

機関番号：83901

研究種目：基盤研究 C 一般

研究期間：2008-2010

課題番号：20590420

研究課題名（和文）悪性胸膜中皮腫の増殖に対する TGF- $\beta$ シグナルの役割と治療への応用研究課題名（英文）The role of TGF- $\beta$  signaling in malignant mesothelioma cell growth

研究代表者

藤井 万紀子 (Makiko Fujii)

愛知県がんセンター（研究所）・分子腫瘍学部・主任研究員

研究者番号：70406031

研究成果の概要（和文）：TGF- $\beta$ は悪性中皮腫の増殖に促進方向に作用しており、悪性中皮腫の種々の細胞外マトリックスたんぱく質を産生に関与していることが考えられた。悪性中皮腫特有の Hippo pathway の欠失と協調することにより、TGF- $\beta$ は Connective Tissue Growth Factor の産生を上昇させることが、この増殖に関与するひとつのメカニズムであると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Loss of NF2 is one of the genetic lesions which have been related to the growth of human malignant mesothelioma (MM). We found that the expression of CTGF induced by TGF- $\beta$  in MM cell lines was greatly affected by defect in Hippo signaling cascade. Our results suggested that both TGF- $\beta$  and CTGF might be candidate for molecular target therapy of MM.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成 21 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 22 年度	800,000	240,000	1,040,000
平成 23 年度	0	0	0
平成 24 年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：実験腫瘍

キーワード：悪性胸膜中皮腫、TGF- $\beta$ 

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性中皮腫は胸膜や腹膜を原発とする予後不良な悪性疾患である。比較的稀な疾患と考えられていたが近年本邦において罹患患者数の急激な増加が認められている。アスベスト曝露が重要な外的要因と考えられているが本邦におけ

るアスベストの大量使用は 1960 年代から 1990 年代まで続き、曝露から発症までの潜伏期が 20 ~ 40 年と長期間であるため今後更に患者数は増加すると予測されている。また、職業性曝露以外にもアスベストを扱う工場の周辺住民にも悪性中皮腫が発生しており、大きな社会問題とな

っている。

(2) 世界的に見ても悪性中皮腫の細胞生物学的、分子メカニズム的な研究は極めて遅れている。悪性中皮腫の細胞特性や特異的な遺伝子異常を明らかにすることは、分子標的治療を開発するために極めて重要である。我々の研究室では、これまでに多くの悪性中皮腫患者から初代培養を試みており、当時既に15種類の細胞株の樹立に成功していた。そこで、これらの材料を用いて、悪性中皮腫患者の治療法の確立に役立つような研究ができないかを考えた。

## 2. 研究の目的

それまでの研究報告から TGF- $\beta$  の悪性中皮腫細胞に対する細胞促進能が示唆されていたが、その分子機構の本態は明らかとなっていなかった。そこで本研究では中皮腫細胞における TGF- $\beta$  シグナル伝達と、下流シグナル経路に関与する TGF- $\beta$  のシグナル伝達系の制御を基盤とした悪性中皮腫の新規治療法の開発研究を目的とした。

## 3. 研究の方法

悪性中皮腫の細胞増殖に関して、TGF- $\beta$  シグナル伝達系の関与および下流制御分子との相互作用を明らかにし、TGF- $\beta$  シグナル伝達系阻害剤が中皮腫治療に有効であるかどうかを以下の方法で明らかにした。

- (1) 悪性中皮腫の細胞増殖に対する TGF- $\beta$  シグナルの関与と役割の解明をマイクロアレイを使用した遺伝子変化を中心に検索
- (2) 悪性中皮腫細胞の TGF- $\beta$  シグナル伝達経路異常の解析と、TGF- $\beta$  を介した悪性中皮腫細胞と間質細胞とのクロストークの検討
- (3) 悪性中皮腫細胞と周辺間質細胞とのパラクライン増殖シグナルの検討

## 4. 研究成果

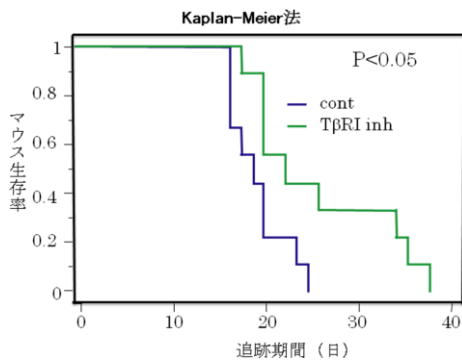
### (1) 悪性中皮腫の細胞増殖に対する TGF- $\beta$ シグナルの関与と役割の解明について

正常中皮細胞をトランスフォームした Met-5A および、患者由来悪性胸膜中皮腫細胞を TGF- $\beta$  処理したところ、細胞内での Smad2 のリン酸化および ERK1/2 の活性化を認めた。Met5A における TGF- $\beta$  処理後2時間でリン酸化を受けるタンパク質を Phospho-kinase profiler Array (R&D 社)を用いて調べると、ERK1/2 の他、p38 $\alpha$ , MSK1/2, CREB, STAT3 などのリン酸化の上昇が認められた。マイクロアレイを用いた実験によって、TGF- $\beta$  によって引き起こされる遺伝子発現の変化を調べると、上昇する遺伝子群のなかに、MMP-2、Collagen Type I, CTGF、fibronectin などが含まれており、また IL-1 の発現の低下などが認められた。TGF- $\beta$  によるこれらの遺伝子の上昇、低下はそれぞれ TGF- $\beta$  阻害剤によって抑制される。更に TGF- $\beta$  阻害剤によって Met-5A および悪性胸膜中皮腫の増殖は、単層培養系、軟寒天培地培養系双方において阻害されることがわかった。

### (2) TGF- $\beta$ による悪性中皮腫の増殖について in vivo での役割

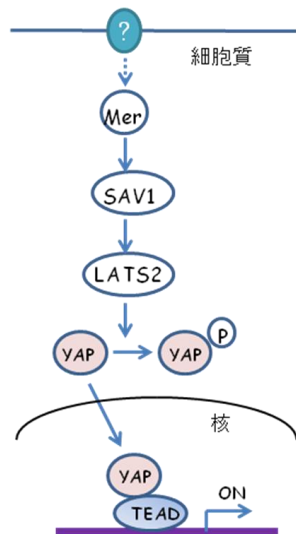
悪性中皮腫は、上皮型、混合型、肉腫型の3つの組織型に分類される。この組織型分類は悪性中皮腫では、患者の予後に強く影響を及ぼし、治療法選択の要にもなる。診断時からの中間生存期間として、Flores R.M.らは、上皮型 16.3 カ月、混合型 9.5 カ月、肉腫型 6.1 カ月という報告をしている (2007 年)。正常中皮細胞では、散発的に p-Smad2 の核内染色を認めるのみで、全体的には陰性であった。一方、悪性中皮腫患者由来の組織においてリン酸化 Smad2 の核内染色は上皮型、混合型、肉腫型全ての組織型で認められることから、悪性中皮腫細胞の増殖には TGF- $\beta$  のオートクライン、パラクラインシグナ

ルが関与して細胞増殖していることが示唆された。悪性中皮腫と共に摘出された周囲の活性化された正常中皮細胞で p-Smad2 の核内染色を認めた。我々は悪性中皮腫細胞株を胸腔内に移植したマウスに、TGF-βI 型受容体阻害剤である SD-208 を経口投与したところ、有意にマウスの生存期間を延ばすことができた。従って TGF-βI 型受容体阻害剤が悪性中皮腫治療に有効ではないかと考えられた。



Kaplan-Meier 法による生存曲線

(3) TGF-β による悪性中皮腫細胞の増殖促進



のメカニズム

悪性中皮腫には遺伝子レベルの特徴がある。悪性中皮腫では癌抑制遺伝子である neuroblastoma type2 (NF2) 遺伝子の欠失、変異が 50% で認められると報告されている。NF2 は Merlin

といったタンパク質をコードする。Merlin の下流にある Hippo pathway の構成タンパク質である Salvador1 や LATS2 を含めると、このシグナル系での変異は 75% で見ついている。正常の細胞では Merlin によって下流の Salvador1 と LATS がリン酸化され、更に oncogene である YAP をリ

ン酸化することによって核外に移行させる。ところが、これらのシグナル経路が欠失することにより、YAP が核内に常時留まることになる。つまり、悪性中皮腫では YAP が核内で TEAD を介して DNA に結合し、増殖促進に関わる遺伝子の転写を促進し続けることが考えられる。

悪性中皮腫で認められるこの特徴を踏まえ、TGF-β による促進作用について調べた。NF2 に欠失の見ついている悪性中皮腫細胞株 NCI-H290 細胞を使用して YAP を shRNA を用いてノックダウンし、そこに TGF-β 処理を行った。転写されてくる遺伝子群をマイクロアレイで検索した結果、YAP と TGF-β 双方によって転写制御される遺伝子が endothelin-1 と CTGF のたった二つの遺伝子であることがわかった。この CTGF のプロモーター領域を調べた結果、TGF-β のシグナル伝達因子 Smad2/3 の DNA 結合サイトと、TEAD 結合サイトが隣合わせにあるということがわかった。

(4) CTGF の悪性中皮腫細胞での働き

悪性中皮腫の増殖に対する CTGF の役割を調べた。レンチウイルスベクターを用いて NCI-H290 の内在性の CTGF をノックダウンしたところ、3 日後の細胞数は低下し、足場非依存的細胞増殖で、コロニーの大きさ、数ともに低下を認めた。NCI-H290 細胞に CTGF 遺伝子を組み込んだレンチウイルスに感染させた 2 週間培養し、focus assay を行ったところ、コントロールに比べて CTGF を過剰発現させたものは、ギムザ染色で強く染色された。更に、マウスに移植した悪性中皮腫細胞の組織を調べたところ、CTGF を強く発現しているものでは細胞周囲を膠原線維が大量に取り囲んでいることがわかった。

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4件)

Kawaguchi K, Murakami H, Taniguchi T, Fujii M, Kawata S, Fukui T, Kondo Y, Osada H, Usami N, Yokoi K, Ueda Y, Yatabe Y, Ito M, Horio Y, Hida T, Sekido Y.

Combined inhibition of MET and EGFR suppresses proliferation of malignant mesothelioma cells.

Carcinogenesis 30(7):1097-105, 2009

Goto Y, Shinjo K, Kondo Y, Shen L, Toyota M, Suzuki H, Gao W, An B, Fujii M,

Murakami H, Osada H, Taniguchi T, Usami N, Kondo M, Hasegawa Y, Shimokata K, Matsuo K, Hida T, Fujimoto N, Kishimoto T, Issa JP, Sekido Y.

Epigenetic profiles distinguish malignant pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma

Cancer Res. 69(23):9073-82. 2009

Murakami H, Mizuno T, Taniguchi T, Fujii M, Ishiguro F, Fukui T, Akatsuka S, Horio Y, Hida T, Kondo Y, Toyokuni S, Osada H, Sekido Y. LATS2 is a tumor suppressor gene of malignant mesothelioma.

Cancer Res. 2011 71:873-83.

Antonov AS, Antonova GN, Fujii M, Dijke PT, Handa V, Catravas JD, Verin AD.

Regulation of endothelial barrier function by TGF- $\beta$  type I receptor ALK5: Potential role of contractile mechanisms and heat shock protein 90.

J Cell Physiol. 2011

[学会発表] (計8件)

藤井万紀子

悪性中皮腫に対する TGF- $\beta$  シグナルの影響  
第81回日本組織培養学会大会

2008.5.19 つくば

Makiko Fujii

The Role of TGF- $\beta$  Signaling in Human Malignant Mesothelioma

67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association

2008.10.28 名古屋

藤井万紀子

悪性中皮腫細胞の増殖における TGF- $\beta$ , Smad シグナル伝達系の役割

第82回 日本組織培養学会

2009.05.18 独協医科大学

Makiko Fujii

The role of TGF- $\beta$  signaling in growth of human malignant mesothelioma cells

FASEB Summer Research Conferences ;

The TGF- $\beta$  Superfamily

2009.06.15 Arizona, USA

Makiko Fujii

The role of TGF- $\beta$  signaling in growth of human malignant mesothelioma cells

第68回日本癌学会学術総会

2009.10.01 パシフィコ横浜

藤井万紀子

悪性中皮腫細胞の増殖における TGF- $\beta$  シグナルおよび YAP の協調的役割について

第83回 日本組織培養学会

2010. 5. 24 岡山大学

藤井万紀子

悪性中皮腫細胞の増殖における TGF- $\beta$  シグナルおよび YAP の協調的役割について

第14回がん分子標的治療学会第14回がん分子標的治療学会

2010. 7. 7 東京 船堀タワーホール

Makiko Fujii

The role of TGF- $\beta$  signaling in human malignant mesothelioma cells

第69回 日本癌学会学術総会第69回日本癌学会学術総会

2010. 9.22 大阪

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 万紀子 (Makiko Fujii)

研究者番号 : 70406031