

科学研究費補助金研究成果報告書

平成22年 5月31日現在

研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2008 ～ 2009
 課題番号： 20790580
 研究課題名（和文） 肺癌細胞の線維化への関与とEGFシグナルによるTGF-βシグナル調節機構の解析
 研究課題名（英文） Role of lung cancer cells to fibrosis and regulation of TGF-beta signaling by EGF
 研究代表者
 鯉沼 代造（KOINUMA DAIZO）
 東京大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号： 80375071

研究成果の概要（和文）： EGF 刺激により TGF-β の細胞内シグナル伝達分子 Smad ファミリーのリンカー領域のリン酸化が誘導される。Smad 結合タンパク Pin1 がこのリンカーリン酸化特異的に Smad に結合することを見出し、それが Smad の Smurf2 ユビキチンリガーゼによるユビキチン化と分解を誘導し、TGF-β シグナルを抑制することを明らかにした。これにより線維化における重要なサイトカインである TGF-β シグナルが癌細胞での様々な EGF シグナル異常により制御を受ける一つのメカニズムが示唆された。

研究成果の概要（英文）： We identified Pin1, a peptidylprolyl cis-trans isomerase, as a novel protein binding Smads. Pin1 interacted with Smad2 and Smad3. This interaction was enhanced by the phosphorylation of (S/T)P motifs in the Smad linker region by EGF or mutant of its downstream protein RAS. (S/T)P motif phosphorylation also enhanced the interaction of Smad2/3 with Smurf2. Pin1 reduced Smad2/3 protein levels in a manner dependent on its peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. Knockdown of Pin1 increased the protein levels of endogenous Smad2/3. In addition, Pin1 both enhanced the interaction of Smurf2 with Smads and enhanced Smad ubiquitination. Pin1 inhibited TGF-beta-induced transcription and gene expression, including connective tissue growth factor, suggesting that Pin1 negatively regulates TGF-beta signaling by down-regulating Smad2/3 protein levels via induction of Smurf2-mediated ubiquitin-proteasomal degradation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード： 癌、シグナル伝達、細胞・組織、発生・分化、発現制御

1. 研究開始当初の背景

(1) TGF- β シグナルはその線維芽細胞増殖促進、細胞外マトリックス産生促進作用等により、多くの肺線維症の病態に共通して関わる重要なサイトカインの一つである。また TGF- β はそのシグナル伝達分子 Smad3 のノックアウトマウスで肺気腫や急性肺傷害の発症が促進されることから、これらの病態にも関わる事が明らかにされている。一方癌とのかかわりでは、TGF- β は上皮細胞に対する増殖抑制、アポトーシス促進作用により癌抑制因子として働いているが、TGF- β のこれら抑制機構を逸脱した癌細胞にとっては、先の TGF- β の間質組織への作用が前景に立ってむしろ腫瘍の増大と転移を進める、癌の促進因子となることが知られている。TGF- β 受容体阻害剤は進行癌の治療に試みられつつあるが、こうした TGF- β の作用の二面性から理論的には二次発癌の可能性もあり対象は限られたものになっている。

一方 EGF シグナルは非喫煙女性肺腺癌患者に多い EGF 受容体の異常、喫煙肺癌患者に多い下流因子 RAS の異常などから呼吸器腫瘍の病態においても重要であることが示されてきた。肺腺癌の治療に用いられ特定の症例に著効を示した Gefitinib により、その重要性は臨床的にも確認されたが、重症の急性肺傷害という副作用が大きな問題となっている。しかしながら EGF シグナルは本来、線維芽細胞の増殖促進による線維化亢進作用を持ち、動物実験モデルでの EGF 受容体阻害剤の抗線維化作用も報告されている。こうしたことから線維化肺を背景にもつ肺癌の病態においては腫瘍と線維化病変の相互作用の存在が推定される。発癌、腫瘍の増大や転移メカニズムにおける間質組織の重要性は多くの癌種で確立しているが、反対に肺癌が元来ある肺線維化病変に対してはどう影響するのか、不明な点が残されている。

ここで、これら肺線維化と肺癌に重要な役割を有する TGF- β と EGF の両シグナルには重要な相互作用が明らかとなっている。上皮細

胞において EGF シグナルは TGF- β シグナル伝達分子 Smad2, Smad3 のリンカー領域をリン酸化してその機能を抑制することが知られている。しかし EGF シグナルによる Smad2, Smad3 のリン酸化により何故機能抑制されるのか、そのメカニズムはまだ確立していない。またこの EGF と TGF- β の関係は、線維芽細胞においては EGF、TGF- β シグナルの両者が増殖促進、細胞外マトリックス産生促進という、共通の作用を有することと相容れない。

研究代表者はこれまで肺癌・肺線維症に関わる臨床経験及び基礎研究の上に TGF- β シグナル調節機構の解析を進め、Smad ファミリーに属しシグナル抑制作用を有する Smad7 のユビキチン化・プロテアソームによる分解について報告してきた (Koinuma et al., EMBO J. 2003)。この研究に関して Smad2, Smad3 の機能制御についてもユビキチン化と分解が役割を占めることを確認したが、別の Smad ファミリーが MAPK ファミリーによるリン酸化により分解促進されるという他の報告と合わせて、同様の機構が TGF- β シグナルにおいても存在することを想定している。さらに研究代表者らは EGF によってリン酸化された Smad に結合する因子を同定しており、その働きが EGF による TGF- β シグナル制御に関わるのではないかと推定している。これらのメカニズムを肺癌細胞、線維芽細胞で解析すること、及び両者の共存状態で EGF または TGF- β シグナルがどのように作用するか解析することで上記のような肺癌・肺線維化の病態への理解を深めることが期待された。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、当初肺癌細胞株及び、肺線維芽細胞株を用いて EGF シグナル及び TGF- β シグナルの細胞増殖、細胞外マトリックス産生等への影響及び、両シグナルの関係について検討することを目的とした。

(2) 合わせて EGF シグナルによる Smad2, 3 リンカー領域のリン酸化による抑制機構に関して、既に同定した Smad2, 3 リン酸化特異的に結合する新規蛋白の機能解析と EGF, TGF- β 両シグナル相互の関係への影響を解析すること、さらに肺癌細胞株と線維芽細胞株の共培養実験系における EGF シグナル及び TGF- β シグナルの相互作用とシグナル阻害剤の影響、Smad2, 3 リン酸化特異的結合蛋白の機能について解析することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肺癌細胞における EGF シグナル異常が TGF- β シグナルに及ぼす影響とその機序

肺癌細胞株等について実際に EGF による Smad2, 3 リンカー領域のリン酸化や TGF- β 反応性への影響を western blotting、RT-PCR 等で確認する。既に同定した Smad2, 3 リンカー領域のリン酸化特異的に結合する新規蛋白について、EGF シグナルや TGF- β シグナルによる Smad2, 3 との結合への影響や、ルシフェラーゼレポーターアッセイによる TGF- β シグナルへの影響を検討する。また Smad2, 3 蛋白量の変化を上記細胞株で比較し、差が認められるならば Smad2, 3 の Smurf1, 2 によるユビキチン化への影響を解析する。検討では siRNA や miRNA を用いた loss of function の検討も行う。

(2) 線維芽細胞における EGF シグナルが TGF- β シグナルの作用に及ぼす影響とその機序
肺線維症由来及び健常肺由来の線維芽細胞をについて EGF と TGF- β シグナルの関係をレポーターアッセイ及び細胞増殖、細胞外マトリックス産生等で検討する。培養細胞実験では EGF 受容体及び TGF- β I 型受容体の特異的阻害剤を用いて両シグナルの関係を解析する。検討には Smad2, 3 のリンカー領域のリン酸化や Smad2, 3 の蛋白量も含め、(1) にあげたような Smad2, 3 結合蛋白の関与も同様に検討する。

(3) 肺癌細胞と線維芽細胞の相互作用と TGF- β シグナル、EGF シグナルの影響
肺癌細胞と線維芽細胞の共培養には通常の

培養法の他にボイデンチャンバーを用いる。それぞれの細胞での遺伝子発現、蛋白発現を検討するために適宜蛍光蛋白によるラベリングを行う。これらの検討で線維芽細胞に対する肺癌細胞の EGF, TGF- β シグナルに関する作用が考えられた場合はいかなる遺伝子発現の変化が線維芽細胞に生じるのか、マイクロアレイによる解析を行う。さらに肺線維化・急性肺傷害モデルでの検討にむけて、動物モデルの実験系の確認と EGF 受容体、TGF- β 受容体阻害剤の効果を確認することを計画した。

4. 研究成果

(1) まず複数の癌細胞株で Western blotting により Smad2, 3 リンカー領域のリン酸化、Smad2/3 リンカー領域結合蛋白 Pin1 の発現を検討した。その結果細胞間での比較はその genetic background が大きく異なり EGF の TGF- β シグナルへの影響を比較することが困難と考えられた。そのためまず変異型 RAS による影響を実験系の確立している 293T 細胞で検討した。そしてリンカーリン酸化 Smad2, 3 が変異型 RAS の発現により Pin1 との結合が促進され、E3 ユビキチンリガーゼ Smurf2 と Smad2, 3 の結合の促進と分解により TGF- β シグナルを抑制することを発見した。

(2) EGF の下流で Pin1 が TGF- β シグナルに及ぼす影響を Pin1 ノックアウトマウス由来の線維芽細胞を用いて検討した。その結果 Pin1 のない線維芽細胞では Smad2/3 の蛋白発現量が多いこと、E3 リガーゼ Smurf2 との結合が弱いことが明らかとなった。そして Pin1 発現のない線維芽細胞では TGF- β 刺激によって Connective tissue growth factor の発現が上昇するものの、Pin1 をアデノウイルスベクターにより発現させた線維芽細胞ではそれが認められなくなることを発見した。

(3) 肺癌細胞と線維芽細胞の相互作用と TGF- β シグナル、EGF シグナルの影響
癌細胞・線維芽細胞双方ともに Pin1 が EGF の下流や RAS シグナル亢進により Smad2/3 の分解を促進して TGF- β シグナルを抑制する

ことが示唆された。

(4) 肺癌細胞における EGF シグナル異常が TGF- β シグナルに及ぼす影響とその機序について、多くの肺癌細胞では EGF シグナルの下流分子の一つ RAS に活性型の変異が入ることが知られている。こうした肺癌細胞では TGF- β 刺激をすることにより上皮間葉転換 (EMT) を起こすことが知られている。肺線維症を背景として肺癌細胞の置かれる状況を考慮し、ある炎症性のサイトカインの存在下に肺癌細胞の TGF- β による EMT などの応答について調べたところ、TGF- β の作用が変化することが観察された。この変化と RAS 変異との関係が今後の検討課題と考えられる。

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 1 件)

- ① Nakano A, Koinuma D, Miyazawa K, Uchida T, Saitoh M, Kawabata M, Hanai J, Akiyama H, Abe M, Miyazono K, Matsumoto T, Imamura T. Pin1 down-regulates transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by inducing degradation of Smad proteins. J Biol Chem. 査読有、284、2009、6109-6115.

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・講師
研究者番号：80375071

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし