

## 論文の内容の要旨

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

Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) は、細胞のストレス応答シグナル伝達経路として重要な c-Jun N-terminal kinase (JNK) 経路や p38 MAP キナーゼ経路をリン酸化により制御する MAP3K 分子の 1 つであり、様々なストレスに応答して活性化する。当研究室のこれまでの研究成果から、ASK1 は炎症反応やアポトーシス制御を介して腫瘍形成を促進あるいは抑制することが判明している<sup>[1]</sup>。一方近年の研究結果から、これらの生理応答は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。私は本学修士課程において ASK1 欠損マウスを用い、がん細胞を尾静注して肺転移を引き起こす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。その結果、肺への高転移性を示すルイス肺がん細胞株にルシフェラーゼを恒常的に発現させた細胞 (3LL-Luc2 細胞)の肺転移において、宿主のマウスが ASK1 欠損の場合にがんの肺転移が著しく減弱すること、及び多段階から成るがん転移過程において、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 ASK1 が関与することを明らかにした。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。そこで本研究においては、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役割の解明を目指した。

### 1. 骨髄キメラマウスにおいて donor、recipient 双方の細胞種の ASK1 ががんの肺転移に関与する

がん転移に関連する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討するため、骨髄キメラマウスを作成し、3LL-Luc2 細胞の肺転移の表現型を解析した。野生型マウスと ASK1 欠損マウス (recipient) に骨髄死を引き起こす線量の X 線を照射し、別個体のマウス (donor) から骨髄細胞を単離して移植し定着させると、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成できる。この骨髄キメラマウスにおいて、donor と recipient のどちらでも、ASK1 を欠損すると肺転移が減弱した。よって、donor 骨髄に由来する細胞種、及びそれ以外の細胞種 (recipient の細胞) 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。次に骨髄由来の細胞種の中でも、顆粒球と単球、マクロファージ特異的に

ASK1 を欠損するマウス (LysM-cre/+; ASK1<sup>FF</sup> マウス) で解析を行ったが、3LL-Luc2 細胞の肺転移の減弱は見られなかった。そのため血小板などの、骨髄由来の他の細胞種における ASK1 の寄与が示唆された。

## 2. 血小板における ASK1 の欠損は血小板の機能低下を引き起こす

血小板は血管内でがん細胞を取り囲み、がん細胞の生存維持、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。1.の結果も踏まえて、私は血小板における ASK1 の機能解析を行うことにした。血液成分の解析から、ASK1 欠損マウスでは血中血小板数などの血球系成分は野生型マウスと差がなかった。しかし単離血小板のウェスタンブロットによる解析から、ASK1 欠損マウスの血小板では血小板活性化や凝集に重要な JNK や p38、Akt のリン酸化レベルの減弱が観察された。これらシグナル伝達分子の活性化阻害や欠失は血小板の機能低下を引き起こすことが報告されているため、まず *in vivo* で ASK1 欠損マウスの血小板機能を解析した。Tail bleeding assay 法を用いて、マウスの尾の切断先端からの出血時間を計測すると、野生型マウスに比べて有意に延長していた。さらに *in vivo* で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においても、ASK1 欠損マウスでは血栓形成の遅延が見られた。以上の結果から、ASK1 欠損マウスは *in vivo* で血小板機能低下の症状を呈することが示された。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 欠損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、その程度を野生型マウスと比較した。すると ADP や、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コラーゲンなどの複数のアゴニストによる血小板凝集が、ASK1 欠損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トロンビンによる血小板凝集には差が見られなかった。以上より、ASK1 欠損マウスの血小板は ADP への応答性が低下していることが示唆された。さらにこれら *in vivo* と *in vitro* の表現型は、血小板特異的に ASK1 を欠損するマウス (Pf4-cre/+; ASK1<sup>FF</sup> マウス) でも見られたことから、血小板における ASK1 の欠損が血小板の機能低下を引き起こすと考えられた。

## 3. 血小板での ASK1 欠損による血小板機能低下ががんの肺転移を減弱させる

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<sup>FF</sup> マウスの肺転移の程度を検討した。悪性黒色腫細胞株にルシフェラーゼを恒常的に発現させた細胞 (B16F10-luc-G5 細胞) の肺転移において、+/+; ASK1<sup>FF</sup> マウスに対して Pf4-cre/+; ASK1<sup>FF</sup> マウスは有意な肺転移の減弱の表現型を呈した。よって、血小板における ASK1 の欠損が血小板機能低下を引き起こし、その結果肺転移を減弱させることが示唆された。

## 4. 血管内皮細胞における ASK1 の欠損もがんの肺転移を減弱させる

B16F10-luc-G5 細胞の肺転移は Pf4-cre/+; ASK1<sup>FF</sup> マウスで減弱した一方で、3LL-Luc2 細胞の肺転移は Pf4-cre/+; ASK1<sup>FF</sup> マウスで有意には低下せず、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。私はここで 1.の結果から、donor 骨髄に由来する細胞以外の細胞種 (recipient の細胞) における ASK1 の役割に注目した。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。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。またがん細胞ががん転移の血管外遊出の際に、血管内皮細胞のアポトーシスを誘導するという報告もあり、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に注目し、血管内皮細胞特異的に ASK1 を欠損するマウス (Cdh5-cre/+; ASK1<sup>FF</sup> マウス) を作出して、肺転移の表現型を解析した。すると Cdh5-cre/+; ASK1<sup>FF</sup> マウスでは 3LL-Luc2 細胞、B16-F10-luc-G5 細胞の双方の肺転移が減弱した。よって血管内皮細胞における ASK1 の欠損も、血小板とは異なる何らかのメカニズムを介して肺転移を減弱させると考えられる。

#### 【まとめと考察】

本研究において私は、血小板及び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を明らかにした。血小板の機能低下により、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。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について、がん転移時の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。これらの解析を通して、ASK1 の阻害ががん転移の新規治療戦略となり得るかを検討したいと考えている。

#### 【参考文献】

[1] Iriyama et al., EMBO J. 2009; 28 (7): 843-853