

機関番号：13501

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20390476

研究課題名 (和文) 癌の進展における TGF- $\beta$  シグナルの分子作用機構の解明研究課題名 (英文) Roles of TGF- $\beta$  signaling in cancer progression

研究代表者

齋藤 正夫 (SAITOH MASAO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：90345041

研究成果の概要 (和文)：

TGF- $\beta$  は EMT だけでなく、長期間の培養により筋線維芽細胞様細胞に変化する EMyoT も誘導することを見出した。その分子機構として、TGF- $\beta$  が FGF 受容体のスプライシングを変化させ、FGF-2 に感受性を持つようになることがわかった。さらに FGF-2 シグナルは TGF- $\beta$  を協調的に増強し、EMT を非常に促進する一方で、TGF- $\beta$  による EMyoT を抑制することを見出した。その分子機構は TGF- $\beta$  は MEK-Erk を抑制することで EMyoT を惹起し、FGF-2 は MEK-Erk 再活性化するために、EMyoT を抑制し、EMT を増強することがわかった。

研究成果の概要 (英文)：

We found that transforming growth factor (TGF)- $\beta$  induced EMT and that long-term exposure to TGF- $\beta$  elicited the epithelial-myofibroblastic transition (EMyoT) by inactivating the MEK-Erk pathway. During the EMT process, TGF- $\beta$  induced isoform switching of fibroblast growth factor (FGF) receptors, causing the cells to become sensitive to FGF-2. The addition of FGF-2 to TGF- $\beta$ -treated cells perturbed EMyoT by reactivating the MEK-Erk pathway and subsequently enhanced EMT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：実験腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

TGF (Transforming Growth Factor)- $\beta$  は個体発生や様々な疾患に関与するサイトカインの1つとして知られている。とくに口腔領域では TGF- $\beta$  3 のノックアウトマウスが高頻度に口蓋裂を発症することや、TGF- $\beta$  ファミリー因子の BMP は骨形成や歯発生に、また TGF- $\beta$  1 も炎症性疾患や口腔癌との関連が多

数報告されている。TGF- $\beta$  の強力な細胞増殖抑制作用は最もよく知られた作用の一つであり、古くより癌との関連が研究されてきた。つまり癌化においては、TGF- $\beta$  受容体やシグナル分子に遺伝子異常等によるタンパク質の質的量的変化がおこり、TGF- $\beta$  の増殖抑制に不応性となった結果、癌細胞特有の無秩序な増殖を引き起こす。したがって TGF- $\beta$  は癌

抑制因子としての一面を持つ。しかしながら近年、TGF- $\beta$ の特異的な阻害剤や阻害分子を用いたマウスの解析から、癌が進行し悪性度が増したような場合には、TGF- $\beta$ は転移や浸潤を促進する作用を有することが報告された。さらに TGF- $\beta$ の受容体やシグナル分子に異常がある癌は全体の数%であることを踏まえると、生体内の TGF- $\beta$ は癌の悪性化促進因子として機能していると考えられる。我々はこれまでに癌の促進因子としての作用点が Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮間葉移行)にあると考え in vitroでの分子機構を検討してきた。これまでに HLH 型転写因子の Id が TGF- $\beta$ の EMT を抑制的に機能することを見出し報告している。さらにその分子機構を進め、過剰発現系の実験や siRNA を用いた loss of function の実験系を駆使し、 $\delta$ EF1 と呼ばれる転写因子群が TGF- $\beta$ の誘導する EMT に深く関与することを発見し、ごく最近報告した。しかしながら、 $\delta$ EF1 の転写活性化機構は全く知られていなかったため、ごく最近、質量分析を用いて結合タンパクの探索を施行したところ、非常に興味ある分子が同定され、本研究ではこの分子の機能解析を含め、これまでの研究をさらに発展させる。また、最近新たに発見した TGF- $\beta$ 受容体の内在化に関する研究と TGF- $\beta$ シグナルを増強する Arkadia 分子の癌細胞での機能を解析、発展させることによって、癌の悪性化促進因子としての TGF- $\beta$ のシグナルを分子レベルで解明し、治療・診断への応用へと発展させることをめざす。

## 2. 研究の目的

TGF- $\beta$ は近年の研究から癌の進展を促進し、悪性度を増悪する機能を有することが明らかになりつつある。しかしその作用点は不明であり、申請者はこれまで癌細胞の上皮間葉移行 (EMT) に着目し、研究を行ってきた。本研究ではさらに EMT の分子機構を探索するばかりでなく、TGF- $\beta$ シグナルを促進する分子である Arkadia の癌での新たな作用を解明することによって、癌悪性化を促進因子としての TGF- $\beta$ の作用機構を理解し、TGF- $\beta$ のシグナル分子を標的とした制癌法の開発や診断に応用するための基礎的な研究を行うものである。

## 3. 研究の方法

癌の進展における TGF- $\beta$ シグナルを分子レベルでその作用機構の解明することのより、顎・口腔領域の発生過程での重要性のみならず悪性病変の浸潤転移機構を理解できると考え、本研究では以下の4点を解明することを目的とする。

### (1). TGF- $\beta$ が誘導する EMT 分子機構の解明

申請者は個体発生での TGF- $\beta$ の重要性や癌での作用機構から、TGF- $\beta$ が EMT を誘導するもっとも重要な因子の1つであると考えている。したがってその分子機構を理解することは非常に重要であり、さらに発展させることにより制癌法や診断にも応用できると考え、これまでにマウスの培養細胞を用いて研究をおこなってきた。またごく最近、EMT にはユビキチン・プロテアソーム経路が非常に重要であることを見出し、これは転写因子を介さずに、上皮系のマーカータンパクの局在制御を行っていることを確認している。さらにごく最近、TGF- $\beta$ における EMT 誘導で非常に重要な分子である  $\delta$ EF1 を用いた質量分析の解析から、MTA (metastasis associated protein) と呼ばれる分子の同定に成功している。この MTA の機能を解析することで癌の悪性化促進因子としての TGF- $\beta$ の機能をさらに理解できると考えている

### (2). EMT のモデル系の確立

癌細胞は間葉組織に浸潤した後、血管リンパ管に侵入、さらに着床し、増殖することで転移巣を形成する。EMT の獲得は主に間葉組織への浸潤と血管リンパ管への侵入を促進し、MET (間葉-上皮移行) は着床後の癌細胞に関与すると考えられている。また血管リンパ管に侵入した細胞は足場非依存的 (anoikis) な細胞増殖の獲得が不可欠であるが、これらを総合的に理解するモデル系はない。申請者らはこれまでに、TGF- $\beta$ によって接着能が非常に亢進する細胞と TGF- $\beta$ によって足場非依存的な増殖をする細胞を探索してきた。そこでこれらの細胞を用いて、TGF- $\beta$ が誘導する癌の浸潤・転移の分子機構を検討し、マウスの転移モデルに応用し、転移を抑制するような制癌への発展を目的とする

### (3). 受容体内在化による極性制御と癌化

TGF- $\beta$ シグナルを増強する分子として Arkadia が知られおり、その機序は Arkadia が TGF- $\beta$ の抑制性分子の分解を促進することが報告されている。申請者はこれまでに Arkadia の結合タンパクからの解析から受容体の内在化に関与する AP (adaptor protein) 2 ならびに trafficking に関与する AP (adaptor protein) 1 の同定に成功している。TGF- $\beta$ 受容体の局在が上皮細胞の極性に深く関わっていることから、癌細胞における極性の逸脱や EMT 時における Arkadia/AP を介した受容体の局在変化に伴うシグナルの変化に関して検討する。

### (4). 癌の悪性化とクロマチン構造

癌細胞はクロマチンの構造異常が認められることが知られており、さらに近年癌化に

も関与することが示唆されている senescence にもクロマチン構造の異常 (ヘテロクロマチン凝縮が報告されている。申請者は当研究室で以前行われた Arkadia の two-hybrid の結果より、Arkadia 結合タンパクとして heterochromatin 結合タンパクが複数同定されていることがわかり、TGF- $\beta$  における senescence ならびにクロマチン構造変化への可能性を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1). TGF- $\beta$ が誘導する EMT 分子機構の解明

TGF- $\beta$  が EMT を誘導するには、ras や増殖因子などのシグナルと協調する必要であることを Snail の発現を指標に明らかにした。この結果を、これまで TGF- $\beta$  単独で EMT が誘導される NMuMG 細胞に応用したところ、FGF-2 により相乗的に EMT が強められた。その分子機構は、まず、TGF- $\beta$  により FGF 受容体のアイソフォームスイッチが誘導され、上皮系の IIIb 型から間葉系の IIIc 型に変換する、IIIc 型のリガンドである FGF-2 により Erk が活性化され TGF- $\beta$  誘導性 EMT を増強する。TGF- $\beta$  によって誘導された  $\delta$  EF1 転写因子は活性化した Erk の下で CtBP1 との結合が強められることがわかった。一方 FGF-2 の非存在下に観察される EMT は SMA やカルポニン陽性の筋線維芽細胞に分化することも見出し、SMA の発現には  $\delta$  EF1 転写因子が非常に重要であることも明らかにした。したがって、これまで 48 時間以内で観察されていた TGF- $\beta$  誘導性 EMT を、長期培養に移行させると、SMA やカルポニン陽性の筋線維芽細胞へ分化する EMyoT (epithelial-myofibroblastic transition) を起こす。その間に FGFR のアイソフォームスイッチがおこり、FGF-2 が存在すると増強された EMT (advanced EMT) にて activated fibroblastic cell へと分化することを明らかとした。これらの研究成果は論文 (1, 6, 7, 8, 10) で発表した。

