

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21日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390052

研究課題名（和文）TGF- β シグナルの細胞応答選択的な制御手法の研究研究課題名（英文）Development of cell-response selective regulation of TGF- β signaling

研究代表者

宮澤 恵二 (MIYAZAWA KEIJI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：40209896

研究成果の概要（和文）：Transforming growth factor (TGF)- β は標的細胞に多様な細胞応答を惹起することにより、個体の恒常性維持において重要な役割を果たしている。本研究において、転写因子 Olig1 が TGF- β シグナル依存的に Smad2/3 と協調し、細胞運動性を促進することが明らかになった。また、Smad2/3 と Olig1 の相互作用を阻害することにより、TGF- β による細胞運動亢進作用を選択的に抑制することに成功した。これらの知見により、TGF- β による細胞応答を選択的に制御する手法の開発へと道が開かれた。

研究成果の概要（英文）：Transforming growth factor (TGF)- β plays crucial roles in embryonic development and adult tissue homeostasis by eliciting various cellular responses in target cells. TGF- β signaling is principally mediated through receptor-activated Smad proteins, which regulate expression of target genes in cooperation with other DNA-binding transcription factors (Smad cofactors).

In this study, we found that the basic helix-loop-helix transcription factor Olig1 is a Smad cofactor involved in TGF- β -induced cell motility. We also observed that cooperation of Smad2/3 with Olig1 is regulated by a peptidyl-prolyl cis/trans isomerase, Pin1. We further found that Olig1 interacts with the L3 loop of Smad3. Using a synthetic peptide corresponding to the L3 loop of Smad3, we succeeded in selectively inhibiting TGF- β -induced cell motility. These findings may lead to a new strategy for selective regulation of TGF- β -induced cellular responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、医化学一般

キーワード：細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

代表的な細胞増殖因子である transforming

growth factor (TGF)- β は、標的細胞の種類や状態に依存して多様な細胞応答を惹起する。顕

著な例として、正常細胞に対してがん抑制的に作用するが、いったんがん化した細胞に対しては悪性化促進的に作用することが知られている。近年、TGF- β のがん悪性化促進作用に注目し、その作用を抑制する化合物が国内外の製薬会社により開発されているが、副作用の問題が懸念される。そこで細胞応答選択的な第2世代のTGF- β シグナル制御法の開発が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究では、TGF- β のシグナル伝達を媒介する Smad タンパク質と転写因子 (Smad cofactor) の協調作用を標的に、細胞応答を選択的に抑制する手法の開発することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞運動性は chamber migration assay、wound healing assay により評価した。細胞増殖は細胞数の計測により評価した。上皮間葉転換はマーカー遺伝子 (E カドヘリン、N カドヘリン) の発現変化をイムノブロット法により検討した。

遺伝子ノックダウンは siRNA オリゴヌクレオチドを用いた。ペプチドの細胞内への導入には peptide transfection 法を用いた。

4. 研究成果

(1) Olig1 は TGF- β による細胞運動性亢進作用に関与する

本研究では Smad cofactor のひとつ、basic helix-loop-helix 型転写因子 Olig1 を研究対象にとりあげた。Olig1 が TGF- β 刺激に应答して Smad2/3 と結合すること、TGF- β の標的遺伝子の一部だけの誘導に関与することはすでに報告していた (Ikushima et al., *EMBO J.* **27**, 2955-2965, 2008)。しかし Olig1 がどのような細胞応答に関与するかは不明であった。そこで Olig1 をノックダウンした細胞で TGF- β への細胞応答を検討した。

Olig1 ノックダウン条件下では、TGF- β による細胞運動性亢進作用は顕著に抑制されたが、細胞増殖抑制作用や上皮間葉転換作用は抑制されなかった。また、他のサイトカインによる運動性亢進作用も影響されなかった。従って、Olig1 は TGF- β による細胞運動性亢進作用に特異的に関与する Smad cofactor であると結論した。

TGF- β による細胞増殖抑制に関与するとされる Smad cofactor の報告はいくつかあるが、実験結果に controversial な点も少なくない。一方、細胞運動性に関与する Smad cofactor としては本研究が初めての報告になる。

TGF- β による細胞運動性亢進作用は、転移・

浸潤に関与するとされ、がん悪性化を促進する細胞応答である。細胞応答選択的な制御手法開発のターゲットとして好適であると考え、研究を進めた。

(2) Smad-Olig1 の協調作用は Pin1 により制御されている

以前にアメリカのグループにより Pin1 が TGF- β による細胞運動性を促進することが報告されていた (Matsuura et al., *J. Biol. Chem.* **285**, 1754-1764, 2010)。そこで、Pin1 が Smad-Olig1 の協調作用に影響する可能性について検討した。

