

学位論文

癌抑制遺伝子 APC とグアニンヌクレオチド交換

因子 Asef の大腸癌発症における役割

(Role of the tumor suppressor APC and the guanine-
nucleotide exchange factor Asef in colorectal
tumorigenesis)

平成 23 年 12 月 博士（理学）申請

生物化学専攻

古川 史織

Abstract

Mutations in the tumor suppressor adenomatous polyposis coli (APC) are responsible for sporadic and familial colorectal cancer. APC induces the degradation of β -catenin and negatively regulates Wnt signaling. However, truncated mutant APCs identified in colorectal tumors are defective in this activity. As a result, β -catenin is accumulated in the nucleus and Wnt signaling is constitutively activated in colorectal tumor cells. Although this mechanism is widely accepted as a main cause of the colorectal tumorigenesis, most mutations in colorectal cancer cells occur in APC and only a small percent of mutations occur in β -catenin. It is therefore possible that inactivation of the additional APC functions might also be important for colorectal tumorigenesis.

Asef is a guanine-nucleotide exchange factor (GEF) specific for Rac1 and Cdc42. APC binds via its armadillo repeat domain to the NH₂-terminal region of Asef and enhances GEF activity of Asef, thereby regulating cell morphology, adhesion and migration. In colorectal cancer cells, mutant APCs aberrantly activate Asef and induce c-Jun amino-terminal kinase (JNK)-mediated transactivation of matrix metalloproteinase (MMP) 9, which is required for tumor invasion. APC also activates Asef2, which has significant structural and functional similarities to Asef. Asef functions downstream of FGF2, VEGF and HGF, and plays a critical role in physiological and tumor angiogenesis. Furthermore, Asef expression is aberrantly enhanced in most human colorectal tumors. Consistent with these findings, we have recently shown that Asef and Asef2 are required for adenoma formation in *Apc*^{Min/+} mice.

Previous studies in our laboratory revealed that activated Asef-induced changes in morphological and migratory properties are similar to those induced by some growth factors.

These findings have encouraged us to examine the possibility that Asef could function as a down-stream component of signal transduction pathways linking growth factors to morphological changes and cell migration. I show here that Asef is required for FGF2- and VEGF-induced endothelial cell migration and microvessel formation. Furthermore, I demonstrate that the growth as well as vascularity of subcutaneously implanted tumors are markedly impaired in Asef-deficient mice compared with wild-type mice. Thus, Asef plays a critical role in angiogenesis and may be a promising target for cancer chemotherapy.

I also show that Asef is overexpressed in colorectal tumors and is required for colorectal tumorigenesis. I attempted to clarify the mechanism underlying aberrant Asef upregulation. I found that the Notch3/CSL pathway up-regulates Asef expression by activating the Asef promoter in colorectal tumor cells. Furthermore, I demonstrate that microRNA-1 (miR-1) is downregulated in human colorectal tumor samples, resulting in the up-regulation of the Notch3-Asef pathway. Thus, the miR-1-Notch3-Asef pathway may be important for tumor cell migration. Moreover, I show that the Notch ligand DLL4 expressed on vascular endothelial cells enhances the Notch3-Asef pathway in colorectal tumor cells. These results suggest that the miR-1-NOTCH3-Asef pathway is important for colorectal tumor cell migration and may be a promising molecular target for the treatment of colorectal tumors.

目次

Abstract1
目次3
第一章：序論	
1. 大腸癌の発症機構5
2. 癌抑制遺伝 APC5
3. APC たんぱく質の構造とその結合たんぱく質6
4. APC の Wnt シグナル伝達経路における機能7
5. グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) Asef/Asef28
6. Asef/Asef2 と腫瘍形成能8
7. APC による細胞骨格系の制御9
8. Rho ファミリーたんぱく質9
9. Asef の機能	...10
10.増殖因子と Asef	...11
11.塩基性繊維芽細胞増殖因子と血管内皮増殖因子	...11
12.Asef の発現亢進とその重要性	...12
13.Asef のアイソフォーム	...13
14.Notch 受容体とシグナル伝達	...13
15.Notch と癌	...14
16.microRNA	...15
17.miRNA-1 (miR-1)	...17
第二章：材料と方法	...18
第三章：結果	
1. Asef 正常マウスと Asef ノックアウトマウスの血管内皮細胞の挙動	...26
2. bFGF/VEGF 依存的な APC と Asef の機能	...27
3. 微小血管形成における Asef の機能	...28
4. 腫瘍組織への血管新生における Asef の役割	...29
5. 腫瘍関マクロファージと血管新生	...29
6. 小まとめ:Asefは増殖因子の下流で血管新生を促進する	...30
7. Asef の発現制御を行う転写因子の探索	...31
8. Notch3 シグナルによる Asef プロモーターの活性化	...33

9. miR-1 による Notch3 の発現制御	...34
10. 大腸癌の運動を制御している miR-1-Notch3-Asef 経路	...36
11. 癌細胞と微小環境のクロストーク	...37
12. 小まとめ：大腸癌における異常な miR-1 の発現減少や微小環境とのクロストークによる Notch3-Asef 経路の活性化が癌細胞の運動能に多大な影響を及ぼす	...39
第四章：考察	
1. 大腸癌における Asef の血管新生制構	...43
2. 大腸癌における Asef 発現亢進メカニズム	...44
謝辞	...47
参考文献	...48
図	...56

第一章：序論

1. 大腸癌の発症機構

日本人の大腸癌による死亡者数はこの 20 年で 2 倍以上に増え続けており、現在女性の癌による死亡原因の 1 位、男性では胃がん、肺がん、肝臓癌に続く第 4 位となっている。従って大腸癌に対する有効な治療法、診断法、抗癌剤等の開発は重要な課題となる。

大腸癌は癌抑制遺伝子 APC の変異によって正常な細胞がポリープ化することから始まり、次いで癌遺伝子 K-Ras の異常によりポリープが肥大、さらに癌抑制遺伝子の p53 が変異することでポリープが癌化する、といったように段階的な進展をしていくと考えられている (Fearon and Vogelstein, 1990; Fodde *et al.*, 2001; Kinzler and Vogelstein, 1996)。APC の変異は大腸癌の最も早期に観察されることから、APC の変異が大腸癌発症の初期段階に重要であると考えられている。

2. 癌抑制遺伝子 APC

APC (Adenomatous polyposis coli) 遺伝子はヒト第 5 番染色体 (5q21-22) に存在し、家族性腺腫性ポリポーシス (Familial adenomatous polyposis: FAP) の原因遺伝子として単離された癌抑制遺伝子である (Bodmer *et al.*, 1987; Fodde *et al.*, 2001; Groden *et al.*, 1991; Joslyn *et al.*, 1991; Kinzler *et al.*, 1991; Kinzler and Vogelstein, 1996; Nishino *et al.*, 1991)。FAP は大腸に数百～数千の腺腫が発生し、大腸癌に進展する常染色体優性の遺伝性疾患である (図 1A)。APC の変異は FAP 患者だけではなく、散发性の大腸癌においても高頻度で見られ、大腸癌全体の 80% を占

める。よって、一般の大腸癌の発症においても APC の変異は重要な要素であると考
えられている。散発性の大腸癌においては変異の 70%が 1309-1550 アミノ酸領域に
集中しており、この領域は *mutation cluster region (MCR)* と呼ばれている (図 1B)。
APC の場合、変異によって終止コドンが発生し、カルボキシル末端側が欠損した短
い遺伝子産物が発現することを大きな特徴としている。

3. APC タンパク質の構造とその結合タンパク質

APC は 2843 アミノ酸から成る 300kDa の巨大なタンパク質で (図 1B) 幾つかの
特徴的なドメイン構造をもっている。アミノ末端側には約 850 アミノ酸に渡ってヘ
プタッドリピートが存在し、*coiled-coil* 構造を形成すると考えられている。実際 APC
タンパク質は正常細胞中でホモダイマーとして存在することが報告されている
(*Joslyn et al., 1993*)。453-767 アミノ酸には約 45 アミノ酸の 7 回繰り返し配列で
あるアルマジロリピートドメインが存在する。アルマジロリピートドメインを介して
は *Asef, IQGAP1, KAP3, PP2AB56 subunit* 等の主に細胞骨格の制御に関わるタン
パク質との相互作用が明らかにされている。(Akiyama and Kawasaki 2006; Jimbo
et al., 2002; Kawasaki et al., 2000; Seeling et al., 1999; Watanabe et al., 2004)。
1014-1210 アミノ酸には 15 アミノ酸の 3 回繰り返し配列、その下流には 20 アミノ
酸の 7 回繰り返し配列が存在しており、この部位には Wnt シグナル伝達経路を担う
因子である β -カテニンや *Axin2/conductin/Axil* が結合し、 β -カテニンの分解を促進
することで Wnt シグナルを負に制御していることが報告されている (*Behrens et al.,*
1998; Ikeda et al., 1998; Kishida et al., 1998)。カルボキシル末端側には塩基性のア
ミノ酸に富んだ領域が存在し、微小管との結合を担っている (*Munematsu et al.,*
1994; Smith et al., 1994)。カルボキシル末端の 284 アミノ酸では微小管の + 端と結

合するタンパク質である EB1 と結合し、微小管の重合を促進する (Su *et al.*, 1995; Askham *et al.*, 1997)。また更にカルボキシル末端には TXV モチーフが存在し、*Drosophila* の癌抑制遺伝子 Dlg のヒトホモログと結合し、細胞の極性や運動に関与することが知られている (Matsumine *et al.*, 1996; Iizuka-Kogo *et al.*, 2005)。

4. APC の Wnt シグナル伝達経路における機能

APC の機能として最もよく研究されているのは Wnt シグナル伝達経路における役割である。Wnt シグナル伝達経路は、個体の発生や細胞の分化、増殖において重要な役割を果たしている。APC は Wnt シグナル伝達経路の因子である β -カテニン、Axin、GSK-3 β と複合体を形成することによって β -カテニンのリン酸化を介したプロテアソーム系による分解を促進することで Wnt シグナルを負に制御している (図 2) (Behrens *et al.*, 1998; Bienz and Clevers, 2000; Cadigan and Nusse, 1997; Hart *et al.*, 1998; Ikeda *et al.*, 1998; Polakis, 2000; Su *et al.*, 1993)。多くの大腸癌細胞で発現しているカルボキシル末端を欠損している変異 APC は β -カテニンの結合部位の大半と Axin 結合部位を欠いており、 β -カテニンの分解を誘導できなくなっている。その結果、APC の変異は Wnt シグナル伝達経路の恒常的な活性化を引き起こす (Fodde *et al.*, 2001; Korinek *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1997)。また、APC 遺伝子に変異のない症例の一部では、 β -カテニンのアミノ末端領域にある GSK-3 β によってリン酸化されるアミノ酸に変異が起こっており、 β -カテニンの安定化が起きている。このような APC もしくは β -カテニンの変異を原因とした Wnt 経路の活性化が細胞の癌化の一因となっていると考えられる。しかし、APC の変異が大腸癌の 80% 以上で見られるのに対し、 β -カテニンの変異は数%程度の大腸癌でしか見られず、大腸癌における APC の変異と β -カテニンの変異の意味合いは同じではないと考えら

れる。従って、APC の癌抑制遺伝子としての機能には Wnt シグナル伝達経路における役割以外にも癌化に関わる重要な機能があると考えられる。

5. グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) Asef/Asef2

当研究室では、APC のアルマジロリピートドメインをベイトとする Yeast two-hybrid screening により APC 結合新規タンパク質として Asef をまた、Asef と 60% の相同性を持つ新規の GEF、Asef2 を同定している (Kawasaki *et al.*, 2000)。Asef/Asef2 は APC との結合部位である ABR(APC binding region)、プロリンリッチなペプチドと結合する SH3 ドメイン、Dbl ファミリーで保存されており GEF 活性を担うと考えられている DH ドメイン、脂質やタンパク質との相互作用に重要な役割を果たしていると考えられている PH ドメインを持っている(図 3A)。

多くの GEF においては分子内結合によって自身の GEF 活性を負に制御していることが知られている。結晶構造解析の結果、Asef の N 末端領域に存在する SH3 ドメインと DH ドメインは分子内結合をしており、Asef 単体では SH3 ドメインによって DH ドメインがマスクされる事により自身の GEF 活性が抑えられていることが示されている。Asef/Asef2 は Rho ファミリーの中でも Rac1 や Cdc42 特異的な GEF として機能し、APC が N 末端領域に結合することで N 末端領域による負の制御が解除され GEF 活性が発揮される(図 3B) (Mitin *et al.*, 2007; Murayama *et al.*, 2007)。

6. Asef/Asef2 と腫瘍形成能

Asef または Asef2 もしくは双方のノックアウトマウスは正常に発生、発育する。しかし、ヒト大腸癌モデルマウスであり、腸管に多くのポリープを発症する APC へ

テロ欠損マウスである APC^{Min/+}マウスと Asef/Asef2 シングルまたはダブルノックアウトマウスを掛け合わせると、これらのマウスでは APC^{Min/+}マウスの腸管と比較して、顕著にポリープの数や大きさが減少する (Kawasaki *et al.*, 2009)。

7. APC による細胞骨格系の制御

APC は様々なタンパク質と結合することで、細胞骨格系の制御に関与していることが明らかになっている (Akiyama and Kawasaki, 2006)。APC はアダプタータンパク質である KAP3 との結合を介してモータータンパク質 Kinesin super family (KIF) 3A/3B と結合し、微小管のマイナス端からプラス端へ移動することで、運動している細胞の先端端に濃縮していることが知られている (Jimbo *et al.*, 2002; Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000)。また APC はアルマジロリピートドメインを介して IQGAP1 と結合し、相互依存的に細胞の leading edge に局在する (Watanabe *et al.*, 2004)。APC-IQGAP1 複合体はアクチン細胞骨格系と微小管との相互作用に必要であり、細胞の極性や運動に重要な働きをしていると考えられている。さらに、APC はアルマジロリピートドメインを介してグアニンヌクレオチド交換因子である Asef と結合し、低分子量 G タンパク質の制御を介してアクチン細胞骨格系の再構築に関与していると考えられている (Kawasaki *et al.*, 2000)。

8. Rho ファミリータンパク質

Rho ファミリータンパク質を含む低分子量 G タンパク質は一般的に GDP と結合している時は不活性型であり、GTP と結合している時に活性型となり下流のエフェクター分子に結合してシグナルを伝えることができる。GDP を取り除き細胞内に存

在する GTP との置換を促進するのがグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) であり、逆に低分子量 G タンパク質自身の GTPase 活性を促進し、GTP 加水分解反応により GDP 結合型への変換を引き起こすのが GAP (GTPase activating protein) である。低分子量 G タンパク質はそれぞれ特異的な GEF と GAP によってその活性が制御されていると考えられているが、Asef が属する DH ドメインを持った Dbl ファミリーの GEF は、Rho ファミリータンパク質特異的 GEF として働くと考えられ、ヒトでは 69 種類存在することが知られている (Rossman *et al.*, 2005)

Rho ファミリーは 22 種類知られており、細胞の形態、運動性や癌細胞の転移・浸潤性能を制御することが知られている。また、Rho ファミリーの中では特に Rac1、Cdc42、RhoA についての解析が進んでいる (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Hall, 1998)。これらの恒常的活性化型変異体を細胞に強制発現させると特徴的な構造体を形成することが知られている (Nobes and Hall, 1995)。一般的には Rac がラメリポディア (葉状仮足) の形成を、Cdc42 がフィロポディア (糸状仮足) の形成を、Rho がストレスファイバーの形成を促進するとされているが、実際その役割は細胞の種類や環境によっても変化する。

9. Asef の機能

Asef は MDCK 細胞に強制発現すると、Rac1 や Cdc42 の活性化を制御する事でアクチン骨格系の再構築に関与し、ラメリポディアを誘導する (Kawasaki *et al.*, 2000)。また、APC に変異のある大腸癌細胞株 SW480 細胞や WiDr 細胞もしくは APC に変異の無い大腸癌細胞株 HCT116 細胞や LS180 細胞において APC や Asef の発現をそれぞれに対する shRNA を用いて抑制すると、APC に変異のある大腸癌細胞株においてのみ運動能の顕著な低下が見られた (Kawasaki *et al.*, 2003)。このことから Asef は APC が変異した大腸癌細胞株の運動において特に重要であるのと共に、変異

型の APC が全長の APC よりも顕著に Asef を活性化することによって大腸癌細胞の異常な運動能の亢進を引き起こしていると考えられる。

10. 増殖因子と Asef

上記した HGF はその受容体である Met を活性化し、Gab1 や Gab2、PI3-kinase などの因子を介して下流にシグナルを伝えることで、細胞の増殖や運動に関与していると考えられている。また、HGF は癌細胞の浸潤能や転移能を促進することで癌の増殖や悪性化にも関与していることが報告されている。さらに多くの癌では HGF などの受容体が過剰発現していることや、変異を起こしているという報告もある (Di Renzo *et al.*, 1995)。

HGF による APC と Asef の細胞の先端端への局在や、運動能の亢進は PI3-kinase の阻害剤を用いることで抑制されることから、HGF による APC と Asef に対する影響は PI3-kinase を介したものであると考えられる。PI3-kinase や phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PIP2)、phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) と結合することで多くのタンパク質の膜局在を仲介している PH ドメインは Asef において PIP3 と結合することが示されていたが、HGF による細胞運動の調節においてもこのドメインが重要であることも示されている。

11. 塩基性線維芽細胞増殖因子と血管内皮増殖因子

線維芽細胞増殖因子 Fibroblast growth factors (FGF) は細胞の増殖や生存、運動や発生時や生体内における分化において重要な役割を果たしている。FGF は塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) と酸性線維芽細胞増殖因子 (aFGF) など計 20 種類以

上のファミリーから成る (Bikfalvi et al., 1997)。また、腫瘍組織においては、血管新生因子として最も早く同定された bFGF が血管新生を誘導し、腫瘍組織の拡大に関与していることが報告されている。

血管内皮増殖因子 vascular endothelial growth factors (VEGF) は、VEGF-A～VEGF-E までのファミリーがあり、これらはレセプターである VEGF-R1,2,3 のどれかに結合してシグナルを伝える。VEGF は低酸素状態など細胞に対する様々な刺激によって繊維芽細胞から産生され、微小血管と大血管の内皮細胞の強力な増殖因子であり、血管新生を促進する (Tisher et al., 1991; Levy et al., 1995; Liu et al., 1995)。しかし、血管内皮細胞以外には影響を及ぼさないことも報告されている (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Senger et al., 1993)。

癌組織において血管新生は癌細胞の増殖を加速させるだけでなく、浸潤・転移の経路ともなる重要な現象である。増殖因子 HGF の下流で Asef が機能しているという先行研究から、このような血管新生に関わる増殖因子 bFGF や VEGF の下流においても Asef が働いている可能性があるのではないかと考えられ、本研究において、Asef の血管新生における機能が存在するのか明らかにすることを目的とした。

12. Asef の発現亢進とその重要性

APCの異常を介したadenoma形成におけるAsef/Asef2の重要性を明らかにするために、APC^{Min/+}マウス (APCに胚性変異があり腸管に多数の腺腫を発症するヒト大腸癌のモデルマウス) とAsef^{-/-}マウスおよびAsef2^{-/-}マウスを交配したところ、発生するポリープの数や大きさがAsefやAsef2の欠損によって激減することを見出した。また、Asef、Asef2双方を欠失したマウスにはほとんど腺腫ができなかった。したがって、変異型APCによるAsefの活性化は腺腫発症に重要な役割を果たしていると考えられた。また、ヒト大腸がんでは約80%の症例でAsef/Asef2の発現が亢進してい

ることを見出した。これらの結果からAsef/Asef2の発現亢進は癌の発症に深く関わっていると考えられるが、大腸癌細胞におけるAsefの発現亢進のメカニズムは長いこと不明なままであった。そこで、本研究では大腸癌発生の初期に働く因子を捉えるために、Asefの上流で働く因子を同定し、大腸癌変異機構の全体像を解明することを目指した。

13. Asefのアイソフォーム

Genbankのデータを参照した結果、Asefのアイソフォームは4つ報告されている。そこで、それらを区別し、Asef-a (AB042199)、Asef-b (AF249745)、Asef-c (AB384116)、Asef-d (DQ424905) とした (図12 A)。Real-timeRT-PCRによる発現量の比較の結果、大腸癌細胞においてはAsef-bの発現量が高いことが示された。

14. Notch受容体とシグナル伝達

Notch経路は進化的に高度に保存されたシグナル伝達経路であり、胚発生から成体における細胞の増殖や分化にといた運命決定に重要な役割を果たしている (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Baron, 2003)。Notchは巨大な一回膜貫通型受容体であり哺乳類ではNotch1-4が報告されている (図10)。また、リガンドとしては同じく一回膜貫通型であるJagged (Jag) -1、2 とDelta-like (DLL) 1、3、4の5つが知られている。細胞-細胞間の相互作用によってNotchとリガンドが結合すると、Notchの立体構造に変化が起こることによって、複数のプロテアーゼがアクセスできるようになり、最終的にNotchの細胞内ドメイン (Notch Intracellular

