

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390115

研究課題名（和文） TGF- $\beta$  研究のがん診断、治療、予防への橋渡し研究研究課題名（英文） Translational TGF- $\beta$  Research for Diagnosis, Treatment, and Prevention of Cancer

## 研究代表者

加藤 光保 (KATO MITSUYASU)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20194855

研究成果の概要（和文）：トランスフォーミング増殖因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ )の関連遺伝子として同定した TMEPAI, TSC22D4 (THG-1), MafK が、癌の発生と進展に関わることを明らかとし、その作用機序を解析し、分子標的治療や前臨床癌の進展予防のための新たな標的分子を同定した。また、TMEPAI, TSC22D4, MafK, Gpnm b などに対する種々の抗体を作製し、臨床病理学的解析や診断応用への道を開いた。

研究成果の概要（英文）：Transforming growth factor- $\beta$ -related molecules TMEPAI, TSC22D4 (THG-1), and MafK were elucidated to initiate carcinogenic activities and promote malignant progression. Study on the molecular mechanisms how these oncogenes functioning provided the novel target molecules for cancer treatment and prevention. We established monoclonal antibodies for TMEPAI, TSC22D4, MafK, Gpnm b and so on. These antibodies will open the application of these works for clinicopathological research and cancer diagnosis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2012年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：がん、TGF- $\beta$ 、TMEPAI、THG-1、MafK、Gpnm b

## 1. 研究開始当初の背景

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )は、細胞増殖、アポトーシス、細胞接着、細胞外マトリックスの産生、血管新生、免疫の制御等を通じて、人体の発生と恒常性の維持ならびに種々の病態において多彩な機能を果たしている。発がんとの関係についても、多くの研究者や企業が注目しており、発がんの初期段階では、がん細胞の増殖を抑制するが、TGF- $\beta$ の増殖抑制作用に耐性を獲得した進行がん細胞では、逆に浸潤や転移を促進することが知られていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、がんの発生と進展における TGF- $\beta$  関連分子の機能を明らかにし、これのがんの新たな診断・治療・予防方法の確立への橋渡しとする。TGF- $\beta$ シグナルの標的遺伝子で、がん細胞における発現が亢進している分子を同定し、その機能を明らかにすることを目的として基礎研究を続けてきた。さらに、TMEPAI、TSC22D4 (THG-1)、MafK の3つの関連分子に関してがんの診断・治療・予防方法を確立するための基礎研究を行ってきた。また、血管新生における TGF- $\beta$ シグナルの作用についても解析した。

### 3. 研究の方法

TMEPAI, TSC22D4 (THG-1), MafK に注目して以下の解析を行った。また、TGF-β/Smad 経路による血管新生の制御について解析した。それぞれ、培養細胞における遺伝子発現やノックダウンの作用と遺伝子改変動物の作製による解析を行った。

(1) TMEPAI については、TGF-βによる発現誘導に関わる転写制御領域を同定するとともに、TMEPAI の細胞内領域にある Smad Interaction Motif (SIM)による TGF-β/Smad シグナルの制御作用について解析した。また、モノクローナル抗体を作製して、がんにおける発現を検討するとともに、肺癌細胞等においてノックダウンを行って、細胞増殖能、スフェア形成能、免疫不全動物における腫瘍形成能に対する TMEPAI の作用について解析した。また、ノックアウトマウスを作製して組織学的解析を行った。

(2) TSC22D4 (THG-1)は、正常組織とがんにおける発現を免疫組織化学的に解析するとともに、EGF シグナルによる活性化について解析した。また、マスペクトロメトリーによる結合分子のスクリーニングを行い、がん細胞における細胞増殖、運動能、スフェア形成、腫瘍形成能亢進の標的分子機構を解析した。また、ノックアウトマウスを作製して組織学的解析を行った。

(3) MafK は、乳腺上皮細胞 MNuMG に発現させたところスフェア形成能、運動能、腫瘍形成能を誘導したため、発現遺伝子の変化をマイクロアレイによって解析した。発現が亢進した遺伝子の中から、注目した *GpnmB* についてその腫瘍形成能を解析した。また、乳がん細胞でノックダウンを行って腫瘍形成能に対する作用を検討した。さらに、細胞形態の変化から、これらの分子が上皮間葉転換を誘導する可能性を検討した。

(4) TGF-β I型受容体の変異ノックインマウスと Tie2-Cre を用いた血管内皮細胞特異的 Smad2/Smad3 ダブルノックアウトマウスを作製して、血管新生における TGF-β/Smad 経路の作用を解析した。また、血管新生に関与する TGF-βファミリーの標的分子であることを見いだした転写因子 E2-2 の制御について分子機構を解析した。

### 4. 研究成果

(1) TMEPAI は、イントロン 1 にある TCF7L2 結合領域と 3カ所の Smad binding domain (SBE)を介して TGF-βによる発現誘導がおこることが示された。また、誘導された TMEPAI は、細胞内領域にある Smad Interaction Motif (SIM)によって Smad2 と Smad3 に特異的に結合して TGF-β/Smad シグナルを制御作用することが示された (論文 4, 5)。

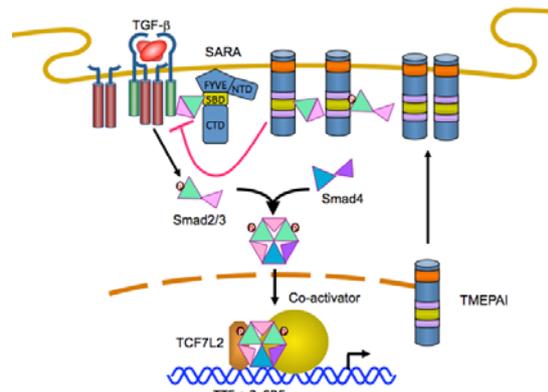


図1 TGF-βシグナルによる TMEPAI の発現誘導とネガティブフィードバック制御

また、モノクローナル抗体を作製して、肺癌細胞で発現が亢進していることを示すとともに、それをノックダウンすると腫瘍形成能が低下することを示した。

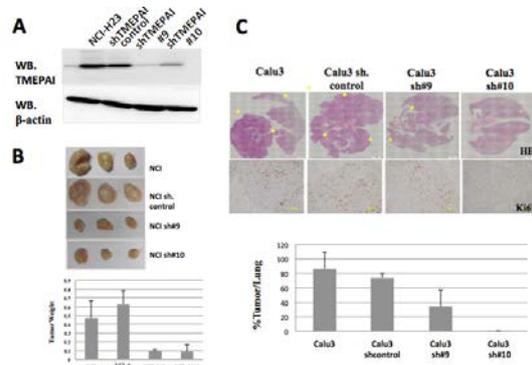


図2 肺癌細胞(NCI-H23)において TMEPAI のノックダウン(A)は、NOD/SCID マウスにおける皮下腫瘍形成能(B)と肺における転移性腫瘍形成能(C)を低下させる。

(2) TSC22D4 (THG-1)は、TGF-βで発現が誘導される TSC22 のファミリー分子であり、正常組織とがんにおける発現を免疫組織化学的に解析したところ、正常組織では、皮膚などの重層扁平上皮の基底層と皮膚付属器に特異的に発現しており、扁平上皮がんの 8割でその発現が亢進していた。

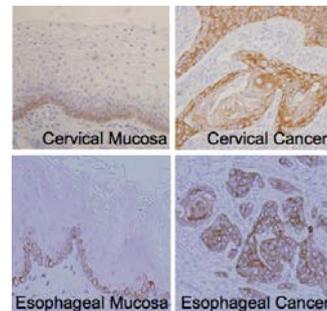


図3 子宮頸部粘膜、食道粘膜における TSC22D4 の発現とがんにおける発現亢進

さらに、TSC22D4 は、EGF/RAS/MAPK 経路の下流でリン酸化を受け活性化して腫瘍形成能を促進し、リン酸化部位に変異を入れると変異 RAS による腫瘍形成能をキャンセルすることも認められた。

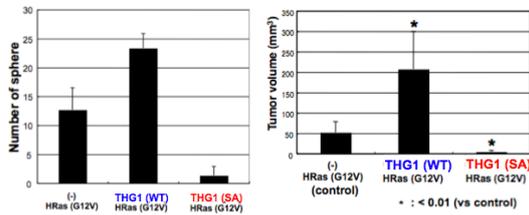


図4 RAS(G12V)による HaCaT 細胞のスフェア形成能 (左) と腫瘍形成能の亢進に対する野生型 TSC22D4(THG-1)による促進作用と変異 TSC22D4(THG-1)による抑制作用

さらに、マスマスペクトロメトリーによって結合分子のスクリーニングを行い、その中から、がん細胞における細胞増殖、運動能、スフェア形成、腫瘍形成能亢進に関与する2つの標的分子を同定して作用機序を明らかにした。現在、論文を投稿するとともに特許を申請中である。ノックアウトマウスでは、表皮の形成不全が見られ、皮膚や体毛の再性能の低下が示唆されており、さらなる解析を継続している。

