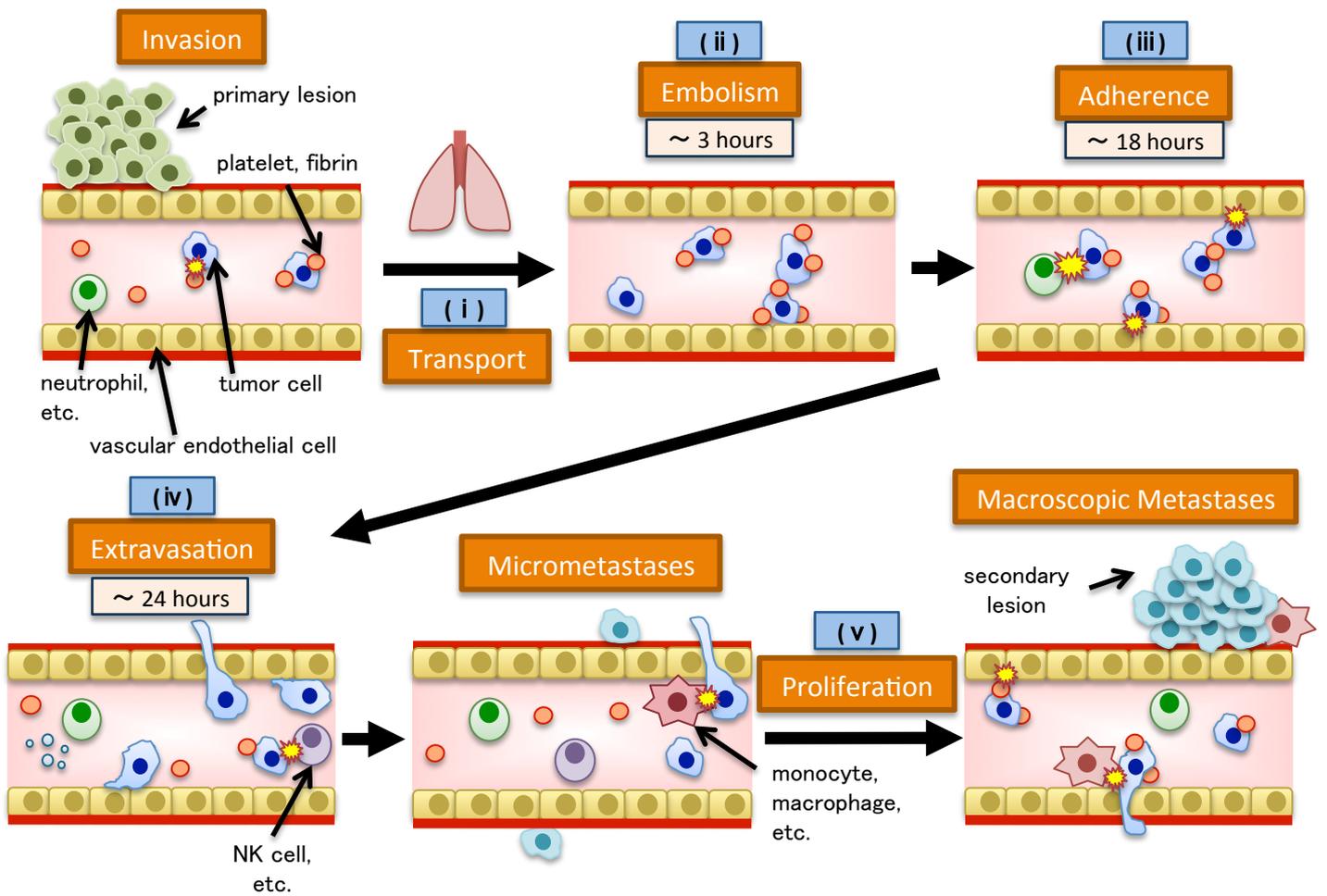


Fig. 3 がん転移は多段階から成り、様々な細胞種により制御される

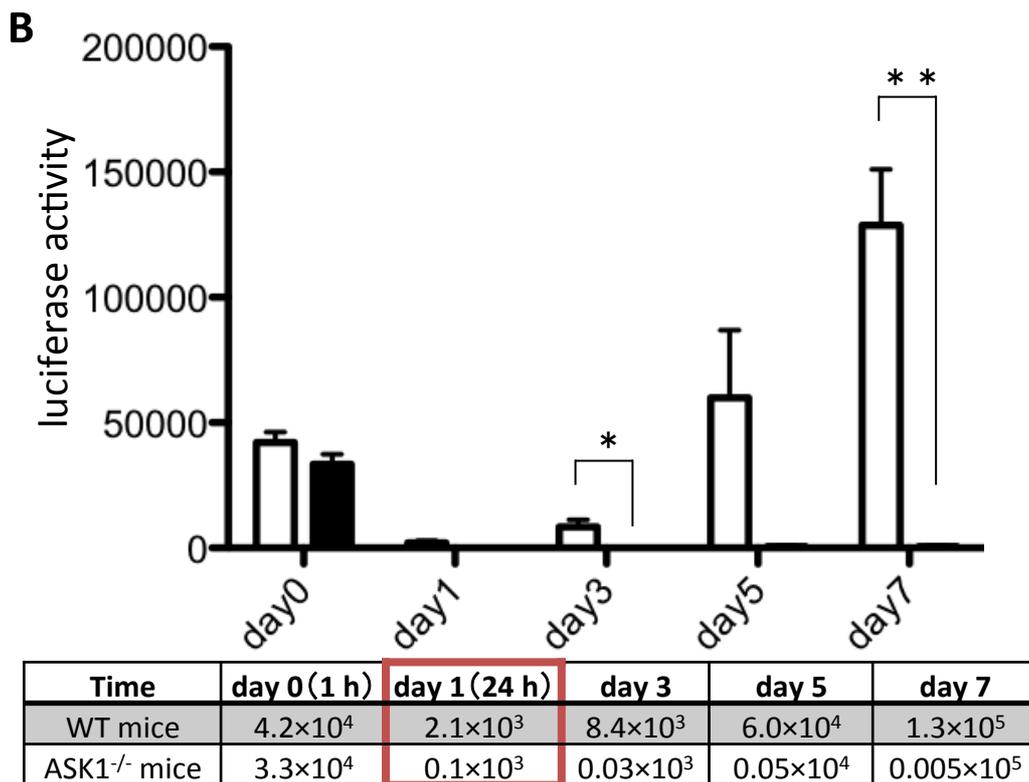
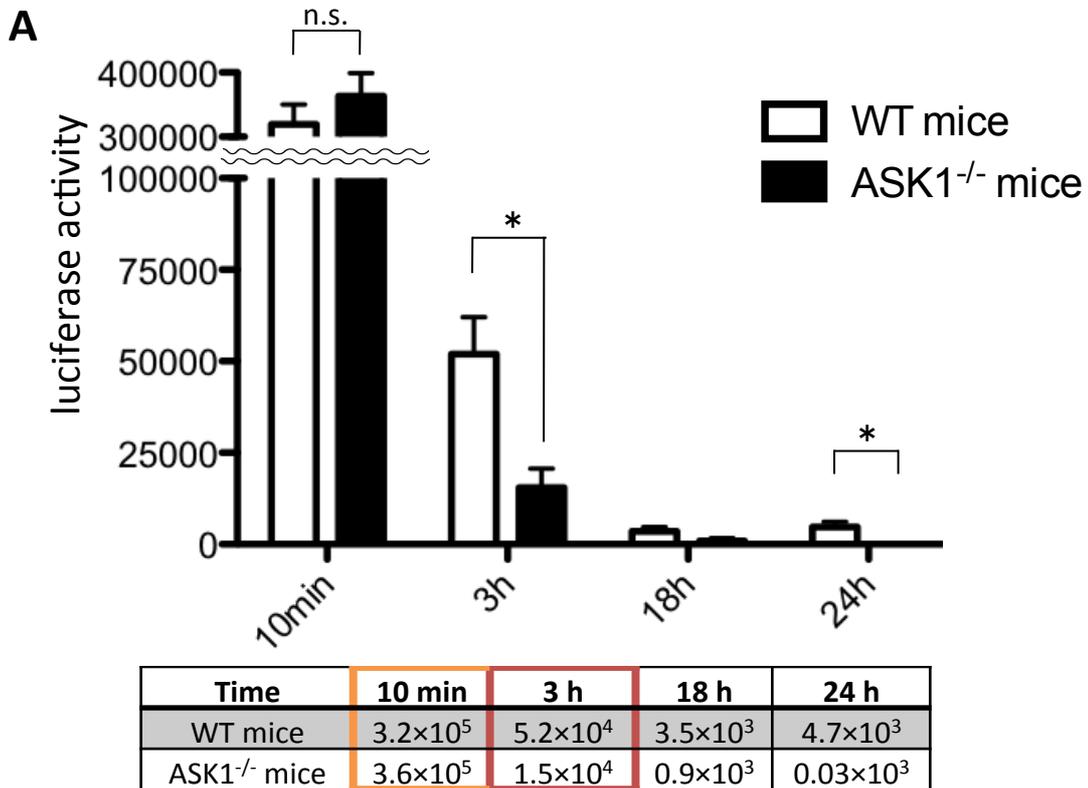


Fig. 4 3LL-Luc2細胞尾静注後のASK1^{-/-}マウスの経時的な肺転移の変化

Luciferase activity of the lung lysates at indicated time points after tail vein injection of 3LL-Luc2 cells (6×10^5 cells for (A), 1×10^5 cells for (B)) was analyzed (n=3 per group). Data are mean \pm SEM and statistically analyzed by unpaired Student's t-test [**p<0.01, *p<0.05].

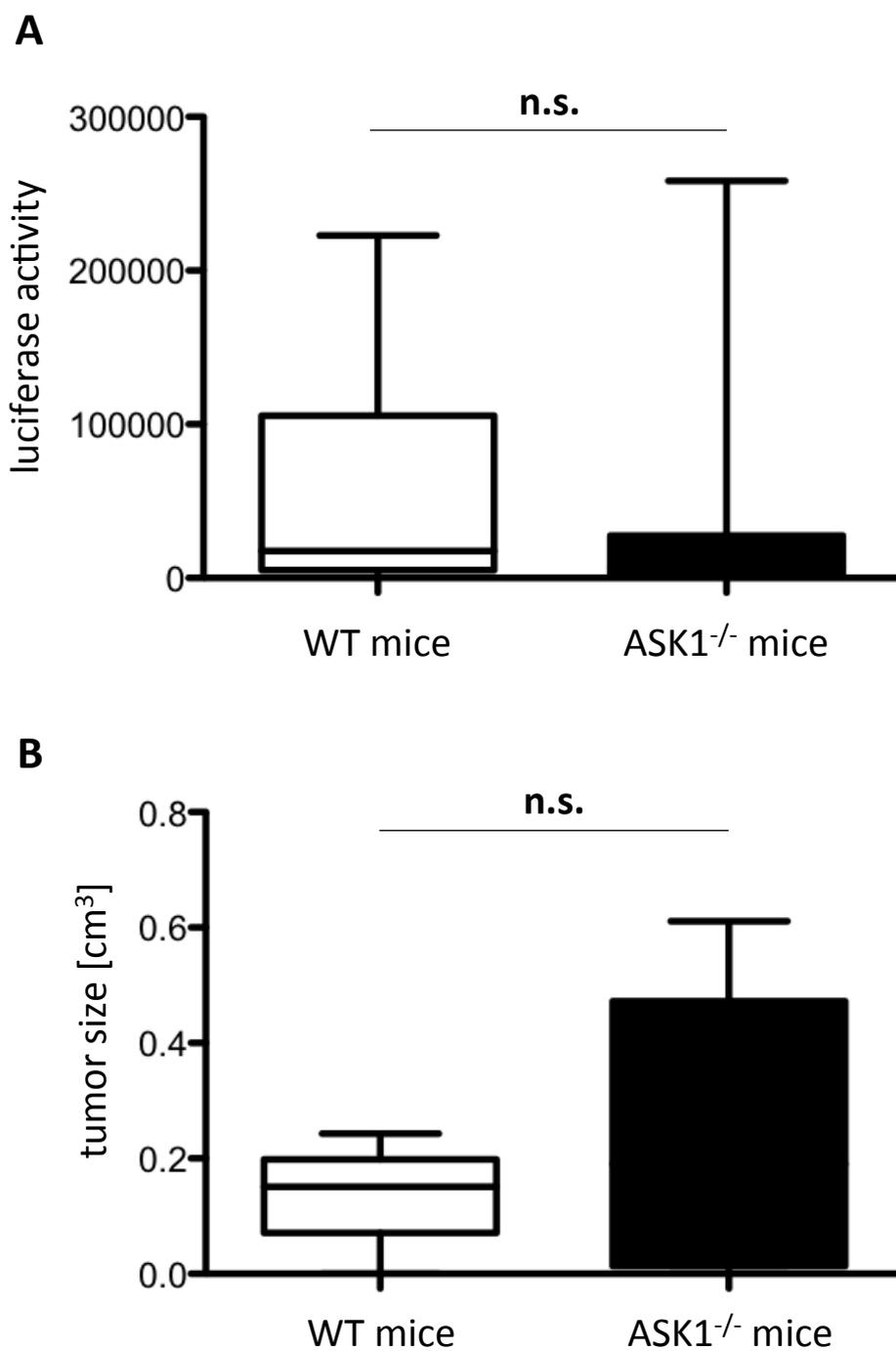


Fig. 5 がん転移の増殖過程におけるASK1の影響の検討

A: Luciferase activity of the lung lysates at 7 days after orthotopic injection of 3LL-Luc2 cells in WT and ASK1^{-/-} mice were analyzed (WT mice: n=25, ASK1^{-/-} mice: n=25).

B: Tumor volume [calculated as (length × width²) / 2] at 28 days after subcutaneous injection of 3LL-Luc2 cells in WT and ASK1^{-/-} mice was analyzed (WT mice: n=9, ASK1^{-/-} mice: n=11).

Data are shown as box-and-whisker plot with maximum and minimum values and statistically analyzed by Mann Whitney test [n.s.; non significant].

