

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791405

研究課題名(和文)アダプタータンパク質ASC下流シグナルを標的とした新規大腸がん治療標的分子の同定

研究課題名(英文) Identification of the novel ASC-binding molecules as therapy targets for advanced colon cancer

研究代表者

藤井 千文 (FUJII, Chifumi)

信州大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10361982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がんは致死人口が高く、がん死の原因としては2番目となっている。本研究では、大腸がんを含む種々のがんの悪性化に伴い発現量の低下がみられるASCの下流シグナル分子の同定を試み、ASCを介したがん細胞増殖抑制の分子機構の解明と、新規大腸がん治療標的分子の同定を試みた。ASCを過剰発現させると増殖抑制が見られるがん細胞株で、種々の分子のノックダウンを行い、ASCを介した細胞増殖抑制に関与する分子の解析を行った。また、同じがん細胞株でASC結合分子の網羅的解析を行い、ASC結合候補分子を得た。その結果、ASCは細胞死誘導やシグナル伝達の調節等の方法で、がん細胞の増殖抑制を行っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Colorectal cancers have high rate of recurrence and is the second leading cause of death in Japan. ASC is an adaptor protein to form various inflammasomes, and has a crucial role for caspase-1 activation and secretion of IL-1b and IL-18 in innate immune cells. ASC has been also reported as an epigenetically silenced gene in several human cancers, including colon cancers. However, little information is available for the signaling pathway regulated by ASC in tumor cells. Here, in order to investigate the roles of ASC in cancer progression, we overexpressed ASC in two cancer cell lines. The cell proliferation was attenuated in ASC expressed cells. Using functional proteome approaches, we identified several candidate proteins involved in signal transduction, cell cycle, and apoptosis. Our results suggested that ASC might contribute to the suppression of cancer cell proliferation through a modulation of several signaling pathways.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：アダプタータンパク質 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

大腸がんは以前より欧米で多発していたが、近年日本でも食生活の欧米化に伴い増加傾向を示している。大腸がんは、早期に発見すれば、ほぼ 100%近くが完治する。また、遠隔転移が見られた場合にも、手術可能な時期であれば外科療法により完全治癒が望める場合があり、外科的治療が非常に効果的である。しかし、一般的には自覚症状がないため発見が遅れることも多く、がん死の原因としては 2 番目に挙げられる。また、大腸がんを早期に発見できる腫瘍マーカーはまだなく、腫瘍マーカーによる診断は困難となっている。従って大腸がんの治療・予防法の確立は急務である。

大腸がんの発症と治療に関する研究は世界的に広く行われており、本邦でも盛んに行われている。治療は外科療法が基本だが、進行がん治療や再発の予防においては化学療法の併用も必要となる。現在国内にて承認されている有効な抗がん剤は、フルオロウラシル等の DNA 合成阻害薬が主なものである。また、分子標的薬として、VEGF 阻害により血管新生を抑制するアバスタチンが 2007 年に、EGF レセプター阻害剤のセツキシマブが 2008 年に相次いで認可され、用いられるようになってきた。しかしながら、1) DNA 合成阻害や血管新生の抑制には重い副作用が伴うこと、2) セツキシマブは *KRAS* 遺伝子変異をもつ患者では効果が低く大腸がんでは *KRAS* 遺伝子変異の割合が 40%以上であること、などから、副作用の軽減によるクオリティ・オブ・ライフ (QOL) の向上と、より大腸がんの効果的な治療法の開発が望まれている。

大腸がんの発症メカニズムとしては様々な過程が報告されている。中でもポリープの形成による慢性炎症からの発がんが最も多く、本研究代表者もその分子メカニズムについて解析を行ってきた。また、近年のエピジェネティクス研究の進歩に伴い、大腸がんを含む多くのがん種で、遺伝子のメチル化により発現量が変化する遺伝子が次々と報告されている。本研究代表者らの研究グループでも、大腸がんにおいてその悪性度と相関して、遺伝子のメチル化に伴い、アダプタータンパク質 apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (以下 ASC) の発現量低下が見られることを報告した (Cancer Lett., 202, 101-108, 2003)。ASC は、抗がん剤でアポトーシスを誘導した白血病細胞内で形成された「スペック」と呼ばれる凝集塊に存在するタンパク質として、本研究代表者らの研究グループにより発見された分子である (J. Biol. Chem., 274, 33835-33838, 1999)。その後の研究から、ASC はインフラマソームの構成分子のひとつとして、種々の病原体センサータンパク質と会合し、IL-1 $\beta$  や IL-18 を活性・分泌型にする重要なアダプター分子であり、免疫・炎症反応の誘導や慢性

化にも重要な役割を果たしていることが明らかにしている (Nat. Rev. Immunol., 9, 287-293, 2009)。

## 2. 研究の目的

本研究代表者らの研究グループではこれまでに、ASC のがん細胞での働きに着目して研究を行ってきた。その結果、以下の成果を見出した。

(1) ASC の発現低下が認められるがん細胞株にヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤を用いることで、ASC の発現増加と細胞増殖の抑制を確認した。

(2) メチル化に伴う ASC の発現抑制が認められたヒト線維肉腫細胞株 HT-1080 に ASC を過剰発現させると、細胞増殖能やコロニー形成能、さらにはヌードマウスでの造腫瘍能が低下することを見出した。

(3) ASC による細胞増殖抑制効果は、これまでに知られている細胞周期抑制やアポトーシス誘導のメカニズムとは異なっていた。

以上の結果より、これまでに全く知られていない ASC による抗腫瘍効果の新しい分子機構が存在する可能性が示唆された。上述のように、ASC は、大腸がんの悪性化に伴い、その発現量の低下が見られることから、ASC の下流シグナル分子の同定を試み、ASC を介した細胞増殖抑制の分子メカニズムを解明することが、新規大腸がんの治療標的分子を同定することにつながると考え、本研究計画を立案した。

## 3. 研究の方法

(1) ASC による細胞増殖抑制の分子メカニズムの解析

① ASC の発現が認められないヒト線維肉腫細胞株 HT-1080、および、ヒト大腸がん細胞株 DLD-1 に野生型 ASC または種々の ASC 欠損変異体を、レトロウイルスベクターを用いて導入し、それぞれの細胞増殖抑制効果を検討した。

② これらの細胞を用いて、種々の細胞増殖抑制因子、細胞死に関与する分子のノックダウン細胞を作成した。①と同様の方法で ASC を発現させ、細胞増殖抑制効果を解析した。このことにより、ノックダウンを行った分子が ASC による細胞増殖抑制に関与しているか否かを考察した。

③ ASC 遺伝子を、レトロウイルスベクターを用いて導入したものに、種々の細胞死関連因子等の阻害剤を添加し、細胞増殖抑制効果を解析した。

上記①-③での細胞増殖抑制効果の評価は、次のように行った。ASC 遺伝子の下流に IRES 配列と GFP 遺伝子を持つレトロウイルスベクターをがん細胞株に導入した。このこと

により ASC と GFP をバイシストロニックに発現させることができる。この細胞を、遺伝子導入を行っていない親株細胞、すなわち GFP 陰性の細胞と、数日間混合培養の後、フローサイトメトリーにより、GFP 陽性細胞の比率を解析した。混合時の GFP 陽性細胞の割合に対する、培養後の GFP 陽性細胞の割合の比率を算出し、ASC による細胞増殖抑制効果として評価した。

(2) 細胞増殖抑制に関わる ASC 結合分子同定の試み

①質量分析を用いた ASC 結合候補分子の網羅的解析

HT-1080 細胞または DLD-1 細胞にレトロウイルスベクターを用いて野生型 ASC または ASC の欠損変異体を過剰発現させ、細胞抽出物の免疫沈降を行った。得られたタンパク質をトリプシン消化の後、LC-QTOF-MS を用いて網羅的に解析し、野生型 ASC または ASC の欠損変異体と共沈したタンパク質のスクリーニングを行った。

②免疫沈降法による ASC と結合候補分子との結合解析

上記①で得られた ASC 結合候補分子と myc タグとの融合タンパク質を ASC-Flag と共に 293T 細胞内で過剰発現させ、anti-Flag による免疫沈降を行い、両者の結合を解析した。さらに、種々のがん細胞を用いて、内在性の ASC と結合候補分子との結合を、免疫沈降法により解析した。

#### 4. 研究成果

(1) ASC による細胞増殖抑制の分子メカニズムの解析

ヒト線維肉腫細胞株 HT-1080 に ASC を過剰発現させると、細胞増殖能が低下したというこれまでの結果を踏まえ、HT-1080 細胞に野生型および種々の ASC 欠損変異体を導入し、それぞれの細胞増殖抑制効果を検討した。ASC は、N 末端側に Pysin domain (以下 PYD)、C 末端側に caspase-recruitment domain (以下 CARD) を持つ。そこで、PYD のみの変異体、および、PYD を一部欠損し CARD を含む変異体 (以下 ΔPYD) を作製し、細胞増殖抑制効果を解析した。その結果、野生型および PYD で細胞増殖抑制効果が見られ、ΔPYD では増殖抑制効果は見られなかった。また、ヒト大腸がん細胞株 DLD-1 でも同様の解析を行ったところ、野生型および PYD で細胞増殖抑制効果が見られ、ΔPYD では増殖抑制効果が見られないという同様の結果が得られた。DLD-1 細胞は、p53 および KRAS 遺伝子に変異を持つことから、ASC による細胞増殖抑制効果は、これらの遺伝子に変異がある場合でも有効であり、この分子メカニズムを明らかにすることは、現在大腸がん治療において問題となっている KRAS 変異を持つ場合の治療法確立にもつながることが示唆された。以後の細胞増

殖抑制機構の解析には、モデル細胞として主に HT-1080 を用いた。

はじめに、細胞周期制御因子である p53、p21 の ASC による細胞増殖抑制への関与を調べるため、これらのノックダウン細胞を作製し、ASC の発現による細胞増殖への影響を解析した。その結果、いずれのノックダウン細胞においても、ASC による細胞増殖抑制効果に差は見られなかった。PYD 変異体についても同様の結果が得られた。HT-1080 細胞は、野生型 p53 を発現しているが、p53 ノックダウン細胞においても ASC の発現により細胞増殖抑制効果が見られたという結果は、p53 に変異がある DLD-1 細胞での結果と矛盾しないものであった。以上の結果より、ASC による細胞増殖抑制には、p53-p21 経路は関与していないことが示唆された。

次に、ASC による細胞増殖抑制に細胞死が関与しているか否かを調べるため、培養系にカスパーゼ阻害剤 z-VAD-fmk またはネクロシス阻害剤 Necrostatin を添加し、解析を行った。その結果、Necrostatin は ASC による細胞増殖抑制に影響を及ぼさなかったが、z-VAD-fmk の添加により、ASC による細胞増殖抑制が、ほぼ完全に阻害された。しかしながら、PYD による細胞増殖抑制は、z-VAD-fmk による阻害を受けなかった。以上の結果から、1) ASC による細胞増殖抑制はカスパーゼに依存した細胞死に起因していること、2) PYD 変異体による細胞増殖抑制のメカニズムは野生型のものとは異なる、ことが明らかとなった。そこで、野生型 ASC と PYD 変異体とを分けて、さらなる解析を行った。

ヒトでは 14 種のカスパーゼが報告されているが、ASC による細胞死誘導がどのカスパーゼに依存しているのかを解析するため、種々のカスパーゼのノックダウン細胞を作成した。得られた細胞に ASC を過剰発現させ、細胞増殖抑制効果を解析した。これまでに、ASC はカスパーゼ-1 と会合し、活性化することが報告されているが、カスパーゼ-1 をノックダウンした際には、ASC による細胞増殖抑制効果に差は認められなかった。さらに、培養系にカスパーゼ-1 の特異的阻害剤 z-YVAD-fmk を添加した場合にも ASC による細胞増殖抑制効果に差が見られなかったことから、これまでに ASC による細胞死との関与が報告されていないカスパーゼが、この系での細胞死に関与している可能性が示唆された。最近になって、ASC と複合体を形成したカスパーゼ-1 が、切断を受けずに立体構造を変化させることによってカスパーゼ-7 との複合体を形成し、その結果カスパーゼ-7 の活性化が起こり、ピロプトーシスと呼ばれる細胞死を誘導することが報告された (Nat. Immunol., 13, 343-351, 2012)。そこで、同様の方法で、ASC が誘導する細胞死へのカスパーゼ-7 の関与を解析したが、カスパーゼ-7 のノックダウンは、ASC による細胞増殖抑制に影響を及ぼさなかった。さらに、アポト

ーシスの主要な実行因子として知られるカスパーゼ-3 についても同様にノックダウン細胞を作製し、解析を行ったが、この場合も ASC による細胞増殖抑制に差は認められなかった。他のカスパーゼを介する細胞死誘導経路としては、ミトコンドリア経由のシグナルによりカスパーゼ-9 が活性化される経路が考えられた。非常に興味深いことに、カスパーゼ-9 をノックダウンした場合には、ASC による細胞増殖抑制が阻害され、同じ培養条件下でウェスタンブロットティングによる解析を行ったところ、カスパーゼ-9 の切断が検出された。以上の結果より、HT-1080 細胞では、ASC による細胞死がカスパーゼ-9 を介して引き起こされることが明らかとなった。今後、ASC からカスパーゼ-9 による細胞死へとつながる分子メカニズムをより詳細に解析することにより、新たながん治療の標的分子の同定に繋げることができると考えている。

## (2) 細胞増殖抑制に関わる ASC 結合分子同定の試み

上述のように、PYD のみの変異体による細胞増殖抑制のメカニズムは野生型のものとは異なるという結果が得られたことから、ASC の PYD を介した下流シグナル分子もまた、新たな大腸がん治療の標的分子となりうると考えた。そこで、ASC の PYD 結合タンパク質の同定を試みた。DLD-1 細胞に、レトロウイルスベクターを用いて ASC-Flag、PYD-Flag または  $\Delta$  PYD-Flag 融合タンパク質を発現させ、細胞抽出物の anti-Flag 抗体による免疫沈降を行った。得られたタンパク質の LC-QTOF-MS による包括的解析を行い、ASC-Flag、PYD-Flag には結合するが  $\Delta$  PYD-Flag には結合しないタンパク質を選別し、PYD と特異的に結合する分子を同定した。その結果、約 100 種のタンパク質が得られた。これらの中には細胞増殖、シグナル伝達、タンパク質合成、細胞骨格の形成に関わるものが含まれていた。また、がん細胞で特異的に発現が亢進することが報告されているタンパク質も含まれていた。さらに、HT-1080 細胞でも同様に網羅的解析を行い、約 50 種の PYD 結合候補タンパク質が得られた。得られた分子群を両者で比較したところ、共通のタンパク質が約 10 種含まれていた。これらには、細胞増殖への関与が報告されている分子、タンパク質合成に関与する分子、タンパク質分解過程に関与する分子、細胞骨格の形成に関与する分子が含まれていた。これらのタンパク質は、ASC の PYD ドメインと特異的に結合していると考えられた。

得られた PYD 結合候補分子のうち、RNA ヘリカーゼ DDX5 について、さらに解析を行った。293T 細胞に ASC と DDX5 を共発現させ、免疫沈降法により ASC と DDX5 との結合を調べたところ、これらの結合は認められなかった。そこで、293T 細胞には ASC と DDX5 との結合に必要な因子が存在していない可能性を考え、ASC (全長)、PYD または  $\Delta$  PYD と DDX5

を HT-1080 細胞で共発現させ、免疫沈降法により結合を解析したが、これらの結合は認められなかった。以上の結果から、今回のスクリーニングで得られた約 10 種の PYD 結合タンパク質のうち、少なくとも DDX5 は ASC による細胞増殖抑制には関与しないことが明らかになった。今後、残りの PYD 結合候補分子についても詳細な解析を行う必要があると考えている。

本研究代表者の研究グループでは、これまでに、単球系白血病細胞株を用いて ASC 結合タンパク質の解析を行ってきた。その結果と今回の結果を比較し、再現性が得られたもののうち 2 種を ASC 結合候補分子として、さらに解析を行った。

293T 細胞に ASC と RNA ヘリカーゼ DDX3X を共発現させ、免疫沈降法により ASC と DDX3X との結合を調べたところ、これらの結合は認められなかった。さらに DDX5 の場合と同様に、ASC (全長)、PYD または  $\Delta$  PYD と DDX3X を HT-1080 細胞で共発現させ、免疫沈降法により結合を解析したが、これらの結合は認められなかった。今回用いた免疫沈降の条件では、ASC と 2 種の RNA ヘリカーゼとの結合は確認できなかったが、プロテオーム解析により、ASC 結合候補分子として複数の RNA ヘリカーゼが得られたことから、DEAD box などの RNA ヘリカーゼに共通のモチーフ構造を持つ分子が ASC と複合体を形成している可能性が考えられる。

これとは別に、MAP キナーゼシグナル伝達の足場タンパク質として知られる IQGAP1 が ASC 結合候補分子として得られた。これまでと同様に、293T 細胞に ASC と IQGAP1 を過剰発現させ、免疫沈降法により両者の結合を解析したところ、ASC と IQGAP1 の結合が認められた。次に、種々のがん細胞株を用いて、内在性の ASC と IQGAP1 の結合を免疫沈降法により解析した。その結果、現在までに 2 種のメラノーマ細胞株において内在性の ASC と IQGAP1 の結合が認められた。しかしながら、ASC と IQGAP1 両者を発現している大腸がん細胞株 HT-29 では、これらの特異的な結合は検出できなかった。また、ASC を発現していないが IQGAP1 を発現している DLD-1 細胞に ASC を過剰発現させ、これらの結合を解析したが、結合は検出できなかった。以上の結果から、ASC と IQGAP1 の結合もしくは複合体の形成は、がん種または細胞種によって異なっている可能性が考えられた。さらに、内在性の ASC と IQGAP1 の結合が認められたメラノーマ細胞株で ASC をノックダウンしたところ、Erk のリン酸化の亢進が認められた。IQGAP1 は、Raf、MEK、Erk と結合し、このことにより Ras からのシグナル伝達を行う足場タンパク質として働くことが知られている。今回の結果を総合して考えると、ある種のがん細胞では、ASC が IQGAP1 に結合することにより、このシグナル伝達カスケードを調節している可能性があると考えられる。IQGAP1 は大腸がん

高発現していることが報告されていることから、今後、さらに他の大腸がん細胞株でのASCとIQGAP1の結合を解析し、その結合部位や、MAPキナーゼシグナル伝達への関与を解析することにより、新しい大腸がん治療法の開発につながるものと期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計10件)

- ① 松村富穂、藤井千文、谷口俊一郎、肥田重明, Actin binding protein fascin1 regulates innate immune responses in tumor cells, 日本免疫学会総会・学術集会, 平成25年12月11日, 幕張
- ② 藤井千文、松村富穂、伊藤賢祐、肥田重明、谷口俊一郎, がん細胞でのASC発現低下は細胞運動能を亢進させる, 第72回日本癌学会学術総会, 平成25年10月3日, 横浜
- ③ 伊藤賢祐、北沢将人、藤井千文、肥田重明、谷口俊一郎, 細胞間相互作用を介したASC依存的な腫瘍抑制機能, 第72回日本癌学会学術総会, 平成25年10月3日, 横浜
- ④ 藤井千文、肥田重明、谷口俊一郎, ASCによるがん細胞運動制御機構の解析, 第22回日本がん転移学会学術集会・総会, 平成25年7月11日, 松本
- ⑤ 肥田重明、藤井千文、北沢将人、松村富穂、岡田なぎさ、谷口俊一郎, ASCによる生体の恒常性維持と腫瘍増殖抑制機構の解析, 第22回日本がん転移学会学術集会・総会, 平成25年7月11日, 松本
- ⑥ 松村富穂、藤井千文、肥田重明、谷口俊一郎, がん細胞におけるfascin1のRIG-Iシグナル抑制機構の解析, 第22回日本がん転移学会学術集会・総会, 平成25年7月11日, 松本
- ⑦ 藤井千文、松村富穂、伊藤賢祐、北沢将人、肥田重明、谷口俊一郎, がん細胞におけるASCと細胞運動能の相関性の解析, 第85回日本生化学会大会, 平成24年12月15日, 福岡
- ⑧ 松村富穂、藤井千文、谷口俊一郎、肥田重明, Involvement of fascin in immune responses through inflammasome activation, 日本免疫学会総会・学術集会, 平成24年12月6日, 神戸
- ⑨ 伊藤賢祐、北沢将人、藤井千文、肥田重明、谷口俊一郎, がん細胞におけるASCの新規腫瘍抑制機能, 第71回日本癌学会学術総会 平成24年9月21日, 札幌
- ⑩ Chifumi Fujii, Shigeaki Hida, Masato Kitazawa, Kensuke Ito, and Shun'ichiro Taniguchi, Potential involvement of ASC in cancer progression and metastasis, 14th International Biennial Congress of

the Metastasis Research Society, 平成24年9月4日, オーストラリア

[その他]

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/department/doctor/grdkarei/i-bunshishuyo/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤井 千文 (FUJII, Chifumi)  
信州大学・医学系研究科・助教  
研究者番号: 10361982