

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06831

研究課題名(和文) TGF-シグナル因子Smadのスキルス胃がんにおける結合部位のダイナミズム

研究課題名(英文) Changes in the binding regions of Smads downstream of TGF-beta signaling in diffuse type gastric cancers

研究代表者

鯉沼 代造 (Koinuma, Daizo)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：80375071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：難治がんの一つスキルス胃がんにおいてはtransforming growth factor- (TGF-)ファミリーのサイトカインの病態への深い関与が明らかになっている。研究代表者らはこれまでの検討によりそのシグナルおよび下流の転写調節機構は細胞種により大きく異なることを報告してきた。そこで本研究ではTGF-シグナルの転写因子Smad2/3の結合部位データを用いて、その経時的変化や他のがんとの比較により病態に関わる分子機構を明らかにすることを目的とした。その結果ある標的遺伝子の発現が患者予後に与える影響が他のがんとは異なること、この遺伝子が細胞運動の抑制に働いていることなどを見出した。

研究成果の概要(英文)：Cytokines of transforming growth factor-beta (TGF-beta) play important roles in the pathogenesis of diffuse type gastric cancers. We previously reported that TGF-beta and the binding sites of its downstream Smad2/3 transcription factors are differentially regulated in different types of the cells. We here analyzed our ChIP-seq data of Smad2/3 obtained from several diffuse type gastric cancer cell lines to reveal its regulatory mechanisms. Through comparison with the Smad2/3 binding data of the other cells, we identified a target gene of TGF-beta whose expression was differentially correlated with the prognosis of patients with gastric cancer. We also found that this target gene regulated cellular motility, suggesting its roles in the progression of cancers.

研究分野：分子病理学・シグナル伝達・癌

キーワード：シグナル伝達 癌 転写因子 TGF-beta ChIP-seq スキルス胃がん

1. 研究開始当初の背景

(1) がん治療法開発のための精力的な取り組みにもかかわらず、未だ治療に難渋するがん腫が存在する。スキルス胃がんは若年女性に好発し、治療の現状の打開が切望されている、こうした難治がんの一つである。一方でがんの病態理解のための分子生物学的な研究は、近年のゲノムレベルでの網羅的な融合遺伝子・変異遺伝子の同定をはじめ、合理的な分子標的薬開発へと実を結びつつある。

(2) スキルス胃がんにおいては Transforming growth factor- (TGF-)ファミリーのサイトカインの病態への深い関与が明らかになっている。がん細胞における TGF- シグナルは標的遺伝子群の発現を介してがんの間質細胞に関与し、スキルス胃がんの特徴的で且つがん都合のよいがん微小環境形成を抑制し、またがん幹細胞様の形質を持ち抗がん剤耐性・再発に関わる一部の細胞に対しても抑制的に働くことが明らかになっている。

(3) 最近の The Cancer Genome Atlas (TCGA) や本邦からの次世代シーケンサーを用いた胃がん患者検体の解析報告では新たに RhoA の高頻度変異などが見いだされる一方で、TGF- 経路を含む多様な遺伝子の変異が明らかになっている。ここで重要なことは TGF- は数多くの他のシグナル経路と相互に調節をしていることである。そしてこれらの変異がもたらす影響が十分に明らかになったとは言いがたい。

(4) 研究代表者はこれまでに高密度ゲノムタイリングアレイや ChIP-sequencing による転写因子結合部位と標的遺伝子の同定手法を活用して、TGF- シグナルの細胞内伝達分子・転写因子である Smad2/Smad3 (Smad2/3) や Smad4 の結合部位を網羅的に同定、報告してきた。結合部位に高頻度に存在するモチーフから Smad2/3 の作用を修飾する因子 ETS1 や TFAP2A の役割を発見した。さらに肝臓がん細胞株での結果との比較により、Smad2/3 結合部位が細胞種によって大きく異なること、肝細胞特異的な制御分子として HNF-4 があることを報告した。また肝臓がん細胞における Smad2/3 結合部位に Myc 結合配列が濃縮していることも見いだされ、がん細胞に特異的な Smad2/3 結合・機能修飾プロセスの存在が示唆された。肺腺がんもまた TGF- が強く病態に関わることが分かっているが、TGF- による肺腺がん細胞の上皮間葉転換 EMT が組織特異的な転写因子で患者予後に関わる TTF-1 によって抑制されることに着目した TTF-1 と Smad3/4 の ChIP-seq による解

析では、そのがん腫に特異的な制御機構を新たに同定している。また同様の手法を用いて TGF- ファミリーの一つ BMP の下流因子 Smad1/Smad5 についても、結合部位には細胞種によって違いがあることが明らかになった。こうした背景から、スキルス胃がんにおいても特異的な TGF- -Smad シグナルの制御機構が存在するものと考えられる。

(5) 以上の背景から、スキルス胃がんにおいても未だ明らかになっていない、がん腫に特徴的かつ重要な TGF- シグナルに対する他経路からの転写制御機構が存在するものと考えられる。

2. 研究の目的

上述のようにスキルス胃がんにおいては TGF- ファミリーの病態への深い関与が明らかになっている。研究代表者はハイスループットシーケンシングを用いたシグナル伝達・転写制御解析を行うことで、スキルス胃がん細胞特異的な TGF- 下流因子 Smad2/3 の結合部位の *in vitro* 及び *in vivo* での同定に成功しており、本研究では TGF- 刺激後の経時的な Smad2/3 結合部位の変化とマウス腫瘍移植モデルでの Smad2/3 結合部位の特徴に着目し、スキルス胃がんを観察される TGF- の各種作用が如何なる機構で発現しているか、俯瞰的な視野から真に重要な制御因子・経路を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、研究代表者がこれまでの検討で取得した、抗悪性度のスキルス胃がん細胞株を用いた抗 Smad2/Smad3 (Smad2/3) 抗体によるクロマチン免疫沈降-シーケンシング法 (ChIP-sequencing 法) による網羅的な結合部位情報を基本情報として解析に用いた。

in vitro での網羅的かつ経時的 Smad2/3 結合部位情報によるシグナル制御機構探索では、抗悪性度のスキルス胃がん細胞に TGF- 刺激を行い 1.5 および 24 時間後の Smad2/3 ChIP サンプルを取得し、次世代シーケンサーを用いて結合部位の DNA 断片を取得してゲノムにマッピングし peak call を行って、FDR 5% での有意な結合部位を算出したものを用いた。本検討では 1.5 時間と 24 時間の Smad 結合データを用い、後述の *in vivo* での観察と合わせ Smad2/3 結合持続性の違いに着目して検討を行った。またこれまでに取得してきた正常上皮細胞での Smad2/3 結合部位と比較し、スキルス胃がん細胞に特異的な結合部位を併せて同定した。比較の結果、それぞれの群について、結合部位に濃縮して存在するモチーフ配列を MEME などを用いて *de novo* で計

算し、いかなる転写因子の特異的結合可能性があるか予測した。さらに TGF- 刺激による遺伝子発現変化について RNA-seq データの取得を行った。

マウス移植モデルの腫瘍サンプルを用いた *in vivo* での Smad2/3 結合部位の網羅的同定解析では、スキルス胃癌細胞の xenograft モデルを用いて得られた腫瘍組織から Smad2/3 の ChIP サンプルを取得済みであった。このデータを用いて結合部位の算出を行った結果、実に 8 割が *in vitro* には認められない領域であった。そこでこうした *in vivo* 特異的な結合部位におけるモチーフ解析を行うことで、その制御経路・制御因子の同定を試みた。また *in vitro* における Smad2/3 結合部位との比較では結合強度持続性のあるほど *in vivo* でも結合が維持される頻度が高いことから、Smad2/3 結合持続部位でのモチーフ解析を併せて行った。

こうして同定した制御因子候補群について shRNA による loss of function の検討を中心に、RNA-seq により遺伝子発現への影響について検討することとした。

また上記検討に用いたスキルス胃癌細胞と同じ患者由来の低悪性度、低腫瘍形成性のスキルス胃癌細胞株について RNA-seq を行い、比較を行った。また公開されている TCGA をはじめとする遺伝子発現・変異情報を取得して、Smad2/3 結合部位の制御因子・経路候補同定の一助とした。

上記の解析を通してスキルス胃癌細胞での TGF- シグナルが如何に *in vivo* で制御されているか、がん幹細胞としての形質やがん微小環境との相互作用などについて、その一端を明らかにすることを目指した。

4. 研究成果

(1) ChIP-seq で見いだされた経時的な Smad2/3 結合部位の変化について、結合部位のモチーフ解析とトランスクリプトーム解析を行った。また *in vivo* 特異的 Smad2/3 結合部位の塩基配列についてモチーフ解析、*in vitro* との比較を行った。これらの結果それぞれの条件においてより強く結合している可能性がある転写因子ファミリーを予測することができた。また追加の検討として、用いたスキルス胃癌細胞株と同一患者由来の低悪性度・低腫瘍形成性株の RNA-seq のデータ取得を行って比較解析した。

これらの解析データを踏まえて、よりスキルス胃癌に特徴的な制御機構を探るため、非スキルス胃癌細胞株との比較解析を行った。研究代表者らがこれまでに同定した複数の TGF- 標的遺伝子について、スキルス胃癌細胞と非スキルス胃癌細胞での発現について検討した。結果、ある標的遺伝子 C

の発現は、スキルス胃癌症例と非スキルス胃癌症例で、予後に与える影響が反対であることを見出した。このためこの遺伝子 C に特異的な siRNA や抗体を購入し、siRNA のノックダウン効率等を評価したうえで RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析を行った。

また標的遺伝子 C のがん種間での発現量比較とがんの諸形質に対する影響について検討を行った結果、この遺伝子の発現は非スキルス胃癌細胞や肺がん・乳がん・大腸がん細胞株などにおいても認められる一方で、スキルス胃癌をはじめ悪性度の高いがんで発現が顕著に抑制されていることが分かった。またこの遺伝子の発現を抑制すると、非スキルス胃癌細胞の運動能が上昇することが明らかになった。この影響は TGF- 刺激によりさらに顕著に認められた。

(2) 一方で Smad2、Smad3 結合部位のモチーフ解析に基づく検討では、スキルス胃癌細胞株から取得した RNA-seq データの解析により、*in vivo* での Smad2、Smad3 結合部位に特異的に算出されたモチーフ R に結合する転写因子の発現が、悪性株と低悪性度株間で必ずしも差が認められないことが明らかになった。また高悪性度株で選択的に発現して Smad2/3 のシグナルを制御する転写制御因子の同定を試みたものの、AP1 結合タンパクをはじめ過去に報告してきた Smad2/3 のコファクター以外に特徴的なものは見いだせなかった。またスキルス胃癌細胞の RNA-seq でのオントロジー解析の結果からは、スキルス胃癌細胞においても TGF- は細胞運動・浸潤能について促進的に働くことが示唆された。これはこの細胞でがん幹細胞性の維持機構や腫瘍微小環境に対する作用を通して TGF- がスキルス胃癌の進展に抑制的に働くとした過去の知見とは別のシグナルの側面を示唆するものになった。

これら本研究プロジェクトの検討内容を含む成果を国際学会で発表したほか、部分的に本研究を通して副次的に得られた成果を国内学会で発表した。

また本研究で得たサンプル、データを含めた変異遺伝子の探索検討を通して、副次的に脳腫瘍における新規遺伝子変異を同定し報告した。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

(1) Akiyoshi Komuro, Erna Raja, Caname Iwata, Manabu Soda, Kazunobu Isogaya,

Keiko Yuki, Yasushi Ino, Masato Morikawa, Tomoki Todo, Hiroyuki Aburatani, Hiromichi Suzuki, Melissa Ranjit, Atsushi Natsume, Akitake Mukasa, Nobuhito Saito, Hitoshi Okada, Hiroyuki Mano, Kohei Miyazono, Daizo Koinuma. Identification of a novel fusion gene HMGA2-EGFR in glioblastoma. International Journal of Cancer, 査読有, 142, 2017, pp. 1627-1639, doi: 10.1002/ijc.31179.

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) Daizo Koinuma. Genome-wide profiling of TGF-beta-related transcription factor footprints. TGF- meeting (国際学会), 2015 年, Uppsala (Sweden)

(2) Daizo Koinuma, Mayu Arase, Kazunobu Isogaya, Ryo Nakaki, Anna Mizutani, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Kohei Miyazono. Dynamics of chromatin accessibility during TGF- -induced EMT of Ras-transformed mammary gland epithelial cells. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

(3) Daizo Koinuma. Integrated analysis of transcriptional regulation by Smads. TGF- meeting (国際学会), 2017 年, Uppsala (Sweden)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://beta-lab.umin.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鯉沼 代造 (KOINUMA, Daizo)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 80375071

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし