

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24年5月16日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590328

研究課題名（和文） TGF- β シグナルによる腫瘍化制御機構の解明研究課題名（英文） Tumorigenicity by TGF- β signaling

研究代表者

伊東 進 (ITO H SUSUMU)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70223154

研究成果の概要（和文）：

- ・TMEPAI 遺伝子の発現が wnt と TGF- β シグナルによって相乗的誘導されることを見出した。
- ・TMEPAI ファミリー分子 C18Orf1 が TMEPAI と同様に TGF- β シグナルを抑制することを見出した。
- ・TMEPAI と C18Orf1 のノックアウトマウスを作出したが、現在まで表現型を見出すことはできなかった。
- ・血管内皮特異的 Smad2/3 ダブルノックアウトは、血管構造がもろくなっていることを見出した。また、その原因として、claudin5、S1PR1、N-カドヘリンの発現が弱くなっていることに起因することを見出した。
- ・Smad2/3 欠損血管内皮細胞は、シェアストレスにより、野生型の血管内皮細胞に比較して、形態変化を起こしていた。

研究成果の概要（英文）：

- TMEPAI gene is synergistically activated by both wnt and TGF- β signaling.
- C18Orf1, one of TMEPAI family, can inhibit TGF- β signaling like TMEPAI.
- Both TMEPAI and C18Orf1 knockout mice were generated. However, no phenotypes for both mice have been observed.
- The structure of blood vessels from endothelial cell-specific Smad2/3 double knockout mice seems to be fragile because the expressions of claudin 5, S1PR1 and N-cadherin are reduced in the endothelial cells from those mice.
- Endothelial cells from endothelial cell-specific Smad2/3 double knockout mice reveal morphological change when cells receive shear stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：TGF- β 、Smad、がん、血管新生、ノックアウトマウス、TMEPAI

1. 研究開始当初の背景

TGF- β は、血管形成時の血管平滑筋(SMC)と共に血管内皮細胞(EC)に作用し、血管成熟を担うため、TGF- β 受容体欠損マウスは、血管新生不全で胎生死となる。加えて、TGF- β シグナル系は、細胞増殖制御やアポトーシスを制御しており、TGF- β シグナル系の破綻は、発癌のみならず様々な疾患の原因となり、生命を脅かしている。多彩な作用を持つ TGF- β シグナル系は、DNA 結合転写因子である Smad による標的遺伝子の活性化を介して、生体応答を現す。したがって、TGF- β シグナル伝達の詳細な分子機構を明らかにすることにより、癌化を含め種々の難治性疾患の分子メカニズムに迫ることができ、TGF- β シグナル伝達制御を標的とした抗癌剤をはじめとした創薬開発推進に繋がる。申請者は、多種多様な TGF- β の生理作用の中で、この数年間特に力を注いできた①発癌機構ならびに②腫瘍血管新生を含めた血管形成に焦点を当て、TGF- β シグナルによる腫瘍化制御の解明に迫る研究を行うことを目的とする。

2. 研究の目的

④ TMEPAI の TGF- β シグナル伝達抑制メカニズムと癌進展との関連

申請者は、DNA マイクロアレイ解析で、TGF- β 刺激により誘導される分子として膜貫通型分子の TMEPAI (PMEPA1) を世界に先駆けて単離し、最近 TMEPAI は、TGF- β シグナルを特異的に抑制することを見出した。その作用機構として、TMEPAI の細胞質領域に存在する SIM ドメインに R-Smad である Smad2 並びに Smad3 が結合することで、TGF- β I 型受容体キナーゼと R-Smad 間の結合阻害及び R-Smad リン酸化抑制に起因する。さらに乳癌の悪性度に依存して TMEPAI 発現量が増加していることも見つけている。乳癌以外でも胃癌、大腸癌、直腸癌並びに腎細胞癌で、TMEPAI の発現が増加している報告もあり、TGF- β によって誘導される TMEPAI の発現亢進と癌化との密接な関連が予測される。以上より申請者は、TMEPAI の機能を発癌との観点に焦点を当てて詳細に検討していく予定である。

⑤ TGF- β シグナルの血管形成、血管新生制御機構

TGF- β ファミリーが、血管新生に影響を与えている事実は、遺伝性出血性末梢血管拡張症(ALK1 または endoglin 遺伝子変異)、原発性肺高血圧症(BMP II 型受容体変異)からも明白である(Siegel & Massagué, Nat Rev. Cancer, 3:807-821, 2003)。申請者は、EC に異なる 2 種類の TGF- β I 型受容体である ALK1 (EC に特異的に発現している) 及び ALK5 が存在し、TGF- β /ALK1/Smad5 シグナルは血管新生を促進し、TGF- β /ALK5/Smad2 シグナルは血管新生を

阻害すること、TGF- β による ALK1 シグナル活性化に ALK5 が必須であることを世界で初めて報告した。加えて、ALK1 シグナル系を維持したまま、ALK5 シグナル系のみを欠損させた ALK5KI マウス、EC 特異的 ALK5 欠損マウス及び SMC 特異的 ALK5 欠損マウスを作製しても、全身欠損型 ALK5KO マウスと同様な表現型を認めることから、TGF- β シグナルが EC 及び SMC 両方に伝わるのが血管形成時に必須であることが示唆された。しかしながら、使用した遺伝子欠損マウスでは、EC のみで TGF- β /ALK5/Smad2 シグナルを欠損した状態を作りだすことができなかった。上記の背景から、(i) TGF- β /ALK1 シグナルの EC 機能制御機構、(ii) TGF- β /ALK1 シグナル系の標的遺伝子でかつ血管新生促進作用があるが DNA に直接結合できない Id1 の血管新生制御機構が、現在まで不明のままになっている。そこで、申請者は、(i)の目的のため、最近作製した TGF- β /ALK5シグナルを EC 特異的に欠損させる Smad2^{F/F}Smad3^{-/-}Tie2Cre マウスを用いて、TGF- β /ALK1 シグナルの EC 機能制御機構を明らかにする。加えて、TGF- β /ALK1 シグナルの標的遺伝子である Id1 によって機能制御される血管新生制御転写因子に焦点を当てて、TGF- β による血管新生制御ネットワークを作成する。本研究計画では、胎仔期の血管形成を中心に TGF- β シグナルの血管形成制御機構の解明を進めていくが、腫瘍細胞より多量の TGF- β が分泌される例が多数報告されており(Siegel & Massagué, Nat Rev. Cancer, 3:807-821, 2003)、分泌された TGF- β が腫瘍周辺部位に異常な血管新生を進行させ、栄養分や酸素を過剰補給し、癌進展を促進することより、TGF- β による血管形成制御研究は、癌撲滅に迫れる課題である。

3. 研究の方法

(1) TMEPAI のプロモーター解析：TMEPAI の遺伝子発現機構を解明するために、TGF- β による転写活性化に必要なエンハンサー領域をルシフェラーゼ法、DNAP 法及び CHIP アッセイによって検討した。

(2) TMEPAI ファミリー分子の機能解析：C18orf1 が TMEPAI の機能を代替していると推測し、両分子の機能を比較し、両分子が協調して TGF- β シグナル抑制及び腫瘍形成亢進を行っている可能性について検討する。さらに、TMEPAI ファミリーと腫瘍化との関連について検討を行う。

(3) TMEPAI とファミリー分子の C18orf1 を欠損したノックアウトマウスを作出し、その機能を調べる。

(4) EC 特異的に TGF- β /ALK5/Smad2 シグナルを欠損させた Smad2^{F/F}Smad3^{-/-}Tie2Cre マウスは胎生 12.5 日まで生存可能であり、従来の ALK5 欠損マ

ウスより 2-3 日間長く生存する。このホモマウスは、異常出血が認められており、血管形成の不全が予測された。そこで、ホモマウスの EC 間並びに EC-SMC 間を構成するジャンクションタンパク質の発現相違を免疫染色により検討する。

(5) Smad2^{F/F}Smad3^{-/-}Tie2Cre 胎仔より EC を樹立し、TGF-βによる EC の機能（細胞増殖、管腔形成、遊走能、細胞間接着能）について調べる。

4. 研究成果

(1) TMPEAI は、TGF-βの直接の標的遺伝子であることより、その遺伝子発現調節機構に関しても検討を行ったところ、TMPEAI 遺伝子のイントロン 1 内に TTE と呼ばれる TCF7L2 が結合できる領域が、TGF-βによる遺伝子発現に重要なシス配列であることがわかった。実際この配列に変異を導入すると TGF-βによる発現誘導がほとんど認められず、TTE 近傍に存在する Smad の結合配列である SBE と強調し、TGF-βによる TMPEAI 遺伝子の発現誘導に関与していることを見出した。実際、ChIP アッセイにおいても、TTE 配列に TCF7L2 が TGF-β依存的に結合すること、並びにこの領域を含むように RNA ポリメラーゼ II も間接的に結合していることを見出した。

(2) TMPEAI ファミリー分子である C18ORF1 の機能解析を行い、C18ORF1 は、細胞内に恒常的に発現し、TGF-βシグナルを特異的に抑制することを見出した。この抑制機構として、TMPEAI と同様に C18ORF1 内に存在する SIM ドメインと Smad2/3 が結合するため、十分な量の Smad2/3 がアダプタータンパク質である SARA と結合できなくなり、その結果 SARA が TGF-β I 型受容体に Smad2/3 を提示できなくなったためであると考えられた。実際、C18ORF1 を細胞内に大量発現させると TGF-βによって誘導される細胞増殖抑制タンパク質の発現が抑制され、逆に C18ORF1 の発現を抑制すると TGF-βによって誘導される細胞増殖抑制タンパク質の発現が誘導された。また、TGF-βによる細胞の運動性充進能が C18ORF1 で抑制されることが見出された。以上の結果より、TMPEAI ファミリーである C18ORF1 は、定常状態での TGF-βシグナルを抑制し、過度の TGF-βシグナルが細胞内に伝達されると TMPEAI が誘導され、C18ORF1 単独では抑制することができなかった過度の TGF-βシグナルを TMPEAI とともに抑制するという協調機構が TMPEAI ファミリー間に存在すると予想している。

(3) TMPEAI と C18ORF1 の単独及びダブルノックアウトマウスを作製したが、いまだ顕著な表現系を見出すことはできていない。今後は、様々な発がん誘導剤や他の自然発症

発がんモデルマウスと掛け合わせることで、がん化を検討していく予定である。

(4) EC-Smad2/3KO マウス血管を電子顕微鏡で観察したところ、tight junction が非常に少なく、EC と VSMC 間に比較的大きなギャップが存在していた。加えて、EC 特異的に発現する claudin5 の発現量、S1PR 及び N-cadherin 量の減少が観察された。

(5) Smad2/3 を欠損した EC をマウス胎仔より樹立し、その機能を検討したが、現在まで優位な差が認められていない。しかしながら、シェアストレスをかけた際に、野生型の EC に比較して形態の著しい変化を認めたので、今後シェアストレス時における機能変化について検討を行う予定としている。

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 7 件)

① 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).

DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02022.x (査読あり)

② Nakano N., Itoh S., Watanabe Y, Maeyama K, Itoh F, Kato M.

Requirement of TCF7L2 for TGF-β-dependent transcriptional activation of the TMPEAI gene.

J. Biol. Chem., 285: 38023-38033 (2010).

<http://www.jbc.org/content/285/49/38023.long>
(査読あり)

③ Ishitobi H., Matsumoto K., Azami T., Itoh F., Itoh S., Takahashi S., Ema M.

Fli1-GFP BAC Tg mice: an animal model for the study of blood vessel development.

Exp. Animals, 59, 615-622 (2010).

DOI: 10.1538/expanim.59.615 (査読あり)

④ Tanaka A., Itoh F., Nishiyama K., Takezawa T., Kurihara H., Itoh S., Kato M.

Inhibition of endothelial cell activation by bHLH protein E2-2 and its impairment of angiogenesis.

Blood, 115, 4138-4147 (2010).

DOI: 10.1182/blood-2009-05-223057 (査読あり)

⑤Watanabe Y., **Itoh S.**, Goto T., Ohnishi, E., Inamitsu M., Itoh F., Satoh K., Wiercinska E., Yang W., Shi L., Tanaka A., Nakano N., Mommaas A. M., Shibuya H., ten Dijke P., Kato M.

TMEPAI, a transmembrane TGF- β -inducible protein, sequesters from active participation in TGF- β signaling.

Mol. Cell, 37, 123-134 (2010).

DOI: org/10.1016/j.molcel.2009.10.028 (査読あり)

⑥Itoh F.[#], **Itoh S.**[#], Carvalho R. L. C.[#], Adachi T., Ema M., Goumans M.-J., Larsson J., Karlsson S., Takahashi S., Mummery C. L., ten Dijke P., Kato M. ([#]equally contributed)

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)

DOI:10.1038/labinvest.2009.37 (査読あり)

⑦Tanaka A., Itoh F., **Itoh S.**, Kato M.

TAL1/SCL relieves the E2-2-mediated repression of VEGFR2 promoter activity.

J. Biochem. 145, 129-135 (2009)

DOI:10.1093/jb/mvn158 (査読あり)

[学会発表] (計6件)

①**Itoh S.**

Role of Smad2 and Smad3 in vascular stability. The 1st International Symposium by JSPS Core-to-Core Program “Cooperative International Framework in TGF- β Family Signaling.” 東京大学、東京 2012.1.24

②**Itoh S.**

Smad2/3 signaling is required for vascular stability.

日蘭二国間セミナー、昭和薬科大学、東京 2011.11.4

③**Itoh S.**

Regulation of endothelial cell migration by FAM96B.

TGF- β meeting in Uppsala. Uppsala, Sweden, 2011.8.20

④**Itoh S.**, Maeyama K, Nakano N, Watanabe Y, Itoh F, Togawa T and Kato M.

Transmembrane AR-Smad Trapper (TARST) family is a negative regulator of TGF- β signaling

FASEB Summer Research Conference, Barga, Italy, 2011.8.23

⑤**Itoh S.**

Negative regulation of TGF- β signaling by TMEPAI and its possible involvement for tumorigenicity.

BMB2010, 神戸ポートピアホテル、神戸、2010.12.8

⑥**Itoh S.**

Regulation of TGF- β signaling by TMEPAI family. TGF- β meeting in Leiden, Leiden The Netherlands, 2010.9.2

[図書] (計5件)

①**Itoh S.**, Itoh F.

Inhibitory machinery for the TGF- β family signaling pathway.

Growth Factors, 29, 163-173 (2011).

②**伊東 進**

TGF- β ファミリーシグナル抑制機構

別冊医学のあゆみ, pp13-19 (2011)

③伊東 史子、**伊東 進**、加藤 光保
血管新生における TGF- β ファミリーの役割と疾患

実験医学, 28, 877-882 (2010).

④宮澤 恵二、**伊東 進**

概論—TGF- β ファミリー研究の新しい流れ

実験医学, 28, 850-855 (2010).

⑤**伊東 進**

TGF- β ファミリーシグナル抑制機構

医学のあゆみ, 234, 893-899 (2010)

[その他]

ホームページ等

<http://www.shoyaku.ac.jp/labosite/seika/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 進 (ITO H SUSUMU)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70223154