##### (2). EMT のモデル系の確立

NMuMG 細胞が一般的な遺伝子導入により細胞のダメージが大きく、現在も、遺伝子導入法の最適化を試みている。

##### (3). 受容体内在化による極性制御と癌化

Arkadia は E3 ligase 活性を持ち、TGF- $\beta$  シグナルを増強する分子である。今回、我々は Arkadia 結合タンパク質として新たに AP2m を同定した。AP2m はクラスリンアダプタータンパク質 AP2 のサブユニットのうちのひとつである。我々は Arkadia が AP2m に結合し、AP2 と複合体を形成していることを見出した。さらに AP2m をユビキチン化することで EGF 受容体のエンドサイトーシスを制御していることを明らかにした。これらの研究成果は

論文 (2) で発表した。

##### (4). 癌の悪性化とクロマチン構造

Arkadia を bait とした酵母 two-hybrid により複数の heterochromatin 結合タンパクを同定し、その結合特性を過剰発現系で確認できた。現在、arkadia に対する機能解析を行っている。

#### 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)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Shirakihara T, Horiguchi K, Miyazawa K, Ehata S, Shibata T, Morita I, Miyazono K, Saitoh M. TGF- $\beta$  regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J.* 30: 783-795 2011 (査読有)
2. Mizutani A, Saitoh M, Imamura T, Miyazawa K, Miyazono K. Arkadia complexes with clathrin adaptor AP2 and regulates EGF signalling. *J. Biochem.* 2010 148:733-741 (査読有)
3. Nagata M, Nagata S, Yuki K, Isogaya K, Saitoh M, Miyazono K, Miyazawa K. Identification of a phosphorylation site in c-Ski as serine 515. *J Biochem.* 2010 148(4):423-427 (査読有)
4. Chano T, Ikebuchi K, Tomita Y, Jin Y, Inaji H, Ishitobi M, Teramoto K, Ochi Y, Tameno H, Nishimura I, Minami K, Inoue H, Isono T, Saitoh M, Shimada T, Hisa Y, Okabe H. RB1CC1 together with RB1 and p53 predicts long-term survival in Japanese breast cancer patients. *PLoS One.* 2010 5:e15737. (査読有)
5. Chano T, Ikebuchi K, Ochi Y, Tameno H, Tomita Y, Jin Y, Inaji H, Ishitobi M, Teramoto K, Nishimura I, Minami K, Inoue H, Isono T, Saitoh M, Shimada T, Hisa Y, Okabe H. RB1CC1 activates RB1 pathway and inhibits proliferation and cologenic survival in human cancer. *PLoS One.* 2010 5:e11404. (査読有)
6. Saito RA, Watabe T, Horiguchi K, Kohyama T, Saitoh M, Nagase T, Miyazono K. Thyroid transcription factor-1 inhibits transforming growth factor-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 2009 69:2783-2791 (査読有)
7. Saitoh M, Shirakihara T, Miyazono K. Regulation of the stability of cell surface E-cadherin by the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009

- 381:560-565 (査読有)
8. Higashikawa K, Yoneda S, Tobiome K, Saitoh M, Taki M, Mitani Y, Shigeishi H, Ono S, Kamata N. Dp63 -dependent expression of Id-3 distinctively suppresses the invasiveness of human squamous cell carcinoma with epithelial-to-mesenchymal transition. Int J Cancer 2009 124: 2837-2844 (査読有)
  9. Nakano A, Koinuma D, Miyazawa K, Uchida T, Saitoh M, Kawabata M, Hanai JI, Akiyama H, Abe M, Miyazono K, Matsumoto T, Imamura T. Pin1 downregulates TGF-beta signaling by inducing degradation of Smad proteins. J Biol Chem. 2009 284: 6109-6115 (査読有)
  10. Horiguchi K, Shirakihara T, Nakano A, Imamura T, Miyazono K, Saitoh M. Role of Ras signaling in the induction of snail by TGF-b. J. Biol. Chem 2009 284:245-253 (査読有)
  11. Fukunaga E, Inoue Y, Komiya S, Horiguchi K, Goto K, Saitoh M, Miyazawa K, Koinuma D, Hanyu A, Imamura T. Smurf2 induces ubiquitin-dependent degradation of Smurf1 to prevent migration of breast cancer cells. J. Biol. Chem 2008 283:35660-35667 (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

1. 齋藤正夫、TGF-b signaling and EMT in cancer progression 第 69 回日本癌学会総会 (大阪) 2010. 9. 23
2. Masao Saitoh, Takuya Shirakihara, Kana Horiguchi, Kohei Miyazono, FGF-2 accelerate TGF-b-induced EMT and promotes invasion of cancer cells, 第 32 回日本分子生物学会総会 (横浜) 2009, 12, 10,
3. 齋藤正夫、molecular mechanism of TGF-b-induced EMT、第 69 回日本癌学会総会 (横浜) 2009. 10. 3

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

齋藤 正夫 (SAITOH MASAO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：90345041

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし