

論文の内容の要旨

論文題目: ASKファミリーキナーゼによる腫瘍形成過程におけるアポトーシスと炎症の制御

指導教員: 上妻 志郎 准教授

共同研究者代表: 一條 秀憲 教授 (東京大学大学院薬学系研究科)

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

生殖発達加齢医学専攻

氏名: 入山 高行

本文

多段階腫瘍形成過程において、アポトーシスはイニシエーション時のバリア機構として働き、炎症反応はプロモーション時において腫瘍形成を促進することは広く知られている。腫瘍形成過程におけるこの両現象は、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: 以下 ROS と略す) を含む外界の多様なストレス刺激により引き起こされるが、その細胞内ストレスシグナル伝達機構に関してはほとんど解明されていない。

c-jun N-terminal kinase (JNK) および p38 に集約されるストレス応答性 MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 経路は、多様なストレス刺激に応答して、アポトーシス誘導および炎症反応を含む細胞応答を調節する重要なシグナル伝達カスケードである。最近になって JNK、p38 の腫瘍形成過程への寄与に関しては解明が進んできてはいるものの、JNK、p38 がどのように上流からのシグナルを受け腫瘍形成を制御しているのかなど、その機構はほとんど分かっていない。

ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) は、JNK、p38 の上流に位置するストレス応答性 MAPK kinase kinase (MAP3K) であり、その活性制御機構を含めて最も解明の進んでいる

MAP3K の一つである。ASK1 は、ROS を介した細胞応答の制御、特にアポトーシスおよび炎症反応誘導に深く関与する分子であることが分かっている。ASK2 は、ASK1 の結合分子として同定された、ASK1 と非常に高い相同性を有する MAP3K であり、ASK1 と共に哺乳類において ASK ファミリーを構成している。ASK2 は、ASK1 と同様、JNK および p38 の上流に位置するストレス応答性 MAP3K であるが、ASK1 とのヘテロ複合体を形成してはじめて安定化され、活性が保持されることで機能する分子であることが分かっている。また ASK2 は、この ASK1 との複合体形成時において ROS により活性化し、ROS による JNK の活性化に関与することが示されているものの、その生理機能に関してはほとんど未解明であった。

本研究において私は、ストレス応答性 MAP3K レベルからの腫瘍形成の制御という新たな機構の存在を検討するべく、ASK1 欠損マウスおよび新たに作製した ASK2 欠損マウスを用いた腫瘍形成実験を行い、その結果を元に ASK ファミリーキナーゼによる腫瘍形成過程の制御機構を明らかとしたので報告する。

ASK1 は全身の臓器で一様に発現しているものの、ASK2 は皮膚や消化管、肺などの外界に接する上皮を有する臓器に多く発現しているというストレス応答性分子として興味深い発現分布を示した。私は皮膚における ASK2 に注目し解析を進めたが、ASK2 は皮膚の表皮層、特にケラチノサイトに多く発現していた。そこで、7,12-Dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA)をイニシエーター、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)をプロモーターとして投与する二段階皮膚腫瘍形成実験を、ASK2 欠損マウスを用いて施行した。その結果、ASK2 欠損マウスは、野生型 (WT)マウスと比較して顕著に皮膚腫瘍形成数が亢進していた。ASK2 は DMBA 刺激により活性化され、ASK2 欠損マウス由来のケラチノサイトにおいて DMBA 誘導性の JNK、p38 経路の活性化の減弱および表皮層における DMBA 誘導性のアポトーシスの抑制がみられた。そして、このケラチノサイトにおける DMBA 誘導性の ASK2-JNK/p38 経路の活性化およびアポトーシスには、DMBA 暴露により細胞内で産生される ROS が深く関与していた。また ASK2 は、環境中の代表的な発癌刺激である紫外線に対しても、紫外線照射により発生する ROS を感知してアポトーシス誘導に関

与していることが明らかとなった。つまり、イニシエーション時において ASK2 は、DMBA や紫外線などの発癌刺激による ROS を感知してケラチノサイトのアポトーシスを誘導することで腫瘍形成を抑制していることが明らかとなった。

さらに ASK2 は、種々のヒト癌細胞株、特に消化管由来の癌細胞株での発現が顕著に低下しており、組織レベルにおいても食道扁平上皮癌組織での発現の低下がみられた。このことは、ASK2 がヒトにおいても癌抑制遺伝子として機能している可能性を示唆している。

一方で、ASK1 欠損マウスにおいては、ASK2 タンパク質の発現がその不安定性のために著明に減少しており、DMBA 誘導性のケラチノサイトのアポトーシスも ASK2 欠損マウスと同程度に抑制されているにもかかわらず、DMBA/TPA 投与による皮膚腫瘍形成の亢進が観察されなかった。ASK1 および ASK2 の両者を欠損した二重欠損マウスにおいても皮膚腫瘍形成の亢進が観察されなかったことより、ASK2 欠損による腫瘍形成の亢進の表現型には ASK1 が必要であり、ASK1 はプロモーション時において腫瘍形成促進に寄与している可能性が示唆された。

TPA は強い炎症反応の誘導により細胞の増殖を惹起しプロモーターとして作用する薬剤であるが、ASK1 欠損マウスにおいて TPA の皮膚への投与による炎症反応の誘導、ケラチノサイトの増殖が顕著に抑制されていた。それに対して ASK2 欠損マウスは、皮膚での TPA への反応性に関して WT マウスとの間に差を認めなかった。また、TPA 塗布による皮膚での TNF- α や IL-6 といった腫瘍形成を促進する炎症性サイトカインの産生も、ASK2 欠損マウスと WT マウスとの間に差はないものの、ASK1 欠損マウスにおいてはその産生が抑制されていた。

碑細胞やマクロファージなどの炎症細胞において、ROS を介した ASK1 の活性化は自然免疫応答に非常に重要な役割を担うことが知られている。マクロファージのような炎症細胞は、ASK2 の発現量がケラチノサイトなどと比較して非常に低く、ASK1 が ASK2 に比して優位に発現している細胞である。そのため、マクロファージにおける ROS 応答 (ROS によるシグナル伝達) に際して、ASK1 は必須であるが、ASK2 はほとんど寄与していなかった。皮膚での TPA 投与による炎症反応の誘導にも ROS が深く関与していることは知られており、プロモーション時においてマクロ

ファージなどの炎症細胞における ASK1 は、おそらく ROS を介した機序により細胞増殖性のサイトカインの産生に寄与し、腫瘍形成過程でのプロモーションを促進していることが示唆された。

以上の結果をまとめると、多段階腫瘍形成過程において、イニシエーション時に上皮細胞（ケラチノサイト）における ASK2 は ASK1 と協調し、DMBA などの ROS 産生性の発癌刺激を感知してアポトーシスを誘導することで腫瘍形成を抑制している。一方、プロモーション時には、炎症細胞に多く発現した ASK1 が腫瘍増殖性のサイトカインの産生などを介して腫瘍形成を促進する。ASK2 はヒトの癌での発現の低下をみとめ、新規の癌抑制遺伝子である可能性も示唆された。本研究において得られた知見は、腫瘍形成過程でのアポトーシスと炎症反応の制御の重要性、ひいてはストレスシグナル伝達系としての MAPK 経路の重要性を認識させるだけでなく、ストレス応答性 MAP3K レベルからの腫瘍形成制御という全く新しい機構の存在を示すものである。ASK2 に関してはヒトの発癌過程への関与も推察され、ASK ファミリーキナーゼを中心としたシグナル伝達機構のさらなる解明が、ヒトの癌に対する予防、治療へとつながる可能性も期待できると思われた。