

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16765

研究課題名(和文) Notchシグナル活性化とTGF-シグナル不活性化のクロストークによる発癌機序

研究課題名(英文) Crosstalk between activated Notch and inactivated TGF-beta signaling in cancer cells

研究代表者

眞野 恭伸 (MANO, Yasunobu)

千葉大学・未来医療教育研究センター・特任助教

研究者番号：80577362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：RASシグナルの活性化およびTGF-シグナルの不活性化は、膵臓癌、大腸癌、胃癌などの様々な癌種において認められる。本研究ではRASシグナルの下流であるNotchシグナルの老化誘導機構に着目する事で、Notchシグナルの活性化およびTGF-シグナルの不活性化のクロストークによる癌化メカニズムの解明を目指した。RNA-Seq解析の結果、JAG1強制発現かつTGFBR2をKDした細胞では、細胞老化誘導時におけるp21及びp15の発現上昇が抑制されていた。さらに正常細胞と共培養させるとJAG1活性化かつ老化誘導を回避した細胞が正常細胞を巻き込みながら増殖し、正常細胞に老化を誘導する事が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Notchシグナルは、癌においては発癌性及び抗腫瘍性の両面性を持つ可能性が示唆されているが、今回の解析によって、癌細胞ではTGF-シグナルの不活性化やp53の変異などにより癌抑制的に機能しないが、周囲の正常細胞では増殖抑制的に機能する事が明らかになった。即ち癌細胞自身は老化せず、周囲の正常細胞を老化させていた。癌細胞はこの機構を巧みに利用して浸潤・転移を加速させている可能性があり、非常に興味深い結果である。将来的にさらに感度の高いGSIやNotchリガンドを阻害する分子標的薬が開発されれば、Notchシグナルを標的とした癌治療の臨床応用への可能性もあり得るのではないかと考える。

研究成果の概要(英文)：Activated Ras and inactivated TGF- signaling have been observed in various cancer such as pancreatic, colorectal, and gastric cancer. However, these crosstalk mechanisms of carcinogenesis remain not completely understood. In this study, we focused the tumor suppressor mechanism of Notch signaling, downstream of Ras and performed RNA-Seq and Time-lapse analysis to identify the molecular mechanism of cooperation between Notch and TGF- signaling in cancer cells. As a result, JAG1 overexpression(OE) and TGFBR2 knockdown(KD) caused repression of p21 and p15, leading to bypass of JAG1-induced senescence. Moreover, we observed that normal cells were induced senescence in co-culture with JAG1-OE and TGFBR2-KD cells and normal cells.

研究分野：癌エピゲノム

キーワード：癌 Notchシグナル TGF-シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

正常な細胞では癌遺伝子の活性化が誘導された際には早期細胞老化と呼ばれる不可逆的な増殖停止状態に至り癌化は起こらない[Sharpless ら *Nat Rev Cancer* 2015]。早期細胞老化は細胞に備わった内在性の癌抑制機構として機能しており、この重要機構の破綻により癌化に至ると考えられている。早期細胞老化機構の破綻した代表的な癌症例として TGF- $\beta$  シグナルの不活性化が挙げられる。TGF- $\beta$  シグナルは、多くの細胞において増殖を抑制する事が知られており、膵臓癌や大腸癌では高頻度の *SMAD4* の変異を認め、TGF- $\beta$  シグナルの不活性化が明らかになっている[TCGA *Nature* 2016; TCGA *Nature* 2012]。さらにマウスの *in vivo* の実験においても *KRAS* 活性型変異と *TFEB2* のノックアウト(KO)により膵臓癌、大腸癌を発症する報告がなされている[Ijichi ら *Genes Dev* 2006; Trobridge ら *Gastroenterology* 2009]。しかし、この RAS シグナルの活性化と TGF- $\beta$  シグナルの不活性化のクロストークによる発癌の分子機構は、炎症と TGF- $\beta$  シグナル遮断の相互作用により浸潤・転移が誘導される事が明らかにされたが、その詳細な分子機構は不明な点が多い。