(3) MafK は、乳腺上皮細胞 MNuMG に発現させたところ強力なスフェア形成能、運動能、腫瘍形成能の亢進を示した。また、乳がん細胞株の多くで発現が亢進していた。乳がん細胞で MafK をノックダウンするとこれらの腫瘍形成能が低下するとともに肺への転移能も低下することが示された。この結果は現在投稿中である。

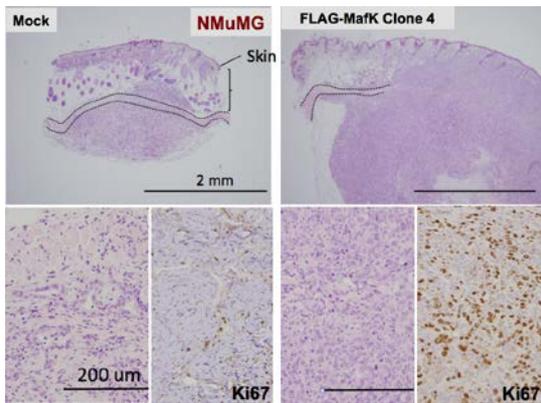


図5 MafK を発現させた乳腺上皮細胞の脱分化と腫瘍形成能の促進

また、MafK は強力な上皮間葉転換(EMT)誘導能をもつことも明らかとなったが、EMT 誘導に関与する既存の転写因子には影響がなく、

全く新しい機序で EMT を誘導していることが示唆された。また、発現遺伝子の変化をマイクロアレイによって解析したところ、発現が亢進した遺伝子の中に Gpnmb があり、乳がん細胞においても MafK の発現亢進に伴って Gpnmb の発現が誘導されていた。乳がん細胞で Gpnmb をノックダウンするとスフェア形成能や腫瘍形成能の低下がみられ、さらに、Gpnmb にも上皮間葉転換を誘導する作用があることが示された。

(4) がん細胞の増殖を支える間質変化に持続的な血管新生がある。TGF-β受容体のノックアウトマウスは血管新生不全のため胎生致死となるため、私達は、TGF-β/Smad 経路の血管新生における作用をより詳細に解析することを目的として、まず TGF-β I 型受容体の Smad 結合部位に変異を導入したノックインマウスを作製した。このマウスも血管新生不全で胎生致死になり、TGFβIR/Smad 経路も血管新生に必要であることが示された (論文 8)。次に Smad2/Smad3 の血管内皮細胞特異的なダブルノックアウトマウスを作製して、血管新生における TGF-β/Smad 経路の作用を解析した。このマウスでは、血管内皮細胞における Nカドヘリンとスフィンゴシン1リン酸受容体の発現が低下するために、周皮細胞の付着が不十分となり、血管が脆弱化し、出血傾向をもたらすことを明らかにした (論文 2)。

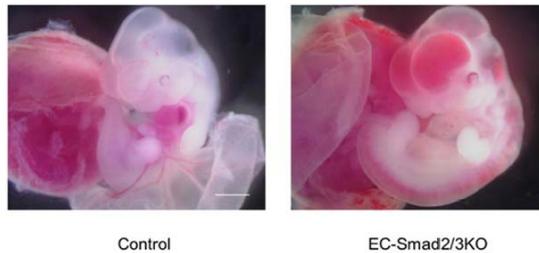


図6 血管内皮特異的 Smad2/Smad3 ノックアウトマウスにおける出血傾向(E11.5)

また、転写因子 E2-2 による血管新生の抑制と Id1 や FAM96B による血管新生誘導の機序について分子レベルで解析した (文献 3, 7)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- (1) Oishi H, Itoh S, Matsumoto K, Ishitobi H, Suzuki R, Ema M, Kojima T, Uchida K, **Kato M**, Miyata T and Takahashi S. Delayed cutaneous wound healing in Fam129b/Minerva-deficient mice. *J. Biochem.* 152: 549-555, 2012. (査読有)
- (2) Itoh F, Itoh S, Adachi T, Ichikawa K, Matsumura Y, Takagi T, Festing M, Watanabe T,

Weinstein M, Karlsson S and **Kato M**. Smad2/Smad3 in endothelium is indispensable for vascular stability via S1PR1 and N-cadherin expressions. **Blood**. 119: 5320-5328, 2012.(査読有)

- (3) Yang W, Itoh F, Ohya H, Kishimoto F, Tanaka A, Nakano N, Itoh S, **Kato M**. Interference of E2-2-mediated effect in endothelial cells by FAM96B through its limited expression of E2-2. **Cancer Sci**. 102: 1808-1814, 2011.(査読有)
- (4) Nakano N, Itoh S, Watanabe Y, Maeyama K, Itoh F, and **Kato M**. Requirement of TCF7L2 for TGF- $\beta$ -dependent transcriptional activation of the TMEPAI gene. **J Biol Chem**. 285: 38023-38033, 2010.(査読有)
- (5) Watanabe Y, Itoh S, Goto T, Ohnishi E, Inamitsu M, Itoh F, Satoh K, Wiercinska E, Yang W, Shi L, Tanaka A, Nakano N, Mommaas AM, Shibuya H, ten Dijke P and **Kato M**. TMEPAI, a transmembrane TGF- $\beta$ -inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF- $\beta$  signaling. **Mol Cell**. 37: 123-134, 2010.(査読有)
- (6) Ohshima M, Yamaguchi Y, Matsumoto N, Micke P, Takenouchi Y, Nishida T, **Kato M**, Komiyama K, Abiko Y, Ito K, Otsuka K and Kappert K. TGF- $\beta$  Signaling in Gingival Fibroblast-Epithelial Interaction. **J Dent Res**. 89: 1315-1321, 2010.(査読有)
- (7) Tanaka A, Itoh F, Takezawa T, Itoh S and **Kato M**. Inhibition of endothelial cell activation by bHLH protein E2-2 and its impairment of angiogenesis. **Blood**. 115: 4138-4147, 2010.(査読有)
- (8) Itoh F, Itoh S, Carvalho RLC, Adachi T, Ema M, Goumans MJ, Larsson J, Karlsson S, Takahashi S, Mummery CL, ten Dijke P and **Kato M**. Poor Vessel Formation in Embryos from Knock-in Mice Expressing ALK5 with L45 Loop Mutation Defective in Smad Activation, **Lab Invest**. 89: 800-810, 2009.(査読有)

[学会発表] (計 10 件)

- (1) Hiroyuki Suzuki, Roles of THG-1/Tsc22D4 in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis, 2013年2月25日, Hyatt Regency Maui, Hawaii, USA.
- (2) Yukari Okita, MafK mediates tumorigenic potential and EMT in breast cancer cells, AACR-JCA Joint Conference, 2013年2月23日, Hyatt Regency Maui, Hawaii, USA.
- (3) Vo Nguyen Thao Thanh, Tumorigenic function of TMEPAI in lung cancer cells, LICR TGF- $\beta$  meeting, 2012年8月30日, Leiden University Medical Center, Leiden, The

Netherlands.

- (4) 鈴木裕之, 細胞増殖、分化、癌化における Tsc-22 ファミリー分子の役割, 第 101 回日本病理学会総会, 2012年4月28日, 京王プラザホテル, 東京.
- (5) 沖田結花里, 乳腺細胞の上皮間葉転換と腫瘍形成における MafK の役割, 第 101 回日本病理学会総会, 2012年4月27日, 京王プラザホテル, 東京.
- (6) Mitsuyasu Kato, TMEPAI in Cancer Cell Biology, The 1<sup>st</sup> International Symposium by JSPS Core-to-Core Program "Cooperative International Framework in TGF- $\beta$  Family Signaling", 2012年1月23日, University of Tokyo, Tokyo.
- (7) Mitsuyasu Kato, TGF-beta stimulated clone-22 domain family 4 (TSC22D4) is a novel oncogene activated in squamous cell carcinoma, TGF- $\beta$  meeting, 2010年9月3日, Leiden University of Medical Center, Leiden, The Netherlands.
- (8) Mitsuyasu Kato, Smad traps for negative regulation of TGF- $\beta$  signaling, The 59th Fujihara International Seminar, 2010年7月15日, Grand Hotel New Oji, Tomakomai.
- (9) 加藤光保, 新規 TGF- $\beta$  関連分子のがんにおける機能, 革新的医薬シーズ 開発研究シンポジウム, 2010年6月22日, 筑波大学先端学際領域研究(TARA)センター, つくば.
- (10) Mitsuyasu Kato, TGF- $\beta$  related genes in early carcinogenesis, International Symposium on TGF- $\beta$  signaling, Inflammation, and Cancer Prevention, 2009年11月20日, Gachon University of Medicine and Science, Incheon, Korea.

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称:画像処理システム、画像処理方法及び画像処理プログラム

発明者:加藤光保、他

権利者:加藤光保、他

種類:特許

番号:特願 2012-140594

出願年月日:平成 24 年 6 月 22 日

国内外の別:国内

[その他]

ホームページ

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/epatho/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 光保 (KATO MITSUYASU)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号:20194855