Domain: NICD) が切り離され、核に移行する (Weinmaster, 2000; Chan and Jan, 1998)。核においてはNICDは転写因子CSL (RBP-J κ またはCBF1とも呼ばれる) と結合する。CSLはNotchのターゲット遺伝子のプロモーター上にコリプレッサーと複合体をつくり、遺伝子発現を負に制御しているがNICDがCSLに結合するとコリプレッサーが放出され、代わりにコアクティベーターが呼び込まれる事で遺伝子発現が誘導されるようになる。Notchのターゲット遺伝子としてHes1、HEY1、HEY2などが有名である (Jarriault *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 2000; Maier and Gessler, 2000)。また、マウスの小腸において、腸上皮幹細胞の存在している粘膜上皮の窪み状のクリプト (陰窩) 部分にNotchのターゲット遺伝子がいくつも発現していることや、前駆細胞の未分化性を保つために必要であることなどが報告されている (Schroder and Gossler, 2002; Sander and Powell, 2004, Fre *et al.*, 2005)。

15. Notchと癌

染色体転座によるNotchシグナルの恒常的な活性化は細胞癌化の原因になっていることが白血病において初めて報告された (Ellisen *et al.*, 1991; Pear *et al.*, 1996)。その後、固形癌においても癌の発症とNotchシグナルの関連性が次々と報告されてきているが染色体転座を原因とするNotch経路の活性化は報告されていない。また、近年は、腫瘍を形成する能力があると考えられるようになってお (癌幹細胞仮説) Notch経路の活性化による未分化性の維持は癌発症に深く関わっていることが明らかにされている。APC^{Min/+}マウスの小腸に形成された腫瘍ではHes1の発現が顕著に上がっており、未分化性と増殖能が保たれているということも報告されている (van Es *et al.*, 2005)。リガンドの結合によってNotchの細胞内領域を切り

出すプロテアーゼのうちの1つ、 γ -セクレターゼは阻害剤 (gamma secretase inhibitor: GSI, DAPT, DBZ) が開発されており、これをAPC^{Min/+}マウスに投与した場合、腸管に発生した腺腫の増殖が抑えられ、分化した細胞へと誘導されることが明らかにされている (van Es *et al.*, 2005; Akiyoshi *et al.*, 2008)。

一方、Notchシグナルは癌細胞の未分化性の維持だけではなく、アポトーシスの制御や細胞運動、さらには血管新生にも関わっていることが報告されている (Konishi *et al.*, 2010; Sahlgren *et al.*, 2008; Iso *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2005)。

16. microRNA

microRNAs (miRNAs) は20-22ヌクレオチド (nt) のsmall non-coding RNAである。最初のmiRNA lin-4 が線虫で見つかり (Lee *et al.*, 1993;)、現在までに1000種類以上ものmiRNAが動植物において同定されている (Baek *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2005)。現在では、ヒトの遺伝子の約1/3がmiRNAによる制御を受けていると予測されており、miRNAは生命現象の様々な局面において、重要な役割を果たしていると考えられている。

miRNAはターゲット遺伝子のmRNAの3'-untranslated region (UTR) に特異的に結合し、mRNAの不安定化と翻訳阻害もしくはそのどちらかの作用によって、遺伝子の発現を抑制する (Filipowicz *et al.*, 2008)。哺乳類のmiRNAのほとんどはRNA polymerase II (pol II) によってprimary miRNA (pri-miRNA) となり、一つまたはそれ以上のstem loopを持ったヘアピン構造をとる (図11)。またmRNAと同じようにpri-miRNAは5'-cap、スプライシング、ポリアデニル化を受ける

(Carthew and Sontheimer, 2009; Kim *et al.*, 2009)。転写されたpri-miRNAはMicroprocessorと呼ばれる主にDroshaやRNAase III 酵素、二本鎖RNA結合ドメイ

ンタンパク質DGCR8/Pashaからなる複合体によってprecursor miRNA (pre-miRNA、70 nt ほどのヘアピン構造) へと消化される。Microprocessor による切断によってmiRNAは2 ntオーバーハングした状態になり、これによってExportin 5 (XPO5) に認識されるようになる。XPO5はRan-GTP依存的にpre-miRNAを核から細胞質へ輸送する機能を持つ (Kim *et al.*, 2009; Okada *et al.*, 2009)。細胞質に輸送されたpre-miRNAは再び切断され22 ntほどのmiRNAになり、DicerやRNAase III enzyme、二本鎖RNA結合ドメインタンパク質TRBP/PACTと複合体を作る (Chendrimada *et al.*, 2005; Hasse *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006) (図11)。

miRNAは発生や分化、細胞増殖、アポトーシス、代謝などの生命現象に幅広く関与していることが分かっている (Bushati and Cohen, 2007)。よって、組織や細胞内におけるmiRNAの量を適切に保つことが多様な生理的機構の制御に重要であると考えられている。よって、成熟miRNAができるまでには、転写と転写後調節で段階的に厳重な制御がなされている。しかし、多くの癌細胞において、これらの調節機構が崩れ、miRNAの発現の異常が生じていることが報告されている。このようなmiRNAは腫瘍形成に重要なタンパク質をターゲットとしていることが多く、例えば癌遺伝子Rasはlet-7 ファミリーによって、慢性リンパ性白血病では抗アポトーシス遺伝子のBcl-2がmiR-15a-miR-16-1によって、E2F1遺伝子はmiR-17-92クラスターによって制御されていることが明らかにされているが、これらのmiRNAの発現減少がいくつもの癌において報告されている (Johnson *et al.*, 2005; Cimmino *et al.*, 2005; O'Donnell *et al.*, 2005; Saito, 2006)。

miRNAの増幅や過剰発現による癌化の例も報告はされているが、面白いことに、癌細胞においては正常と比べて発現が減少していることの方が圧倒的に多い (Lu *et al.*, 2005; Calin and Croce, 2006; Gaur *et al.*, 2007)。近年、miRNAの癌における発現減少の原因として、miRNAの転写後調節の異常 (Thomson *et al.*, 2006)、

miRNAプロモーター上のCpG islandの高度メチル化 (Saito *et al.*,2006; Lujambio *et al.*, 2007) 癌遺伝子による転写抑制 (Chang *et al.*, 2008) 、 TARBP2、 XPO5、 DICER1などのmiRNAの成熟に関わる因子の発現減少 (Melo *et al.*, 2009 and 2010; Kumar *et al.*, 2007, 2009; Lambertz *et al.*, 2010) などが報告されている。

17.miRNA-1 (miR-1)

miR-1は筋細胞特異的に発現するmiRNAとして知られており、平滑筋や骨格筋の発生や分化に関わっていることが現在までに報告されている。ショウジョウバエにおいてmiR-1の発現を抑制すると、筋肉の分化が抑制されることが報告されている。また、肺癌細胞と頭頸部扁平上皮癌細胞においては、発現の減少が報告されており、miR-1の発現減少が癌細胞のアポトーシスの抑制や運動の亢進をしていることから、癌抑制的miRNAとしての報告がされている (Nasser *et al.*, 2008; Nohata *et al.*, 2011)。

第二章：材料と方法

細胞培養

HAEC と MAEC は bFGF、epidermal growth factor (EGF)、VEGF、IGF1 と 2% fetal bovine serum (FBS) を加えた EGM-2 培地 (Cambrex) で培養した。B16-F10 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium に 10% fetal calf serum (FCS) とブドウ糖 (4.5g/liter) を加えた培地で培養した。DLD-1 細胞は 10% FBS を含む RPMI164 培養液で、CaCo2 細胞は 10% FCS を含む Dulbecco's modified Eagle's medium 培養液で、WiDr 細胞は 10% FBS を含む Ham's F12 培養液、HUVEC は増殖因子と 2% FCS を含む EBM-2 (Ronza) 培養液にて培養した。培養環境はすべて 37°C、CO₂ 5%にておこなった。

発現ベクターと抗体

Hemagglutinin (HA) タグ付きの Asef 発現ベクターは以前に当研究室によって作製されていたものを使用した (Kawasaki *et al.*, 2000)。Myc タグ付き APC 発現ベクターは pCS2 に挿入した。

マウスモノクローナル抗体 APC は、APC の 119-250 アミノ酸をを抗原として以前に作製されたものを使用した (Kawasaki *et al.*, 2003)。ラビットポリクローナル抗体 Asef は N 末端の 1-113 アミノ酸を抗原としたもの、または C 末端の 485-605 アミノ酸を抗原として作製したものを使用した。抗 Myc 抗体 (9E10)、抗 Cdc42 抗体、抗 Ki67 抗体と抗 VEGF 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社から、抗 Rac1 抗体は BD Transduction Laboratories 社から、抗 F4/80 抗体は Serotec 社から、抗 α -tubulin 抗体は and Oncogene Research 社から、抗 CD31 抗体は Pharmingen 社から、抗 HA 抗体 (3F10) は Roche 社からそれぞれ購入した。

siRNA による遺伝子発現抑制

Asef と APC に対する Stelth small interfering RNA (siRNA) は Invitrogen から購入した。これらの siRNA がヒト Asef または APC の cDNA のターゲットしている配列は以下の通りである。

Asef, 5'- CAAGGATGTTGAAGCCGCCTTGCA -3'

APC-1, 5'- TCGTCTGATTCAGATTCCATCCTTT -3'

APC-2, 5'- CCCACCTAATCTCAGTCCCACCTATA -3'

HAEC には $1 \mu\text{M}$ の siRNA を Lipofectamine 2000 (Roche 社から購入) を用いてトランスフェクションした。siRNA をトランスフェクションしてから 24 時間後に培養液を交換し、48 時間遺伝子の発現抑制を行い、細胞の運動アッセイやチューブ形成アッセイに用いた。

ウェスタンブロット法

SDS-polyacrylamide gel で電気泳動を行った後、Immobilon Membrane (Millipore) に転写し、ブロッキングした後、TBS (20mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 0.1%) で希釈した 1 次抗体溶液を用いて 4°C で 1 時間から一晩反応させた。その後、TBS-T (20mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween20) で 3 回洗浄し、さらに TBS で希釈した 2 次抗体溶液 (anti-mouse/rabbit/goat IgG AP conjugate-Promega) を室温で 1 時間反応させた。TBS-T で 3 回洗浄し、NBT/BCIP (Gibco BRL) を用いて発色反応を行った。

免疫沈降法

細胞を RIPA バッファーに溶解し、20 分間氷上に静置し、1,500 rpm で 15 分間遠心した後、上清を回収した。この上清に抗体を加え、 4°C で 1 時間攪拌した。その後、

Protein A sepharose CL-B4 (GE Healthcare bio-science) を加え 4°C で 1 時間攪拌した。Wash buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 0.5% NP-40) で 3 回洗浄し、さらに 1 回純水で洗浄後、SDS sample buffer を加えて 5 分間ボイル、SDS-PAGE、ウェスタンブロット法によって、検出に必要な抗体を用いて解析を行った。

蛍光免疫染色

目的の発現ベクターをトランスフェクションした細胞を 24 時間後に PBS で洗浄し、10%ホルマリンで 5 分-1 時間室温にて固定した。PBS で 1 回洗浄し、0.2% TritonX-100/TBS を加えて 5 分間室温で静置して細胞を浸透処理した。PBS で 1 回洗浄し、ブロッキング液 (1% BSA, 3% FBS, 0.2% TritonX-100 /TBS) で希釈した 1 次抗体を加え、1 時間室温で静置した。PBS で 3 回洗浄し、2 次抗体 (Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG) 希釈溶液を加えて、1 時間室温で静置した。その後、PBS で 3 回洗浄し、VECTORSHIELD Mounting Medium を用いて細胞をスライドガラスにマウントし、共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss LSM 510) にて観察、撮影を行った。

MAEC の単離

マウスの動脈血管内皮細胞は Asef^{+/+} マウスと当研究室で既に作出されていた Asef^{-/-} マウスから単離し、EGF、VEGF、IGF1 と 2% fetal bovine serum (FBS) を加えた EGM-2 培地 (Cambrex) で培養した。また、継代時には、血管内皮細胞の初代培養の系に習い、Dil-Ac-LDL の取り込みによって、血管内皮細胞の評価を行った。

運動アッセイ

細胞の運動アッセイは Transwell migration chambers (Costar) を用いて行った。

Chamber の底面に設置されているフィルターの上下、両面を $10 \mu\text{g/ml}$ の Collagen Type I (Koken) で一晩コートした。HAEC 1.6×10^4 細胞/well、または、MAEC 2.0×10^4 細胞/well フィルターの上部に撒き、3.5-4.5 時間運動させた。このとき、必要に応じて、下受けの chamber 内に bFGF (25 ng/ml)、VEGF (10 ng/ml) または 0.5%BSA を加えた。細胞の運動は、フィルターの下面に移動してきた細胞の数測定することで比較した。

In Vitro 血管内皮細胞チューブ形成アッセイ

24 well culture plate の各 well にマトリゲル $200 \mu\text{l}$ を加え、ゲルを形成させるために 37°C にて 1 時間以上置いた。トリプシンによって MAEC 細胞を回収し、血清を含まない EGM-2 に再懸濁し 5×10^4 細胞/well の割合でマトリゲル層の上に加え、その後 2% FBS と $12 \mu\text{g/ml}$ の bFGF または $12 \mu\text{g/ml}$ の VEGF を加えて 24 時間培養した。MAEC のチューブ形成像の撮影や測定は位相差顕微鏡によって行った。また、測定は 100 倍の視野でのチューブの数や長さや枝分かれの数によって行った。

GTPase activation アッセイ

MAEC と HAEC は一晩、血清飢餓処理を行い bFGF (25 ng/ml) または VEGF (25 ng/ml) で 2 時間処理し、lysis buffer (2% IGEPAL, 50 mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgCl_2 , 0.3M NaCl) に溶解した。氷上に 20 分静置した後、遠心によって上清を回収した。この細胞の可溶化液中の活性型 GTP 結合 GTPase を検出するために、リコンビナントの GAT-PAK-CRIB が結合した glutathione-sepharose beads を加え、30 分間混合した。その後、beads を wash buffer (25mM Tris-HCl pH7.5, 30mM MgCl_2 , 40mM NaCl) で 2 回洗浄し、SDS-PAGE とウェスタンブロット法によって解析した。

大動脈輪アッセイ

Asef^{+/+}マウスと Asef^{-/-}マウスから胸部大動脈を摘出し、血管周囲の脂質やその他の組織を外科的に取り除いた後、長さ 1mm 程度に切断した。これらをマトリゲルでコートした culture plate の well に置き、さらにその上からマトリゲルで覆った。その上から EGF、VEGF、IGF1 と 2% fetal bovine serum (FBS) を加えた EGM-2 培地を加え、8 日間培養した。伸長してきた微小血管は位相差顕微鏡で観察し、血管新生の度合いは各動脈から伸長された血管の数を数えて比較した。

In Vivo 血管新生アッセイ

400 ng/ml bFGF と 50 mg/ml heparin を含ませたマトリゲル (BD Biosciences) 500 μ l を 8 週齢マウスの腹部付近の皮下へ注射した。5 日後にマトリゲルを取り出し、H&E 染色と抗 CD31 抗体による免疫染色によって新生されてきた血管に関して解析した。マトリゲル内に浸潤してきた血管量比は CD31 による蛍光免疫染色の結果を ImageJ software を用いて計測・比較した。

腫瘍形成能アッセイ

マウス B16-F10 細胞の造腫瘍能は Asef^{+/+}マウスと Asef^{-/-}マウスそれぞれに 1×10^6 細胞ずつ皮下注射し、測定した。腫瘍細胞を移植した後、いくつかの時点で腫瘍の大きさをノギスにて測定した。腫瘍の体積は次の公式によって算出した $V = \pi/6 \times [L \times W^2]$ (V: 体積、L: 長さ、W: 幅 /長さは幅より長いとする)。

腹腔内のマクロファージの単離

マクロファージはマウスの腹腔内の浸出液から単離した。マクロファージを単離するに当たり、マウスに炎症を惹起させるため 4% Brewer-Thioglycollate を 3ml 注射

し、4日後に腹腔内浸出液を回収、10% FBS を含む RPMI1640 培養液中にて培養した。マクロファージは~1.5 時間でシャーレに接着するため、その時点で接着していないマクロファージ以外の細胞を洗い流し、マクロファージを単離した。

ヒト大腸癌検体

ヒト大腸癌とその周辺部の正常組織は informed consent によって合意を得た患者から、東京大学医学部腫瘍外科が得たものを提供してもらった。組織は *RNAlater* 溶液 (Ambion) 中に保存されていた状態から、*mirVana miRNA Isolation Kit* (Ambion) を用いて RNA を単離した。これらのサンプルから mRNA レベルでの遺伝子の発現解析を行うために *PrimerScript RT reagent Kit* (TaKaRa) を用いて、また、miRNA の発現解析を行うために *mir-X mRNA First-Strand Synthesis Kit* (clontech) を用いて cDNA を合成した。

プラスミドコンストラクションと Luciferase assay

Hemagglutinin (HA) タグ付きの Asef 発現ベクターは以前に当研究室によって作製されていたものを使用した (Kawasaki *et al.*, 2000)。Notch3 Intracellular Domain (N3ICD) は hemagglutinin (HA) タグ付きの pcDNA3.1 ベクターへ *EcoRI* サイトと *SaI* サイトを利用して組み込んだ。Notch3 の cDNA は筑波大学の千葉滋教授から供与されたものを使用。Asef のプロモーター領域は各領域とも BAC clone RP11-135O12 (Invitrogen) から増幅し、pGL3 Basic ベクターに組み込んだ。Luciferase assay を行うに当たり、これらの Asef プロモーターを組み込んだベクター 500 μ g とインターナルコントロール用に pRL-SV ベクターを 50 μ g 細胞へトランスフェクションした。Luciferase 活性は Dual-luciferase reporter assay kit (Promega) を用い、ルミノメーター (Mithoras LB 940, BERTHOLD) で測定した。

Notch3 3'UTR reporter assay のために DLD-1 細胞の cDNA を用いて Notch3 3'UTR 領域を PCR にて増幅した。この PCR 産物を pRL-TK ベクターの *Xba*I サイトと *Not*I サイトを利用して Renilla Luciferase の下流に組み込んだ。miRNA からの影響を確かめるため、この pRL-TK レポーターベクターと合成 miRNA (Pre-miRs, Ambion)、そしてインターナルコントロールに pGL3-Basic を同時にトランスフェクションした。トランスフェクションには Lipofectamin LTX (Invitrogen) を使用した。

siRNA による遺伝子発現抑制とウェスタンブロット法

第二章と同様に行った。新たに使用した抗体は以下の通りである。

Notch3 (sc-5593, 1:1000; Santa Cruz), CSL (sc-28713, 1:500; Santa Cruz), Asef (NB100-1316, 1:500; NOVUS BIOLOGICALS), HA-tag (3F10, 1:1000; Roche), tubulin (DM1A, 1:500; Calbiochem)

Real-Time PCR

RNA は TRIsure (BIOLINE) を用いて各細胞から抽出し、1 μ g の RNA から PrimerScript RT reagent Kit (TaKaRa) を用いて cDNA を合成した。Real-Time PCR は Light Cycler 480 System (Roche) を利用し、各サンプルとも duplicate で行った。全ての mRNA の定量は GAPDH または Actin によって規準化した。

Chromatin-immunoprecipitation (ChIP) assays

ChIP assay は CSL 抗体と Rabbit IgG (CHEMICON) を用い、主に Upstate Biotechnology 社のプロトコルに沿って行った。沈降してきた DNA 断片は、Asef プ

ロモーター上に予測された CSL 結合領域周辺に対するプライマーを用い、Real-Time PCR によってこの領域が存在するかを検出した。また、ネガティブコントロールとして GAPDH のプロモーター領域に対するプライマー、ポジティブコントロールとして Hes1 の CSL 結合領域を含むようなプライマーを用いた。

第三章：結果

1. Asef 正常マウスと Asef ノックアウトマウスの血管内皮細胞の挙動

培養細胞に Asef を強制発現するとラメリポディアやラッフル膜を形成し、細胞の運動を誘導することが示されている。このような挙動は細胞に増殖因子を作用させた時に見られる反応と類似しており、APC/Asef は増殖因子の下流で機能している可能性が考えられた。APC/Asef 複合体の形成の促進に働くような増殖因子を探索する事は、癌の発生や増殖などの理解において重要な知見であると考え、様々な増殖因子による刺激を行い、APC/Asef の動態を解析した。その結果、ヒト大動脈内皮細胞 (HAEC) では、血管新生に必須の増殖因子 bFGF や VEGF の刺激によって、APC/Asef がラッフル膜やラメリポディアに濃縮、局在することを見出した。これらの結果から、APC/Asef は bFGF と VEGF の下流因子として機能している可能性が示唆された。次に HAEC を用いて、siRNA による APC または Asef のノックダウンによる細胞の運動能を検討した。APC または Asef のノックダウンを行った細胞とコントロールの細胞において運動アッセイを行ったところ、コントロールの HAEC に比べ APC または Asef のノックダウンを行った細胞では bFGF や VEGF による刺激を行っても優位に運動能が抑制されていた (図 4C)。ただし、siRNA による APC の発現抑制は Wnt シグナルの活性化も引き起こしていると考えられるが、HAEC へ分解を免れる安定型の β -カテニンを強制発現し、bFGF や VEGF による刺激を行っても細胞の運動能には影響がなかった事から、Wnt シグナルによる細胞の運動能への影響はないと考えられる。

HAEC の結果から Asef が血管新生において役割を果たしている可能性が示唆された。よって次に、その可能性を確かめるため、既に当研究室で作製されていた Asef

ノックアウトマウスから大動脈内皮細胞 (MAEC) を採取し、運動能やチューブ形成能の検討に使用するために培養した。最初に、野生型の *Asef* 正常マウス由来の MAEC (以降 *Asef*^{+/+} MAEC) と *Asef* ノックアウトマウス由来の MAEC (以降 *Asef*^{-/-} MAEC) を用いて抗 *Asef* 抗体による免疫染色を行ったところ、*Asef*^{+/+} MAEC では細胞質に *Asef* の発現が見られるが、*Asef*^{-/-} MAEC においては *Asef* の発現が完全に消失していることが確認できた (図 4A)。しかし、細胞の形態や増殖においては 2 つの細胞間で差は見られなかった (図 4B)。一方で、細胞の運動能においては bFGF または VEGF 存在下で *Asef*^{+/+} MAEC と *Asef*^{-/-} MAEC の間には顕著な差が現れ、*Asef*^{-/-} MAEC において大幅な運動能の低下が見られた (図 4C)。加えて、血管構造の形成に必要なチューブ形成能への影響を確かめるため、血管内皮細胞チューブ形成アッセイを行ったところ、*Asef*^{-/-} MAEC は FBS や bFGF の存在下でもほとんどチューブ構造を形成できないことが分かった (図 4D-G)。

以上の結果より、APC と *Asef* は bFGF や VEGF の下流で機能し、血管内皮細胞の運動能やチューブ形成能を制御していることが示唆された。

2. bFGF / VEGF 依存的な APC と *Asef* の機能

先にも述べたように、HAEC 細胞を bFGF や VEGF で刺激したときの APC と *Asef* の細胞内での挙動を確認したところ、刺激依存的に APC と *Asef* は細胞のラッフル膜やラメリポディアへ濃縮し、共局在することが確かめられた (図 5A)。また、HAEC へ *Asef* や APC を強制発現させ bFGF で刺激を加えた場合にも、それぞれのタンパク質がラッフル膜やラメリポディアへと濃縮された (図 5B)。このとき APC と *Asef* の相互作用も増加していることが pull-down アッセイによって示された (図 5C)。さらに、bFGF や VEGF による刺激の元で *Asef* が Rac1 や Cdc42 の活性化に

働いているかを $Asef^{+/+}$ MAEC と $Asef^{-/-}$ MAEC を用いて確かめた。 $Asef^{+/+}$ MAEC を bFGF や VEGF で刺激すると明らかに GTP 結合型 Rac1 と Cdc42 が増加したが、 $Asef^{-/-}$ MAEC においてはそのような効果が観察されなかった (図 5D)。また HAEC で siRNA による APC の発現抑制を行うと、bFGF や VEGF 刺激による GTP 結合型 Rac1 や Cdc42 の増加が見られなかった (図 5E)。これらの結果から、 $Asef$ と APC は bFGF や VEGF の刺激依存的に複合体を形成し、Rac1 や Cdc42 の活性化を介して血管内皮細胞の運動能やチューブ形成能を促進していると考えられたお1。

3. 微小血管形成における $Asef$ の機能

次に $Asef$ の血管新生における役割を明らかにするために、大動脈輪アッセイ (aortic ring assay) を行った。 $Asef^{+/+}$ マウスと $Asef^{-/-}$ マウスから大動脈の一部を切り出し、bFGF、EGF、VEGF、IGF-1 と血清を含むマトリゲル中に封入した後、8日間経過を観察した。その結果 $Asef^{+/+}$ マウスの大動脈と比較して $Asef^{-/-}$ マウスの大動脈からは少数の毛細血管しか新生されなかった (図 6)。このことから $Asef$ が血管新生において重要な働きを担っていることが示唆された。

さらに *in vivo* での血管新生における役割を検証するために、 $Asef$ KO マウスを用いたマトリゲルアッセイを行った。予め bFGF を含むマトリゲルを $Asef^{+/+}$ マウスと $Asef^{-/-}$ マウスの皮下に移植し、5日後に取り出した。比較対象として移植した bFGF を含まないマトリゲルと比べ、 $Asef^{+/+}$ マウスに移植した bFGF を含むマトリゲルは内部に伸長してきた多くの血管によって赤褐色に変化していた。一方、 $Asef^{-/-}$ マウスの皮下に移植されたマトリゲルは淡い褐色を示しているにすぎなかった (図 7A)。また $Asef$ 抗体による免疫染色では $Asef^{+/+}$ マウスに移植したマトリゲルに進入してきた血管は全て $Asef$ の発現が確認されたが (褐色部位)、 $Asef^{-/-}$ マウスのマトリゲルに

侵入してきた血管内皮では全く Asef の発現は確認されなかった。さらに血管内皮マーカーの CD31 抗体による免疫染色においても確認したところ、Asef^{-/-} マウスに移植したマトリゲル内の新生血管は Asef^{+/+} マウスのマトリゲルと比べ、密度が低いことを確認した (図 7C)。これらのデータを統計的に定量した結果も、Asef^{-/-} マウスに移植したマトリゲルでの血管新生の顕著な減少を認めた (図 7D)。これらの CD31 陽性血管内皮細胞において増殖マーカーである抗 ki67 抗体による染色やアポトーシスを検知するための TUNEL 染色を用いて確認したところ、Asef の有無によって血管内皮細胞の増殖や生存に変化はないことが確認された。

4. 腫瘍組織への血管新生における Asef の役割

血管新生は腫瘍の増殖や転移過程で重要な役割を果たしている。そこで、腫瘍の血管新生に Asef が与える影響を B16 メラノーマ細胞を用いて検討した。B16 メラノーマ細胞を Asef^{+/+} マウスと Asef^{-/-} マウスの皮下へ移植し、経過観察したところ、Asef^{+/+} マウスに移植した腫瘍細胞は急速な増殖を見せるのに比べ、Asef^{-/-} マウスに移植した腫瘍細胞の増殖は顕著な遅延を示した (図 8A, B)。また、摘出した腫瘍において、抗 CD31 抗体を用い免疫染色を行ったところ、Asef^{-/-} マウスに移植した腫瘍組織内に伸長してきた血管の数は Asef^{+/+} マウスのものと比べ、明らかにその割合が減少していた (図 8C, D)。加えて、これら腫瘍に新生されてきた血管の割合を統計的に定量した結果からも、Asef^{-/-} マウスにおける顕著な血管新生の低下が示された (図 8E)。

5. 腫瘍関連マクロファージと血管新生

近年、腫瘍組織に浸潤してくるマクロファージ系の細胞が産生する増殖因子やサイトカインが腫瘍の血管新生を促進したり、細胞外マトリックスの崩壊と再構築、または癌細胞の運動能を亢進させることで腫瘍の悪性化に関与していることが分かっている。そのため、マクロファージによる腫瘍の血管新生に *Asef* が与える影響を検討した。まず、*Asef*^{+/+} マウスと *Asef*^{-/-} マウスに移植した B16 メラノーマ腫瘍組織内に浸潤してきているマクロファージの量を、抗 F-4/80 抗体を用いた免疫染色により比較検討したところ、2つの組織において目立った差は認められなかった(図 9A, B)。逆転写 PCR 法によって、*Asef*^{+/+} マウスと *Asef*^{-/-} マウスのマクロファージにおいては、*Asef*^{+/+} マウスでは *Asef* の発現が認められ、*Asef*^{-/-} マウスでは *Asef* の発現が完全に失われていることも確認した(図 9C)。また、マクロファージは血管新生に関わる増殖因子を産生しているため、*Asef*^{+/+} マウスと *Asef*^{-/-} マウス由来の腫瘍組織内における増殖因子の量を、抗 VEGF 抗体を用いた免疫染色により検討した。その結果、双方のマクロファージから産生されている VEGF 量に大きな差は見られなかった(図 9D)。以上のことから、*Asef* の欠損による腫瘍血管新生の抑制はマクロファージに起因するものではなく、血管内皮細胞の運動能やチューブ形成能の低下に因るものであると考えられた。

6. 小まとめ：*Asef* は増殖因子の下流で血管新生を促進する

本研究により、血管内皮細胞においては増殖因子 bFGF と VEGF の下流で APC と *Asef* の相互作用が促進され、その結果、Rac1 や Cdc42 の活性化が誘導され、血管内皮細胞の運動やチューブ形成能を促進することが明らかとなった。また、大動脈輪アッセイの結果からも *Asef* が血管新生において重要な役割を果たしていることが示され、血管内皮細胞は *Asef* を介することで運動能を制御し、血管新生を行っていることが示唆された。詳細は提示していないが、血管新生を観察する系として

マウスの網膜での血管形成が出生後から始まることを利用したアッセイにより、*Asef*^{+/+} マウスと *Asef*^{-/-} マウス新生児の網膜への血管新生の度合いも比較したところ、上記してきたような *Asef*^{-/-} マウスにおける表現系と一致するように *Asef*^{-/-} マウスの網膜において若干の血管新生の遅れを確認している。またこの時、*Asef*^{-/-} マウスの網膜において VEGF 量や酸素濃度は *Asef*^{+/+} マウスの網膜と比較して差はなかった。しかし、*Asef*^{-/-} マウスが正常に生まれてくることや、網膜の血管新生も最終的には野生型に追いつくことを考えると、生体内では他の Dbl ファミリーがリダンダントに *Asef* の機能を補償していると推測される。加えて、血管内皮細胞において siRNA による APC の発現抑制も細胞の運動能の低下を引き起こしていることから、bFGF や VEGF 誘導性の *Asef* を介した内皮細胞の運動に正に APC も関与しているのかはさらに検討しなければならない点である。

7. *Asef* の発現制御を行う転写因子の探索

Asef の上流で働く因子を同定するため、*Asef* のプロモーター解析を行った。*Asef*^a、*Asef*^b、*Asef*^c、*Asef*^d (図12A) の転写開始点から上流2kbpの領域と下流1kbの領域の配列をプロモーター領域とし、結合する転写因子の予測を行った(転写因子結合サイト予測プログラム、P-MATCHとSoftberryを用いた)。予測された転写因子のうち、4つのアイソフォームのプロモーター領域に共通して予測された転写因子、約30種類についてshRNAを用いたスクリーニングを行った。大腸癌細胞株のDLD-1を用い、shRNAによって発現が抑制されることで*Asef* の発現に影響を与える因子を探索したところ、Notchシグナル経路の一般的転写因子であるCSLのノックダウンによって*Asef* の発現量が減少することを見出した。さらに、CSLに対する複数配列のsiRNAを用いて同様の実験を行ったところ、*Asef* の発現がmRNAとタンパク質レベルで減

少することが示された (図12B)。さらに、Notchシグナルの阻害剤である γ -セクレターゼ阻害剤gamma-secretase inhibitor (GSI) をDLD-1細胞に作用させ、Asefの発現量を検証したところ、コントロールとして用いたDMSOで処理した細胞と比べ、GSI処理した細胞ではAsefの発現量の低下が観察された (図12C)。この結果から、Asefの発現はNotch/CSLはAsefの上流因子として機能している可能性が示唆された。

そこで次に、大腸癌におけるNotch1-3の発現を確認した。哺乳類においてはNotch1-4が報告されているが、大腸癌においてNotch4の発現は見られないことが既に示されている (Akiyoshi *et al.*, 2008)。実際、本実験に用いているDLD-1細胞での発現を確認したところ、やはりNotch4の発現は見られなかったため、Notch1-3についてのみの解析を行った。ヒト大腸癌検体を用い、大腸癌組織とその付近の正常組織からRNAを抽出し、逆転写によってcDNAを合成後、Notch1-3の発現をreal-time PCRで比較検討した。その結果、大腸癌組織では隣接した正常組織に比べて、Notch3のみが優位に発現上昇していることを見出した (図12D)。この結果から、大腸癌発症に寄与しているNotchシグナルは主にNotch3が担っているのではないかと考え、以降はNotch3に注目した解析を行った。また、APC^{Min/+}マウスの小腸ポリープと近傍の正常組織を採取し、それぞれの組織から合成したcDNAを用いてNotchの発現量をreal-time PCRにて比較検討したところ、mRNAレベルでAsefと同様にNotch1-3の発現上昇が観察された (図13A)。さらにNotch1-3の中でもNotch3の上昇率が最も高いことを示す結果を得た。また同じようにして組織を回収し、RIPAバッファーにより溶解後、得られた組織抽出物を用いてWestern Blotを行った。その結果、ポリープでは周辺正常組織と比べてNotch3、Asef、Hes1などの発現がタンパク質レベルでも向上していることが確認できた (図13B)。

siRNAを用いてDLD-1細胞でNotch3をノックダウンしたところ、CSLの発現を抑

制した場合やGSI処理した場合と同じくAsefの発現抑制が観察された（図12E）。また、逆にNotch3アクティブ型（N3ICD：Notch3の細胞内ドメイン）を強制発現すると、Asefの発現上昇が起こることも観察された（図12F）。よって、大腸癌細胞においてはAsefがNotchシグナルにより発現制御を受けている可能性が示唆された。

8. Notch3シグナルによるAsefプロモーターの活性化

NotchシグナルによってAsefの転写が引き起こされているのか確かめるため、ルシフェラーゼアッセイを行った。本検証では、大腸癌細胞で最も発現が高いアイソフォームAsef-bを使用した。Asef-bのプロモーターのCSLの結合サイトは転写会始点より2kbp上流に4箇所存在する（図14A）。始めに2kbp（P-2kbp）上流の配列と1kbp（P-1kbp）上流の配列、そしてCSL結合サイトを全く含まない配列（P-77bp）を蛍ルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだコンストラクトを作製した（図14B 図中に表示）。これら大腸癌細胞株であるCaCo2細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼの活性を測定したところ、P-77bpはほぼ活性を示さなかったのに対し、P-2kbpとP-1kbpはN3IDの強制発現によって、2倍程度活性化することを見出した。また、N3ICDを共にトランスフェクションしていない状態でも、P-2kbpとP-1kbpはCSL結合サイトを含まないP-77bpに対して5倍程度の活性を示していることから2kbp以内に重要な転写因子結合サイトが含まれていることが示唆された。加えて、P-2kbpとP-1kbpの反応性はほぼ同等であることから、以降、1kbp以内のCSL結合サイトに絞って解析を進めた。1kbp以内のプロモーター上には3つのCSL結合サイトがあるが、転写開始点に近いものからCSL-1、2、3とした（図14A中）。これらCSL-1、2、3に一箇所ずつ部位特異的ミュータジェネシスにより変異を加え、蛍ルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだコンストラクトを作製した

(Mut-1、Mut-2、Mut-3：図12B中に表示)。N3ICDと共にCaCo2細胞へトランスフェクションし、活性を測定したところ、Mut-1、Mut-3には大きな活性の変化は現れなかった。一方、Mut-2においてはP77bpと同じレベルに至る、顕著な活性の低下が見られた。以上の結果より、Asef-bのプロモーター上においてはCSL-2領域にN3ICDとCSLの複合体が結合し、Asefの転写活性を制御していることが示唆された。

さらにAsefのプロモーター上に直接CSLが結合していることを確かめるため、抗CSL抗体を用いてChromatin immunoprecipitation (ChIP) アッセイを行った (図14C)。その結果、CSL-2領域を含むDNA断片にCSLが結合していることが示された。ポジティブコントロールとして、既知のNotchシグナルのターゲットであるHes1のCSL結合領域結合領域を用いた。以上を踏まえると、CSLはAsefのプロモーター上に直接結合してAsefの転写を誘導していると考えられた。

9. miR-1によるNotch3の発現制御

本研究により、大多数の大腸癌の症例でNotch3が特異的な発現上昇していることを明らかにした。さらに、腫瘍発生初期に働く因子を捉えるために、Notch3/Asef経路を制御する因子の同定を試みた。既にNotch1-3はmicroRNA (miRNA) によって発現制御されているということが明らかにされているため (Ji Q *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2009)、大腸癌におけるNotch3の発現亢進にもmiRNAによる発現制御が関与している可能性検証した。

まず、ヒトのNotch3の3'UTRをもちいてin silico miRNA結合サイトの予測 (TargetScanを用いた) を行った。予測の結果、Notch3の3'UTRにおいて脊椎動物間で高度に保存されているmiRNAの結合配列はmiRNA-1 (miR-1) とmiRNA-206

(miR-206) の2つであった。そこでまず、これらのmiRNAについて大腸癌におけるmiRNAの網羅的遺伝子発現解析の結果を参照したところ、miR-1のみが大腸での発現があり、癌組織において発現減少していた。よって、大腸癌においてはmiR-1がNotch3の発現を制御している可能性が示唆された。また、実際に大腸癌におけるmiR-1の発現を調べるために、ヒト大腸癌検体を用いたreal-time PCRを行った。その結果、アレイのデータに示されていたように、miR-1は正常組織に比べ、癌組織で顕著に減少していることが確認できた (図15A)。そこで次に、miR-1に対する合成oligo (Pre-miR-1: Ambion) をDLD-1細胞にトランスフェクションし、Notch3の発現に与える影響を確認した。コントロールのPre-miR-NC(negative control)とpre-miR-1を強制発現したDLD-1細胞を回収し、ウェスタンブロットによってタンパク質の発現量を比較したところ、miR-1を強制発現したDLD-1においてNotch3の発現の低下が見られた (図15B左)。また、real-time PCRによってmRNAレベルでの発現量の比較をしたところ、mRNAでもNotch3の発現減少が観察された (図15B右)。加えて、Notch3の下流因子であることを明らかにしたAsefや、ポジティブコントロールのHes1の転写も抑制されていることが確認できた。よって、miR-1がNotch3の発現制御をしている可能性が示されたため、次にmiR-1がNotch3の3'UTRに直接作用しているのかどうかを調べるためにルシフェラーゼアッセイによって検討した。そのためにまず、Notch3の3'UTR (~1kbp) をRenilla luciferase遺伝子の5'UTRに組み込んだコンストラクト (WT-3'UTR) と、miR-1の結合サイトに変異を入れ、miR-1が結合できない3'UTRをRenilla luciferaseの5'UTRに組み込んだコンストラクト (Mut-3'UTR) を作製した (図15C)。得られたコンストラクトをDLD-1細胞に遺伝子導入したところ、WT-3'UTRを持つルシフェラーゼの活性はmiR-1の強制発現によって減少するのに対し、Mut-3'UTRをもつルシフェラーゼの活性はmiR-1の強制発現によっても影響を受けなかった (図13D)。このことから、miR-1

はNotch3の3'UTRに直接結合し、Notch3のmRNAの安定性や翻訳に作用することで、発現量を調節している可能性が示唆された。

加えて、miR-1の発現がDLD-1の約18倍高いWiDr細胞（図15F）にmiR-1のAnti-sense（Anti-miR-1）を強制発現し、miR-1の機能を阻害することによってNotch3の発現に影響があるかどうかを検証した。コントロールのAnti-sense-NCを強制発現したWiDr細胞と比較して、Anti-miR-1を強制発現したWiDr細胞のNotch3のタンパク発現量をウェスタンブロットによって確認したところ、Anti-miR-1を強制発現したWiDr細胞でNotch3の発現量が上昇していることが観察された（図15F左）。また、real-time PCRによってNotch3およびAsefのmRNA量も調べたところ、両者とも発現量が亢進していることが確認できた。これらの結果から、miR-1がNotch3やAsefの上流因子として機能していることが示唆された（図15F右）。

10. 癌細胞の運動を制御しているmiR-1-Notch3-Asef経路

これまでの研究結果から、大腸癌においてはmiR-1の減少によるNotch3の発現上昇がAsefの発現亢進を誘導しているという構図が示唆された。よって、miR-1-Notch3-Asef経路の存在と癌発症における重要性を調べるために、トランスウェルを用いた運動アッセイによる機能的レスキュー実験を行った。

トランスウェルは24well-plateのwell内にチャンバーが挿入されており、そのチャンバーの底面は細胞が移動できるよう0.8 μ mの穴が開いたフィルターが装着されている。チャンバーに播種した細胞がフィルターの上面から裏側に移動する割合をもって細胞運動能を測ることができる。まずsiRNA-Control（siControl）と共にMockまたはN3ICDを強制発現したDLD-1細胞を、トランスウェルにて4時間培養した。その後フィルターの裏に移動した細胞をDAPI染色し、移動した細胞の数を測定した

結果、N3ICDを強制発現したDLD-1細胞はMockを強制発現させた細胞よりも運動能が亢進していることを見出した（図16A）。一方、siRNAを用いてAsefの発現を抑制すると、N3ICDによる細胞運動能の活性化が抑制された。この結果から、Notch3はAsefの上流因子として機能し、細胞運動能の制御に関わっていることが示唆された。

次にmiR-1の細胞運動への関与と下流因子を用いたレスキュー実験を行った。まず、miR-1をDLD-1細胞に強制発現すると大幅に運動能が抑制された（図16B&C）。そこで、miR-1に加えて下流であるN3ICDとAsefもそれぞれ強制発現したところ、運動能が回復する結果が得られた（図16B&C）。これらの結果から、大腸癌細胞ではmiR-1の発現減少がNotch3とその下流のAsefの発現亢進を招き、細胞運動能を促進することで、癌細胞の浸潤・転移に関与している可能性が示唆された。

11. 癌細胞と微小環境のクロストーク

近年癌細胞はそれ自体のみでなく、周辺の微小環境（間質細胞（線維芽細胞、炎症細胞、免疫細胞）、血管、リンパ管、低酸素状態など）との相互作用が、増殖や浸潤・転移といった悪性化に重要であると考えられてきている。微小環境と癌細胞の相互作用がどのようにして成り立っているのか、分子レベルでの理解が進むことは、今後の癌治療にむけた有用な知見となると考えられる。

正常な腸管組織では、血管におけるNotchリガンドのDelta-like-4 (DLL4) の発現は低いですが、癌組織に侵入している血管（主に血管内皮細胞）ではDLL4の発現が亢進していることが知られているように、血管に直接接触している癌細胞では血管内皮細胞が提示するDLL4によって、Notch経路が活性化しており、その活性化が癌

細胞の増殖、転移に重要であることが報告されている。そこで、本研究では、大腸癌細胞と血管内皮細胞の相互作用によるNotch/Asef経路の活性化が大腸癌細胞の転移能に与える影響をTransendothelial migration assay（内皮下浸潤アッセイ）によって検証した（図17A）。トランスウェルのチャンバーにヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）を播種し、そのままフィルター上に一様な内皮細胞層を形成させるため48時間培養した。その後、チャンバー内にDLD-1細胞を播種し3時間培養した。このアッセイではフィルターの裏にHUVECも移動してきているので、DLD-1細胞と判別するためDAPI染色と共に上皮細胞のマーカーであるEpCAMの染色も行い、EpCAMによって染色された細胞を計測することでフィルターの裏に移動してきたDLD-1細胞の数を測定した。

まず、DLD-1細胞とHUVECが接触することでNotchシグナルが活性化され運動能に影響があるのかを確かめるため、HUVECに発現しているDLL4をsiRNAを用いて発現抑制した上でTransendothelial migration assayを行った。結果、HUVECにおいてDLL4の発現が抑制されていると、DLD-1細胞の運動能が顕著に低下しており、血管内皮細胞に発現しているDLL4が癌細胞の運動能の増加に寄与していることが示唆された（図17B）。次に、DLD-1細胞にmiR-1を強制発現するとHUVEC存在下でも運動は抑制された。しかし、N3ICDまたはAsefを強制発現すると運動能はレスキューされた（図17C）。これらの結果から、DLD-1細胞の運動能はmiR-1の発現の減少によって発現亢進したNotch3が隣り合った血管内皮細胞のDLL4によって活性化され、それによってAsefの発現上昇が引き起こされることで、細胞の運動能が亢進されるのではないかということが示唆された。

12. 小まとめ：大腸癌における異常な miR-1 の発現減少や微小環境とのクロストークによる Notch3-Asef 経路の活性化が癌細胞の運動能に多大な影響を及ぼす

本研究により、大腸癌におけるAsefの発現亢進にはNotchによる直接制御が関与していることが示唆された。siRNAによるCSLの発現抑制やGSIによるNotchシグナルの阻害がAsefの発現を減少させることから、AsefはNotchによる正の制御を受けていると考えられた。近年、様々な癌においてNotchの寄与が報告されているが、大腸癌においてもNotchの発現亢進が癌化に寄与していることが示されている (Nickoloff *et al.*, 2003; Ranganathan *et al.*, 2011; van Es *et al.*, 2005; Akiyoshi *et al.*, 2008)。また、大腸癌におけるNotchシグナルの研究はNotch1が中心となっていたが、ヒト大腸癌検体を用いた解析から大腸癌での発現亢進が認められたのはNotch3のみであった。よって、大腸癌においてはNotch3の寄与するところが大きいのではないかと考えた。

大腸癌で発現が亢進しているNotch3がAsefの転写を活性化していると予測し、DLD-1細胞にてsiRNAによるNotch3の発現抑制をしたところ、Asef mRNAの発現の減少が見られた。また、これとは逆にN3ICDによるNotch3経路の活性化によってはAsef mRNAの発現が亢進した。以上のことから少なくともAsefはNotch3による転写制御を受けていると考えられた。さらに、Notch3がAsefの転写を直接制御しているのか検証するため、Asef-bプロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイと、抗CSL抗体を用いたChIPアッセイを行った。その結果、転写開始点から上流2kbpに予測されたCSL結合サイトのうちの1つ (CSL-2: 図12A) がAsefのプロモーター活性に重要であることが示された。またChIPアッセイからはCSLがCSL-2領域周辺にて直接結合していることも見出された。以上より、大腸癌細胞においてAsefはNotchシグナルからの直接の転写制御を受けていると考えられる。

しかし、Notch経路の癌発症への寄与は数多く報告されているのにも関わらず、

その発現上昇のメカニズムはほとんど解明されていない。そこで、大腸癌においてNotch3が特異的に発現亢進している原因を探るため、プロモーター解析とmiRNAによる発現制御の可能性を探索した。現在のところ、プロモーター解析からは有力な転写因子の候補は挙がっていない。miRNAに関してはNotch1,2と3のそれぞれについて1報ずつ報告がされていたため、miRNAによる発現調節についても確認を行った (Ji *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2009)。Notch3に関しては、miR-206による制御が報告されており、HeLa細胞においてmiR-206を強制発現すると、Notch3の発現がタンパク質とmRNAレベルの双方で抑制されることが示されている。またmiR-206の強制発現によりNotch3の発現減少を介した細胞のアポトーシスや、運動能の低下が誘導されることから、miR-206が癌抑制的miRNAであることが報告されている。

本研究においては、Notch3の3'UTRに結合するmiRNAとしてin silico解析からmiR-1とmiR-206が予測された。その為、大腸癌検体を用いた定量PCRによる解析によって、miR-1のみが大腸正常組織で発現がみられ、尚且つ癌組織で発現が減少していることを見出した。本研究で用いた大腸癌検体の実に80%以上でmiR-1の大幅な減少がみられた。またこれらの検体において、miR-1とNotch3の発現には明確な相関関係が見られた。以上の結果から、大腸癌においてNotch3はmiR-1による発現抑制が解除されている可能性があると考えられた。そこで、大腸癌細胞にmiR-1を強制発現したところ、Notch3の発現はタンパク質レベルおよびmRNAレベルで抑制された。よって、Notch3はmiR-1によって発現が負に制御されていると考えられた。また、この抑制によってターゲットであるAsefやHes1の転写活性も抑えられていることから、miR-1-Notch3-Asef経路の存在が示唆された。さらに、このmiR-1によるNotch3の発現抑制が直接的なものであるのかを確かめるために、Ntoch3の3'UTRを用いたレポーターアッセイを行ったところ、WT-3'UTRがmiR-1の強制発

現によって活性が低下するのに対し、Mut-3'UTRは全く活性に変化がなかった。よって、Notch3の3'UTRに予測されたmiR-1の結合サイトはNotch3の発現制御に必須であり、miR-1からの直接の制御を受けていると考えられた。加えて、これらの事実を補強するため、miR-1に対するアンチセンスオリゴ (Anti-miR-1) を用いて、Notch3-Asefの発現に与える影響を検証した。WiDr細胞は大腸癌細胞株ではあるが、DLD-1細胞と比べて~18倍ほどmiR-1の発現が高くNotch3の発現もDLD-1細胞より低い細胞である。この細胞を用いてAnti-miR-1を強制発現したところ、miR-1の発現抑制を行うとNotch3の発現量はタンパク質、mRNAともに増加した。これに伴い、AsefやHes1の転写活性も上昇した。以上の結果を踏まえると、多くの大腸癌細胞でmiR-1の発現減少によるNotch3の発現亢進がAsefの発現上昇を招いているのではないかと推察された。

これまでの研究成果によって、miR-1-Notch3-Asef経路の存在が示唆されたが、次にこのシグナル伝達経路の癌発症における重要性を検証した。miR-1は肺癌と頭頸部扁平上皮癌において発現の減少が報告されており、各癌細胞株へのmiR-1の強制発現はアポトーシスと細胞運動の抑制を引き起こすことが明らかにされている。またNotchシグナルに関しても細胞の運動を制御しているという報告はいくつかあり、上皮間葉転換Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) という癌細胞が浸潤・転移するとき重要な現象を制御していることも知られている

(Timmerman *et al.*, 2004; Zavadil *et al.*, 2004)。加えて、最近AesというNotch/CSLを核とした転写複合体に含まれるco-repressor が大腸癌での浸潤抑制因子であると報告された (Sonoshita M *et al.*, 2011)。CSLを含む転写因子複合体による転写制御メカニズムについては未知の部分も多く、Aesの発見は興味深いものである。転移・浸潤を起こした癌細胞では、何らかの原因によりAesの発現が減少しており、Notchシグナルが活性化することによって転移能が増大している。以上

のような知見からNotchシグナルの活性化による転移能亢進にAsefが関わっている可能性があると考えられた。実際、大腸癌細胞でもNotch3による運動能の正の制御が見られたが、Asefの発現が抑制されているとNICDの強制発現によっても運動能の向上は引き起こせなかったことから、Notch経路の活性化による細胞の運動能亢進はAsefを介していることが示唆された。加えて、本研究によって、大腸癌細胞においてはmiR-1による細胞運動の制御もNotch3/Asef経路を介していることが示唆された。

また、癌細胞はそれ自身だけでなく、周囲の微小環境を利用することで、生存や悪性を促進していることが明らかとなっているが、特に血管は正常な腸管と比較し、癌組織に進入してきているものでNotchリガンドのDLL4の発現が亢進していることが明らかになっている。大腸癌組織内ではDLL4を発現している間質細胞に接している癌細胞でのみNICD（Notchの活性化）が観察されることも報告されていることから、癌細胞は癌組織内に新生されてきた血管と相互作用し、Notchシグナルを活性化させることで浸潤能を高めている可能性が示唆された。このように癌細胞が微小環境とのやり取りにより、より悪性を増していく仕組みは近年注目され始めている。そこで癌細胞と血管内皮細胞の相互作用によるNotch/Asef経路の活性化が大腸癌細胞の転移能に与える影響を検討した。その結果、血管内皮細胞が提示するDLL4が、大腸癌細胞のNotch経路の活性化による内皮下浸潤に重要であり、大腸癌細胞の浸潤・転移にAsefが深く関わっていることが示唆された（図18）。

第四章：考察

1. 大腸癌における Asef の血管新生制御機構

今回の結果から Asef が bFGF や VEGF の下流で血管新生を制御している可能性が示唆されたが、これは Asef と APC が受容体型チロシンキナーゼを介して増殖因子の下流で働いている可能性を示している。事実、当研究室の先行研究において、表皮細胞では Asef が EGF や HGF の下流で機能していることが示唆されている。本研究においては、Asef と APC が bFGF や VEGF の刺激によって、細胞の先端端のラップリング膜やラメリポディアへ濃縮されることと、そこで APC-Asef 複合体が Rac1 や Cdc42 を活性化し、血管内皮細胞の運動能の一旦を担っているのであろうと考えられた。

また、本研究の結果を裏付けるように、増殖因子のシグナルを介し、Vsv2/3 や P-REX、Tiam1 などといったいくつかの GEF やエフェクターの PAC2 が Rac1 や Cdc42 依存性の血管内皮細胞の運動や血管新生に関わっているという報告がされている (Birukova *et al.*, 2007; Garrett *et al.*, 2007; Gavard and Gutkind, 2006; Gonzalez *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2005)。血管新生における反応系において、これらの GEF や PAK2 が Asef の上流かまたは下流で働いているのかということに興味を持たれる点である。加えて、Cdc42 は運動中のアストロサイトにおいて APC と Dlg1 の共局在を先端端に誘導することで、細胞の極性や運動を制御しているという報告もある (Etinne-Manneville and Hall, 2003; Etinne-Manneville *et al.*, 2005)。これら既知の報告と総合して考察すると Asef が細胞の極性や運動の制御に関わっている可能性はより確かなものだと考えられた。

さらに、癌における血管新生にも Asef が関与している可能性を探るため、B16メラノーマ細胞を用いマウスに移植したところ、Asef^{-/-}マウスに移植した B16 メラノ

ーマは *Asef*^{+/+} マウスに移植したものと比べて腫瘍の大きさだけでなく、腫瘍内部に伸長してきた微小血管の数は顕著に減少していた。これらの結果から、*Asef*^{-/-} マウスにおいて、腫瘍の増殖スピードに差が生じたのは腫瘍に酸素や栄養素を送る血管の形成が阻害されたことによると考えられた。血管新生に関わる他の因子、例えば腫瘍関連マクロファージの割合にはマウス間で差は見られなかったことから、*Asef* が腫瘍の血管新生に関わる重要な因子であることが示唆された。

2. 大腸癌における *Asef* 発現亢進メカニズム

前半の結果も加味すると *Asef* は大腸癌の発生において、腫瘍の血管新生を促進するという微小環境での側面と、癌細胞自体の悪性変異（*miR-1* の発現減少に伴う *Notch3* の発現亢進）による発現上昇によって、癌細胞の運動能を促進し浸潤・転移の助長をするといった側面の双方で重要な役割を果たしていることが示唆された。

第一章の結果から *Asef* は血管新生において血管内皮細胞の運動に寄与していることが明らかになったが、血管新生においては内皮細胞の運動だけではなく、**Matrix Metalloproteinases (MMPs)** による血管を裏打ちしている基底膜の分解も重要であることが報告されている。基底膜が分解されないと、血管内皮細胞は間質に遊走して新たな血管構造を形成することができないため、血管新生において **MMPs** の発現制御は重要であると考えられる。当研究室の先行研究によって、*Asef* は **bFGF** や **VEGF** の下流因子として機能していること、および大腸癌細胞においては *Asef* が **JNK** 経路を介して **MMP9** の発現を制御していることを見出している (**Kawasaki *et al.*, 2009**)。また、血管新生時の **MMPs** は **VEGF** などの増殖因子刺激によって、血管内皮細胞から産生されることも明らかにされている。これらの知見を考え合わせると、血管内皮細胞においても *Asef* は **VEGF** などの増殖因子からの刺激を受けて、**MMP9** の発現の誘導しているかもしれない。現在までに、**MMP** は多くのサブタイプが報告

されており、その数は 20 種類以上に上る。しかし、血管を裏打ちしている基底膜を構成している IV 型コラーゲンの分解には MMP-9 とその基質である MMP2 が主要な役割を果たしていることが知られている (Egeblad *et al.*, 2002; Nagase *et al.*, 1991; Morodomi *et al.*, 1992)。よって、Asef が血管内皮細胞の運動と基底膜分解との両方向から血管新生に寄与している可能性もあり、その重要性がより助長される。

本研究結果から、大腸癌の発生に関わる miR-1-Notch3-Asef という新たな経路の存在を明らかにしたが、miR-1 の癌化への寄与はほとんど解析されておらず、大腸癌での発現減少のメカニズムも解明できていない。一方、肺癌細胞においては miR-1 の発現減少が報告されており、ヒストンアセチル化によるエピジェネティックな変化を介した発現制御を受けていることが明らかにされている。miR-1 の発現制御機構は組織によって異なるとされており、プロモーターがメチル化の制御を受けているということや、mTOR 経路による制御を受けているということが報告されている。しかし、大腸癌細胞においては miR-1 のプロモーターのメチル化やアセチル化の関与は見出せなかった。よって、大腸癌における miR-1 の発現制御機構の解析は今後の課題であると考えられる。

加えて、癌細胞の生存や悪性化を支える微小環境と癌細胞との関連においては、血管内皮細胞に発現する DLL4 と近接した癌細胞の Notch3 が相互作用し、シグナル伝達が促進されることで、下流の Asef の発現ならびに細胞の運動の制御が行われていることが示唆された。また、DLL4 からの刺激は癌細胞の Notch3 の発現を亢進することも報告されており、初期の癌細胞において miR-1 の発現減少により発現抑制が解除された Notch3 は、微小環境と相互作用することで更にその発現を促進している可能性が考えられる。しかし、リガンドと Notch 受容体の相互作用は Notch の細胞内ドメインを切り出すための酵素が作用できるように、受容体の立体構造の変化を起こすのみであり、直接活性化を誘導しない。この細胞内ドメインを切り出す酵素には γ -

セクレターゼの他に MMP-9 や MMP-2 も必要であることが報告されており、癌細胞で Asef によって発現制御されている MMP9 は Notch シグナルの活性化にポジティブフィードバック的に作用している可能性が考えられる。このことが事実ならば、Notch シグナルの下流で Asef が機能している意義がより明らかになるのではないかと考える。

以上のように、大腸癌では miR-1 の発現減少を引き金に Notch3 の発現亢進がおり、微小環境との相互作用によって Notch3 経路が活性化することで、Asef の発現が誘導されるという構図が明らかになった。さらに、miR-1 から Asef における経路は、微小環境からの追加的な刺激を受けながら、癌細胞の運動能に深く関わっていることを明らかにした。

本研究によって得られた結果を総合的に評価すると、miR-1-Notch3-Asef 経路は大腸癌治療の有望な標的となるのではないかと考える。また、APC^{Min/+}マウスと Asef ノックアウトマウスを交配したところ、Asef のヘテロ欠損によっても腸管に発生するポリープの数や大きさが減少するが、ホモ欠損によって、さらにポリープの数や大きさが減少することから、Asef の発現量が細胞の癌化に重要であることを見出している。さらに、Asef のノックアウトマウスがほぼ正常に発生・生育することから、特に Asef をターゲットとした分子標的薬の開発は、より副作用の少ない抗癌剤の開発に繋がると期待できる。

謝辞

本研究を行う機会を与えてくださると共に、5年間に渡る懇切丁寧なご指導を頂きました、東京大学分子細胞生物学研究所 分子情報研究分野 秋山徹教授に心から御礼を申し上げます。

また本研究を進める上で、技術面、知識面において多大なるご指導、ご助言を頂きました、東京大学分子細胞生物学研究所 分子情報研究分野講師 川崎善博博士に深く感謝いたします。

加えて、本研究を行うに当たり協力を頂いた、以下の方々に謝意を表します。

大腸癌検体の提供をしていただいた、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻 北山丈二博士、日吉雅也博士。

プラスミドの提供をしていただいた、筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻 千葉滋教授。

日々、研究生活を共にし、実験技術や研究方針への多くのアドバイスを頂くと共に、研究以外の面でも様々に支えていただきました、分子情報研究分野の皆様。

また、本研究は革新的細胞解析研究プログラム（セルイノベーション）、科学研究費助成事業新学術領域研究、グローバル COE プログラムによるサポートを頂きました。深く感謝いたします。

最後に、長期間に渡り、研究者を目指す私に理解を示し、支えてくれました家族においては感謝に耐えません。

平成 23 年 12 月

参考文献

- Akiyama T and Kawasaki Y (2006) Wnt signalling and the actin cytoskeleton. *Oncogene* 25: 7538-7544
- Akiyoshi T *et al.* (2008) γ -secretase inhibitors enhance taxane-induced mitotic arrest and apoptosis in colon cancer cells. *GASTROENTEROLOGY* 134: 131-144
- Artavanis-Tsakonas S *et al.* (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770-7776
- Askham JM *et al.* (2000) Regulation and function of the interaction between the APC tumor suppressor protein and EB1. *Oncogene* 137: 1651-1662
- Baek D. *et al.* (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature*: 455, 64-71
- Baron M (2003) An overview of the Notch signaling pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 14: 113-119
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 116: 281-297
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-23
- Behrens J *et al.* (1998) Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC and GSK3beta. *Science* 280: 596-599
- Benedito R *et al.* (2009) The Notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* 137: 1124-1135
- Bienz M and Clevers H (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103:

311-320

- Brembeck FH, Rosário M and Birchmeier W (2006) Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β -catenin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16: 51-59
- Cadigan KM and Nusse R (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 11: 3286-3305
- Calin GA. & Croce CM. (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*: 6, 857-66
- Chan YM and Jan YN, Roles for proteolysis and trafficking in notch maturation and signal transduction. *Cell* 94: 423-426
- Chang TC. *et al.* (2008) Widespread micro-RNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat. Genet*: 40, 43–50
- Carthew RW & Sontheimer EJ. (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*:136, 642-55
- Chendrimada TP. *et al.* (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* : 436, 740-4
- Cimmino A. *et al.* (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* : 102, 13944–13949
- Dang TP *et al* (2000) Chromosome 19 translocation, Overexpression of Notch3, and human lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 1355-1357
- Dang L *et al* (2006) Notch3 signaling initiates choroids plexus tumor formation. *Oncogene* 25:487-491
- Egeblad M *et al* (2002) New functions for the matrix metalloproteinase in cancer progression. *Nature Rev. Cancer* 2: 161-174
- Ellisen LW *et al.* (1991) TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene

- is broken by chromosomal translocation in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*: 66, 649-661
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN and Sonenberg N (2008) Mechanism of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9: 102-114
- Fodde R, Smits R and Clevers H (2001) APC, Signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1: 55-67
- Gaur A. *et al.* (2007) Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res*: 67, 2456-68
- Gotthardt K and Ahmandian MR (2007) Asef is Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor. *Biol. Chem.* 388: 67-71
- Greenwald I (1998) LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev* 12: 1751-1762
- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS and Bartel D (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466: 835-840
- Haase AD. *et al.* (2005) TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep*: 6, 961-7
- Hart MJ *et al.*, (1998) Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr. Biol.* 8: 573-581
- Iizuka –Kogo A, Shimomura A and Senda T (2005) colocalization of APC and DLG at the tips of cellular protrusions in cultured epithelial cells and its dependency on cytoskeletons. *Histochem. Cell Biol.* 123: 67-73

- Ikeda S *et al.*, (1998) Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin. *EMBO J.* 17: 1371-1384
- Indraccolo S *et al.* (2009) Cross-talk between tumor and endothelial cells involving the Notch3-Dll4 interaction marks escape from tumor dormancy. *Cancer Res.* 69: 1314-1323
- Ji Q *et al.* (2009) MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLOS one* 4: e6816
- Johnson SM. *et al.* (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*: 120, 635-47
- Kawasaki Y *et al.* (2000) Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science* 289: 1194-1197
- Kawasaki Y *et al.* (2003) Mutated APC and Asef are involved in the migration of colorectal tumor cells. *Nat. Cell Biol.* 5: 211-215
- Kawasaki Y *et al.* (2009) The adenomatous polyposis coli-associated exchange factor Asef and Asef2 required for adenoma formation in APC^{Min/+} mice. *EMBO reports* 10: 1355-1362
- Kawasaki Y *et al.* (2010) The adenomatous polyposis coli-associated guanine nucleotide exchange factor Asef is involved in angiogenesis. *J. Biol. Chem* 285: 1199-1207
- Kim VN. *et al.* (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*:10, 126-39
- Kinzler KW and Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170

- Kopan R and Ilagan M (2009) The canonical Notch signaling pathway: Unfolding the activation mechanism. *Cell* 137: 216-233
- Korinek *et al.* (1997) Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275: 1784-1787
- Kumar MS. *et al.* (2007) Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat. Genet.* 39, 673–677
- Lambertz I. *et al.* (2010) Monoallelic but not biallelic loss of Dicer1 promotes tumorigenesis in vivo. *Cell Death Differ.* 17, 633–641
- Lechertier T, Berard M, Vassy R, Herve MA and Crepin M (2004) Transendothelial migration of two metastatic breast carcinoma cells depend on the SDF-1 α -CXCR4 complex. *Anticancer Res.* 24: 4011-4018
- Lee RC. *et al.* (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*: 75, 843-54
- Li Y and Zhu C (1999) A modified Boyden chamber assay for tumor cell transendothelial migration in vitro. *Clin. Exper. Metas.* 17: 423-429
- Lim LP. *et al.* (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*: 433, 769-73
- Lu J. *et al.* (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*: 435, 834-8
- Lujambio A. *et al.* (2007) Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res*: 67, 1424–1429
- Melo SA. *et al.* (2009) A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat. Genet.* 41, 365–370
- Melo SA. *et al.* (2010) A genetic defect in Exportin-5 traps precursor microRNAs

- in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell* 18, 303–315
- Mitin N *et al.* (2007) Release of autoinhibition of Asef by APC leads to Cdc42 activation and tumor suppression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14: 814-823
- Morin PJ *et al.* (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275: 1787-1790
- Morodomi T *et al.* (1992) Purification and characterization of matrix metalloproteinase 9 from U937 monocytic leukemia and HT1080 fibrosarcoma cells. *Biochem. J.* 285: 603-611
- Murayama K *et al.* (2007) Crystal structure of the rac activator, Asef, reveals its autoinhibitory mechanism. *J. Biol. Chem.* 282: 4238-4242
- Nagase H *et al.* (1991) Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem. Soc. Trans.* 19: 715-718
- Nasser MW *et al.* (2006) Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. *J. Boil. Cancer* 283: 33394-33405
- Nickoloff BJ, Osborne BA and Miele L (2003) Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* 22: 6598-6608
- Nohata N *et al.* (2011) miR-1 as a tumor suppressive microRNA targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2: 29-42
- O'Donnell KA. *et al.* (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*: 435, 839-43
- Pear WS *et al.* (1996) Exclusive development to T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med*: 183, 2283-2291

- Peifer M and Polakis P (2000) Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis—a look outside the nucleus. *Science* 287: 1606-1609
- Pierfelice T *et al.* (2011) Notch3 activation promoted invasive glioma formation in a tissue site-specific manner. *Cancer Res.* 71: 1115-1125
- Polakis P (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 14: 1837-1851
- Ranganathan P, Weaver K and Capobianco AJ (2011) Notch signalling in solid tumors: a little bit of everything but not all the time. *Nat. Rev. Cancer* 11: 338-351
- Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L and Lendahl U (2008) Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 6392
- Saito Y. *et al.* (2006) Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*: 9, 435–443
- Sarver AL *et al.* (2009) Human colon cancer profiles show differential microRNA expression depending on mismatch repair status and are characteristic of undifferentiated proliferative states. *BMC Cancer* 9:401
- Serafin V *et al.* (2011) Notch3 signalling promotes tumor growth in colorectal cancer. *J. Path.* 224: 448-460
- Song G, Zhang Y and Wang L (2009) MicroRNA-206 targets notch3, activates apoptosis, and inhibits tumor cell migration and focus formation. *J. Biol. Chem.* 284: 31921-31927
- Sonoshita M *et al.* (2011) Suppression of colorectal cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling. *Cancer Cell* 19: 125-137

- Stefano I *et al.* (2009) Cross-talk between tumor and endothelial cells involving the Notch3-Dll4 interaction marks escape from tumor dormancy. *Cancer Res.* 4: 1314-1323
- Su LK *et al.* (1993) Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262: 1734-1737
- Taketo MM (2011) Reflections on the Spread of metastasis to cancer prevention. *Cancer Prev. Res.* 4: 324-328
- Timmerman *et al.*, (2004) Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev.* 18: 99-115
- Thomson JM. *et al.* (2006) Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* 20: 2202–2207
- Weinmaster G, Notch signaling transduction: a real trip and more. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 363-369
- van Es JH *et al.* (2005) Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435: 959-963
- Zavadil *et al.* (2004) Integration of TGF- β /Smad and Jagged/Notch signalling in epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J* 23: 1155-1165

A



FAP大腸

正常大腸

B

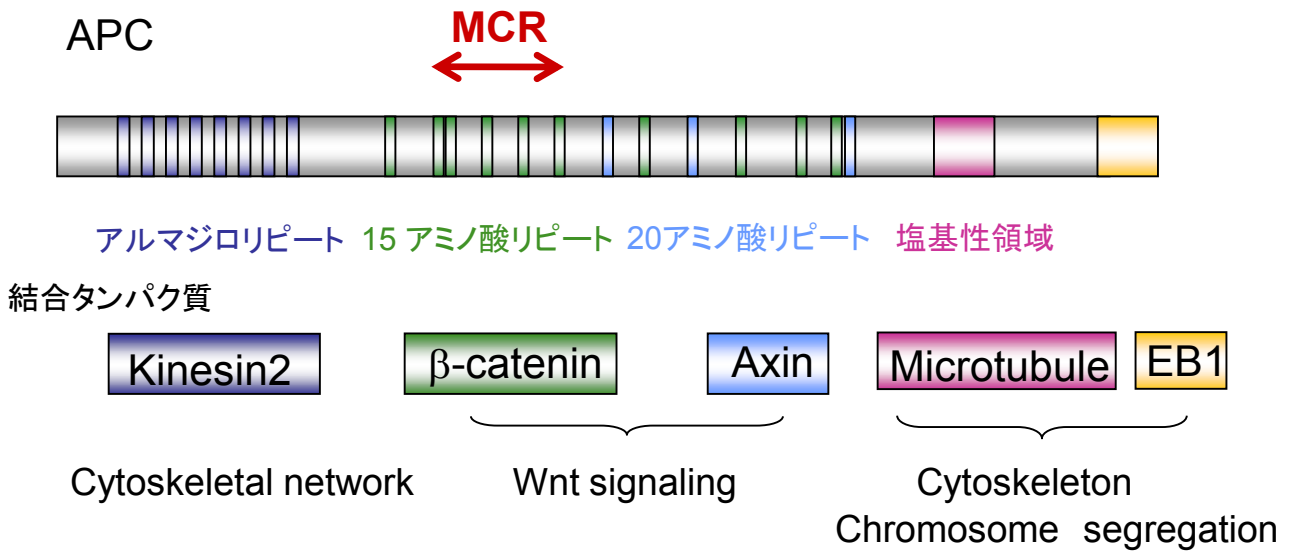
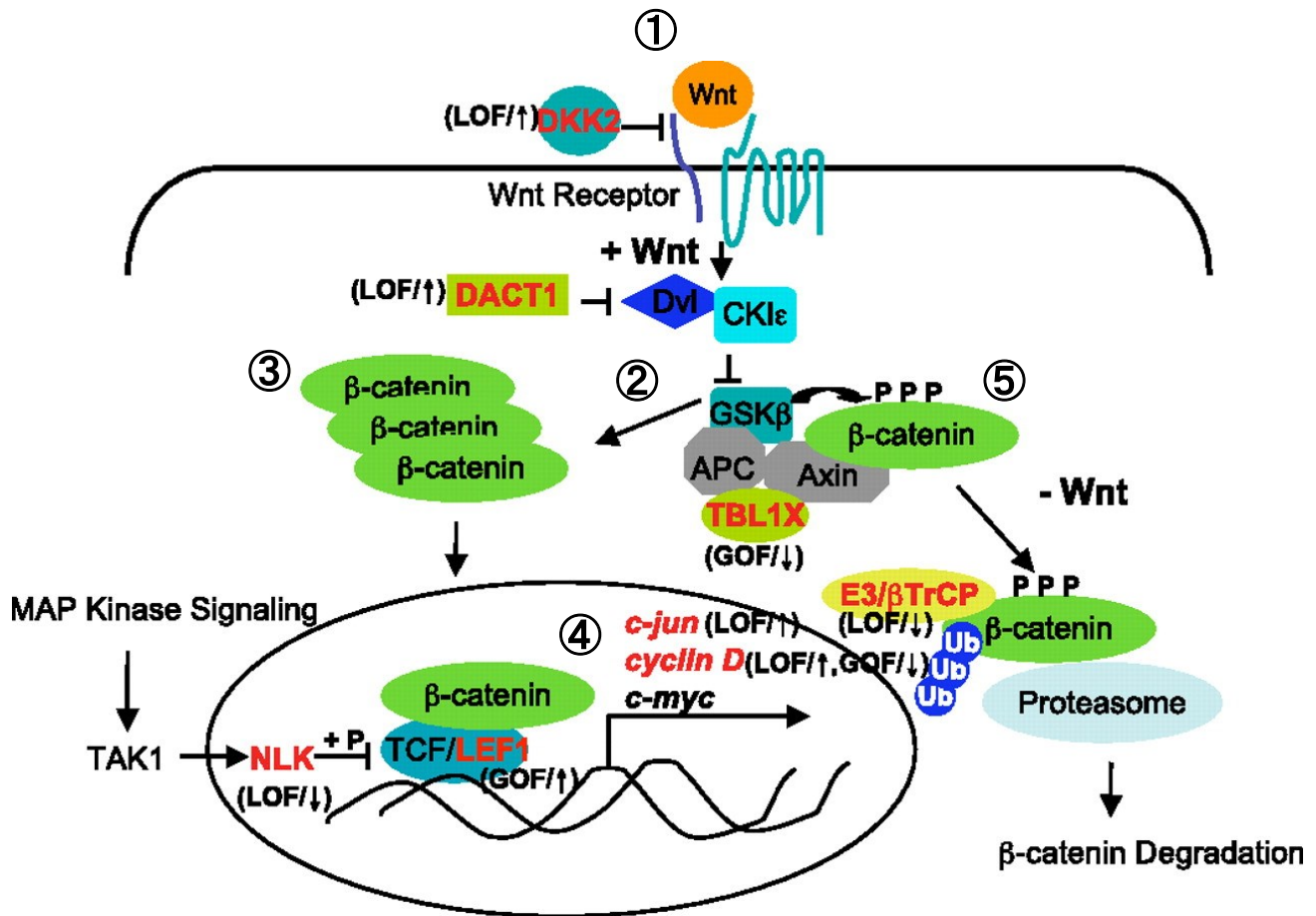


図1 癌抑制遺伝子APC (Adenomatous polyposis coli)

A: 家族性腺腫性ポリポーシス (FAP) 患者の大腸上皮 (左) と正常大腸上皮 (右)

B: APCタンパク質のドメイン構造と結合タンパク質

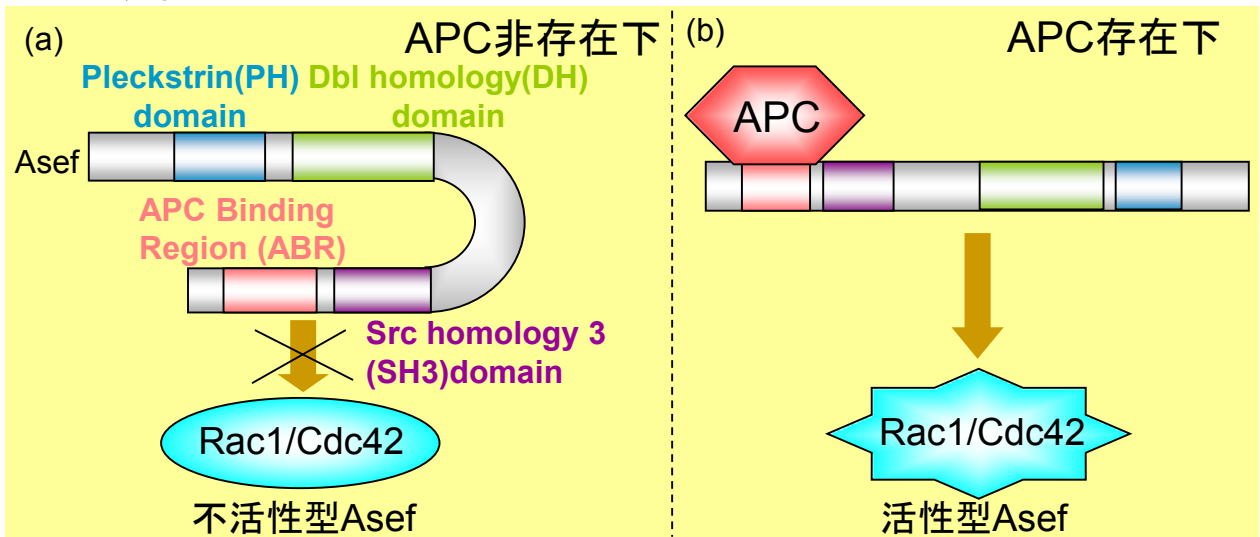


MKH Kim 2009 PNAS 106

図2 canonical Wnt シグナル経路

- ① Wntタンパク質が細胞膜表面受容体のFrizzledに結合すると、受容体にDishevelled (Dvl)を放出させる。
- ② DvlはAxin/GSK-3/APC複合体を抑制し③ β-cateninの安定化が起こりβ-cateninが核へ移行する。
- ④ 核に移行したβ-cateninはTCF/LEF1と複合体を作り、標的遺伝子の転写を促進する。
- ⑤ Wntシグナルが活性化していない場合は、β-cateninはAxin/GSK-3/APC複合体によってユビキチン化され、分解へ向かう。

A 正常大腸細胞



B

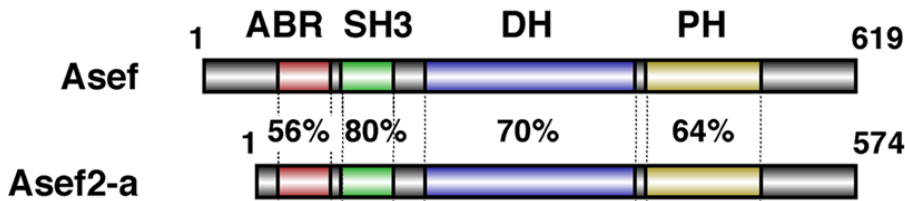


図3 グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)Asef/Asef2

A: (a) SH3ドメインとDHDドメインは分子内結合をしており、Asef単体ではSH3ドメインによってDHDドメインがマスクされる事により自身のGEF活性が抑えられている。
 (b) APCがAsefのN末端領域に結合することでN末端領域による負の制御が解除さGEF活性が発揮される。
 (c)大腸癌では変異型APCによって、恒常的にAsefが活性化されている

B: AsefとAsef2のドメイン構造と相同性

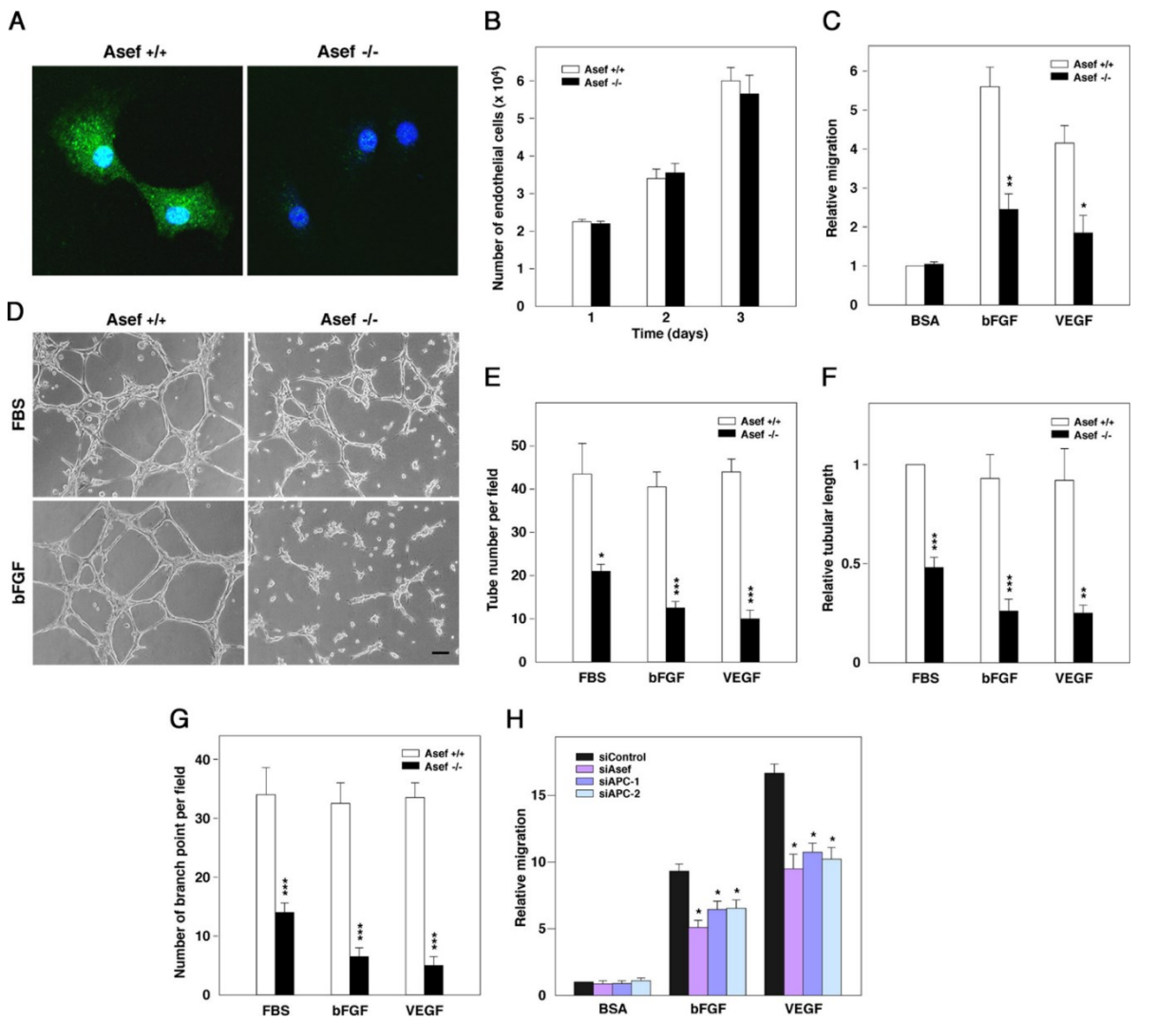


図4 Asefの血管内皮細胞における運動能とチューブ形成能への関与

A: Asef+/+ マウス とAsef-/- マウス由来のMAECの抗Asef抗体による染色(緑色)とTO-PRO (青色)による核染色。

B: Asef+/+ マウス とAsef-/- マウス由来のMAECの細胞増殖速度の比較。MAECは 2.0×10^4 細胞を6well plateに播種し(day0)、24時間ごとに細胞数を数えた。4回の独立した施行の平均とS.E.を示す。

C: Transwellを用いた運動アッセイ。Asef+/+ マウス またはAsef-/- マウス由来のMAECに bFGFやVEGFによる刺激を与えた時の細胞の運動量を定量した。各MAECは4.5時間運動させ、Transwellの底面に移動してきた細胞の数を測定した。4回の独立した施行の相対値の平均とS.E.を示す。

D: BSAまたはbFGFを含むマトリゲル上にMAECを播種し、チューブ形成具合を位相差顕微鏡によって観察した。スケールバーは50 μ m

E-G: Dの結果を定量化した。X100倍の視野中におけるチューブの数(E)、チューブの長さ(F)、枝分かれの数(G)を示す。4回の独立した施行の平均とS.E.を示す。

H: AsefまたはAPCのノックダウンによるHAECの運動能への影響。Transwellを用いAsefまたはAPCに対するsiRNAをトランスフェクションした細胞をBSAやbFGFまたはVEGFの存在下で3.5時間運動させ、底面に移動した細胞の数を測定した。4回の独立した施行の相対値の平均とS.E.を示す。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. BSA, bovine serum albumin

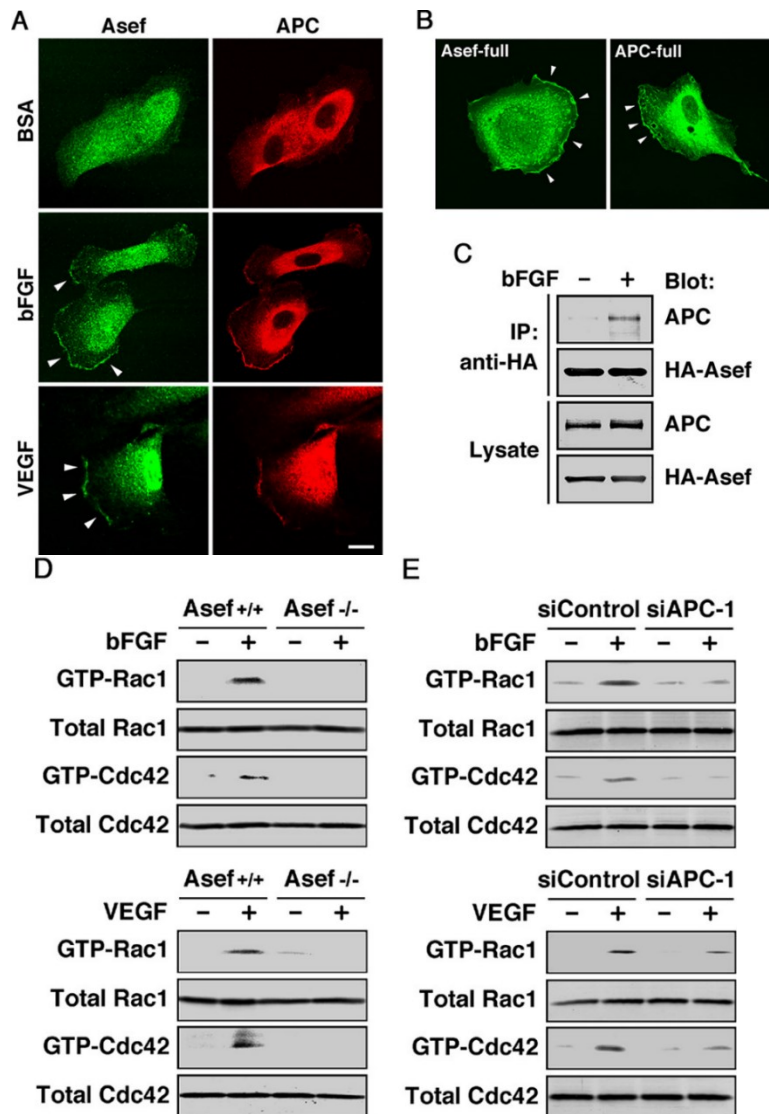


図5 APC/Asef複合体はbFGFとVEGFの下流で機能する

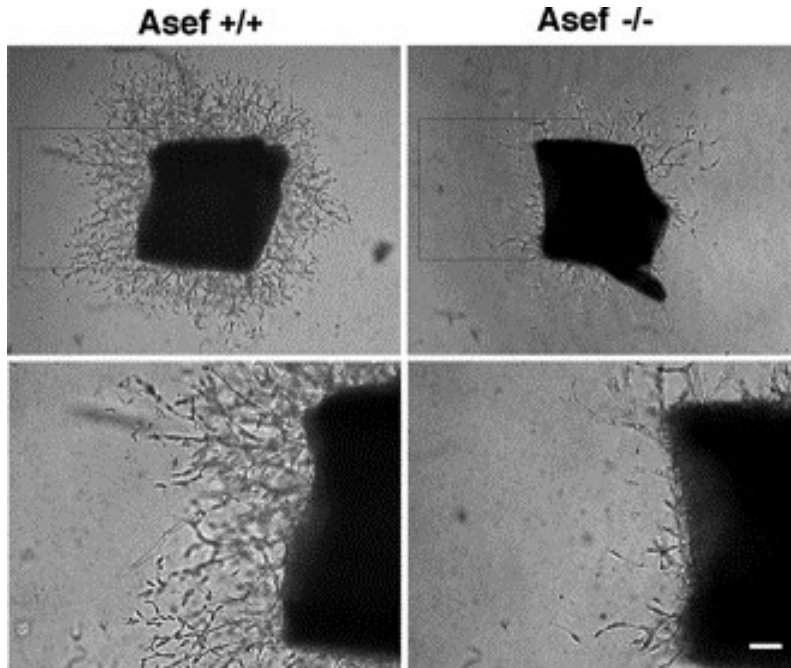
A: bFGFまたはVEGFを作用させた時のHAEC細胞を示す。細胞は24時間の飢餓状態の後、bFGF (25 ng/ml)またはVEGF(10 ng/ml)で30分間刺激し、抗Asef抗体と抗APC抗体にて二重染色した。矢頭はラッフル膜にAsefとAPCが局在している領域を示す。スケールバーは20 μ m

B: AsefまたはAPCをHAECに強制発現し、bFGFによって刺激したときのそれぞれの局在を示す。HAECはHAタグ付きAsefまたはMycタグ付きAPCを強制発現し、それぞれ抗HA抗体、抗Myc抗体によって染色した。矢頭はラッフル膜を示す。

C: bFGFによる刺激はAsefとAPCの相互作用を促進する。HAタグ付きAsefの全長をコードしたアデノウイルスを感染させたHAECにbFGFによる刺激を行ったものまたは刺激を行っていない細胞からlysateを回収し、抗HA抗体にて免疫沈降を行った。その後、抗APC抗体または抗HA抗体にてImmuno blotを行った。

D-E: AsefとAPCはbFGFまたはVEGF誘導性のRac1とCdc42の活性化に必要である。Asef^{+/+} とAsef^{-/-} MAEC、または正常なHAECとAPCのノックダウンを行ったHAECにbFGFまたはVEGF刺激を加え、活性化型のGTP-Rac1またはGTP-Cdc42をGST-PAK CRIPが結合したglutathione-sepharose beadsを用いて測定した。GTP結合型のGTPaseは図中に示す各抗体を用いてImmunoblottingにて検出した。

A



B

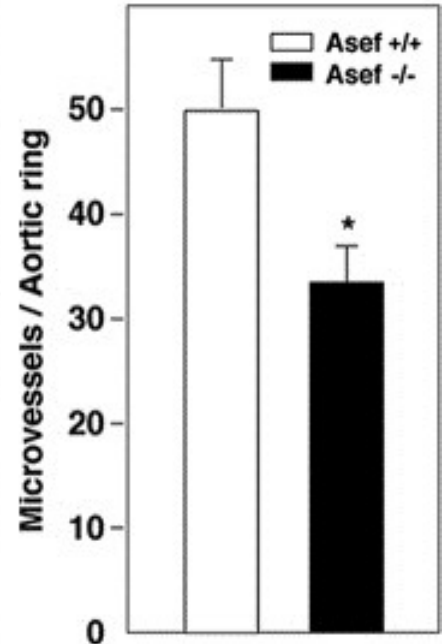
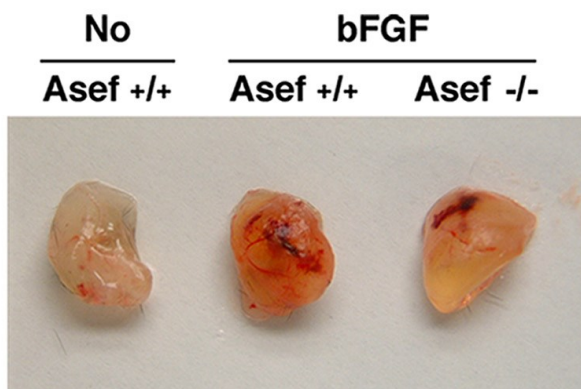


図6 動脈からの毛細血管の新生におけるAsefの役割

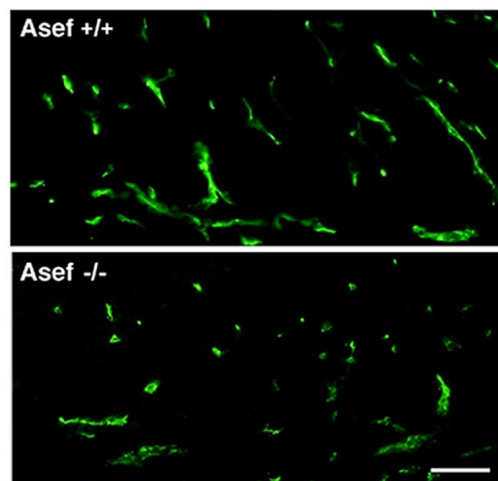
A: *Asef*^{+/+} マウスと*Asef*^{-/-} マウスから大動脈を切り出し、bFGF、EGF、VEGF、IGF-1と2%の血清を含むマトリゲル中に封入した後、8日間培養した。写真上部は倍率40倍、下部は100倍での撮影図。スケールバーは100 μ m

B: *Asef*^{+/+} マウスまたは*Asef*^{-/-} マウス由来の動脈(各3サンプル)の培養から8日目に出芽してきた血管の数の平均とS.E.を示す。*, $p < 0.05$

A



B



C

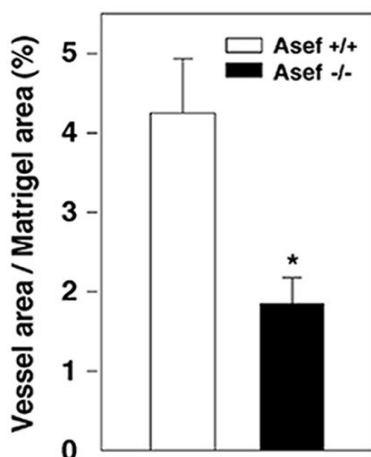


図7 *in vivo*でのマトリゲルプラグ内への血管の伸長

A: Asef^{+/+} マウスへ増殖因子を含まないマトリゲルプラグを移植したもの(左)、bFGFを含むマトリゲルプラグを移植したもの(中央)、Asef^{-/-} マウスへbFGFを含むマトリゲルプラグを移植したもの(右)を5日後に摘出した。

B: Asef^{+/+} マウスまたはAsef^{-/-} マウスへ移植したbFGFを含むマトリゲルプラグ内に伸長してきた血管を抗CD31抗体によって蛍光染色した。スケールバーは50 μ m

C: Bのデータを定量化した。Asef^{+/+} マウスまたはAsef^{-/-} マウス各4-5匹から独立して摘出したマトリゲルプラグにおいて200倍での視野における血管の占める割合の平均値とS.E.を示す。*, $p < 0.05$

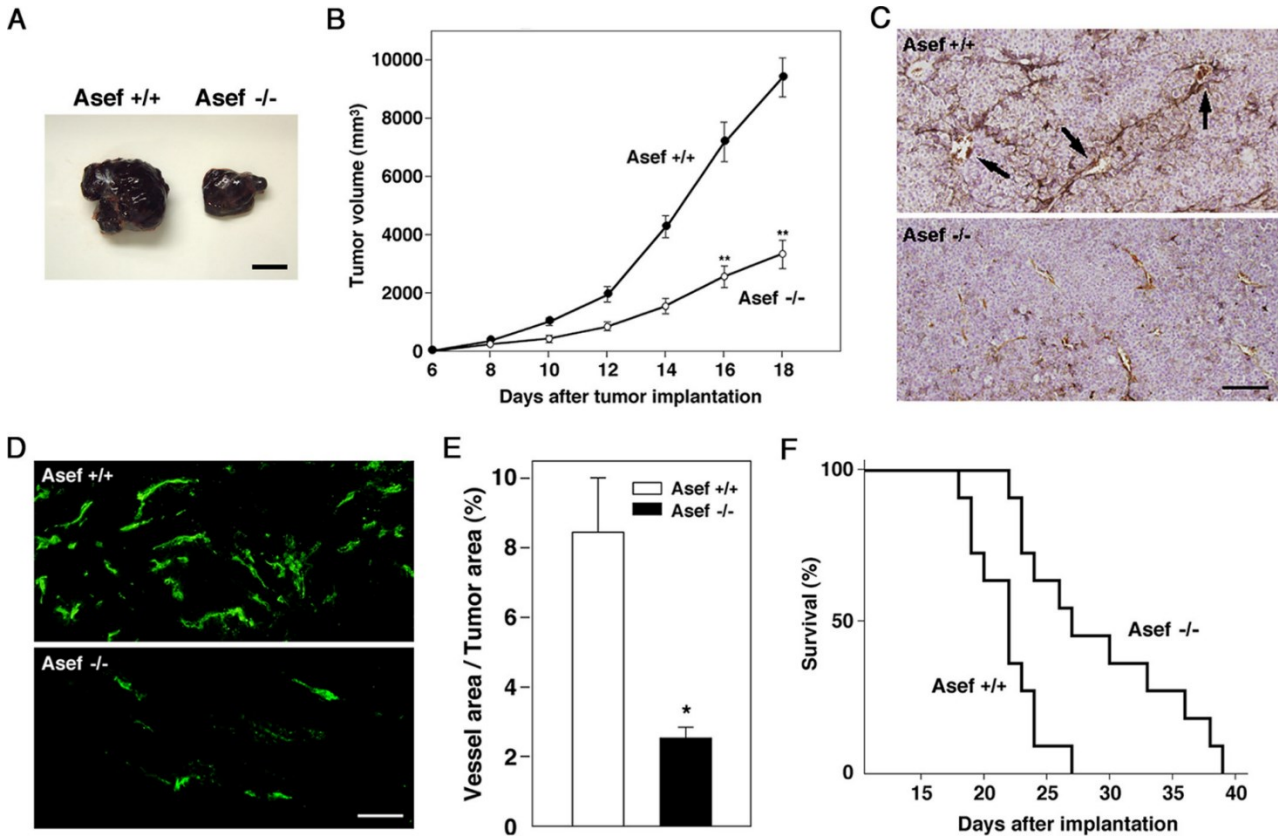


図8 Asef^{-/-} マウスへ移植した腫瘍は大きさも血管新生も減少する

A: Asef^{+/+} マウスまたはAsef^{-/-} マウスの皮下へB16メラノーマ細胞を移植し、14日後に摘出した。スケールバー 10mm

B: Asef^{+/+} マウスまたはAsef^{-/-} マウス各11匹に移植したB16メラノーマ細胞の腫瘍の大きさの平均値とS.E.を示す。

C: Asef^{+/+} マウスまたはAsef^{-/-} マウスから摘出した腫瘍組織の断面を抗CD31抗体で染色(茶色)し、対比染色をHematoxylinにて行った。矢印は赤血球を含むような毛細血管を示す。スケールバーは50 μ m

D: 抗CD31抗体による蛍光染色。スケールバーは50 μ m

E: Dのデータを定量化した。Asef^{+/+} マウスまたはAsef^{-/-} マウス各6-7匹から摘出した腫瘍組織に占める血管の割合の平均値とS.E.を示す。

F: Kaplan-Meier 生存曲線は皮下へB16メラノーマ細胞を移植されたAsef^{+/+} マウスまたはAsef^{-/-} マウス各11匹の結果による。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

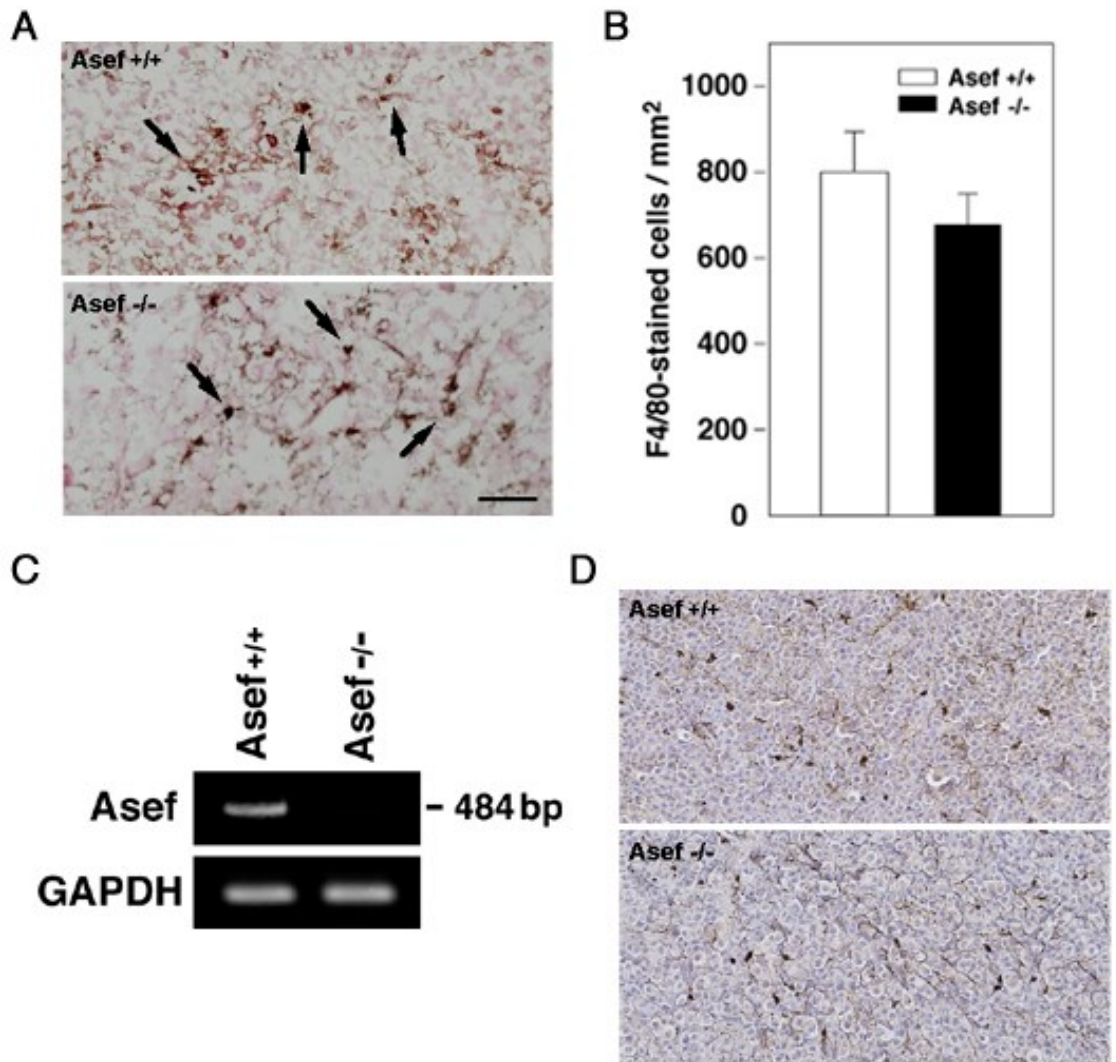


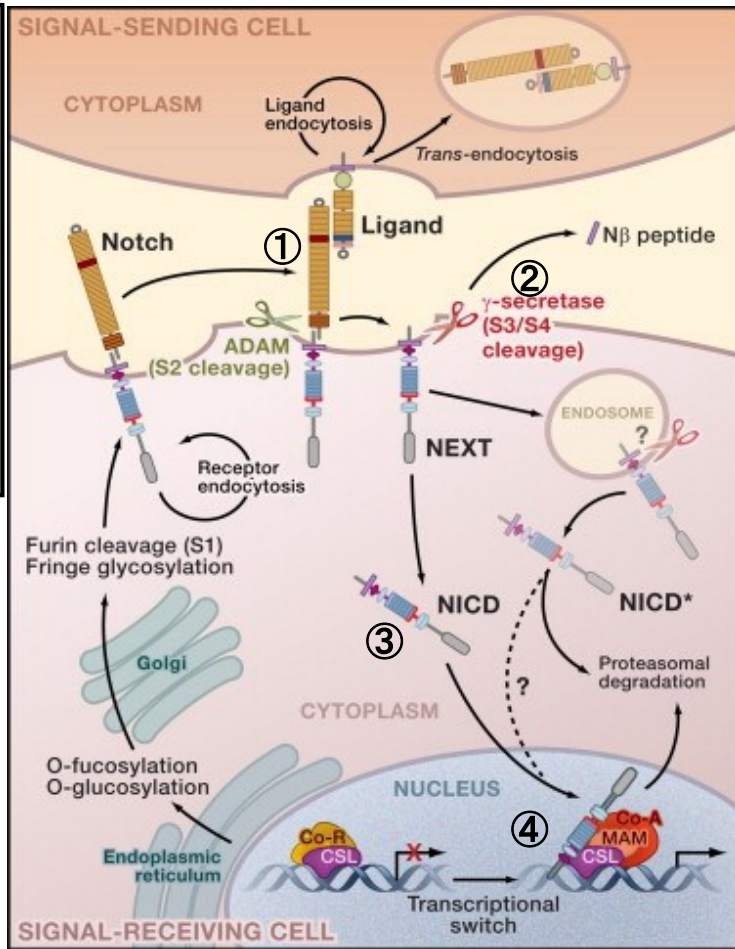
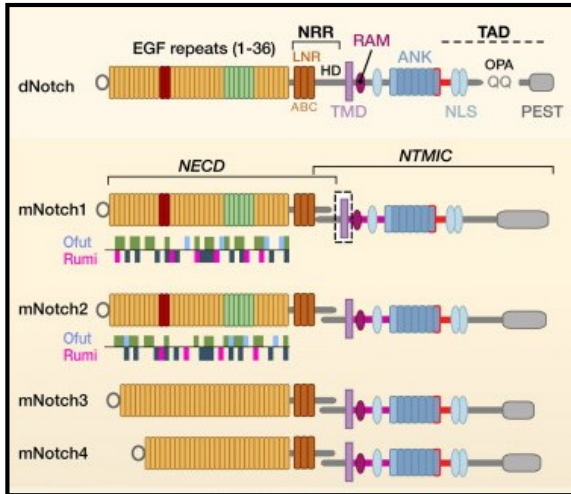
図9 腫瘍関連マクロファージと血管新生

A: Asef^{+/+} マウスまたはAsef^{-/-} マウスから抽出した腫瘍組織の切片を抗F4/80抗体(茶色)と対比染色用のnuclear fast red によって免疫染色を行った。矢印はF4/80ポジティブなマクロファージを示す。スケールバー50 μ m

B: Asef^{+/+} マウスまたはAsef^{-/-} マウスから抽出した腫瘍組織内に占めるマクロファージの量を定量化した平均値とS.E.M.を示す。

C: Asef^{-/-} マウスのマクロファージはAsefの発現を消失している。Asef^{+/+} マウスまたはAsef^{-/-} マウスから抽出したマクロファージからRNAを回収し、RT-PCRを行った。GAPDHをインターナルコントロールとした。

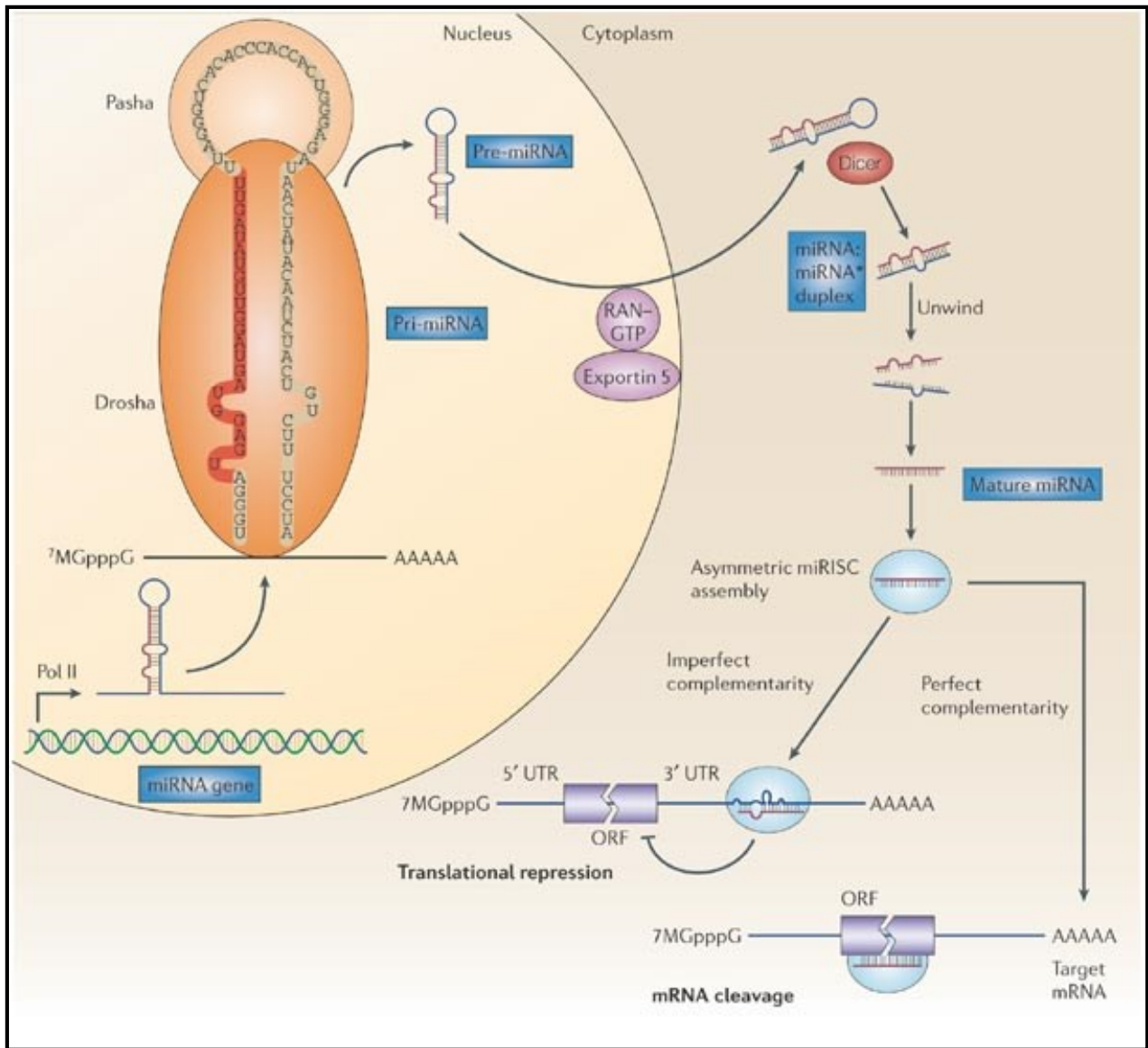
D: Asef^{+/+} マウスまたはAsef^{-/-} マウスから抽出した腫瘍組織の切片を抗VEGF抗体(茶色)と対比染色用のhematoxylinで染色した。



(Kopan R and Ilagan M 2010)

図10 Notch1-4受容体(マウス)のドメイン構造(左)とNotchシグナル伝達経路の概要図(右)

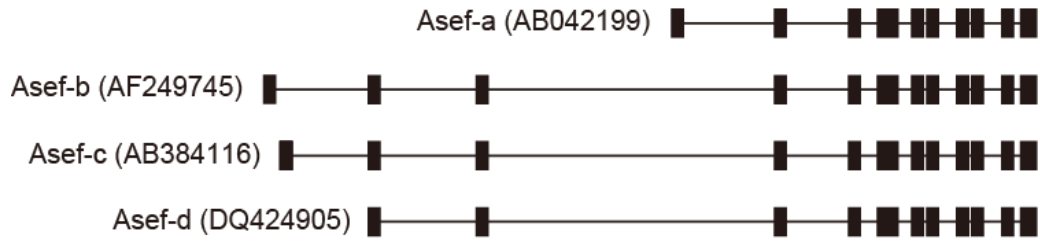
- ①Notch受容体にリガンドが結合すると、Notchの立体構造が変化しproteaseが作用できるようになる。
- ②γ-secretaseがNotchの膜貫通付近の領域を切断し、細胞内ドメイン(NICD)が切り離される。
- ③NICDは膜から開放され核へと移行する。
- ④核へ移行したNICDは標的遺伝子のプロモーター上のCSLと結合し、転写活性複合体を作ることによって、転写を促進する。



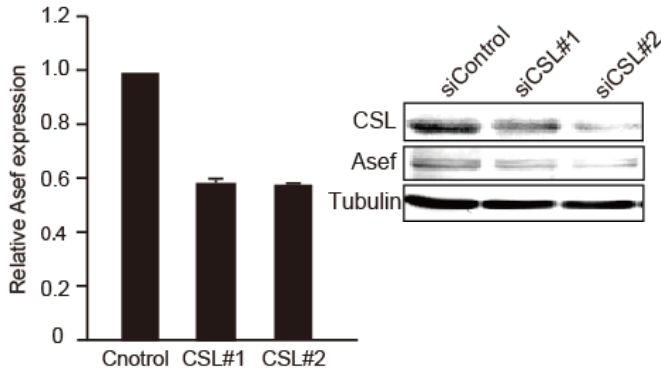
(Kerscher AE and Slack FJ 2006)

図11 microRNAの成熟過程の概略図

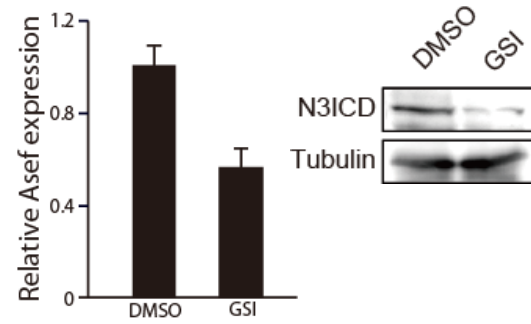
A



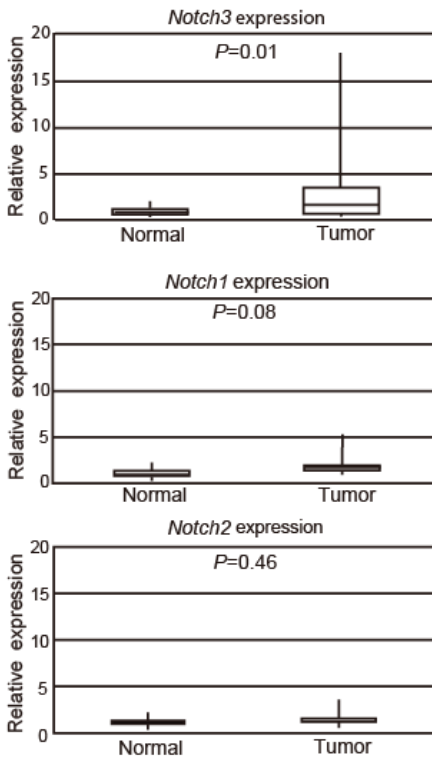
B



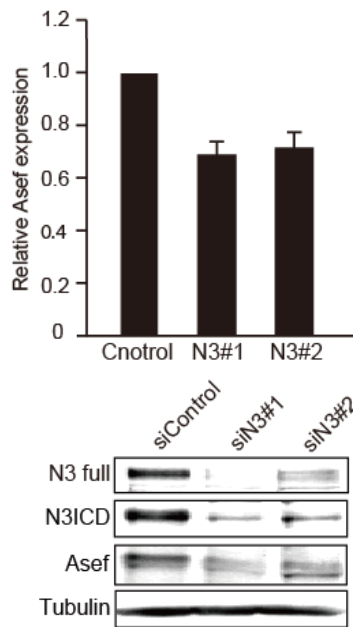
C



D



E



F

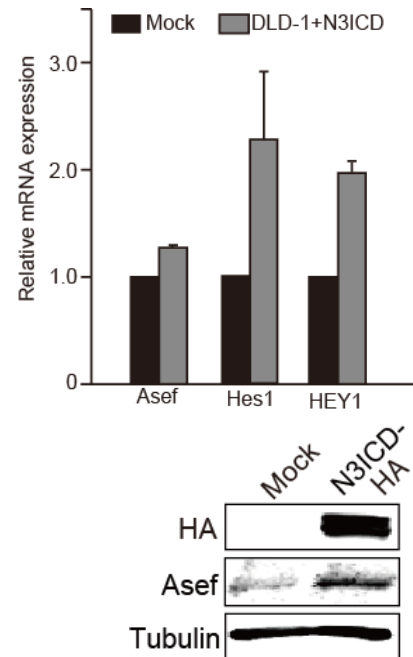


図12 NotchシグナルによるAsefの転写制御

A: Asefの4つのアイソフォーム。黒いボックスはexonを間はintronを示す。

B: DLD-1細胞にてsiRNA(2配列: #1, #2)によるCSLのノックダウンを行い、Real-Time PCRにてAsefの発現量への影響を比較した。相対定量を行うため、サンプル間の誤差の調整にはGAPDHを用い、controlに対する相対値でAsefの発現の変化を定量した。3回の独立した施行の相対値の平均とS.E.を示す。siRNAによるCSLタンパク質の発現抑制とそれに伴うAsefのタンパク質の発現をimmunoblotにより、抗CSL抗体と抗Asef抗体によって検出した。

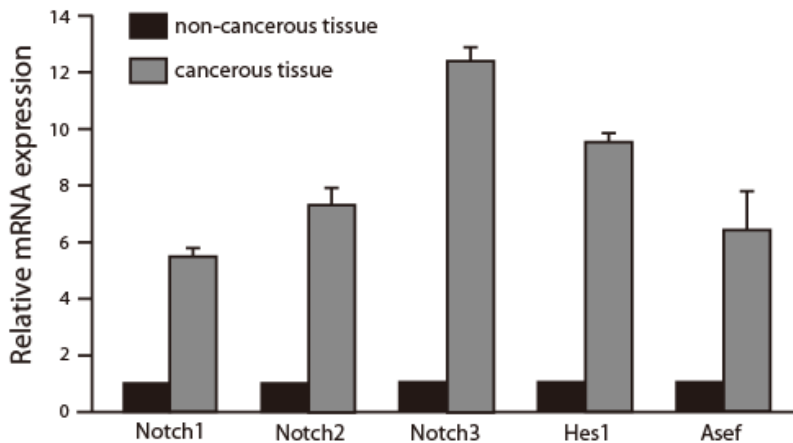
C: GSIとcontrolのDMSOを作用させたDLD-1細胞からRNAを抽出し、Real-Time PCRによってAsefの発現量を定量した(左)。3回の独立した施行の相対値の平均とS.E.を示す。抗Notch3抗体を用いたImmunoblotによりGSIの影響でNotch3が切断され、N3ICDがcontrolに比べて減少し、Notchシグナルが抑制されていることを示す(右)。

D: ヒト大腸癌の検体と周辺部の正常組織からRNAを抽出し、Notch1-3の発現量の相対値を比較し、box plotで示した。26検体を用いた定量の結果、正常組織と癌組織間でNotch3のみ発現に有意な発現差が確認された(上)。Notch1(中)、Notch2(下)は有意な発現差は確認されなかった。

E: DLD-1細胞にてsiRNA(2配列: #1, #2)によるNotch3のノックダウンを行い、Real-Time PCRにてAsefの発現量への影響を比較した。相対定量を行うため、サンプル間の誤差の調整にはGAPDHを用い、controlに対する相対値でAsefの発現の変化を定量した。3回の独立した施行の相対値の平均とS.E.を示す(上)。siRNAによるNotch3タンパク質の発現抑制とそれに伴うAsefのタンパク質の発現をimmunoblotにより、抗Notch3抗体と抗Asef抗体によって検出した。

F: DLD-1細胞にHAタグ付きN3ICDまたはMockの強制発現を行い、RNAを抽出し、Real-Time PCRによってAsefとNotchシグナルの下流遺伝子Hes1やHEY1の発現を定量した。相対定量を行うため、サンプル間の誤差の調整にはGAPDHを用い、controlに対する相対値で各遺伝子の発現の変化を定量した。3回の独立した施行の相対値の平均とS.E.を示す(上)。ImmunoblotによりHAタグ付きN3ICDの発現を抗HA抗体によって、Asefの発現を抗Asef抗体によって検出した(下)。

A



B

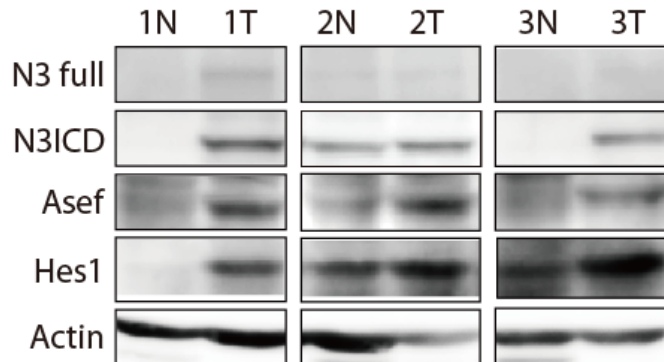


図13 APCMin/+マウスの小腸ポリープにおけるNotchの発現

A: APCMin/+マウスの小腸から近接したポリープ4-5個と同程度の体積の周辺正常組織を採取し、これらを正常-癌組織の一組とし、5組のサンプルからRNAを抽出した。Real-Time PCRによって正常組織に対するポリープでの各遺伝子の発現量の相対値を定量した。相対定量を行うため、サンプル間の誤差の調整にはGAPDHを用い、controlに対する相対値で各遺伝子の発現の変化を定量した。3回の独立した施行の相対値の平均とS.E.を示す。

B: タンパク質レベルでのNotch3と下流の標的遺伝子の発現量を定量するため、RNA回収時と同様に組織を採取しRIPA/バッファーにlysisし、抗Notch3抗体、抗Asef抗体、抗Hes1抗体を用いImmunoblotを行った。N:Normal, T:Tumor

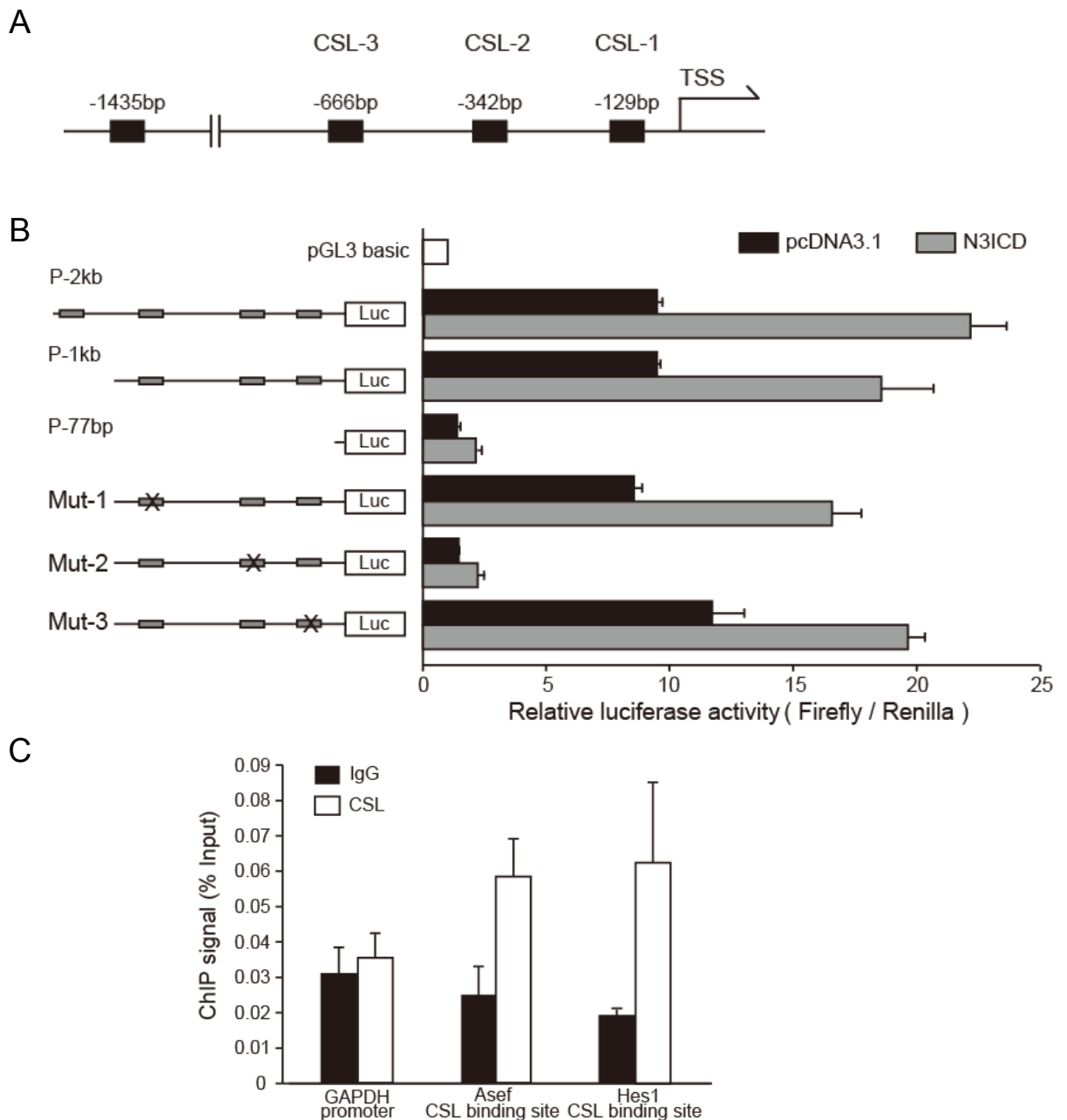


図14 Notch3/CSLによるAsefの転写活性

A: Asef-bのプロモーター上に存在するCSL結合モチーフの位置を示す(黒いボックス)。ボックスの上部には転写開始点からの距離を示している。TSS, Transcription Starting Site

B: 左側にレポーターコンストラクトの概略図を示す。灰色のボックスはCSLの結合モチーフを示す。CaCo細胞はMock(pcDNA3.1)またはN3ICDをトランスフェクションし、24時間後に各レポーターコンストラクトをトランスフェクションした。さらに24時間後に細胞をlysisし、Luciferase assayを行った。3回の独立した施行の相対値の平均とS.E.を示す。

C: CaCo2細胞は固定後、RIPAバッファーでlysisし、sonicationによってchromatinを破碎し、抗CSL抗体または抗rabbit IgG抗体を用いたChIP assayを行った。GAPDHのプロモーターとHes1のプロモーターはそれぞれ、ネガティブコントロール、ポジティブコントロールとして用いた。

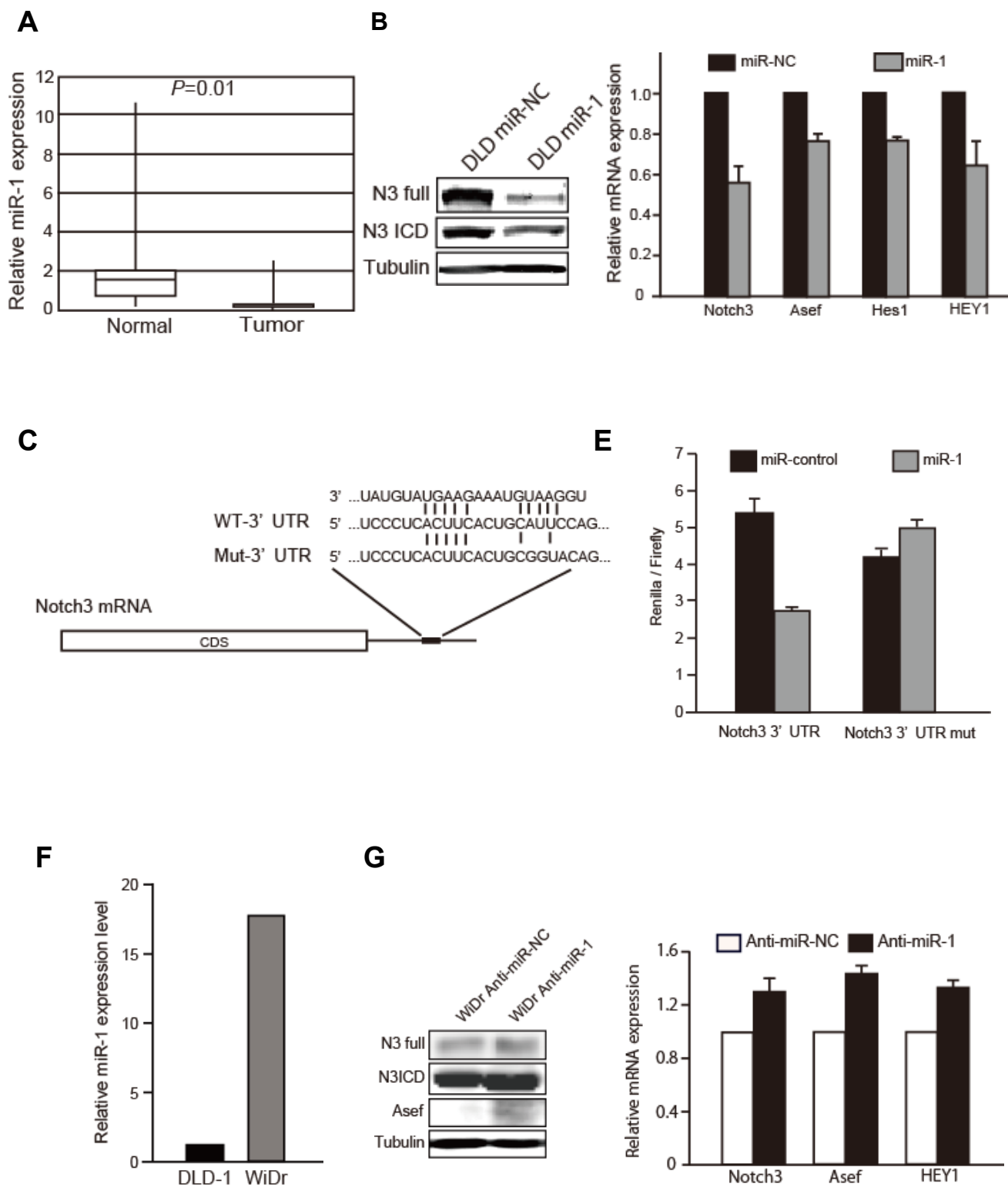


図15 miR-1によるNotch3の発現制御

A: small RNAを含む総RNAをヒトの大腸癌検体と周辺の正常組織から抽出し(n=26)、miR-1を定量するためにReal-Time PCRを行った。相対定量を行うため、サンプル間の誤差の調整にはU6遺伝子を用い、癌組織でのmiR-1の発現量を正常組織に対する相対値で定量した。

B: 合成oligo、miR-1 (Pre-miR-1)の強制発現はNotch3の発現を抑制する。DLD-1細胞へのPre-miR-Negative Control(NC) またはPre-miR-1をトランスフェクションし、RIPAバッファーにlysisした後、図中に示した抗体を用いてImmunoblotを行った(左)。また、Asefや標的遺伝子Hes1やHEY1のmRNAの発現をReal-Time PCRによって定量した(右)。

C: 予測されたmiR-1の結合シード配列、WT-3'UTR。miR-1が結合できないような変異を加えた配列、Mut-3'UTR。これらをRenilla luciferase遺伝子の下流に組み込み、次の実験を行った。

E: DLD-1細胞にレポータープラスミドとPre-miR-NCまたはPre-miR-1を同時にトランスフェクションした。48時間後に細胞を回収し、Luciferase assayを行った。

F: anti-sense miRNAを用いた抑制実験を行うため、miR-1の発現が高い細胞株をスクリーニングした。細胞株からsmall RNAを含む総RNAを抽出し、Real-Time PCRによってmiR-1の発現量を定量したところ、WiDr細胞はDLD-1に比べて~18倍ほど高いmiR-1の発現をしていることが示された。

G: WiDr細胞にanti-miR-Negative control (NC) またはanti-miR-1をトランスフェクションし、48時間後にRIPAバッファーにlysisし、Notch3タンパク質の発現量の変化をImmunoblotによって検出した(左)。

また、この時のNotch3やAsef、HEY1のmRNA量の変化を同様の条件下で培養した細胞から総RNAを回収してReal-Time PCRを行うことで定量した。相対定量を行うため、サンプル間の誤差の調整にはGAPDHを用い、controlに対する相対値で各遺伝子の発現の変化を定量した。3回の独立した施行の相対値の平均とS.E.を示す。

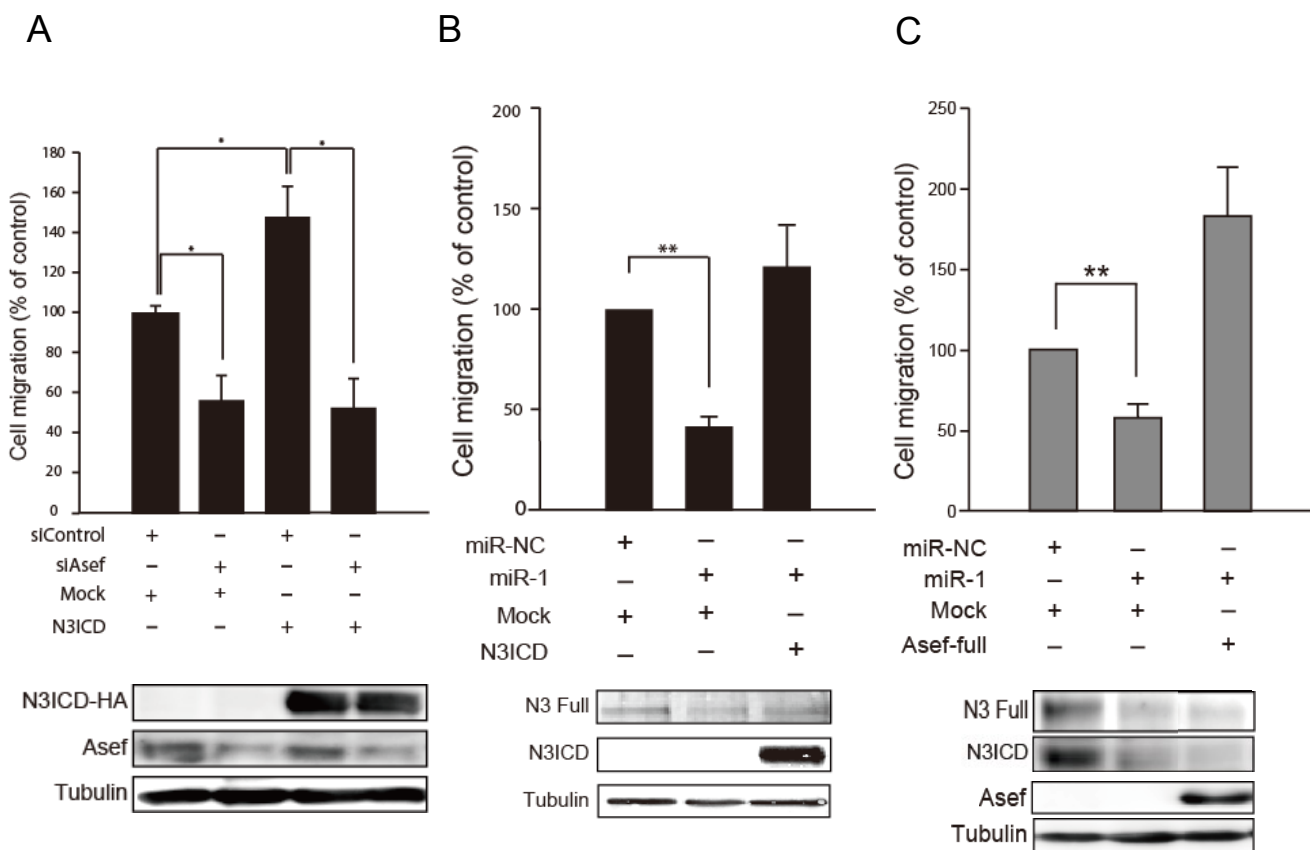


図16 miR-1-Notch3-Asef経路による癌細胞の運動制御

A: DLD-1細胞を 3.0×10^5 細胞/well (6well plate)播種し、24時間後に図中に示したような siRNAと発現ベクターコンストラクトをそれぞれ同時にトランスフェクションした。48時間後に細胞をtrypsin処理によって剥がし取り、 1.0×10^5 細胞/200 μ l mediumとし、Transwellのチャンバー内へ添加した。チャンバー底面のフィルターの裏面は予め 10μ g/mlのCollagen Type Iで一晩コートした。細胞は4時間運動させ、その後フィルターの裏面に移動した細胞をDAPI染色し、数を数えた。siRNAのcontrolとMockをトランスフェクションした細胞の運動度を100%とし、その他の細胞の運動度の変化を相対的に示した。3回の独立した施行の相対値の平均とS.E.を示している。

B-C: 6well plate へDLD-1細胞を 3.0×10^5 細胞/well 播種し、24時間後に図中に示したような siRNAと発現ベクターコンストラクトを同時にトランスフェクションした。48時間後に細胞をtrypsin処理によって剥がし取り、 1.0×10^5 細胞/200 μ l mediumとし、Transwellのチャンバー内へ添加した。細胞の運動はAと同様に行った。図は3回の独立した施行の相対値の平均とS.E.を示している。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

A

Transendothelial migration assay

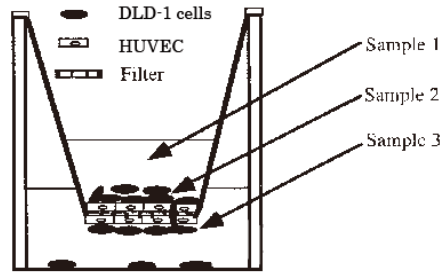
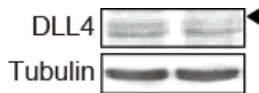
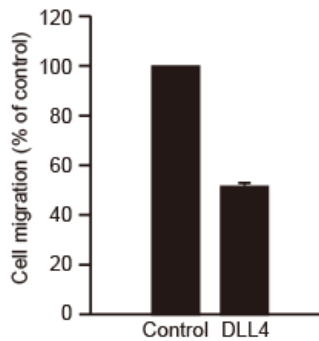
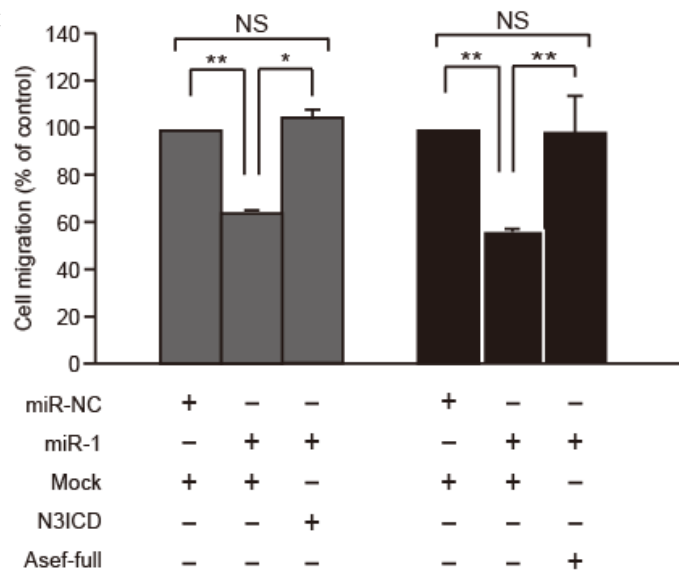
**B****C**

図17 Transendothelial migration assay

A: Transendothelial migration assay の概要図。

始めにSample 1のチャンバー内にHUVECを 2×10^5 細胞/200 μ l EBM-2播種し、下層のwellにもEBM-2を700 μ l加え、48時間培養する。その後、チャンバー内とwellのEBM-2を除きDLD-1細胞(Sample 2)を 1.0×10^5 細胞/200 μ l RPMI640をチャンバーに加える。WellにもRPMI640を加え、12時間培養する。HUVEC層を通り抜け、フィルターの下層に移動してきた細胞数を測定し、細胞の移動度を測定する。

B: HUVECに発現しているDLL4を抑制するとDLD-1細胞の運動能が低下する。HUVECにDLL4特異的なsiRNAを用いて48時間ノックダウンを行った後、Transendothelial migration assayを行った。3回の独立した施行の相対移動度の平均とS.E.を示している(上図)。DLL4に対するsiRNAによるDLL4たんぱく質の発現減少をimmunoblottingによって確認した。矢頭がDLL4たんぱく質のバンドを示す(下図)。

C: 大腸癌細胞株へのmiR-1の強制発現は、HUVECとの共培養においても、細胞の運動能を低下させる。DLD-1細胞へ、図中に示すような組み合わせでmiRと発現ベクターの強制発現を同時に行い48時間後にTransendothelial migration assayに用いた。3回の独立した施行の相対移動度の平均とS.E.を示している。

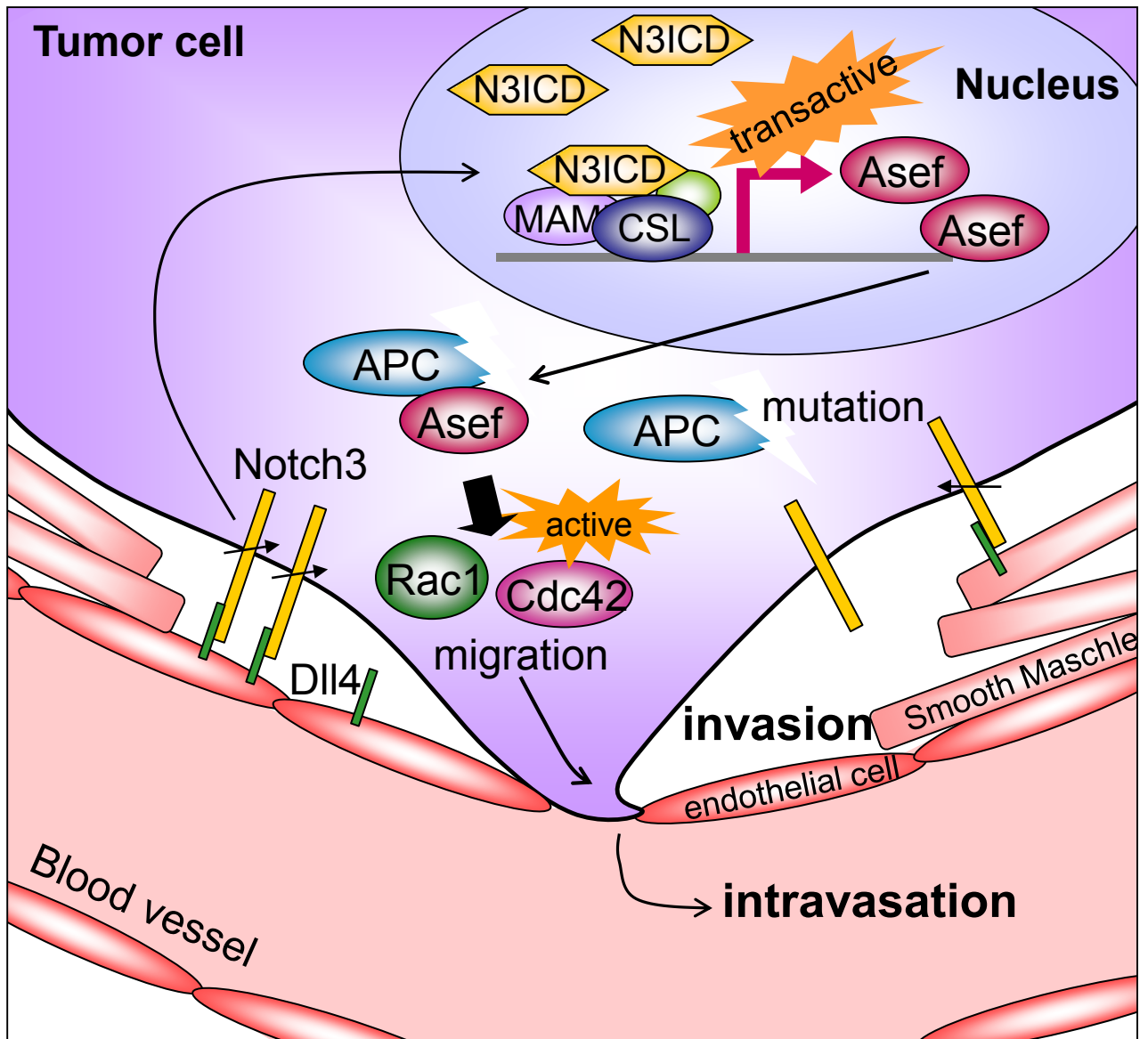


図18 miR-1-Notch3-Asef経路を介した大腸癌の悪性化機構の概略図