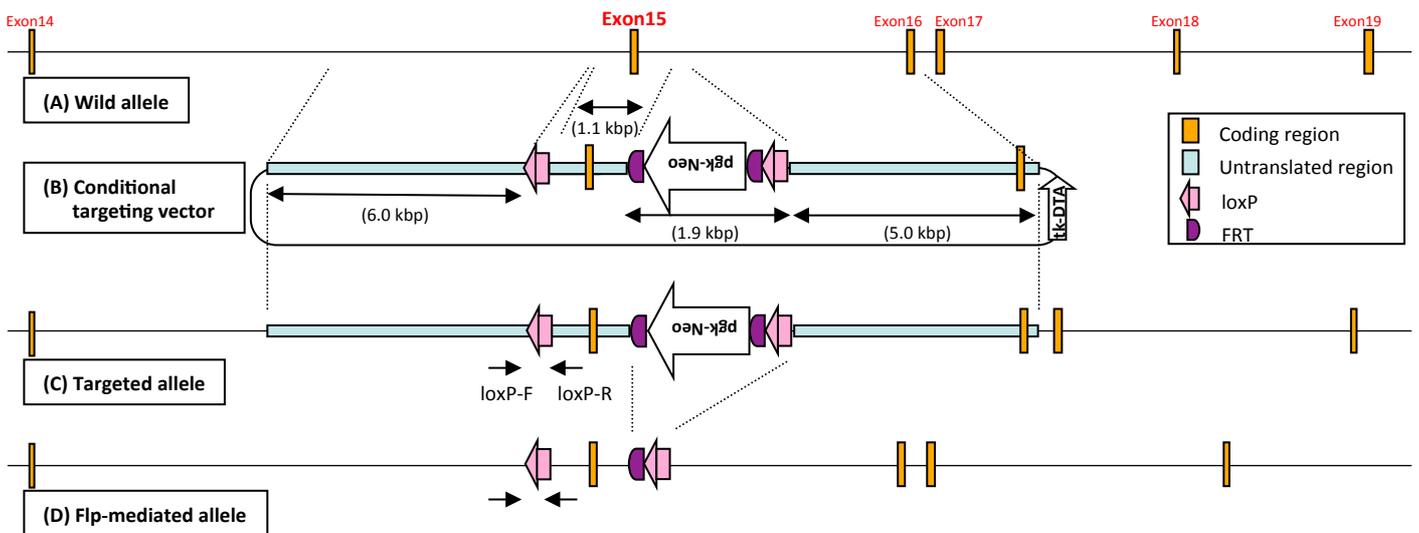


Fig. 6 ASK1^{flx/flx} (ASK1^{F/F})マウスの作製

Schematic diagram of targeting vector and genome structure around Exon 15 of mouse ASK1 gene.

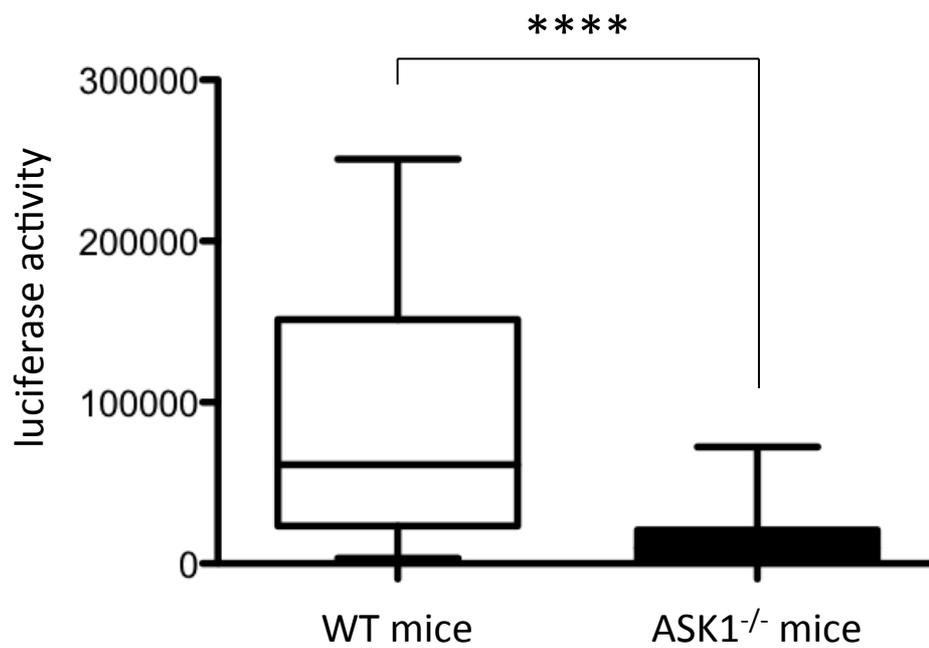


Fig. 7 B16F10-luc-G5細胞尾静注14日後のASK1^{-/-}マウスの肺転移の表現型

Luciferase activity of the lung lysates 2 weeks after tail vein injection of B16F10-luc-G5 cells was analyzed. Data are shown as box-and-whisker plot with maximum and minimum values and statistically analyzed by Mann Whitney test [**** $p < 0.0001$]. (WT mice: $n=24$, ASK1^{-/-} mice: $n=23$)

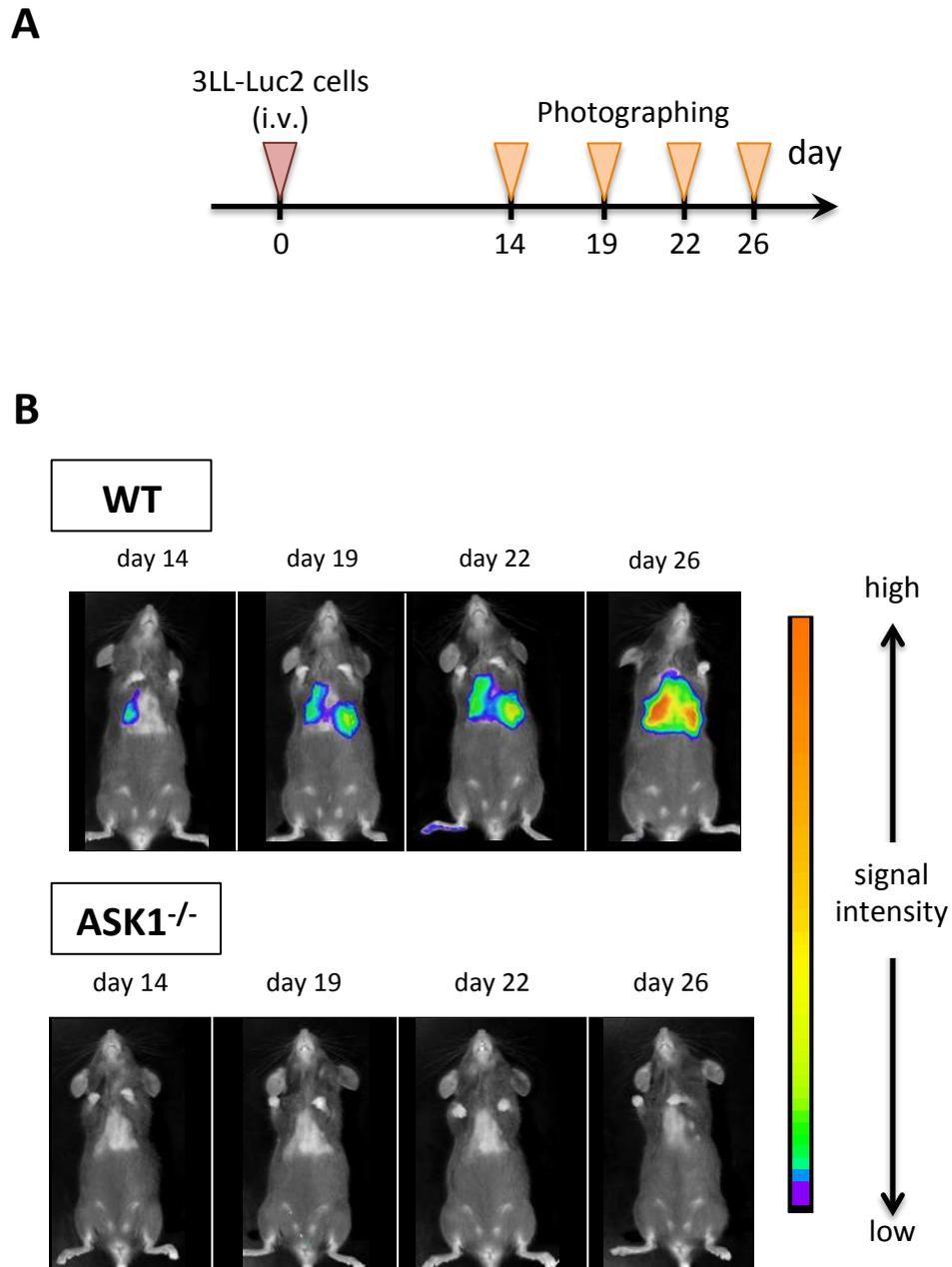


Fig. 8 3LL-Luc2細胞尾静注によるASK1^{-/-}マウスの肺転移のIVISでの観察 (1)

A: Experimental protocol for IVIS observation of tumor lung metastasis using 3LL-Luc2 cells.

B: Mice with tail vein injection of 3LL-Luc2 cells were analyzed with *in vivo* imaging system (IVIS). **Data by Shogo Ehata & Kei Takahashi**

C

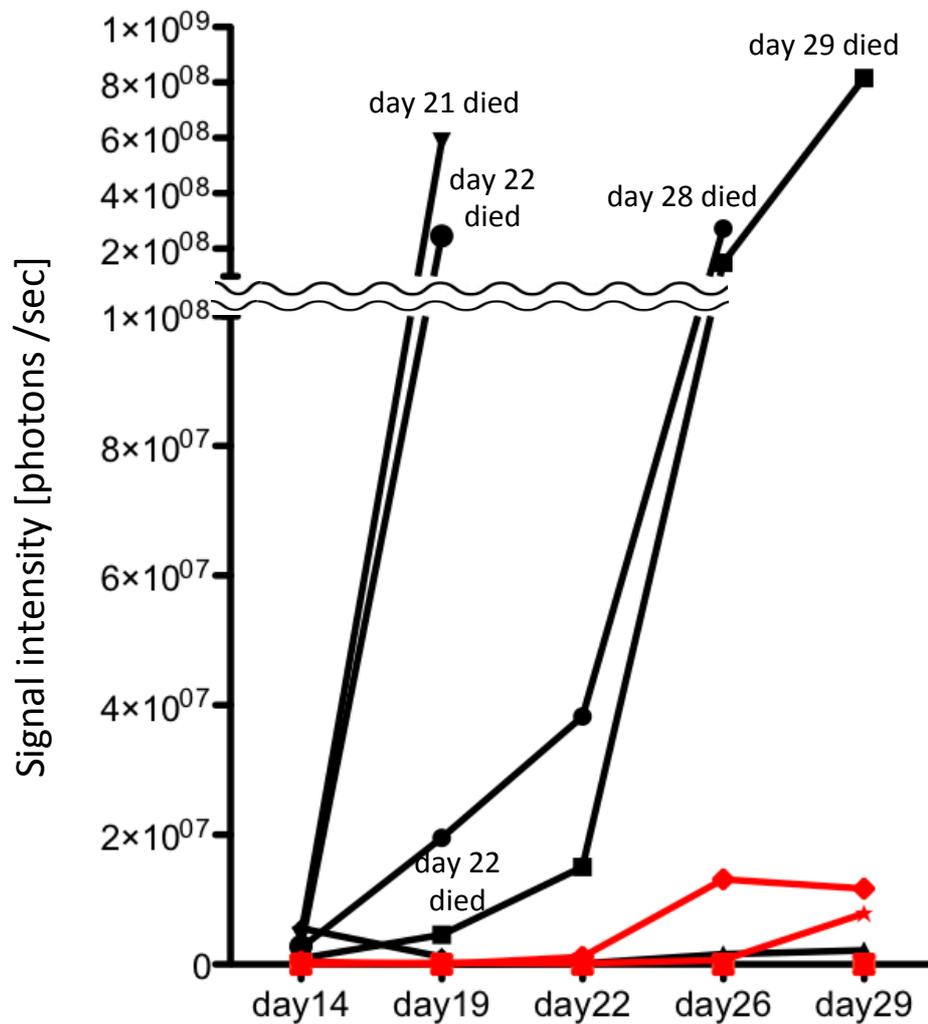


Fig. 8 3LL-Luc2細胞尾静注によるASK1^{-/-}マウスの肺転移のIVISでの観察 (2)

C: Signal intensity of the luciferase from 3LL-Luc2 cells within the lungs was measured over time with IVIS (WT mice: n=6 in black, ASK1^{-/-} mice: n=6 in red).

Data by Shogo Ehata & Kei Takahashi

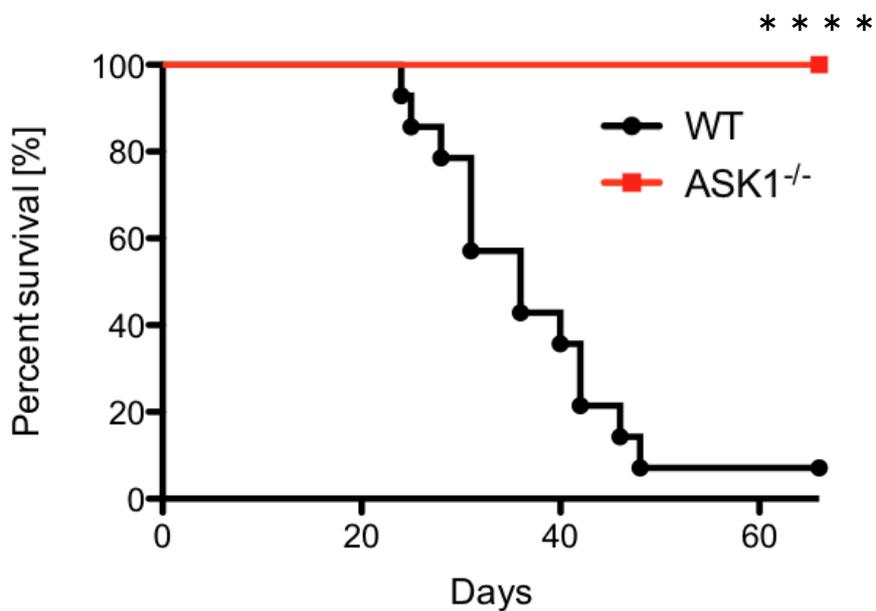


Fig. 9 3LL-Luc2細胞尾静注後のASK1^{-/-}マウスの生存率

The survival of mice with tail vein injection of 3LL-Luc2 cells was monitored. Data are analyzed by Gehan-Breslow-Wilcoxon test [****p < 0.0001]. (WT mice: n=14, ASK1^{-/-} mice: n=15)

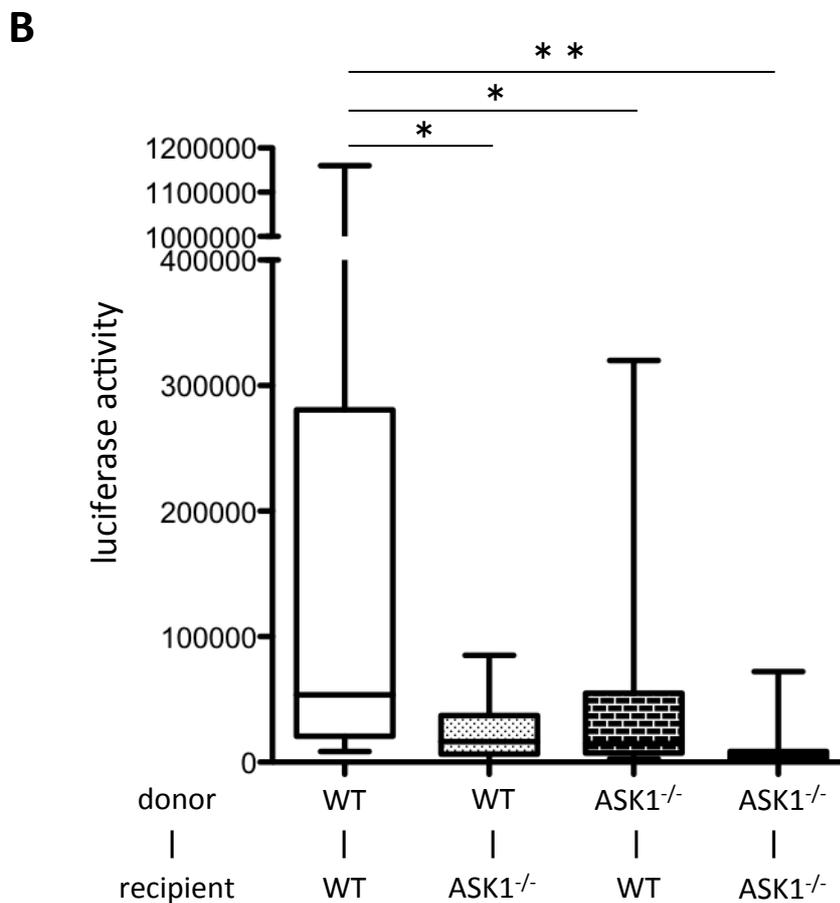
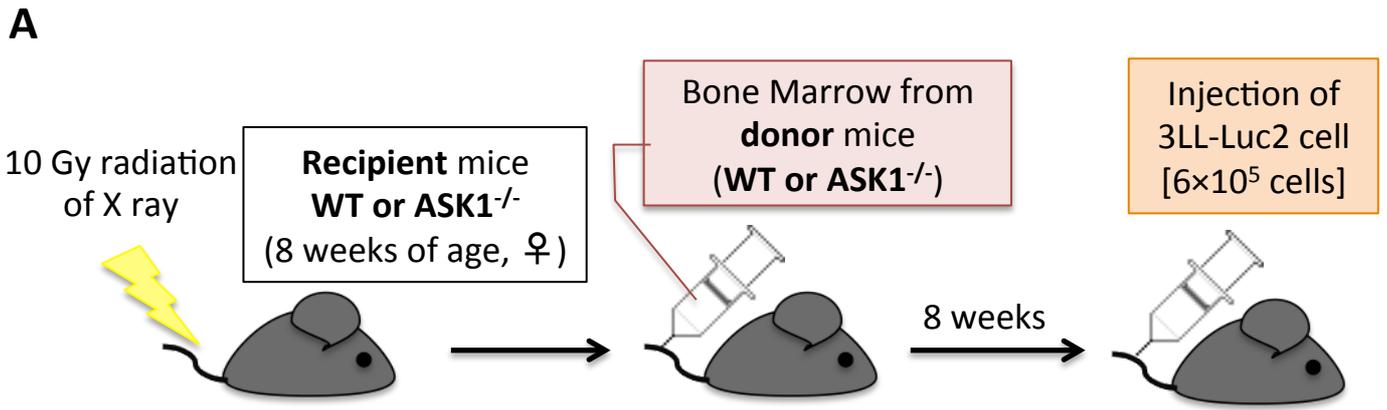


Fig. 10 骨髄キメラマウスにおける3LL-Luc2細胞の肺転移の表現型

A: Experimental protocol for production of bone marrow chimeric mice
 B: Luciferase activity of the lung lysate was analyzed (WT-WT: n=14, WT-ASK1^{-/-}: n=12, ASK1^{-/-}-WT: n=14, ASK1^{-/-}-ASK1^{-/-}: n=16). Data are shown as box-and-whisker plot with maximum and minimum values, and statistically analyzed by One-way ANOVA followed by Ryan's method [******p<0.01, *****p<0.05].

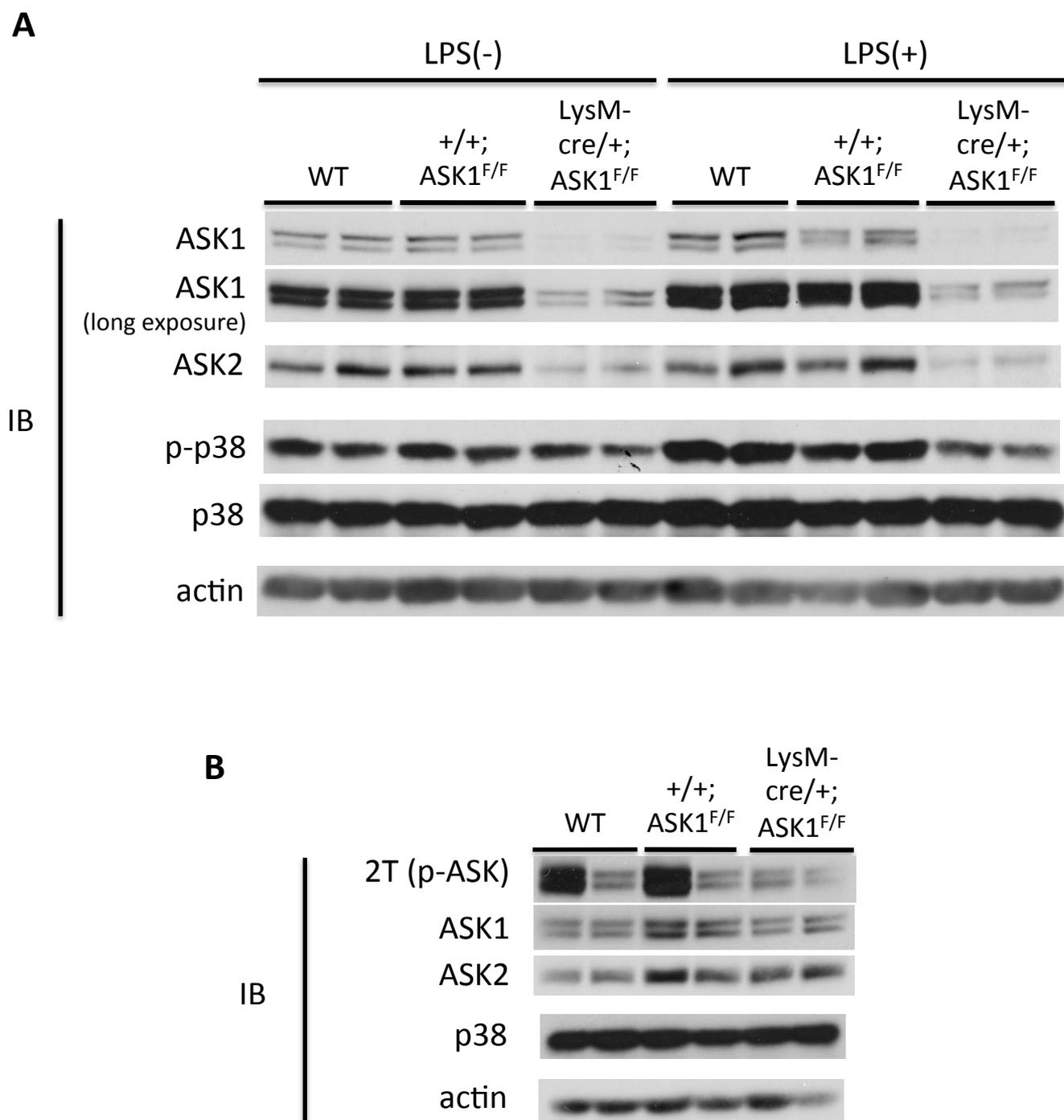


Fig. 11 LysM-cre/+; ASK1^{F/F} マウスの各組織のウエスタンブロット

Peritoneal macrophages (A) and lungs (B) of WT, +/+; ASK1^{F/F} and LysM-cre/+; ASK1^{F/F} mice (n= 2) were isolated, lysed and subjected to western blot.

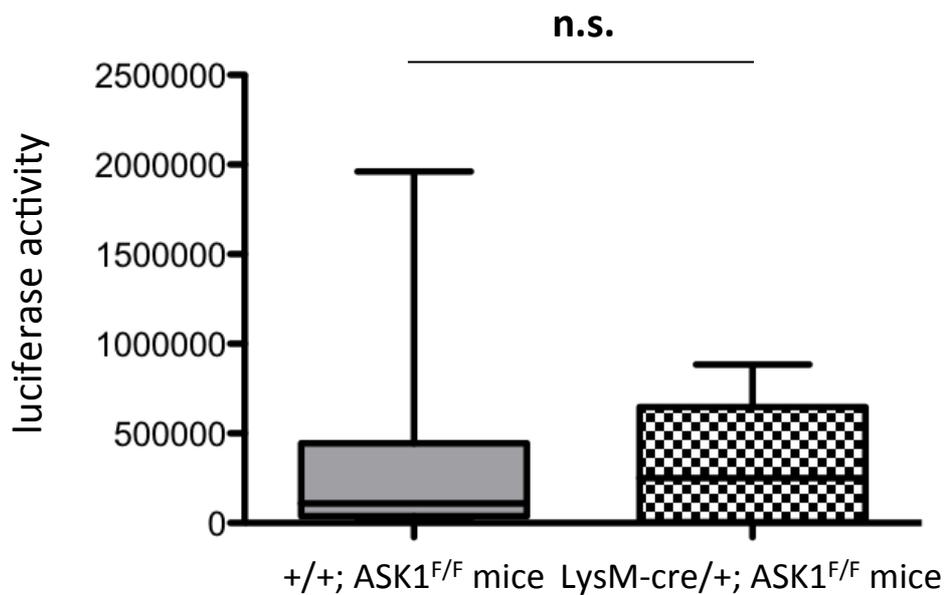


Fig. 12 LysM-cre/+; ASK1^{F/F} マウスにおける3LL-Luc2細胞の肺転移の表現型

Luciferase activity of the lung lysates 2 weeks after tail vein injection of 3LL-Luc2 cells was analyzed. (+/+; ASK1^{F/F} mice: n=10, LysM-cre/+; ASK1^{F/F} mice: n=14 / Data are shown as box-and-whisker plot with maximum and minimum values and analyzed by Mann Whitney test. [n.s.; non significant])

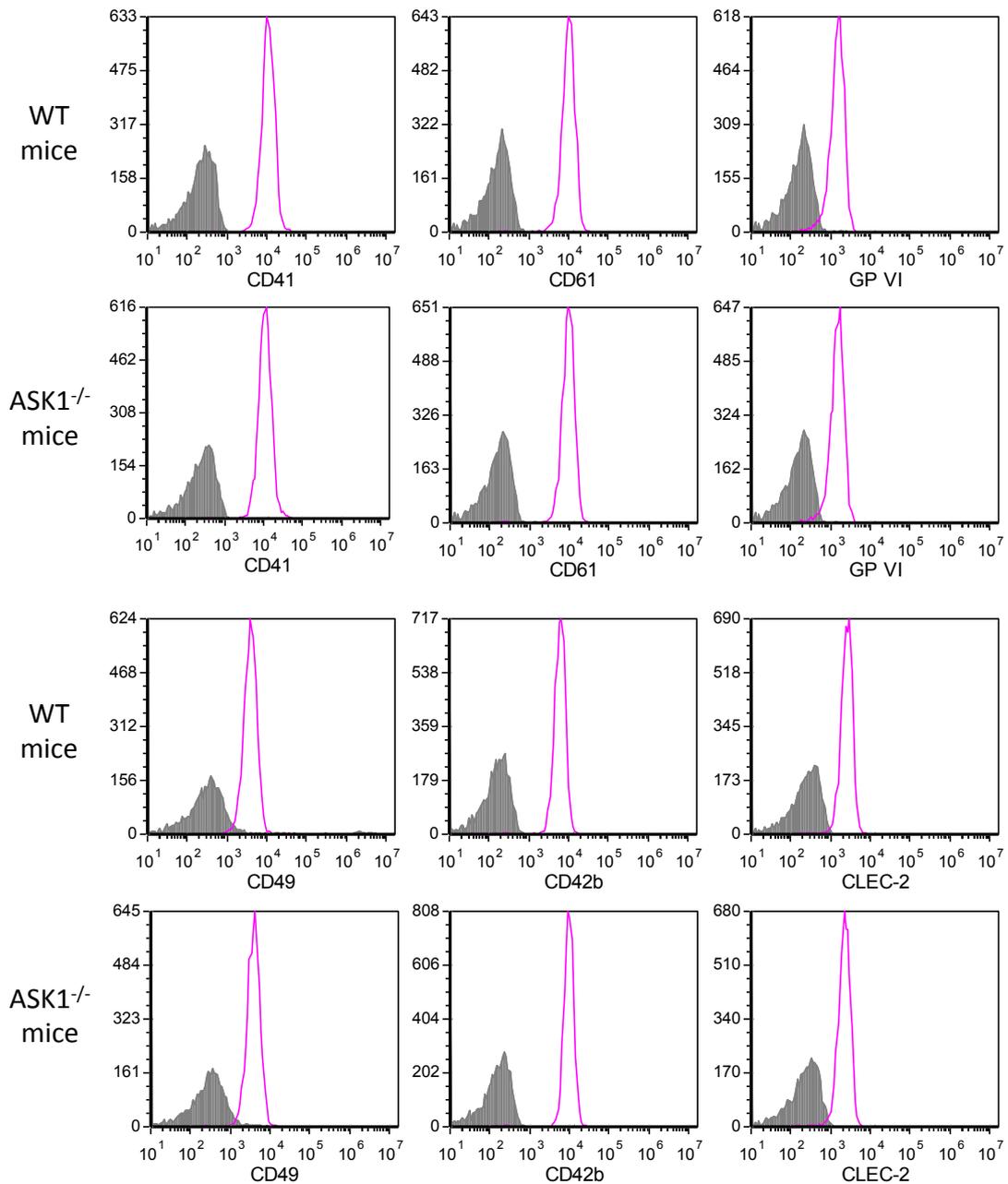


Fig. 13 ASK1^{-/-}マウスにおける血小板膜表面受容体の発現

Platelet surface expression of functional receptors (CD41, CD61, GPVI, CD49, CD42b and CLEC-2) was comparable between WT and ASK1^{-/-} mice. (n= 3) **Data by Shogo Tamura**

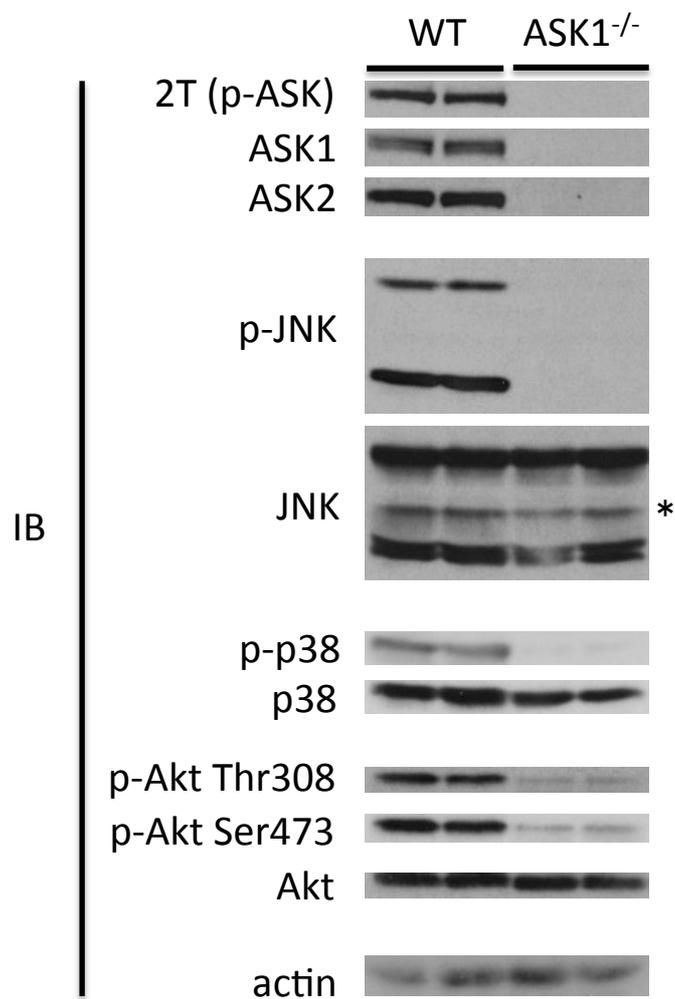


Fig. 14 ASK1^{-/-}マウスの血小板のウエスタンブロット

Platelets of WT and ASK1^{-/-} mice (n=2) were isolated, lysed and subjected to western blot. (*; non-specific band)

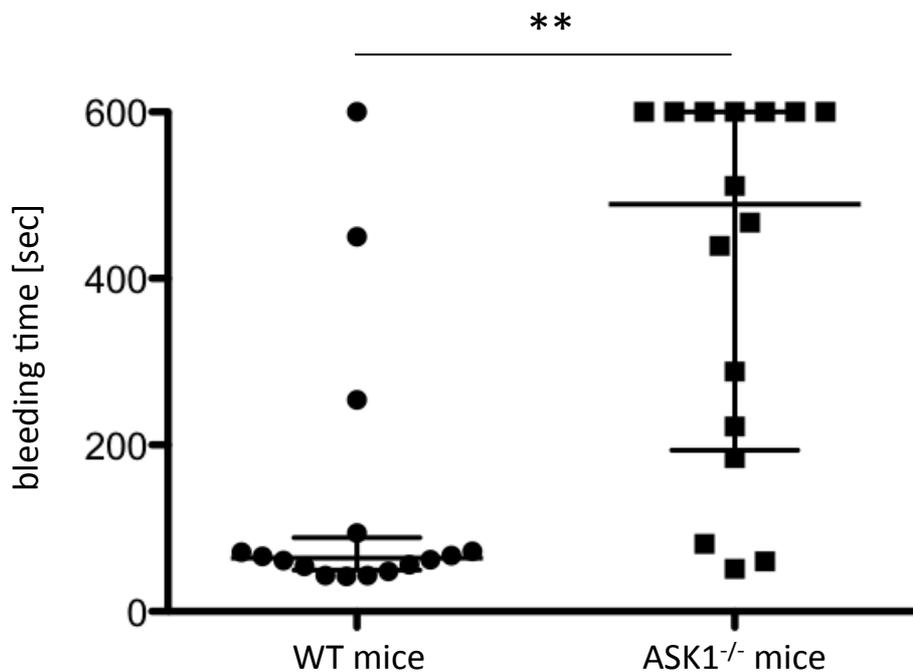
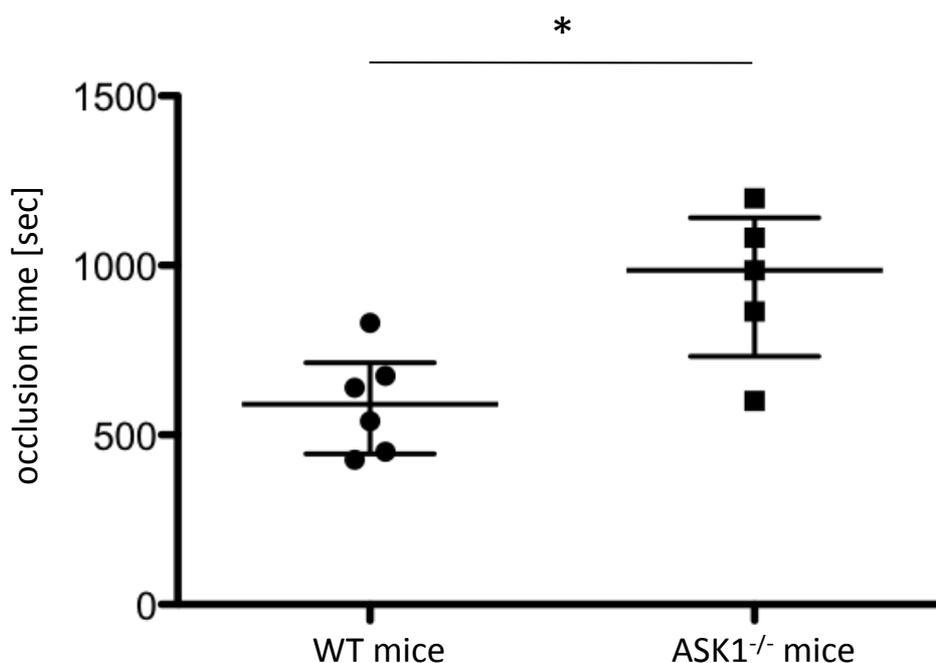
A**B**

Fig. 15 ASK1^{-/-}マウスは*in vivo*において血小板機能低下の症状を呈する

A: The bleeding time of WT and ASK1^{-/-} mice was measured with tail bleeding assay (WT mice: n=16, ASK1^{-/-} mice: n=16).

B: The occlusion time in femoral artery of WT and ASK1^{-/-} mice was measured with FeCl₃-induced thrombosis model (WT mice: n=6, ASK1^{-/-} mice: n=5). **Data by Toshiaki Shirai**

Data are median with interquartile range and are statistically analyzed by Mann Whitney test [**p<0.01, *p<0.05].

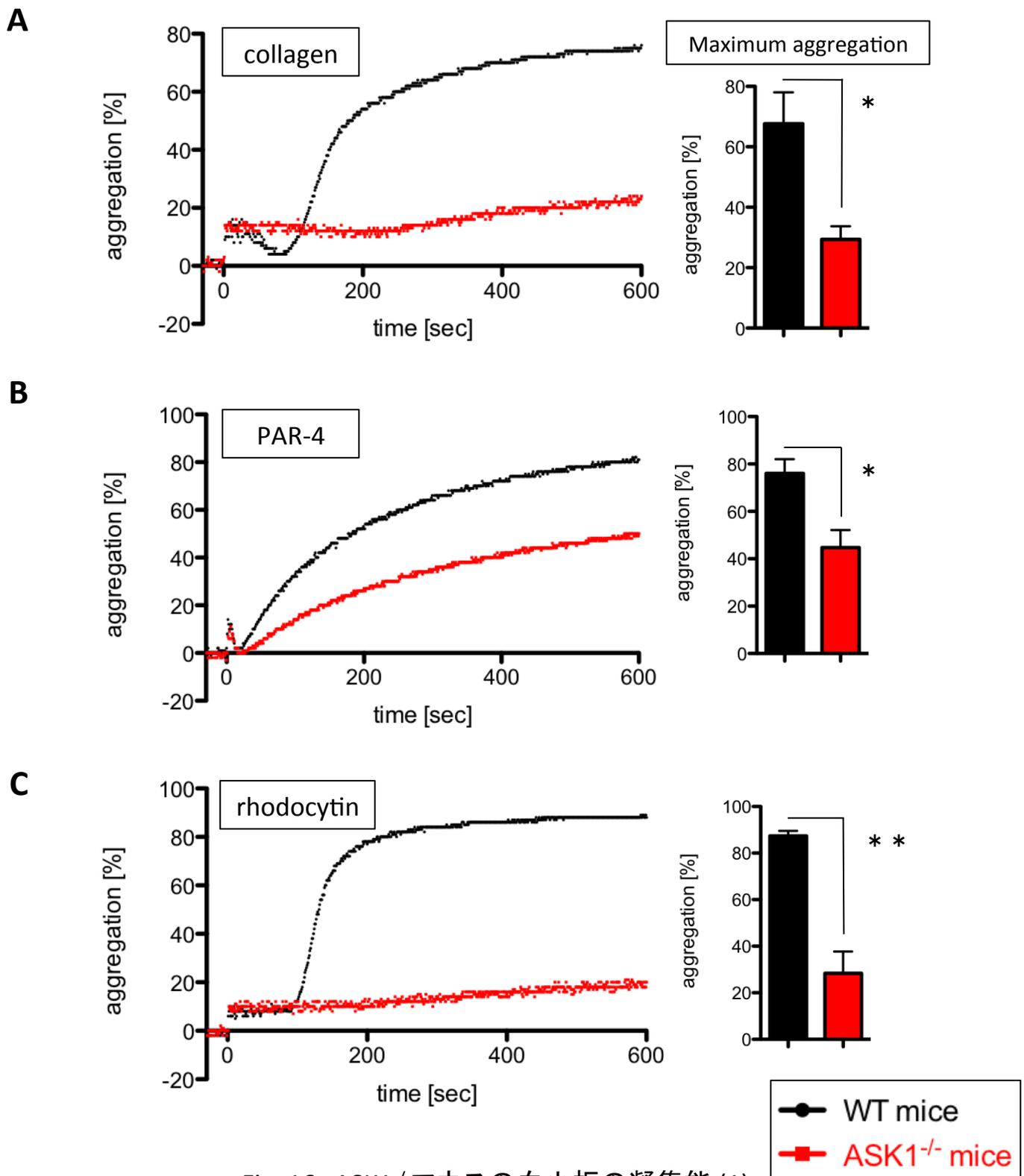


Fig. 16 ASK1^{-/-}マウスの血小板の凝集能 (1)

Platelet aggregation induced by 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ collagen (A), 50 μM PAR-4 (B) and 1 nM rhodocytin (C) was analyzed with aggregometer. Representative traces are shown on the left and the maximal aggregation within 10 minutes of measurement is shown as mean \pm s.e.m. on the right (n=3). The maximal aggregation was statistically analyzed by unpaired Student's t-test or unpaired t test with Welch's correction [*p<0.05, **p<0.01].

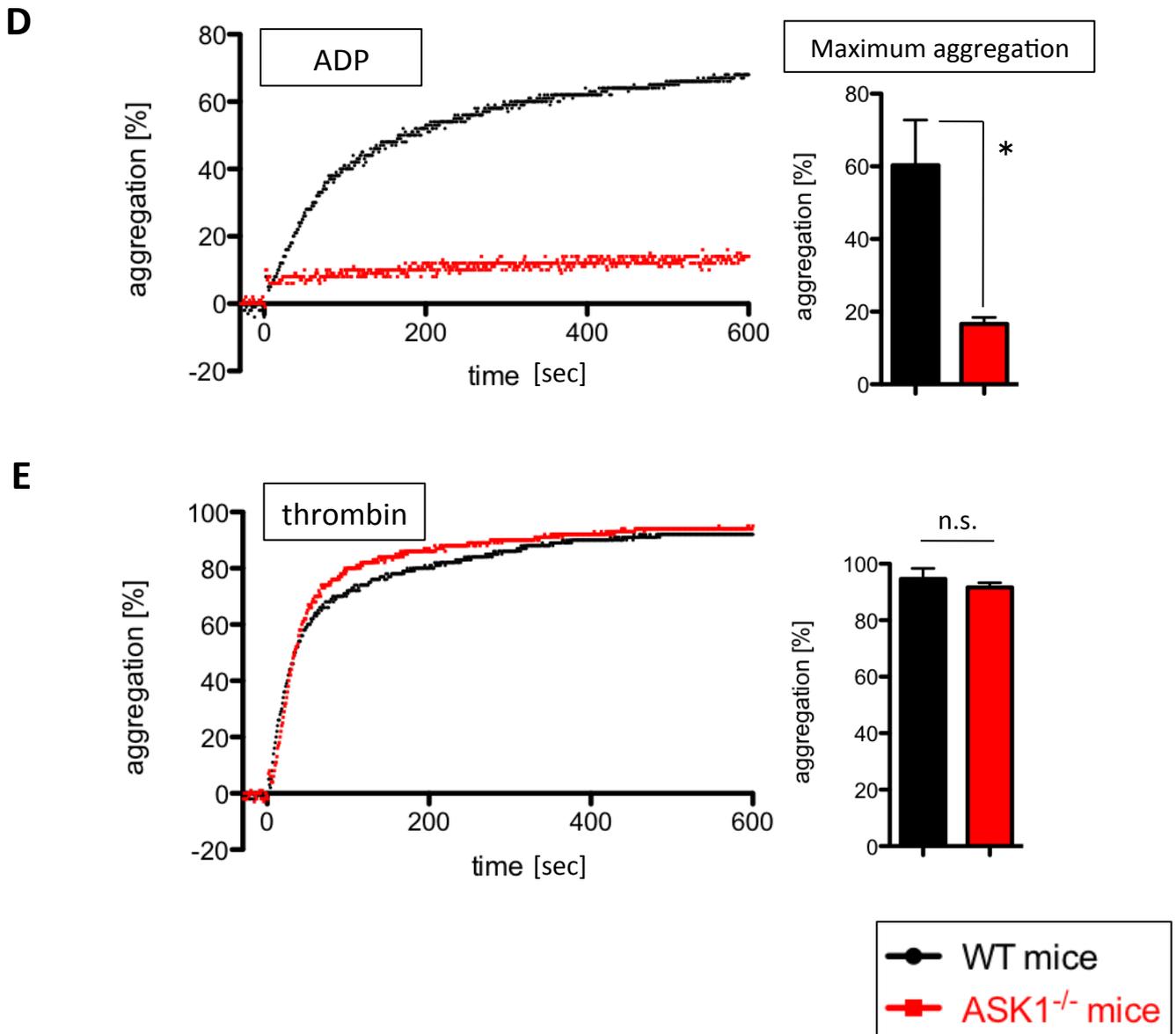


Fig. 16 ASK1^{-/-}マウスの血小板の凝集能 (2)

Platelet aggregation induced by 10 μ M ADP (D) and 0.025 U/ml thrombin (E) was analyzed with aggregometer. Representative traces are shown on the left and the maximal aggregation within 10 minutes of measurement is shown as mean \pm s.e.m. on the right (n= 3). The maximal aggregation was statistically analyzed by unpaired Student's t-test or unpaired t test with Welch's correction [*p<0.05, n.s.; non significant].

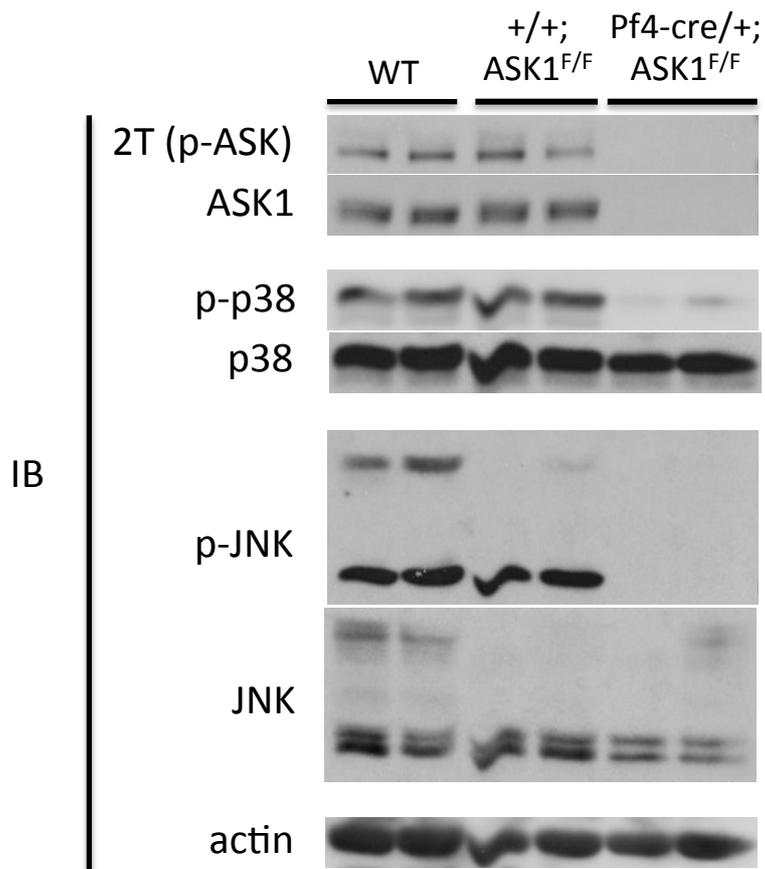
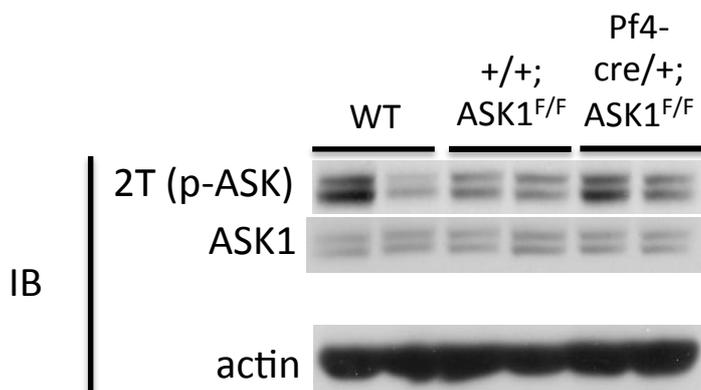
A**B**

Fig. 17 Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウスの各組織のウエスタンブロット

Platelets (A) and lungs (B) of WT, +/+; ASK1^{F/F} and Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} mice (n= 2) were isolated, lysed and subjected to western blot.

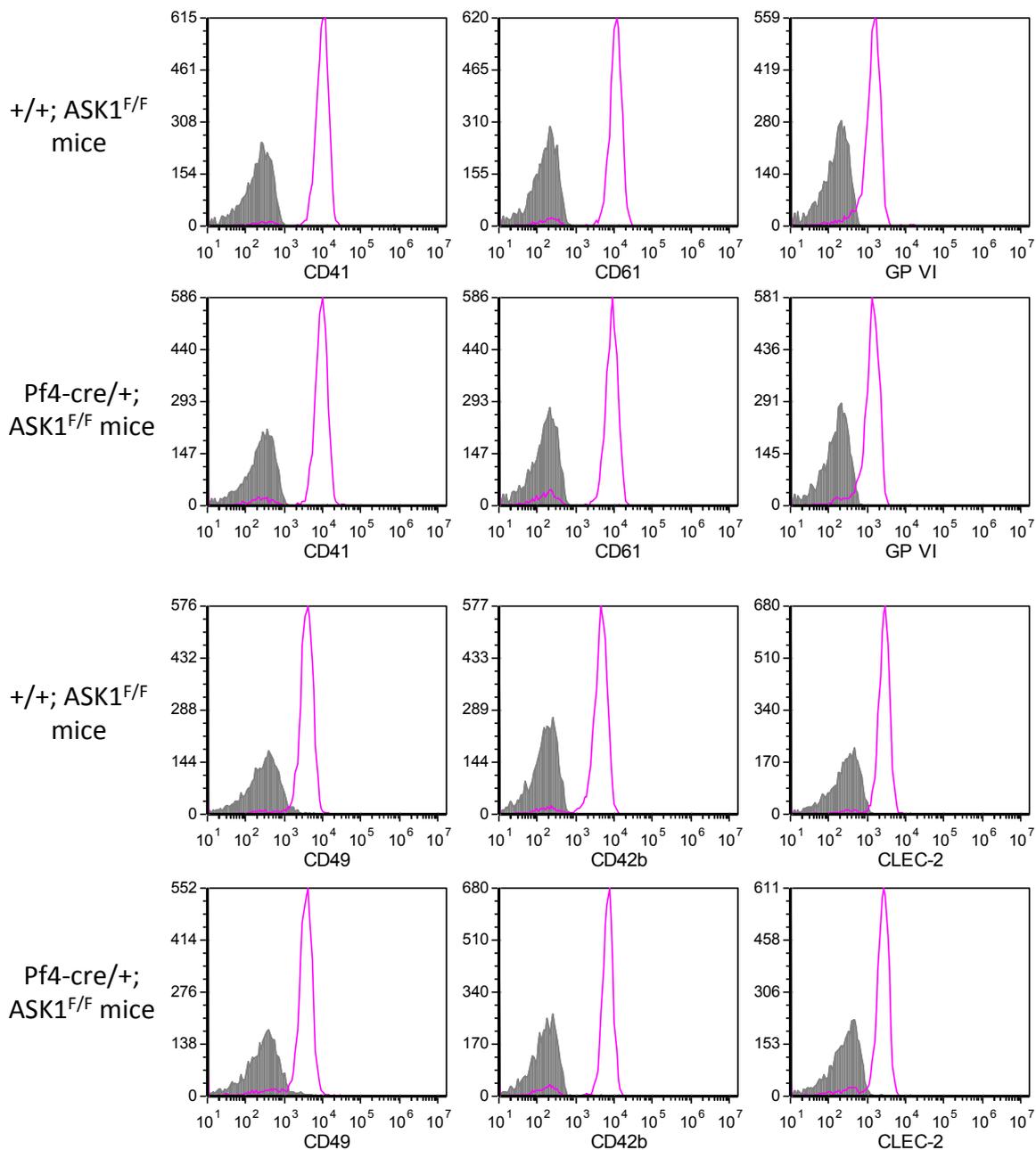


Fig. 18 Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウスにおける血小板膜表面受容体の発現

Platelet surface expression of functional receptors (CD41, CD61, GPVI, CD49, CD42b and CLEC-2) was comparable between +/+; ASK1^{F/F} and Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} mice. (n= 3) **Data by Shogo Tamura**

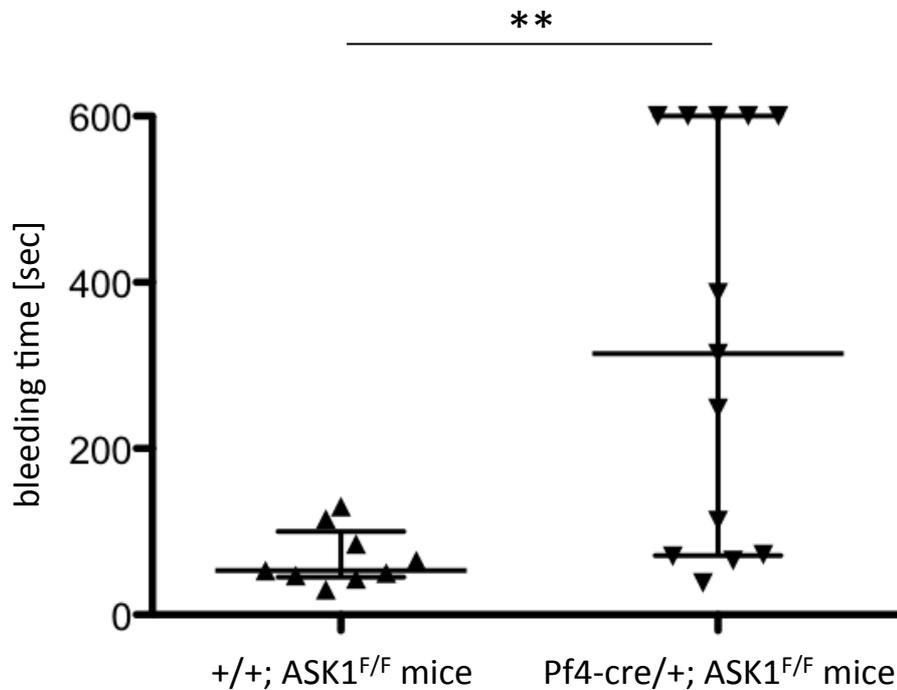
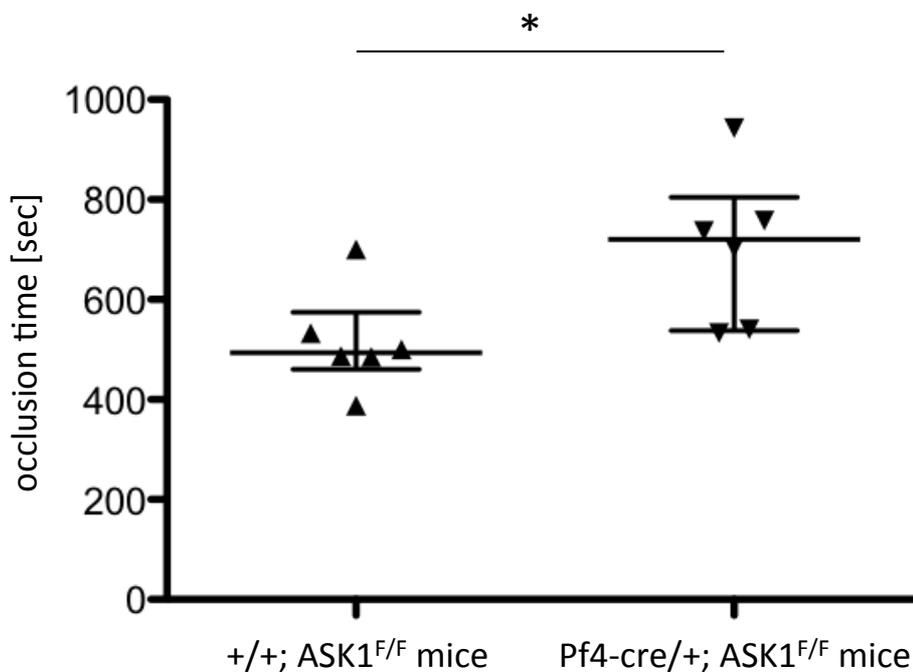
A**B**

Fig. 19 Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウスもASK1^{-/-}マウスと同様、*in vivo*において血小板機能低下の症状を呈する

A: The bleeding time of +/+; ASK1^{F/F} and Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} mice was measured with tail bleeding assay (+/+; ASK1^{F/F} mice: n=9, Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} mice: n=13).

B: The occlusion time in femoral artery of +/+; ASK1^{F/F} and Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} mice was measured with FeCl₃-induced thrombosis model (+/+; ASK1^{F/F} mice: n=6, Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} mice: n=6). **Data by Toshiaki Shirai**

Data are median with interquartile range and are statistically analyzed by Mann Whitney test [**p<0.01, *p<0.05].

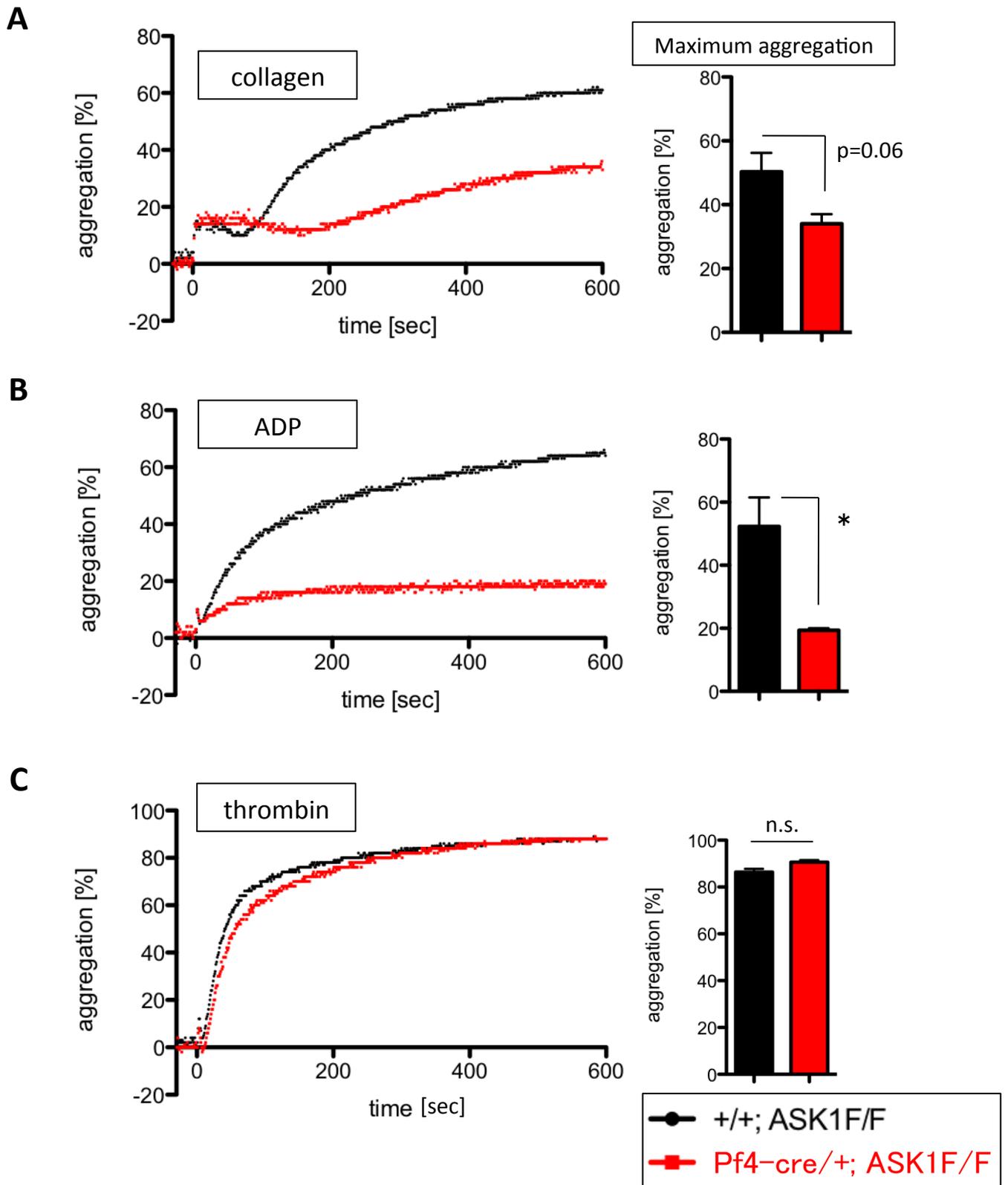


Fig. 20 Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウスの血小板の凝集能

Platelet aggregation induced by 1 μ g/ml collagen (A), 10 μ M ADP (B) and 0.025 U/ml thrombin (C) was analyzed with aggregometer.

Representative traces are shown on the left and the maximal aggregation within 10 minutes of measurement is shown as mean \pm s.e.m. on the right (n= 3). The maximal aggregation was statistically analyzed by unpaired Student's t-test or unpaired t test with Welch's correction [*p<0.05, n.s.; non significant].

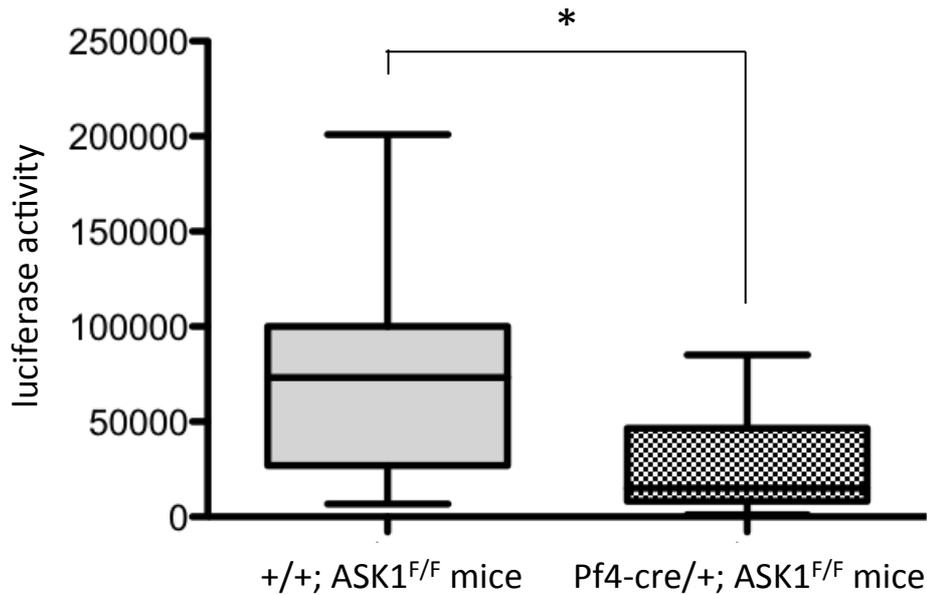
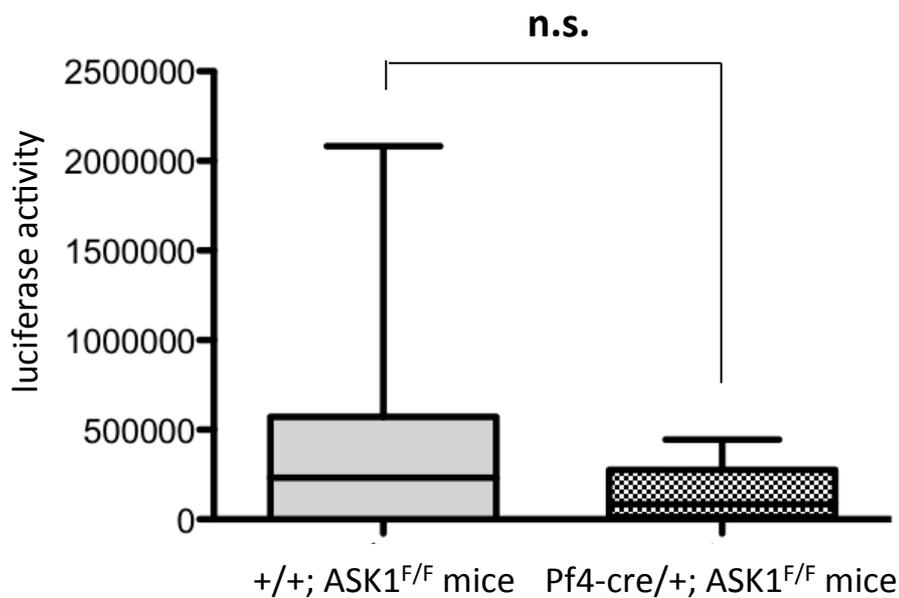
A**B**

Fig. 21 Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウスにおけるがんの肺転移の表現型

Luciferase activity of the lung lysates 2 weeks after tail vein injection of B16F10-luc-G5 (A) or 3LL-Luc2 (B) cells was analyzed. Data are shown as box-and-whisker plot with maximum and minimum values and statistically analyzed by Mann Whitney test [*p<0.05, n.s.; non significant]. (A, +/+; ASK1^{F/F} mice: n=11, Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} mice: n=10, B, +/+; ASK1^{F/F} mice: n=13, Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} mice: n=13)

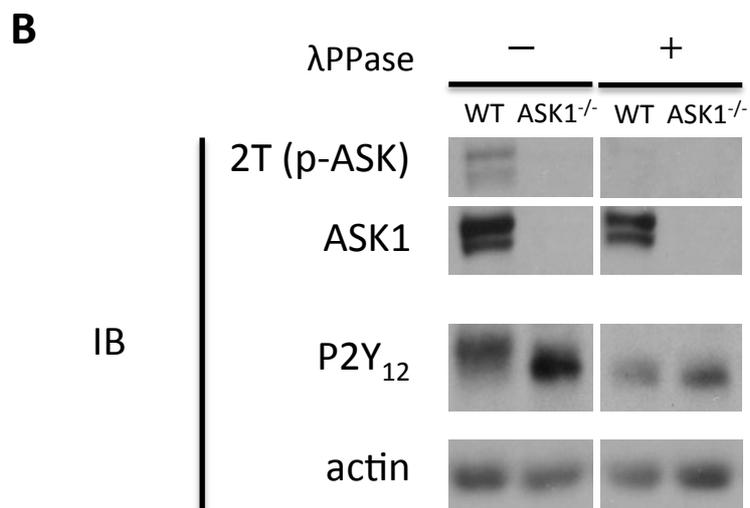
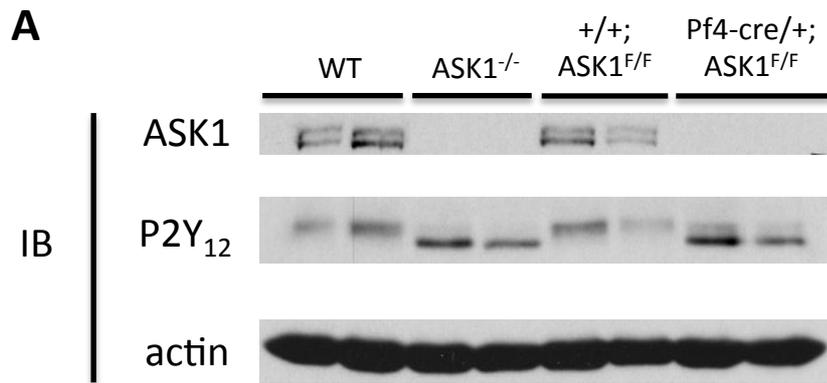


Fig. 22 ASK1はADP受容体P2Y₁₂のリン酸化を制御する

A: Protein expression of P2Y₁₂ was assessed in platelets of WT, ASK1^{-/-}, +/+; ASK1^{F/F} and Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} mice with western blot (n= 2).

B: Platelet lysates were subjected to dephosphorylation by λPPase followed by western blot.

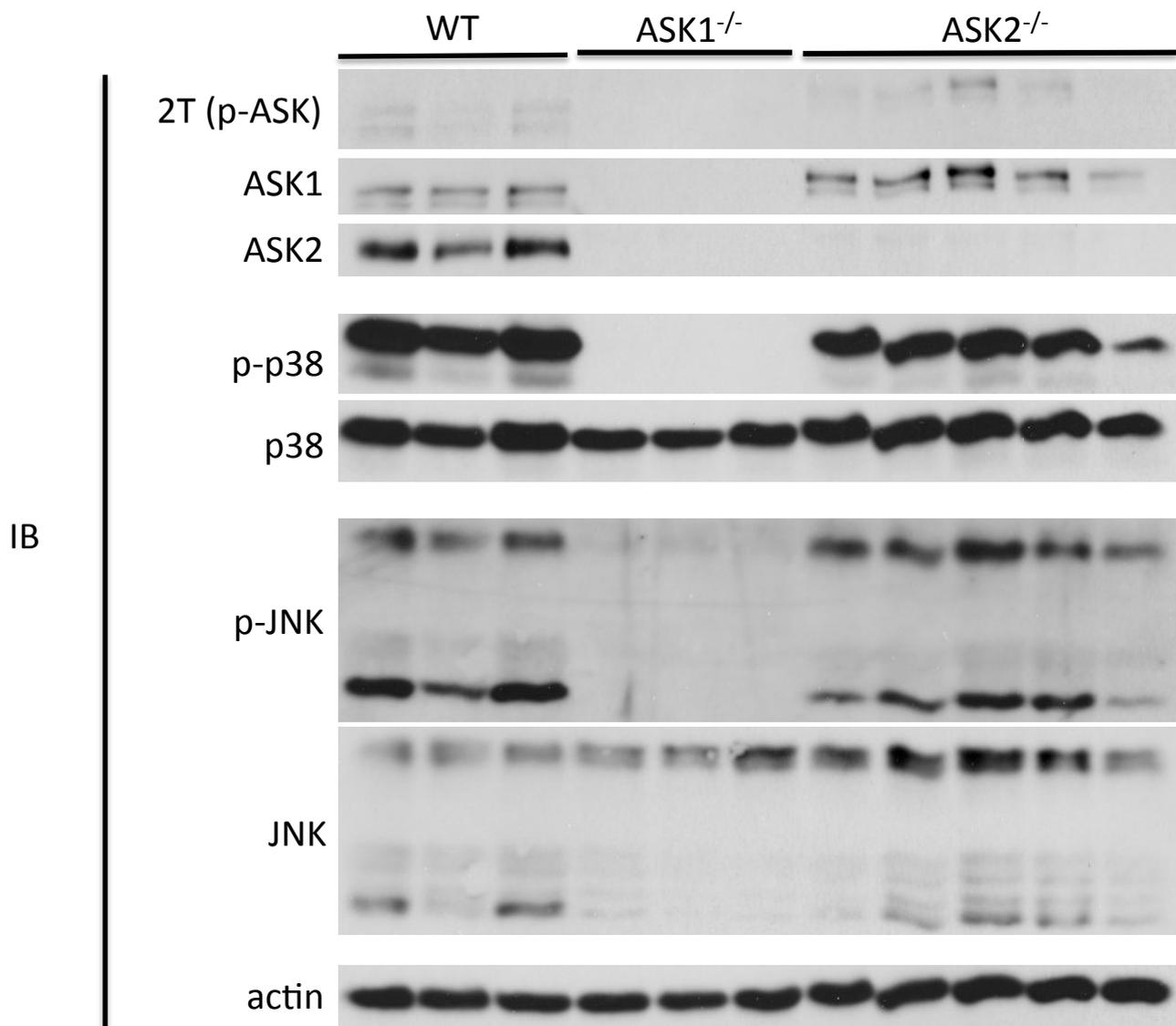


Fig. 23 ASK2^{-/-}マウスの血小板のウエスタンブロット

Platelets of WT (n=3), ASK1^{-/-} mice (n=3) and ASK2^{-/-} mice (n=5) were isolated, lysed and subjected to western blot.

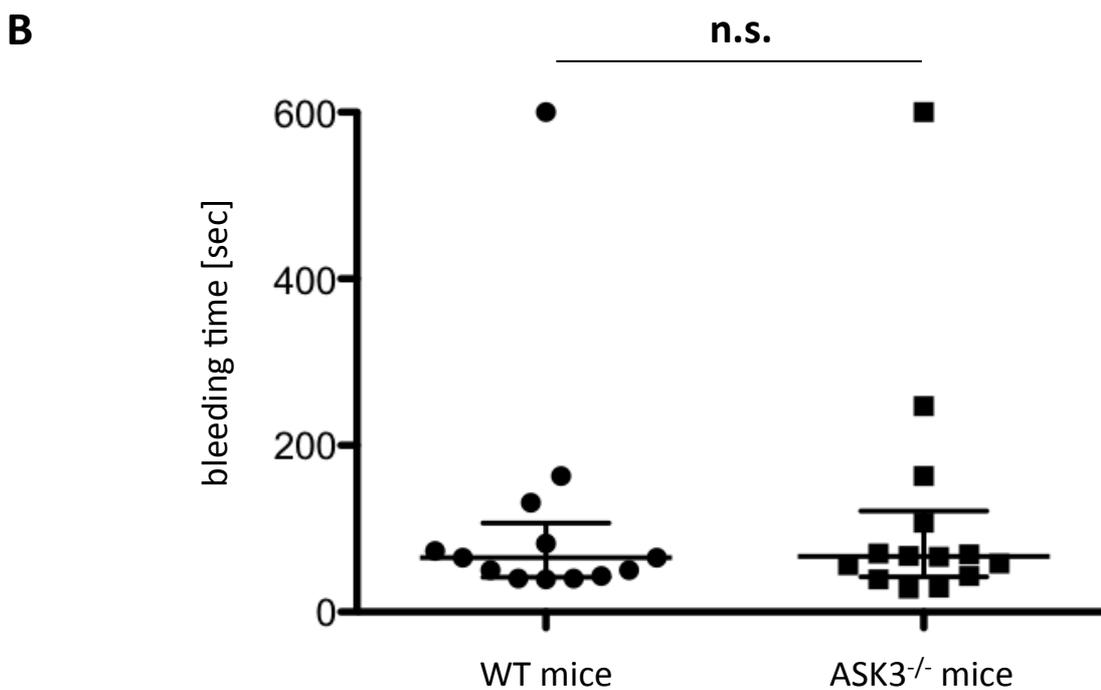
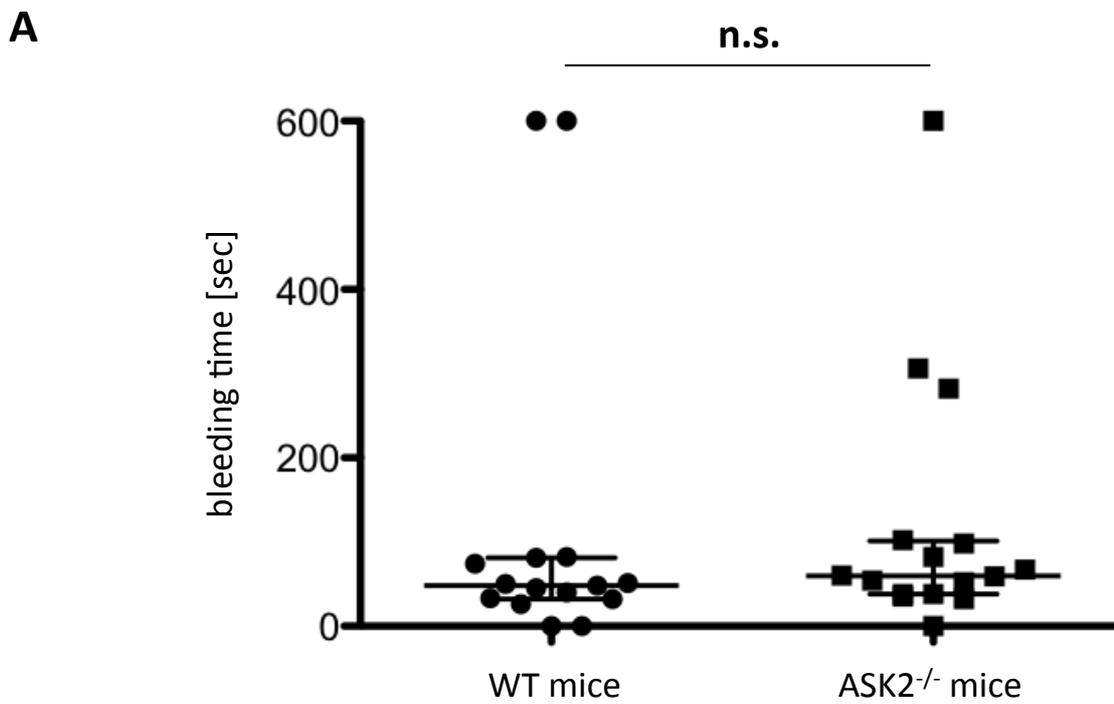


Fig. 24 ASK2^{-/-}マウス及びASK3^{-/-}マウスのTail bleeding assayにおける表現型

The bleeding time of ASK2^{-/-} mice (A) and ASK3^{-/-} mice (B) was measured with tail bleeding assay (A, WT mice: n=15, ASK2^{-/-} mice: n=16, B, WT mice: n=13, ASK3^{-/-} mice: n=14). Data are median with interquartile range and are statistically analyzed by Mann Whitney test [n.s.; non significant].

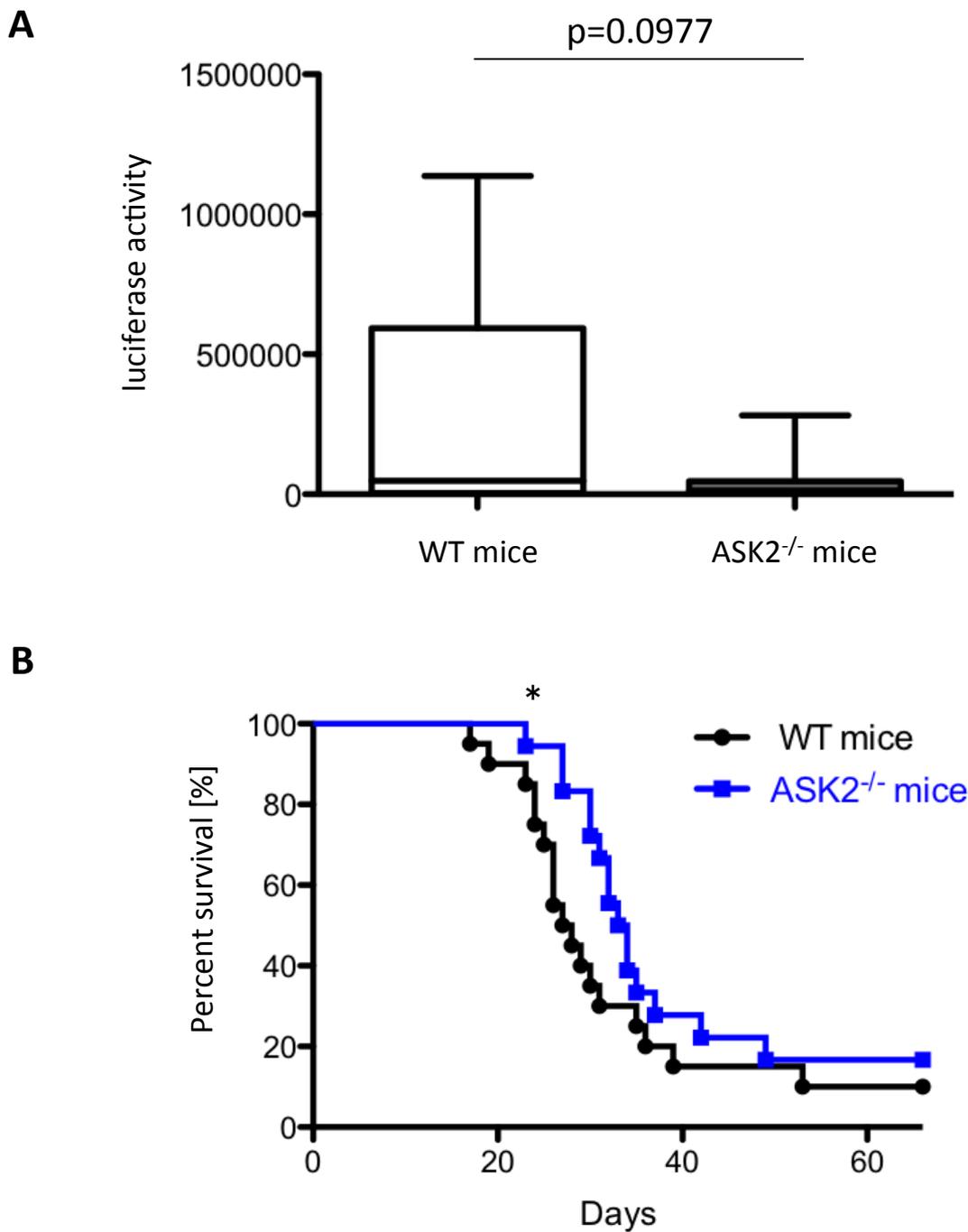


Fig. 25 ASK2^{-/-}マウスの、3LL-Luc2細胞尾静注14日後の肺転移の表現型と3LL-Luc2細胞尾静注後の個体生存率

A: Luciferase activity of the lung lysates 2 weeks after tail vein injection of 3LL-Luc2 cells was analyzed. Data are shown as box-and-whisker plot with maximum and minimum values and statistically analyzed by Mann Whitney test. (WT mice: n=19, ASK1^{-/-} mice: n=18)

B: The survival of mice with tail vein injection of 3LL-Luc2 cells was monitored. Data are analyzed by Gehan-Breslow-Wilcoxon test [*p < 0.05]. (WT mice: n=20, ASK2^{-/-} mice: n=18)

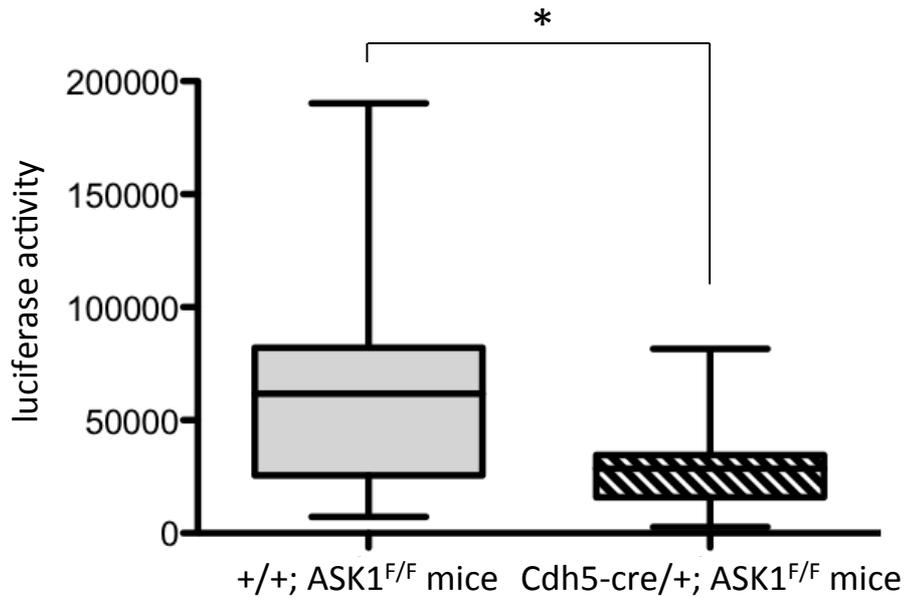
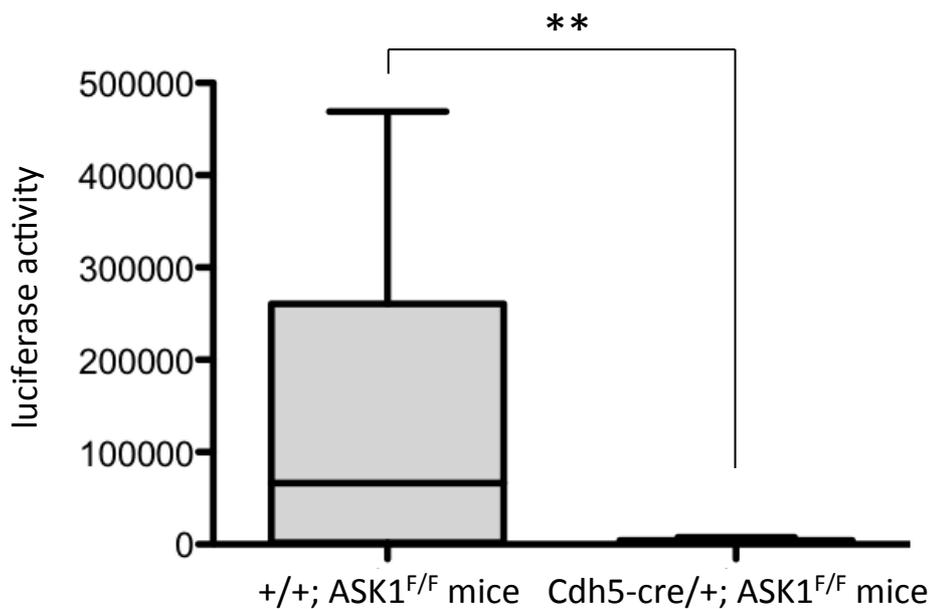
A**B**

Fig. 26 Cdh5-cre/+; ASK1^{F/F} マウスにおけるがんの肺転移の表現型

Luciferase activity of the lung lysates 2 weeks after tail vein injection of B16F10-luc-G5 (A) or 3LL-Luc2 (B) cells was analyzed. Data are shown as box-and-whisker plot with maximum and minimum values and statistically analyzed by Mann Whitney test [******p<0.01, *****p<0.05]. (A, +/+; ASK1^{F/F} mice: n=12, Cdh5-cre/+; ASK1^{F/F} mice: n=12, B, +/+; ASK1^{F/F} mice: n=12, Cdh5-cre/+; ASK1^{F/F} mice: n=10)

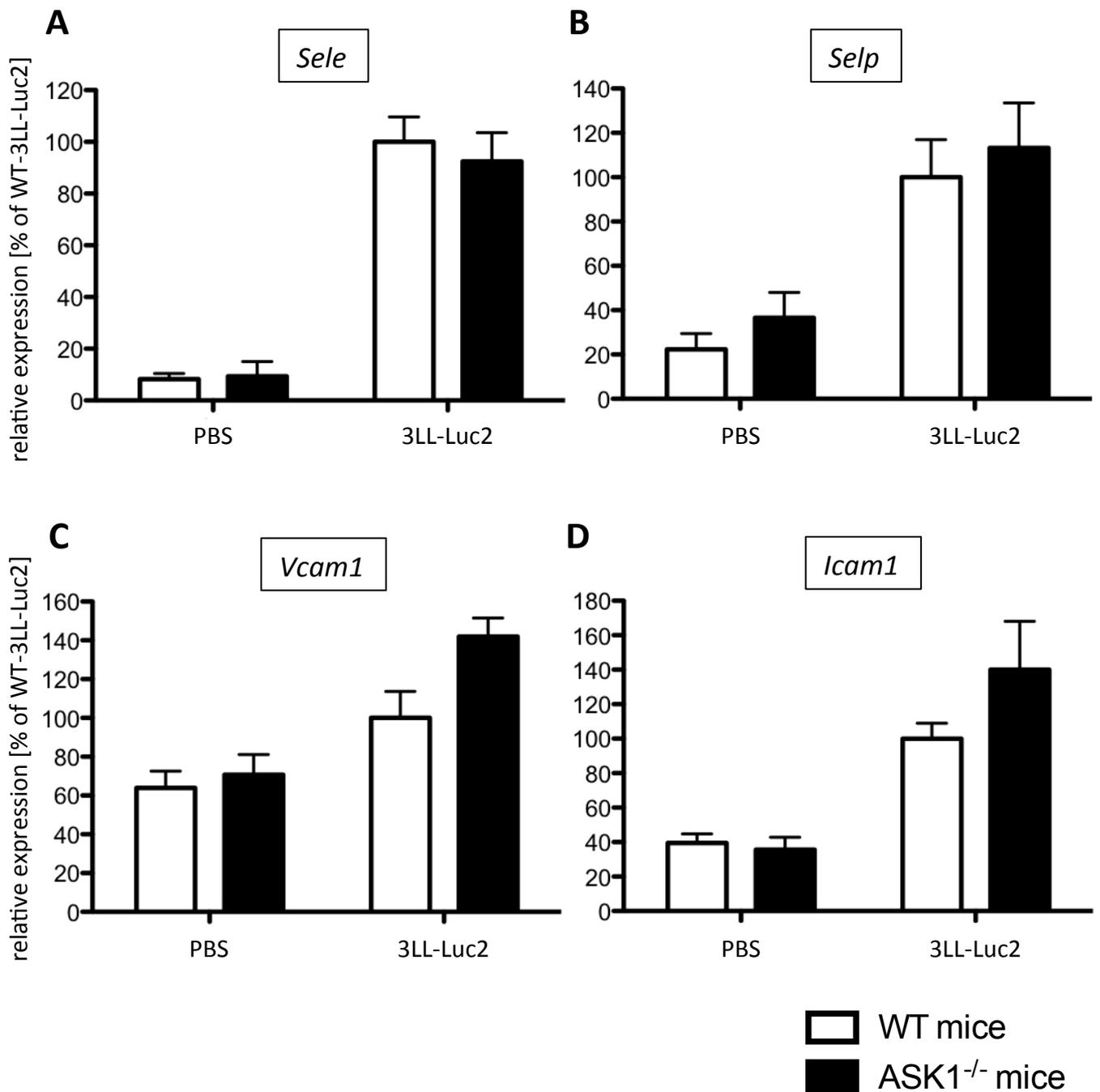


Fig. 27 3LL-Luc2細胞尾静注3時間後の肺における、転写レベルでの接着因子の発現 (1)

mRNA of the lungs at 3 h after tail vein injection of 3LL-Luc2 cells or PBS (negative control) was extracted and subjected to qRT-PCR. (WT-PBS: n=6, ASK1^{-/-}-PBS: n=6, WT-3LL-Luc2: n=6, ASK1^{-/-}-3LL-Luc2: n=5) **Data by Kosuke Fuse**

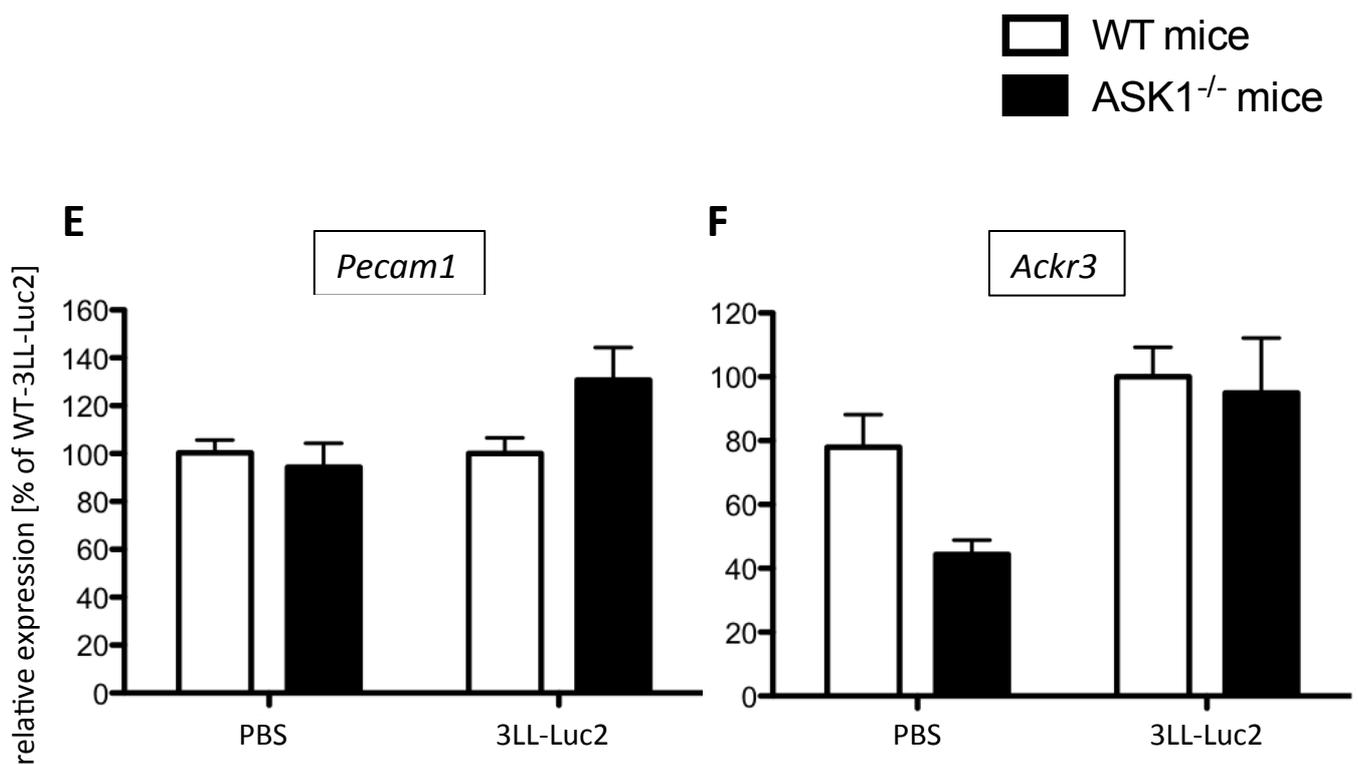


Fig. 27 3LL-Luc2細胞尾静注3時間後の肺における、転写レベルでの接着因子の発現 (2)

mRNA of the lungs at 3 h after tail vein injection of 3LL-Luc2 cells or PBS (negative control) was extracted and subjected to qRT-PCR. (WT-PBS: n=6, ASK1^{-/-}-PBS: n=6, WT-3LL-Luc2: n=6, ASK1^{-/-}-3LL-Luc2: n=5) **Data by Kosuke Fuse**

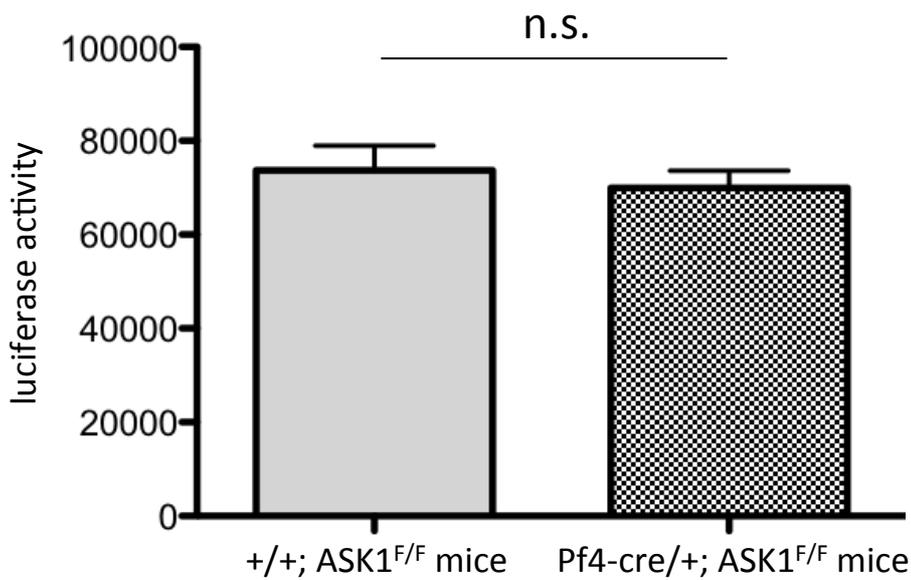
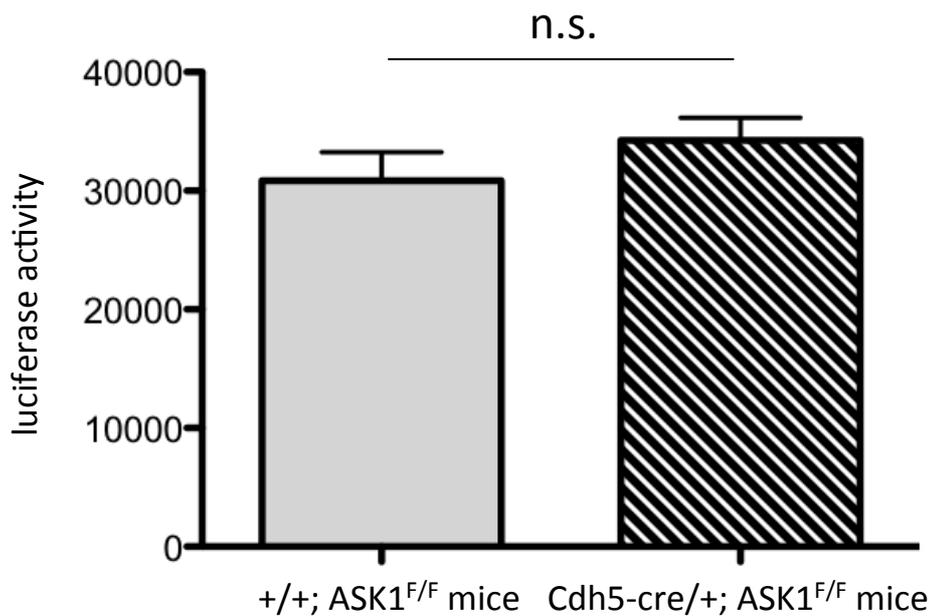
A**B**

Fig. 28 Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} マウス及びCdh5-cre/+; ASK1^{F/F} マウスにおける 3LL-Luc2細胞尾静注3時間後の肺転移の表現型

Luciferase activity of the lung lysates at 3 h after tail vein injection of 3LL-Luc2 cells was analyzed. (A, +/+; ASK1^{F/F} mice: n=14, Pf4-cre/+; ASK1^{F/F} mice: n=13, B, +/+; ASK1^{F/F} mice: n=3, Cdh5-cre/+; ASK1^{F/F} mice: n=4 / Data are mean ± SEM and statistically analyzed by unpaired Student's t-test [n.s.; non significant].

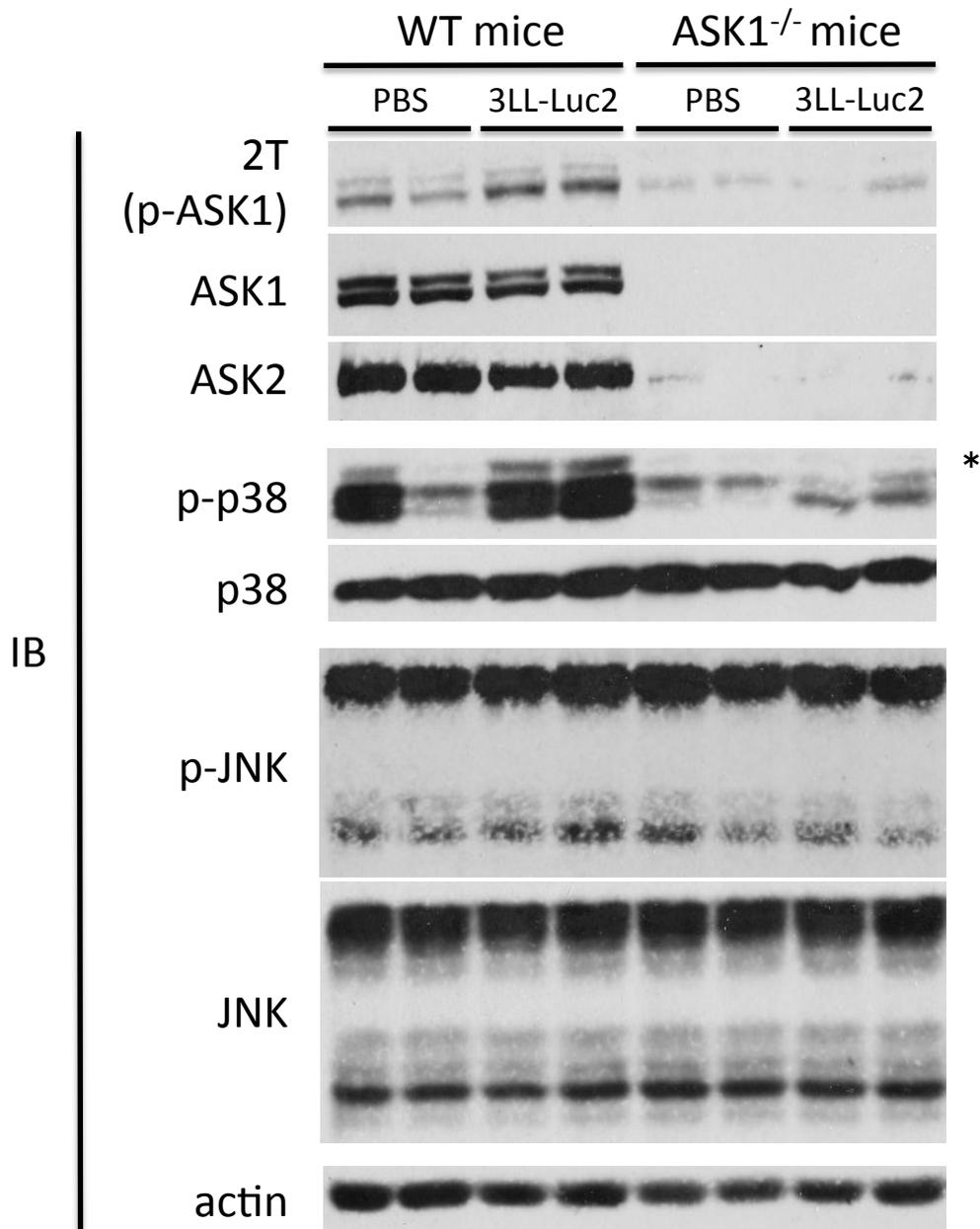


Fig. 29 3LL-Luc2細胞尾静注1時間後の肺溶解液のウエスタンブロット

Lungs of WT and ASK1^{-/-} mice 1 hour after intravenous injection of 3LL-luc2 cells or PBS (negative control) (n=2) were isolated, lysed and subjected to western blot. (*; non-specific band)

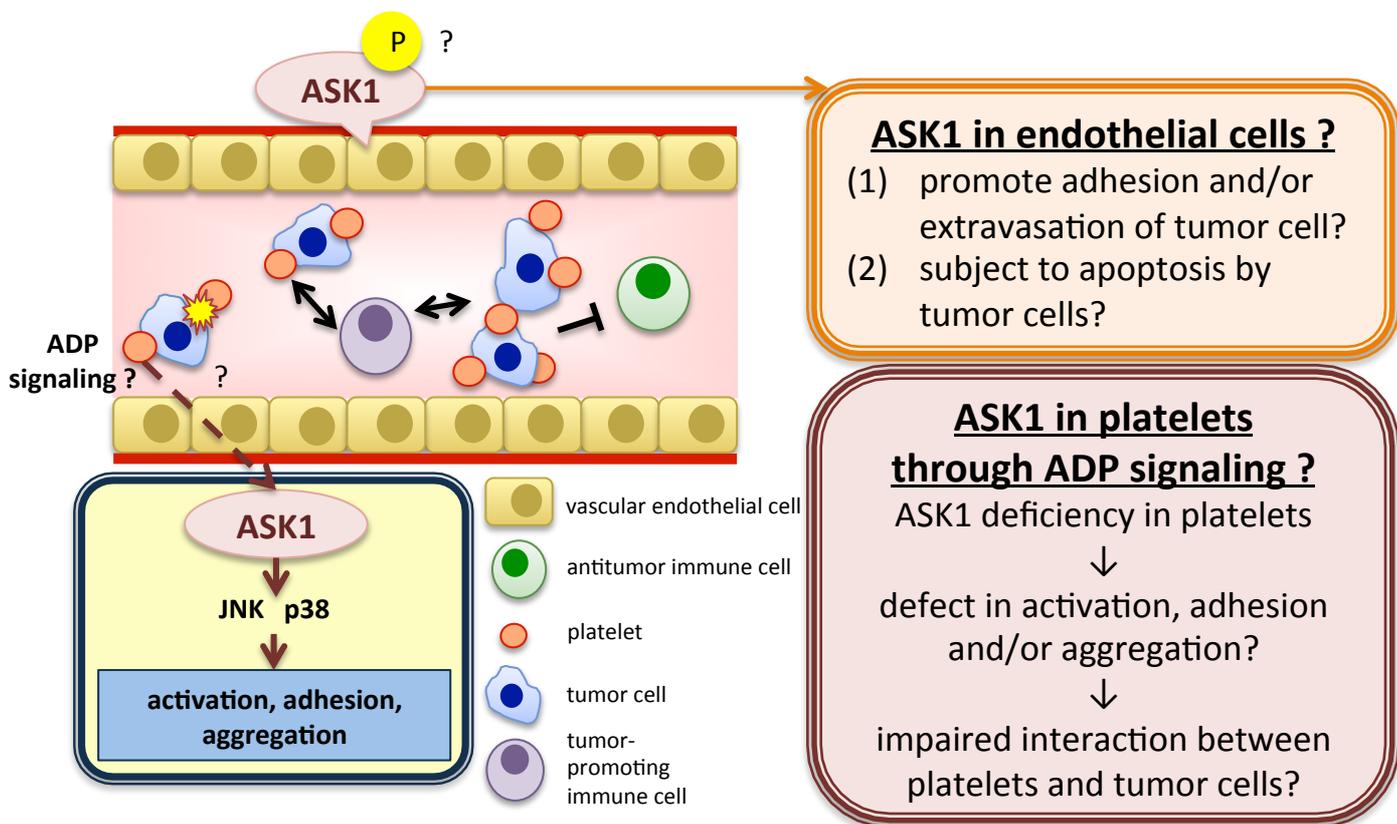


Fig. 30 血小板及び血管内皮細胞におけるASK1のがんの肺転移関与メカニズムのモデル