Pin1 をノックダウンすると Smad2/3 と Olig1 の結合が抑制され、TGF- β による細胞運動性も阻害されることがわかった。また、DNA マイクロアレイと用いた解析により、Olig1 ノックダウンと Pin1 ノックダウンは TGF- β による標的遺伝子の誘導に対して同様の影響を与えた (図1)。したがって、Pin1 は Smad2/3-Olig1 の協調作用に必須の因子であることがわかった。

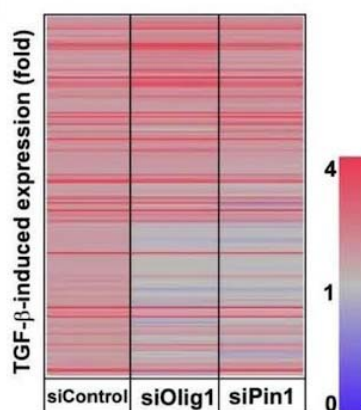


図1. TGF- β 標的遺伝子の誘導に対する Olig1・Pin1 ノックダウンの効果。DNA マイクロアレイの解析データをヒートマップ表示した。

Pin1 のこの作用には Smad2/3 のリンカー部位の CDK8/9 によるリン酸化が必要であることもわかった。この知見は、Smad タンパク質の修飾により Smad cofactor との協調作用が調節されるメカニズムを明らかにした初めての例である。

(3) Smad-Olig1 相互作用の抑制による細胞運動性の選択的制御

最後に、Smad-Olig1 の複合体形成阻害により、細胞応答を選択的に抑制することを試みた。Smad3 のアミノ酸置換変異体を用いた実験により、Smad3 タンパク質上で Olig1 との相互作用に関与する領域を L3 ループ上の 2 アミノ酸にまでに絞り込んだ (図2)。

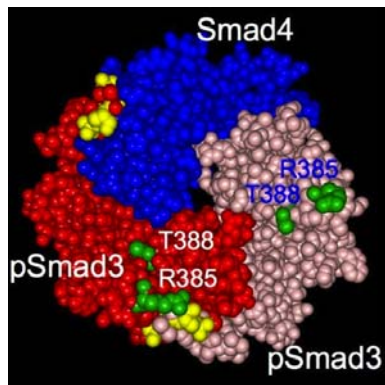


図2. Olig1 との結合に関与するアミノ酸残基 R385 と T388 を Smad の立体構造モデル上に表示した (緑色の残基)。この2残基を含むループ構造は L3 ループと呼ばれる。

ついで、L3 ループに該当するペプチドを合成し、細胞に取り込ませたところ、Smad2/3 と Olig1 の結合が阻害され、同時に TGF- β による細胞運動性が抑制されることを見いだした。一方、TGF- β による細胞増殖抑制や上皮間葉転換は影響を受けなかった。Smad と Smad cofactor の結合を阻害することにより、TGF- β シグナルの細胞応答選択的抑制が実現できることが実証できた。これは低分子化合物により TGF- β のシグナル伝達の細胞応答選択的制御に成功した初めての例である。

以上の結果により、TGF- β によるがん悪性化促進作用を特異的に抑制する手法の開発へと道筋をつけることができ、本研究の当初の目的は達成できたと考えている。今後は、この機能阻害ペプチドを、作用の強さと特異性に優れた化合物に置き換えることが重要である。また、TGF- β によるがん悪性化に深く関与する Smad cofactor の同定も進める必要がある。

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 11 件)

- ① Motizuki, M., Isogaya, K., Miyake, K., Ikushima, K., Kubota, T., Miyazono, K., Saitoh, M., and Miyazawa, K. (2013) Oligodendrocyte transcription factor 1 (Olig1) is a Smad cofactor involved in cell motility induced by transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* in press 査読有
doi: 10.1074/jbc.M113.480996.
- ② Saitoh, M., Shirakihara, T., Fukasawa, A., Horiguchi, K., Sakamoto, K., Sugiya, H., Beppu, H., Fujita, Y., Morita, I., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2013) Basolateral BMP signaling in polarized epithelial cells. *PLoS ONE* 8:e62659. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0062659.
- ③ Saitoh, M. and Miyazawa, K. (2012) Transcriptional and post-transcriptional regulation in TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition. *J. Biochem.* **151**, 563-571. 査読有
doi: 10.1093/jb/mvs040.
- ④ Ishii, R., Seto, A., Isogaya, K., Seto, A., Koinuma, D., Watanabe, Y., Arisaka, F., Yaguchi, S., Ikushima, H., Dohmae, N., Miyazono, K., Miyazawa, K., Ishitani, R., and Nureki, O. (2012) Structure of dominant-negative helix-loop-helix transcriptional regulator HHM representing the autoinhibition state. *EMBO J.* **31**, 2541-2552. 査読有
doi: 10.1038/emboj.2012.77.
- ⑤ Horiguchi, K., Sakamoto, K., Koinuma, D., Semba, K., Inoue, A., Inoue, S., Fujii, H., Yamaguchi, A., Miyazawa, K., Miyazono, K., and Saitoh, M. (2012) TGF- β drives epithelial-mesenchymal transition through δ EF1-mediated downregulation of ESRP. *Oncogene* **31**, 3190-3201. 査読有
doi: 10.1038/onc.2011.493.
- ⑥ Ikushima, H., Todo, T., Ino, Y., Takahashi, M., Saito, N., Miyazawa, K., and Miyazono, K. (2011) Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4. *J. Biol. Chem.* **286**, 41434-41441. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M111.300863.
- ⑦ Koinuma, D., Shinozaki, M., Nagano, Y., Ikushima, H., Horiguchi, K., Goto, K., Chano, T., Saitoh, M., Imamura, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2011) RB1CC1 positively regulates TGF- β signaling through modulation of Arkadia E3 ubiquitin ligase activity. *J. Biol. Chem.* **286**, 32502-32512. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M111.227561.
- ⑧ Inoue, Y., Iemura, S-i., Natsume, T., Miyazawa, K., and Imamura, T. (2011) Suppression of p53 activity through the cooperative action of Ski and histone deacetylase SIRT1. *J. Biol. Chem.* **286**, 6311-6320. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M110.177683.
- ⑨ Shirakihara, T., Horiguchi, K., Miyazawa, K., Ehata, S., Shibata, T., Morita, I., Miyazono, K., and Saitoh, M. (2011) TGF- β regulates FGF receptor isoform switching and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J.* **30**, 783-795. 査読有
doi: 10.1038/emboj.2010.351.
- ⑩ Mizutani, A., Saitoh, M., Imamura, T., Miyazawa, K., and Miyazono, K. (2010) Arkadia complexes with clathrin adaptor AP2

and regulates EGF signaling. *J. Biochem.* **148**, 733-741. 査読有
doi: 10.1093/jb/mvq127.

- ① Kamiya, Y., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2010) Smad7 inhibits transforming growth factor- β family type I receptors through two distinct modes of interaction. *J. Biol. Chem.* **285**, 30804-30813. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M110.166140.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 望月光由、齊藤正夫、宮澤恵二 : TGF- β による運動性促進に必須である Smad-Olig1 複合体形成は Pin1 によって制御される : 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日 (札幌)
- ② Keiji Miyazawa : Pin1 regulates the cooperative action of Smad2/3 and Olig1 : Ludwig Foundation TGF- β meeting、2012 年 8 月 29 日 (Leiden, Nederland)
- ③ Keiji Miyazawa : Selective regulation of TGF- β -induced cellular responses: TGF- β Family : Signal Network in Biologocal Functions The 1st International Symposium by JSPS Core-to-Core Program "Cooperative International Framework in TGF- β Family Signaling"、2012 年 1 月 23 日 (Tokyo)
- ④ 望月光由、齊藤正夫、宮澤恵二 : Smad 共役因子 Olig1 は TGF- β により誘導される細胞運動を制御する : 第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 4 日 (名古屋)
- ⑤ Keiji Miyazawa : Olig1 is a Smad cofactor that mediates TGF- β -induced cell motility : Ludwig Foundation TGF- β meeting、2011 年 8 月 18 日 (Uppsala, Sweden)
- ⑥ Keiji Miyazawa : How to achieve cellular-response-selective regulation of TGF- β signaling : KSBMB、2011 年 5 月 17 日 (Seoul, Korea)
- ⑦ Mitsuyoshi Motizuki, Masao Saitoh, and Keiji Miyazawa : Olig1 is an essential transcription factor for the TGF- β -induced cell migration : BMB2010、2010 年 12 月 7 日 (Kobe)
- ⑧ Keiji Miyazawa : The role of Smad-Olig1 transcription complex in TGF- β signaling : Ludwig Foundation TGF- β meeting、2010 年 9 月 2 日 (Leiden, Nederland)
- ⑨ Keiji Miyazawa : An-Id-like molecule, Maid, is a cellular-response selective regulator of TGF- β signaling. 藤原セミナー、2010 年 7 月 15 日 (苫小牧)

[図書] (計 1 件)

宮澤恵二 化学同人、がん増殖と悪性化の分子機構 2012、13

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/bioche02/bioch2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮澤 恵二 (MIYAZAWA KEIJI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号 : 40209896

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

望月 光由 (MOTIZUKI MITSUYOSHI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号 : 90174341

許 昭俊 (XU ZHAOJUN)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号 : 00345703