

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32645  
研究種目：若手研究  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K16368  
研究課題名(和文) Phosphorylation status-dependent roles of TGF-beta receptor-regulated SMADs in inflammation-induced chemoresistance of breast cancer  
研究課題名(英文) Phosphorylation status-dependent roles of TGF-beta receptor-regulated SMADs in inflammation-induced chemoresistance of breast cancer  
研究代表者  
裴 恩真 (Bae, Eunjin)  
東京医科大学・医学部・兼任助教  
研究者番号：40773388  
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)：癌の進展と転移において重要な働きをするサイトカインであるTGF- $\beta$ が乳癌の治療抵抗性と治療反応性をどのように制御するかを検討した。乳癌組織においては、TGF- $\beta$ シグナル伝達分子SMADリンカー部位リン酸化がみとめられた。SMAD各種変異体を移入した各種乳癌細胞株を用いて、抗がん剤抵抗性を誘導する部位と上流のシグナル伝達経路を同定した。RNAシーケンスとクロマチン免疫沈降シーケンスにより同定した経路による遺伝子発現調節を網羅的に解析した。アデノ随伴ウイルスベクターを用いたマウス乳癌細胞株を樹立し、生体イメージングを用いた同所性同種移植乳癌マウスモデルの実験プロトコルを最適化した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんは本邦において最も多い女性のがんで30-64歳の世代ではがんによる死亡数第一位である。抗がん薬に対する治療抵抗性は予後を改善するために解決すべき課題である。本研究では、がんの進展と転移に重要な働きを及ぼすサイトカインであるTGF- $\beta$ の細胞内信号伝達経路がどのように治療抵抗性を調節するのかを明らかにした。本研究の成果は、乳がんの抗がん薬抵抗性を抑えて有効性を高める新規治療方法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  plays crucial roles in cancer progression and metastasis. I have investigated the mechanisms how TGF- $\beta$  regulates chemoresistance and chemosensitivity of breast cancer in this study. The linker region of TGF- $\beta$  signaling molecule, SMAD was phosphorylated in human breast cancer tissues, which was not observed in normal tissues. Breast cancer cell lines transfected with various mutants of SMAD revealed the site and upstream signaling pathway responsible for chemoresistance. Comprehensive analyses using RNA-seq and ChIP-seq showed the gene regulatory network by the identified pathway. I have optimized the mouse orthotopic transplant breast cancer model using syngeneic mouse breast cancer cell line transfected with the identified mutants using the adeno-associated virus vector for in vivo imaging.

研究分野：腫瘍学、分子生物学

キーワード：乳癌 治療抵抗性 TGF-beta

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳癌は、邦において最も多い女性のがんで、30～64歳の世代では癌による死亡数第一位である。病期によって手術と薬物・放射線治療を組み合わせる治療を行うが、抗がん薬に対する治療抵抗性は予後を改善するために解決すべき課題である。

炎症性サイトカインと Transforming growth factor (TGF)-β は、癌の進展、転移を促進する為(文献)、TGF-β 阻害薬の抗腫瘍効果が期待されてきたが、免疫チェックポイント阻害薬の成功に反して、長年に渡って乳癌を含めた各種動物癌モデルでの効抗腫瘍果を報告されてきた TGF-β 阻害薬は未だ臨床試験段階に留まっている(文献)。

乳癌治療抵抗性の機序について多くの研究がなされているが、治療抵抗性を抑制して治療効果を高める有効な治療標的は未解明である。

2. 研究の目的

乳癌微小環境炎症性サイトカインと TGF-β の細胞内信号伝達経路のネットワークを研究し、乳癌治療抵抗性獲得機序を明らかとすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

乳癌患者組織における TGF-β 細胞内シグナル伝達を免疫組織染色によって解析した。

各種乳癌細胞株(ヒト MCF7: エストロゲン受容体(ER)・プロゲステロン受容体(PR)陽性、ヒト MDA-MB-231、マウス 4T1:ER・PR・ヒト上皮増殖因子受容体2(HER2)陰性)の抗癌剤反応性を、各種刺激下及び各種 TGF-β 細胞内信号伝達分子変異株導入下に検討した。

同定した因子、各種リン酸化 SMAD による遺伝子発現変化を RNA シーケンスにより、さらにヒストン修飾並びに DNA メチル化と各種リン酸化 SMAD の結合部位をクロマチン免疫沈降シーケンスにより網羅的に解析した。

免疫原性が低いアデノ随伴ウイルスベクターにより同定された治療抵抗性誘因部位の各種変異体を導入したマウス 4T1 細胞株による同所性同種移植乳癌マウスモデルを用いて、抗癌剤治療反応性を、生体イメージング (IVIS)、病理組織学、フローサイトメトリーによる細胞免疫学的手法により解析した。

4. 研究成果

(1) 乳癌患者組織における TGF-β 細胞内シグナル伝達

TGF-β 細胞内シグナル伝達は、TGF-β が結合した II 型受容体が I 型受容体をリン酸化、受容体に結合する SMADs である SMAD2、SMAD3 の C 末端をリン酸化し古典的経路を伝達する。一方、MAP キナーゼ

は SMAD2、SMAD3 のリンカー部分をリン酸化する(図1)。乳癌患者組織における TGF-β 細胞内シグナル伝達様式を検討する為に、組織学的グレード 2 から 3 に分類される乳癌組織アレイを用いて受容体 SMAD に対する抗体で免疫染色した部位がリン酸化されていた(図2)。

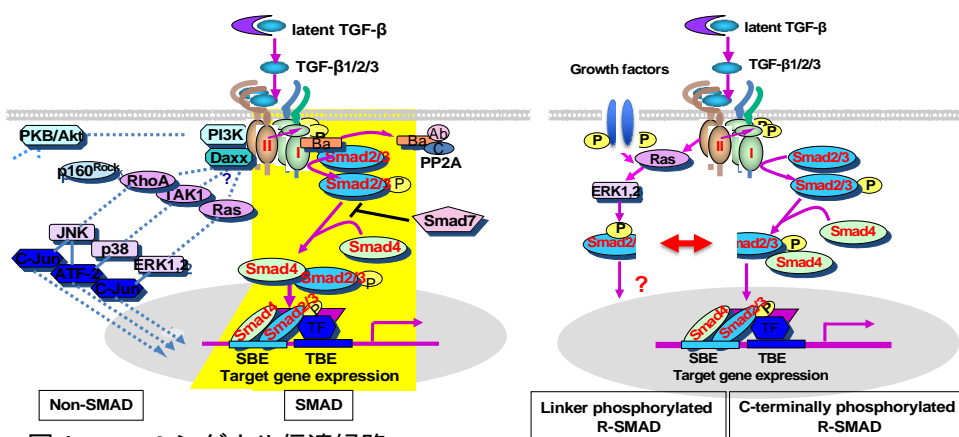


図1 TGF-β シグナル伝達経路

と、腫瘍においてはリンカー

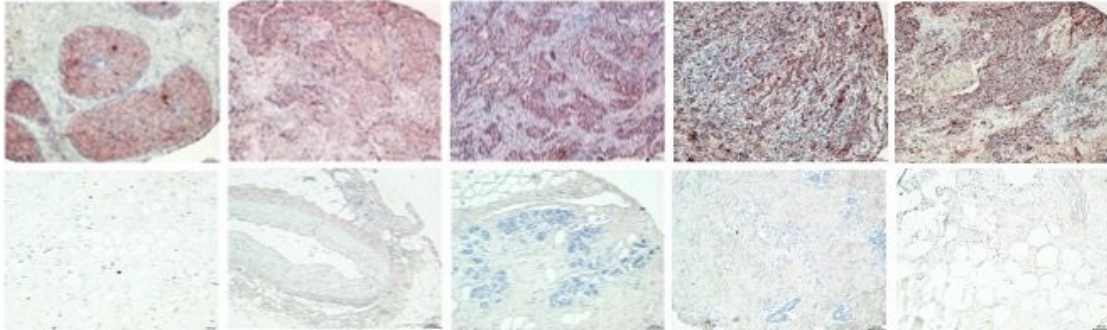


図2 乳癌組織におけるリンカーリン酸化受容体 SMAD

(上段:乳癌組織、下段:正常乳腺組織、青色:細胞核、褐色:リンカーリン酸化受容体 SMAD)

(2) 受容体 SMAD のリンカー部位リン酸化は乳癌抗癌剤抵抗性を誘導する

乳癌組織におけるリンカー部位リン酸化受容体 SMAD の機能的意義を解析する為、受容体 SMAD リンカー部位の各種変異体を作成し乳癌細胞株に移入、タキサン系微小管阻害薬パクリタキセルと、ER・PR 陽性株に対しては抗エストロゲン薬タモキシフェンに対する感受性を検討した結果、リンカー部位リン酸化受容体 SMAD は薬剤抵抗性を誘導することを見出した。さらに、薬剤抵抗性を誘導するリン酸化部位を同定した。

(3) 受容体 SMAD リンカー部位をリン酸化する因子の同定

各種サイトカインと薬剤を用いてスクリーニングすることによって、(2)で同定した受容体 SMAD リンカー部位をリン酸化する因子を同定した。

(4) リンカー部位リン酸化 SMAD による網羅的遺伝子発現制御解析

同定した因子、各種リン酸化 SMAD による遺伝子発現変化を RNA シーケンスにより、さらにヒストン修飾並びに DNA メチル化と各種リン酸化 SMAD の結合部位をクロマチン免疫沈降シーケンスにより網羅的に解析し、乳癌治療抵抗性を誘導する新規機序を発見した。

(5) 同所性同種移植乳癌マウスモデルによる治療抵抗性解析

同所性同種移植乳癌マウスモデルによる動物実験を行う為に、免疫原性が低いアデノ随伴ウイルスベクターにより各種 SMAD 変異体と対照を導入したマウス 4T1 細胞株を樹立し、生体イメージング (IVIS) を用いた実験プロトコルを最適化した。現在治療反応性について解析中である。

<引用文献>

Battle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*. 2019 Apr 16;50(4):924-940. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.024. PMID: 30995507; PMCID: PMC7507121.

Ciardillo, Davide, et al. "Clinical development of therapies targeting TGF $\beta$ : current knowledge and future perspectives." *Annals of Oncology* 31.10 (2020): 1336-1349.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mizuko Mamura, Eunjin Bae, Jin Soo Han, In-Kyu Lee, Ji Hyeon Ju, Yukari Okubo and Jeong-Hwan Yoon
2. 発表標題 CD4+ T cell-intrinsic SMAD4 is essential for Th2 differentiation in Th2-type allergic dermatitis
3. 学会等名 The 71st Annual meeting of Japanese Society of Allegology (第71回日本アレルギー学会学術大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mizuko Mamura, Jeong-Hwan Yoon, Eunjin Bae, Inkyu Lee, Jin Soo Han, Ji-Hyun Ju, Masahiko Kuroda, Yukari Okubo, Isao Matsumoto, Takayuki Sumida
2. 発表標題 Canonical TGF- signaling via SMAD3 and SMAD4 suppresses Th1 and Th17 differentiation in the pathogenesis of psoriasis
3. 学会等名 The 66th Annual General Assembly and Science Meeting of the Japan College of Rheumatology (第66回日本リウマチ学会総会・学術集会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eunjin Bae, Jeong-Hwan Yoon, Yasuo Nagafuchi, Yojiro Makino, Atsumi Tamura, Inkyu Lee, Jin Soo Han, Ji-Hyun Ju, Aoi Sukeda, Toshitaka Nagao, Tatsuo Ohira, Norihiko Ikeda, Keiji Miyazawa, Mitsuyasu Kato, Keishi Fujio, Masahiko Kuroda, Mizuko Mamura
2. 発表標題 Suppression of the canonical TGF-beta signaling via SMAD3 renders EGFR-mutant lung adenocarcinoma resistant to EGFR-TKIs
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第81回日本癌学会学術総会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jeong-Hwan Yoon, Eunjin Bae, Susumu Nakae, Katsuko Sudo, Jin Soo Han, In-Kyu Lee, Ji Hyeon Ju, Yukari Okubo and Mizuko Mamura
2. 発表標題 SMAD4 suppresses allergic contact dermatitis by inhibiting cytotoxic T lymphocyte-induced Th1 apoptosis
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (第50回日本免疫学会学術集会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jeong-Hwan Yoon, Eunjin Bae, Yukari Okubo and Mizuko Mamura
2. 発表標題 Canonical TGF- signaling via SMAD3 and SMAD4 suppresses Th1 and Th17 differentiation in psoriasis
3. 学会等名 The 70th Annual meeting of Japanese Society of Allergology (第70回日本アレルギー学会学術大会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mizuko Mamura, Eunjin Bae, Jin Soo Han, In-Kyu Lee, Ji Hyeon Ju, Yukari Okubo and Jeong-Hwan Yoon
2. 発表標題 SMAD3/4-mediated TGF- signaling suppresses allergic contact dermatitis by inhibiting cytotoxic T lymphocyte-induced Th1 apoptosis
3. 学会等名 The 70th Annual meeting of Japanese Society of Allergology (第70回日本アレルギー学会学術大会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eunjin Bae, Jeong-Hwan Yoon, Yojiro Makino, Atsumi Tamura, Inkyu Lee, Jin Soo Han, Ji-Hyun Ju, Aoi Sakeda, Toshitaka Nagao, Tatsuo Ohira, Norihiko Ikeda, Masahiko Kuroda, and Mizuko Mamura
2. 発表標題 Linker-phosphorylated SMAD2 induces resistance to tyrosine kinase inhibition in EGFR-mutated lung adenocarcinoma
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第80回日本癌学会学術総会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jeong-Hwan Yoon, Eunjin Bae, Inkyu Lee, Jin Soo Han, Ji-Hyun Ju, Masahiko Kuroda, and Mizuko Mamura
2. 発表標題 Intense ALK5 inhibition facilitates progression and metastasis of mouse melanoma
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第80回日本癌学会学術総会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eunjin Bae, Jeong-Hwan Yoon, Yojiro Makino, Atsumi Tamura, Inkyu Lee, Jin Soo Han, Ji-Hyun Ju, Aoi Sakeda, Toshitaka Nagao, Tatsuo Ohira, Norihiko Ikeda, Masahiko Kuroda, and Mizuko Mamura
2. 発表標題 Linker-phosphorylated SMAD2 induces resistance to tyrosine kinase inhibition in EGFR-mutated lung adenocarcinoma
3. 学会等名 The 85th Annual Meeting of the Japanese Society of Interferon & Cytokine Research (第85回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jeong-Hwan Yoon, Eunjin Bae, Inkyu Lee, Jin Soo Han, Ji-Hyun Ju, Masahiko Kuroda, Yukari Okubo, and Mizuko Mamura
2. 発表標題 Canonical TGF- signaling via SMAD4 suppresses Th1 and Th17 differentiation in psoriasis
3. 学会等名 The 85th Annual Meeting of the Japanese Society of Interferon & Cytokine Research (第85回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mizuko Mamura, Jeong-Hwan Yoon, Eunjin Bae, Jin Soo Han, Inkyu Lee, Ji-Hyun Ju, Yuya Kondo, Isao Matsumoto and Takayuki Sumida
2. 発表標題 Reciprocal repression of STAT3 and SMAD3/4 regulates Th17 differentiation, which predicts therapeutic response to IL-6 antagonism in rheumatoid arthritis
3. 学会等名 The 65th Annual General Assembly and Science Meeting of the Japan College of Rheumatology (第65回日本リウマチ学会総会・学術集会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jeong-Hwan Yoon, Eunjin Bae, Yukari Okubo and Mizuko Mamura
2. 発表標題 SMAD4-mediated TGF- signaling suppresses Th1 and Th17 differentiation in the pathogenesis of psoriasis
3. 学会等名 The JSA/WAO Joint Congress 2020 (第69回日本アレルギー学会学術大会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jeong-Hwan Yoon, Eunjin Bae, Jin Soo Han, Ji Hyeon Ju, Masahiro Yokozawa, Yuya Kondo, Isao Matsumoto, Takayuki Sumida, Mizuko Mamura
2. 発表標題 Reciprocal repression of STAT3 and SMAD3/SMAD4 in Th17 predicts therapeutic response to biologic disease-modifying antirheumatic drugs
3. 学会等名 The 65th Annual General Assembly and Science Meeting of the Japan College of Rheumatology (第64回日本リウマチ学会総会・学術集会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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		
韓国	Kyungpook National University	Konkuk University	Catholic University of Korea