これまでに当研究室では、癌防御機構である早期細胞老化機構とその破綻による発癌分子機構に関して解析を行ってきた。癌遺伝子 Ras/Raf 誘導性早期細胞老化をモデルとしてゲノムワイドな遺伝子発現解析とエピゲノム解析から *Bmp2* が早期細胞老化において重要である事[Kaneda ら *PLoS Genet* 2011]、[申請者ら *World J Biol Chem* 2016]、さらに実際の BRAF 変異陽性大腸癌の遺伝子変異解析においても BMP2 を初め BMP シグナルに関連する因子がほぼ全症例で破綻しており、BMP シグナルが癌防御機構に重要であることを報告した[申請者ら *Int J Cancer* 2016]。これまでに申請者は、Ras/Raf 誘導性早期細胞老化における新規重要因子探索を目的として、80,000 種類の shRNA ライブラリーによる網羅的ノックダウン(KD)スクリーニングを行い、Notch シグナルのリガンドである JAG1 が、*p21*、*p15* の発現上昇を介して老化誘導で重要な役割を果たしている事を明らかにしている。Notch シグナルは、発生、分化、増殖などの様々な細胞の運命決定を調節する重要なシグナルである(図 1)。癌に関しては発癌性及び抗腫瘍性の両面性を持つ可能性が報告されているが、申請者は正常細胞において JAG1 の強制発現によって老化が誘導され、その老化誘導は TGFBR2 の KD によって回避する事を見出している(図 2)。

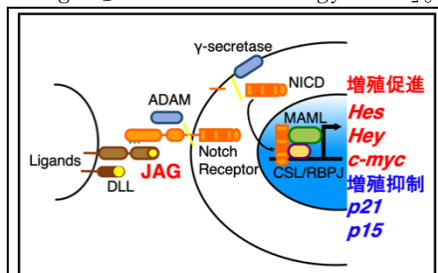


図 1. Notch シグナルの活性化機構と癌化における両面性。

Notch シグナルは細胞表面にある Notch のリガンド JAG/DLL と受容体の NOTCH が直接結合する事により NOTCH の細胞内ドメインが核内に移行し、下流遺伝子(増殖促進/抑制因子)の発現を制御する。

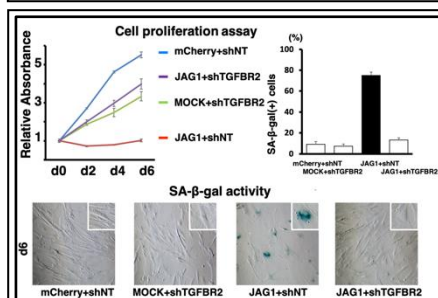


図 2. Notch シグナルの活性化による老化誘導と TGFBR2 の KD による老化回避。

細胞増殖実験と SA- $\beta$ -gal 染色から、JAG1 の強制発現による老化誘導を認め、さらに TGFBR2 の KD により、その老化誘導を回避した。

## 2. 研究の目的

RAS シグナルの活性化と TGF- $\beta$  シグナルの不活性化のクロストークによる発癌機構において浸潤・転移能の獲得は、癌の悪性化に大きく貢献している。この RAS シグナルの活性化と TGF- $\beta$  シグナルの不活性化のクロストークによる発癌の分子機構は、炎症と TGF- $\beta$  シグナル遮断の相互作用により浸潤・転移が誘導される事が明らかにされたが、その詳細な分子機構は不明な点が多い。申請者は RAS シグナルの下流である Notch シグナルの老化誘導機構に着目する事で、RAS シグナルの活性化と TGF- $\beta$  シグナルの不活性化のクロストークによる発癌機構の新たな分子メカニズムの解明を目的とした。また既存の薬剤に関して RAS シグナル亢進癌、Notch シグナル亢進癌に対する有用性を検証する事で新規癌治療方法の研究基盤確立を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) Notch シグナルの活性化と TGF- $\beta$ シグナルの不活性化による網羅的遺伝子発現解析。

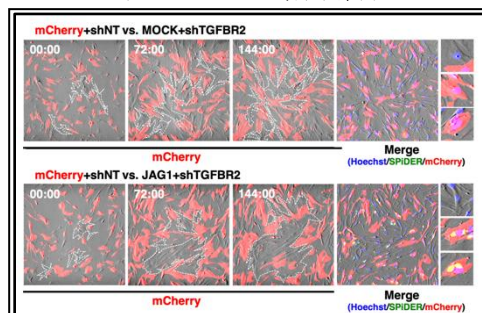
正常細胞においては Notch シグナルの活性化は、*p21*、*p15* の発現上昇を介して老化を誘導するが、TGFBR2 KD によりその老化誘導を回避する。JAG1 強制発現+TGFBR2 KD 細胞株において時系列に RNA を回収し、次世代シーケンサーを用いて RNA-Seq を行い、網羅的遺伝子発現変化を解析した。また JAG1 の強制発現の細胞株においても同様の解析を行った。これまで得られているヒストン修飾変化(H3K27ac, H3K4me3, H3K27me3)な

どのデータと統合解析を行った。

- (2) Notch シグナル活性化+TGF- $\beta$  シグナル不活化細胞と正常細胞との共培養解析。  
Notch シグナルの活性化による老化誘導を回避した細胞 (JAG1 強制発現+TGFBR2 KD) が周囲の正常細胞にどのような影響を与えるかを明らかにするため、正常細胞との共培養を行い、タイムラプス解析を実施した。あらかじめ正常細胞には赤色蛍光タンパク質 mCherry を発現させ、細胞を判別した。また老化細胞は緑色蛍光試薬である SPiDER- $\beta$  Gal で評価した。
- (3) RAS シグナル活性化+TGF- $\beta$  シグナル不活化癌臨床標本での Notch シグナル関連因子の検証。  
公共データベースである The Cancer Genome Atlas (TCGA) の膵臓癌データから網羅的な遺伝子発現変化解析、DNA メチル化解析、遺伝子変異解析を行う。そして KRAS (+) と TGF- $\beta$  シグナルに変異が認められる膵臓癌に関して JAG1 及び Notch シグナル標的因子との関連性の有無を検証した。
- (4) RAS/Notch シグナル亢進癌に対する Notch シグナル阻害の有用性の検証。  
Notch シグナルは JAG や DLL などのリガンドと NOTCH レセプターが直接結合し、ADAM,  $\gamma$ -secretase により NOTCH が切断される事で、NOTCH の細胞内ドメインが核内に移行し下流標的遺伝子の発現を制御する (図 1)。そのため GSI ( $\gamma$ -secretase inhibitor) を添加する事で、Notch シグナルの活性を阻害する事が可能である。RAS 亢進癌や Notch シグナル亢進癌に対して Notch シグナル阻害剤の GSI である DAPT と LY-411575 を用いて浸潤能の阻害を検証した。また Notch シグナルの関連因子の KD においても検証を行った。

#### 4. 研究成果

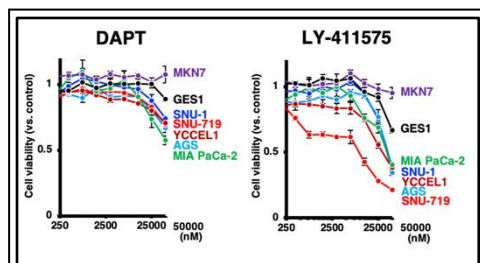
- (1) Notch シグナルの活性化と TGF- $\beta$  シグナルの不活化による網羅的遺伝子発現解析。  
TGFBR2 の KD により JAG1 強制発現による老化誘導を回避した細胞に関して RNA-Seq を行った結果、JAG1 強制発現かつ TGFBR2 を KD した細胞では、細胞老化誘導時における *p21* 及び *p15* の発現上昇が抑制されており、その結果老化を回避しているのではないかと考えられた。また JAG1 強制発現で発現上昇している、TGFBR2 KD でその発現上昇が抑制されていた遺伝子群は、興味深い事に GO (Gene Ontology) 解析で、HIF2 pathway が濃縮していた。
- (2) Notch シグナル活性化+TGF- $\beta$  シグナル不活化細胞と正常細胞との共培養解析。  
Notch シグナルの活性化による老化誘導を回避した細胞 (JAG1 強制発現+TGFBR2 KD) と正常細胞を共培養し、タイムラプス解析後、SPiDER- $\beta$  Gal 染色によって老化細胞を評価した。JAG1 活性化かつ老化誘導を回避した細胞が正常細胞 (赤色) を巻き込みながら増殖し、正常細胞に老化を誘導していく様子 (黄色細胞) が確認された (図 2)。即ち JAG1 の活性化と TGFBR2 の不活化は、細胞自身の老化誘導を回避しつつ、周囲の正常細胞に細胞を誘導する事が明らかとなった。



**図 3. JAG1 強制発現+TGFBR2 の KD 細胞と正常細胞の共培養によるタイムラプス解析。**  
正常細胞に mCherry を発現させ、共培養時のタイムラプス解析を行い、その後、老化細胞を SPiDER を用いて染色した。JAG1 強制発現+TGFBR2 の KD 細胞が正常細胞を巻き込みながら増殖し、正常細胞に老化を誘導していく様子が確認された。

- (3) RAS シグナル活性化+TGF- $\beta$  シグナル不活化癌臨床標本における Notch シグナル関連因子の検証。  
公共データベース The Cancer Genome Atlas の 81 検体の KRAS (+) 膵臓癌と 46 検体の KRAS (+) と TGF- $\beta$  シグナルに変異 (SMAD2, SMAD3, SMAD4, TGFBR1, TGFBR2) が認められる膵臓癌のデータを用いて統合解析を行い、KRAS (+) と TGF- $\beta$  シグナルに変異が認められる膵臓癌で特異的に発現上昇している 47 遺伝子群を抽出した。またその中の候補遺伝子は、生存曲線解析においても高発現している群で予後不良の傾向が認められた。
- (4) RAS/Notch シグナル亢進癌に対する Notch シグナル阻害の有用性の検証。  
膵臓癌や胃癌などの様々な細胞株に関して、まず Notch シグナル阻害剤の GSI である DAPT と LY-411575 を用いて増殖阻害の検証を行った。その結果、DAPT と LY-411575 の双方の薬剤で高メチル化癌細胞株での増殖阻害効果を認めた (図 4)。また shRNA を用いて Notch シグナル関連因子 (*NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4*, *JAG1*, *JAG2*, *DLL1*, *DLL3*,

*DLL4* の KD を行い、細胞増殖の検証を行った。興味深い事に高メチル化癌細胞株で JAG1 と *DLL3* の KD で合成致死の表現系が認められた。上記の結果から、Notch シグナルを標的とした阻害剤は、高メチル化癌に対する新しい治療戦略になり得る可能性が示唆された。しかしながら GSI による感受性の差は少なく、投与量も  $\mu\text{M}$  のオーダーで高い事を踏まえると、実際に臨床応用に展開するのは非常に難しいのではないかと予想された。将来的にさらに感度の高い GSI や Notch リガンドを阻害する分子標的薬が開発されれば、Notch シグナルを標的とした高メチル化癌治療の臨床応用への可能性もあり得るのかもしれない。



**図 4. 種々の細胞株における GSI の増殖阻害効果の検証。**

正常細胞株や低メチル化癌細胞株と比較して、高メチル化や超高メチル化癌細胞株では GSI の感受性を認めた。

以上、本研究により TGF- $\beta$  シグナル不活化は、JAG1-Notch シグナルの活性化による *p21* や *p15* の発現上昇を抑制して老化誘導を回避する事、さらに今回の様に JAG1-Notch シグナルが活性化しているにも関わらず、癌細胞の様に自身の細胞老化機構が破綻している場合には JAG1-Notch シグナルの活性化を介して周囲の正常細胞へ老化誘導しながら増殖していく事が明らかとなった。癌細胞はこの機構を巧みに利用して浸潤・転移を加速させている可能性があり、非常に興味深い結果である。また Notch シグナル阻害剤 GSI の臨床応用への可能性を提示できたのではないかと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugiura Masahiro, Sato Hiroaki, Okabe Atsushi, Fukuyo Masaki, Mano Yasunobu, Shinohara Ken-ichi, Rahmutulla Bahityar, Higuchi Kosuke, Maimaiti Maihulan, Kanesaka Manato, Imamura Yusuke, Furihata Tomomi, Sakamoto Shinichi, Komiya Akira, Anzai Naohiko, Kanai Yoshikatsu, Luo Jun, Ichikawa Tomohiko, Kaneda Atsushi	4. 巻 14
2. 論文標題 Identification of AR-V7 downstream genes commonly targeted by AR/AR-V7 and specifically targeted by AR-V7 in castration resistant prostate cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 100915 ~ 100915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2020.100915	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Li Wenzhe, Okabe Atsushi, Usui Genk, Fukuyo Masaki, Matsusaka Keisuke, Rahmutulla Bahityar, Mano Yasunobu, Hoshii Takayuki, Funata Sayaka, Hiura Nobuhiro, Fukayama Masashi, Tan Patrick, Ushiku Tetsuo, Kaneda Atsushi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Activation of EHF via STAT3 phosphorylation by LMP2A in Epstein-Barr virus-positive gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14978	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡部 篤史、Kie Kyon Huang、松坂 恵介、福世 真樹、星居 孝之、臼井 源紀、関 元昭、眞野 恭伸、Bahityar Rahmutulla、神田 輝、鈴木 孝禎、牛久 哲男、深山 正久、Patrick Tan、金田 篤志
2. 発表標題 ウイルスがもたらすヘテロクロマチン破綻と新たなエピジェネティック発癌機構「エンハンサー侵襲」の発見
3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞野恭伸、福世真樹、岡部篤史、松坂恵介、山中遼太、油谷浩幸、金田篤志
2. 発表標題 JAG1活性化細胞と正常細胞の共培養モデルを用いたRas/Raf誘導性早期細胞老化機構の解析
3. 学会等名 第13回エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒川 友哉、中川 拓也、松坂 恵介、福世 真樹、眞野 恭伸、美馬 勝人、三澤 清、花澤 豊行、金田 篤志
2. 発表標題 中咽頭癌におけるメチル化遺伝子マーカーに基づく放射線療法の治療効果予測の検討
3. 学会等名 第30回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ホームページ等 千葉大学大学院医学研究院分子腫瘍学 <a href="https://www.m.chiba-u.ac.jp/class/moloncol/">https://www.m.chiba-u.ac.jp/class/moloncol/</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松坂 恵介  (MATSUSAKA Keisuke)		
研究協力者	岡部 篤史  (OKABE Atsushi)		
研究協力者	福世 真樹  (FUKUYO Masaki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------