

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20974

研究課題名(和文) 乳癌幹細胞の制御における抑制型Smadの機能と分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Roles and mechanisms of inhibitory Smads in the regulation of breast cancer stem cells

研究代表者

赤木 蓉子(勝野蓉子)(AKAGI, Yoko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：70771004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：TGF-betaによる上皮間葉移行(EMT)の誘導は、がんの浸潤や転移、がん幹細胞の産生を介してがんの進行に促進的に作用する。近年の研究で、メチルトランスフェラーゼによるタンパクのメチル化がタンパクの機能を定める重要な役割を持つことがわかってきている。本研究課題では、メチルトランスフェラーゼであるPRMT1とSmad7の相互作用がTGF-betaによるEMT誘導やがん幹細胞産生に必要であることを示し、その分子メカニズムを明らかにした。PRMT1の発現上昇とがんの進行が関連することも報告されており、この新規メカニズムの解明は、がんのより効果的な治療法の開発につながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Tumors are composed of different cell types including cancer stem cells (CSCs), their heterogeneous progeny and the stromal cells. In contrast to classical model of CSC differentiation, epithelial cancer cells are now considered to have differentiation plasticity. Understanding the signaling networks that control the differentiation plasticity is essential to target cancer cells.

The epithelial-to-mesenchymal transdifferentiation (EMT) is an essential process in development, and is reactivated in cancer cells to promote invasion, contribute to cancer stroma formation, generate CSCs and decrease sensitivity to anticancer drugs. TGF-beta signaling, which is often activated in carcinomas, drives EMT of carcinoma cells.

This study provides evidence that an Arginine methyltransferase PRMT1 promotes the TGF-beta-induced EMT and epithelial stem cell generation through the methylation of Smad7. This mechanism may provide a new treatment strategy to target CSCs.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：TGF-beta 上皮間葉移行 がん幹細胞 PRMT1 抑制型Smad

1. 研究開始当初の背景

上皮系のがんは、がん幹細胞や分化したがん細胞などを含む不均質ながん細胞と、線維芽細胞や免疫細胞、内皮細胞などの間質細胞を含む多種類の細胞から構成されている。このようながんの不均質性が、がんの治療を困難なものとする大きな要因となっている。がん幹細胞が多様ながん細胞に分化するという古典的な一方向のモデルと異なり、現在では、がん細胞の分化には可塑性があると考えられている。すなわち、がん幹細胞が分化して多種類のがん細胞を産生する一方で、分化したがん細胞の脱分化によりがん幹細胞が産生される。

乳がんなどの上皮系のがん細胞において、がん細胞の脱分化によるがん幹細胞の産生は、上皮系、間葉系の性質の可塑性と関係し、上皮間葉移行 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT) とよばれるプロセスと関連する。上皮細胞は、EMT を経て上皮系の形質と細胞間接着を失い、間葉系の形質を獲得し、運動、浸潤能を亢進させる。EMT は発生の段階で必須であり、また、がんにおいては浸潤能の亢進、がん幹細胞の産生、抗がん剤抵抗性の獲得を促すことでがんの進行を促進させる役割を持つ。

がん細胞の EMT と分化の可塑性は、がんの微小環境からのシグナルによって制御される。多くのがんでは、がんの微小環境において TGF-β の産生が亢進しており、TGF-β は強力な EMT 誘導因子として働き、がんの浸潤や転移、がん幹細胞の産生を促進する。TGF-β シグナルによるがん細胞の EMT と脱分化の分子メカニズムの詳細な解析は、より効果的ながん治療法の開発のために重要である。

TGF-β や BMP を含む TGF-β ファミリーのシグナルは 2 種類の受容体を介して細胞内へ伝達される。リガンドの結合により活性化された受容体は特異型 Smad (R-Smad) をリン酸化し、活性化する (図 1)。リン酸化された特異型 Smad は共有型 Smad である Smad4 と複合体を形成し、核内へと移行し転写を制御する。一方、抑制型 Smad である Smad6 と Smad7 は特異型 Smad の受容体への結合を阻害することにより特異型 Smad のリン酸化を阻害し、シグナルを負に制御する (図 1)。

近年の研究で、メチルトランスフェラーゼによるタンパクのメチル化がタンパクの機能を定める重要な役割を持つことがわかってきている。アルギニンメチルトランスフェラーゼである PRMT は、ヒストンのアルギニンをメチル化することで遺伝子発現をエピジェネティックに制御する一方で、ヒストン以外のタンパクのメチル化によりそれらの機能を制御する。PRMT のうち最も多く発現している PRMT1 は、ヒストンに加え、シグナル伝達分子を含む多くのタンパクをメチル化する。乳がんなどのいくつかのがんにおいて、PRMT1 の発現増加とがんの増殖、が

んの進行が関連することが報告されている。

申請者らの先行研究で、PRMT1 による Smad6 のアルギニンメチル化が、受容体からの Smad6 の解離とそれに伴う特異型 Smad のリン酸化による BMP シグナルの開始に必要であることを示した。また、PRMT1 による TGF-β 依存的な Smad7 のアルギニンメチル化も同様に TGF-β シグナルの開始に必要であることが示唆されている。TGF-β のシグナルは、乳がん細胞の EMT と脱分化を誘導することから、PRMT1 による Smad6、Smad7 のアルギニンメチル化が TGF-β による乳がん細胞の EMT とがん幹細胞の産生に重要な役割を持つことが示唆された。

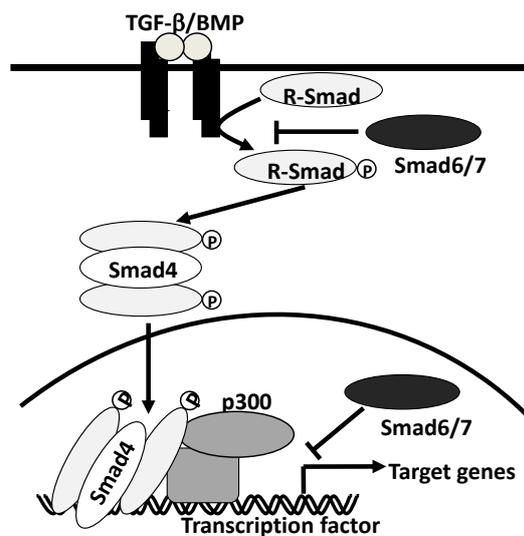


図1. TGF-β/BMPシグナル伝達メカニズム

2. 研究の目的

本研究では、TGF-βによる乳がん細胞の EMT と脱分化の誘導の分子メカニズムの詳細な解明のため、抑制型 Smad である Smad7 とアルギニンメチルトランスフェラーゼ PRMT1 の相互作用に注目した。PRMT1 による Smad7 のアルギニンメチル化の、TGF-β による EMT や幹細胞の制御における役割を明らかにすることを目的とした。この修飾の役割とその分子メカニズムを解析することで、EMT とがん幹細胞の分化を制御するシグナル伝達メカニズムの詳細を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TGF-βによる EMT の誘導とがん幹細胞の制御における Smad7 と PRMT1 の相互作用の役割

乳腺上皮細胞及び乳がん細胞を用い、TGF-βに誘導される EMT と幹細胞様の形質の獲得における PRMT1 の役割を検討した。ヒト乳腺上皮細胞株 HMLE と乳がん細胞株 HMLER の TGF-β刺激による EMT と幹細胞様の形質の誘導をモデルとした。PRMT1 のノックダウンの EMT と幹細胞様形質の獲得へ

の影響を検討した。EMT は、上皮マーカーと間葉マーカーの発現を qRT-PCR、Western blot、免疫染色を用いて調べることにより評価した。がん幹細胞のマーカーの発現は、Flow cytometry により CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup> 細胞の割合を調べることで検討した。幹細胞の形質を mammosphere の形成能を調べることにより検討した。がん幹細胞の形質は、寒天中での培養による sphere 形成能の検討、免疫不全マウスへの移植による腫瘍形成能の検討により解析した。

(2) PRMT1 による Smad7 アルギニンメチル化が、TGF-βシグナルと EMT を制御する分子メカニズムの解析

生化学的手法を用いて、PRMT1 による Smad7 のメチル化が、TGF-βシグナルを制御するメカニズムを明らかにした。精製タンパクを用いた実験、293T 細胞への PRMT1 や Smad7 の過剰発現を用い、メチル化アッセイ、共免疫沈降など生化学的な検討を行った。また、内因性の PRMT1 や Smad7 の機能と分子メカニズムについては、ヒト表皮角化細胞株 HaCaT の TGF-β刺激による EMT の誘導をモデルとして検討した。さらに、乳腺上皮細胞や乳がん細胞を用いて EMT と幹細胞様の形質の誘導を促進する分子メカニズムを明らかにした。

#### 4. 研究成果

(1) TGF-βによる EMT の誘導とがん幹細胞の制御における Smad7 と PRMT1 の相互作用の役割

TGF-βによって EMT が誘導される細胞であるヒト表皮角化細胞 HaCaT 細胞とヒト乳腺上皮細胞 HMLE 細胞を用いて、TGF-βシグナル伝達における PRMT1 の役割を検討した。HaCaT 細胞及び HMLE 細胞において、PRMT1 のノックダウンにより、TGF-β刺激に誘導される特異型 Smad である Smad2、Smad3 のリン酸化と標的遺伝子の転写誘導が阻害され、TGF-βシグナルの活性化に PRMT1 が必要であることが示唆された。

さらに TGF-βシグナルによって制御される現象である EMT と上皮細胞の脱分化における PRMT1 の役割を検討した。マウス乳腺上皮細胞株 NMuMG、ヒト乳腺上皮細胞株 HMLE、ヒト乳がん細胞株 HMLER を用いて解析を行った。TGF-βは、これらの細胞において、EMT を誘導し、運動・浸潤能を更新させ、がん細胞の脱分化とがん幹細胞の形質の獲得を促す。TGF-βで短時間刺激することにより、乳がん細胞株は一時的に間葉系と幹細胞の形質を獲得するが、TGF-βを除くとこの形質はもとに戻り、細胞は上皮系の性質を再獲得し、幹細胞の性質を失う。一方、乳がん細胞をさらに長時間 TGF-β存在下で培養することにより、間葉系の性質と幹細胞様の性質を安定化させることができ、TGF-βを除いても細胞は間葉系にとどまり、幹細胞様の形質

も維持される。間葉系、癌幹細胞様の形質が安定化された細胞においては、内因性の TGF-βシグナルとその下流のシグナルが活性化されている。このモデルシステムを用いて、PRMT1 のノックダウンを行い、PRMT1 が TGF-βに誘導される EMT とがん幹細胞の形質、腫瘍形成能の獲得に重要な役割を持つことを明らかにした。PRMT1 をノックダウンすることにより、TGF-βによる上皮マーカーの発現抑制と間葉マーカーの発現増強が阻害された。EMT による間葉系形質の獲得は、細胞の運動能の獲得、幹細胞様の形質の獲得と関連する。PRMT1 をノックダウンした細胞では、TGF-βによる細胞の運動能の亢進が抑制された。また、TGF-βによる EMT の誘導は、幹細胞様の形質の獲得と関連する。HMLE 細胞を TGF-β存在下で培養することにより、幹細胞のマーカーである CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup> の発現パターンを示す細胞集団の割合が増加する。PRMT1 をノックダウンした細胞では TGF-βによる CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup> 細胞の割合の増加が、阻害された。さらに、乳腺上皮細胞の幹細胞の形質を mammosphere の形成能を調べることにより検討した。PRMT1 をノックダウンすることにより、TGF-βによる mammosphere の形成能の上昇が抑制された。以上の結果から、PRMT1 は TGF-βによる EMT と幹細胞の形質の獲得の誘導に必要であることが示唆された。

(2) PRMT1 による Smad7 アルギニンメチル化が、TGF-βシグナルと EMT を制御する分子メカニズムの解析

先行研究で、PRMT1 が BMP シグナルの活性化に必要であることを報告し、BMP シグナルの活性化における PRMT1 の役割の分子メカニズムを明らかにしている。BMP 刺激によって、BMPII 型受容体 (BMPRII) に結合している PRMT1 が Smad6 をメチル化する。BMPI 型受容体 (BMPRI) に結合している Smad6 は、このメチル化を受けることにより BMP 受容体から解離し、そのことにより特異型 Smad である Smad1、5 のリン酸化が誘導される。(1) で明らかにしたように PRMT1 が TGF-βシグナルの活性化に必要であること、また、TGF-βシグナルは Smad7 によって抑制されることから、PRMT1 が Smad6 を介した BMP シグナル制御のメカニズムと同様のメカニズムで Smad7 のメチル化を介して TGF-βシグナルを制御するかどうかを検討した。

293T 細胞に過剰発現した Smad7 や HaCaT 細胞における内因性の Smad7 を用いたメチル化の検討により、BMP 刺激が PRMT1 による Smad6 のメチル化を誘導するのと同様に、TGF-β刺激が PRMT1 による Smad7 のメチル化を誘導するというを示した。さらに、in vitro のアッセイや、293T 細胞へのトランスフェクションを用いた実験により、PRMT1 が TGF-βII 型受容体 (TβRII) と結合しており、TGF-β刺激により TGF-βI 型受容体 (TβRI)

と T $\beta$ RII の複合体が形成されることで PRMT1 が受容体複合体にリクルートされ、Smad7 のメチル化を促した。このことから、BMP 刺激に誘導される BMPRI と RII の複合体形成によって、BMPRII に結合した PRMT1 が BMPRI に結合した Smad6 をメチル化するというモデルと同様のモデルが TGF- $\beta$  シグナルにおける PRMT1 による Smad7 のメチル化においても機能していることが示された。すなわち、TGF- $\beta$  刺激による T $\beta$ RII/T $\beta$ RI 複合体の形成によって、T $\beta$ RII に結合した PRMT1 が T $\beta$ RI に結合した Smad7 をメチル化することが明らかになった。

さらに、PRMT1 によってメチル化される Smad7 のメチル化サイトを同定し、PRMT1 によってアルギニンメチル化されない Smad7 変異体を作成した。この変異体を用いた実験と、*in vitro* でメチル化した Smad7 を用いた実験により、PRMT1 による Smad7 のメチル化によって、Smad7 の T $\beta$ RI からの解離が促され、受容体による Smad3 のリン酸化が促進されることを示した (図 2)。

HaCaT 細胞及び HMLE 細胞の TGF- $\beta$  による EMT の誘導において上記の PRMT1 を介したメカニズムが働いていることが明らかになった。これらの細胞において、PRMT1 のノックダウンにより TGF- $\beta$  による Smad3 のリン酸化と、Smad3 の直接の標的遺伝子の発現誘導が抑制された。また、TGF- $\beta$  刺激によって誘導される EMT のマスターレギュレーターである転写因子 Snail/Slug、ZEB1/2 の発現が PRMT1 のノックダウンにより抑制された。さらに、幹細胞の形質に重要な働きを持つ Nanog、POU5F1、KLF4 の TGF- $\beta$  による発現誘導が、PRMT1 ノックダウンにより阻害された。PRMT1 による Smad7 のメチル化が、TGF- $\beta$  による Smad3 の活性化と EMT や幹細胞の形質を制御する転写因子の発現誘導に必要であることが示された。

### (3) SETDB1 と Smad3 の相互作用の EMT とがんの悪性化における役割

さらに Smad とメチルトランスフェラーゼの相互作用の TGF- $\beta$  による EMT の誘導と幹細胞の産生における役割を解析していく過程で、ヒストンメチルトランスフェラーゼ SETDB1/ESET が Smad3 と相互作用することに着目した。TGF- $\beta$  による EMT の誘導と幹細胞の産生における SETDB1 と Smad3 の相互作用の役割とその分子メカニズムを解明した。乳腺上皮細胞と乳がん細胞の TGF- $\beta$  による EMT の誘導と幹細胞の産生のモデルにおいて、SETDB1 のノックダウンにより乳腺上皮細胞の TGF- $\beta$  による EMT と幹細胞の産生が促進した。さらに、乳がん細胞において SETDB1 をノックダウンすることにより、がん細胞の運動、浸潤が促進され、マウスへの移植モデルにおいて、肺転移が亢進した。このことから、SETDB1 は TGF- $\beta$  による EMT とがん幹細胞の産生、がん細胞の浸潤を抑制

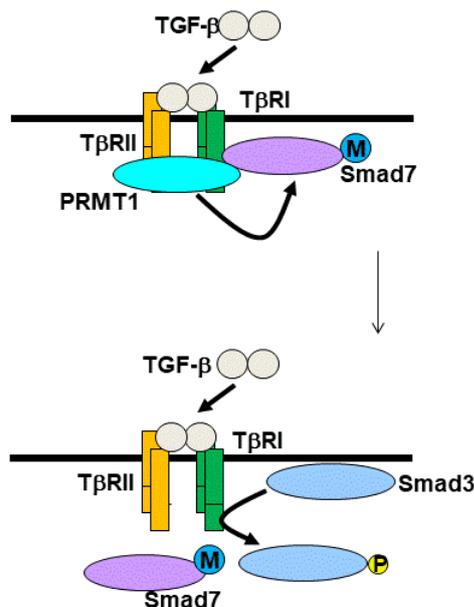


図 2. PRMT1 による Smad7 メチル化の TGF- $\beta$  シグナル伝達における役割

することが示唆された。その分子メカニズムを解析し、SETDB1 が Smad3 と結合して、Smad3 による EMT のマスターレギュレーターである Snail の発現誘導を抑制することで EMT を抑制することを明らかにした。

### 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)

Du D, Katsuno Y, Meyer D, Budi EH, Chen SH, Koeppen H, Wang H, Akhurst RJ, Derynck R. Smad3-mediated recruitment of the methyltransferase SETDB1/ESET controls Snail1 expression and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO Rep.* 19 :135-155. doi: 10.15252/embr.201744250. 2018 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1) Yoko Katsuno  
Regulation of epithelial plasticity and differentiation of breast cancer cells by TGF- $\beta$   
TGF- $\beta$  meeting in Leiden, 2016

2) Yoko Katsuno, Kohei Miyazono, Rik Derynck  
Prolonged exposure to TGF- $\beta$  stabilizes stem-cell state of breast cancer cells through activation of Akt signaling.  
第 75 回日本癌学会学術総会, 2016

3) Yoko Katsuno, Kohei Miyazono, Rik Derynck  
Prolonged exposure to TGF- $\beta$  stabilizes the stem cell-like state of breast cancer cells through activation of Akt-mTOR signaling.  
FASEB Science Research Conference "TGF- $\beta$  Superfamily: Signaling in Development and Disease" 2017

4) Yoko Katsuno, Kohei Miyazono, Rik Derynck  
Prolonged exposure to TGF- $\beta$  stabilizes the stem  
cell-like state and increases drug resistance of  
breast cancer cells.

第 76 回日本癌学会学術総会 2017

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤木 蓉子 (勝野蓉子)

(AKAGI, Yoko (KATSUNO, Yoko))

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：7 0 7 7 1 0 0 4