

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07936

研究課題名(和文) 翻訳後修飾制御によるTGF-βのがん抑制因子から悪性化因子への転換機構

研究課題名(英文) Mechanism of conversion of TGF-beta from tumor suppressor to malignant factor by post-translational modification control

研究代表者

井上 靖道 (Inoue, Yasumichi)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：10450579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：TGF-betaは増殖因子として発がんに関わる一方で、がんの悪性化を促すといった作用を持つことが知られている。しかしながら、その相反する生理作用がどのように制御されているかについては未だ不明なままである。本研究では、メチルトランスフェラーゼSET8がその作用を媒介する一つのSmadコファクターであることを見出した。また、がん抑制遺伝子p53がTGF-betaのがん抑制的な作用をフォローアップするコファクターであることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It is known that TGF-beta is involved in carcinogenesis as a growth factor, but also has the effect of promoting malignancy of cancer. However, how these contradictory physiological effects are controlled remains unclear. In this study, we found that methyltransferase SET8 is one Smad cofactor that mediates its action. It also revealed that the tumor suppressor gene p53 is a cofactor that follows up the cancer suppressive action of TGF-beta.

研究分野：生物系薬学

キーワード：TGF-beta Smad p53 翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

TGF- β (Transforming growth factor- β) は増殖抑制因子として知られ、早期のがんでは細胞増殖を抑制して、がんの進展を抑える作用を持つ。しかし、多くのがんでは TGF- β による増殖抑制作用を受けなくなっており、一方で腫瘍組織では TGF- β を豊富に産生している場合が多い。注目すべきことに、TGF- β による増殖抑制から回避したがん細胞においても TGF- β による上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) 促進作用は見られることが多く、TGF- β はがんの浸潤・転移を促すなどがんの悪性化に寄与している (Inoue & Imamura, *Cancer Sci*, 2008, Ikushima & Miyazono, *Nat Rev Cancer*, 2010)。それら TGF- β の相反する生理作用がどのように制御されているかについては未だ不明なままであり、TGF- β の腫瘍悪性化作用を選択的に抑制するがん治療法の確立に向け解明されることが求められている。

がんにおける相反したジキルとハイドの様な TGF- β の細胞応答の誘導は、核内での TGF- β 標的遺伝子の転写制御領域上における選択的な Smad 及び Smad と協調的に機能するコファクターの組み合わせ、ならびにそれに伴う特異的なエピジェネティック変化に起因していると想定し研究を進めたところ、ヒストンメチルトランスフェラーゼとして知られる SET8 が新たな細胞応答選択的な TGF- β シグナルの抑制因子であることを見いだした。TGF- β は p21 や PAI-1 を誘導して増殖抑制をおこなうが、SET8 はこれら遺伝子の発現誘導を抑制し、TGF- β による腫瘍抑制作用を阻害した。一方、TGF- β による EMT の誘導には SET8 は影響を与えず、がんの悪性化を促す作用は抑制しなかった。即ち、SET8 は TGF- β によるがん抑制的に作用する働きのみ遮断し、TGF- β の作用を腫瘍悪性化の方向へ特化させる新たな Smad 制御因子であると考えられた。このような Smad コファクターを同定し、がんにおける TGF- β シグナル制御を介したその生理作用を明らかにすることで、がんの新たな分子標的的作用点を見いだすことにも繋がると期待された。

2. 研究の目的

本研究では、SET8 による TGF- β シグナル制御機構を明らかにすることを目的とし、SET8 を標的に TGF- β による増殖抑制作用の回復を狙った新しい分子標的薬の開発につながる分子基盤の構築を目指した。

また、TGF- β シグナルを制御する Smad コファクターによる TGF- β の作用に与える影響についても解析した。

3. 研究の方法

SET8 をはじめとした Smad コファクターによる TGF- β シグナル制御制御に関しては、Western blotting、RT-PCR 等で解析した。また TGF- β による生物学的応答への作用に関しては BrdU による増殖やアポトーシスの誘導、または免疫染色法による EMT の評価などで検討した。

4. 研究成果

まず SET8 について得られた研究結果を述べる。SET8 は TGF- β によるがん抑制的に作用する働きのみを遮断する作用を有しているが、その作用には SET8 のメチルトランスフェラーゼとしての酵素活性が必要であった。また、エピジェネティック変化としてヒストン H4 のモノメチル化 (H4K20me1) が TGF- β 刺激で減少し、がんで見られる SET8 の高発現は TGF- β シグナルによる H4K20me1 低下を抑制していた。PAI-1 や p21 のプロモーター上では、SET8 は TGF- β 刺激のない状態から直接あるいは Smad 分子を介して SBE 付近に結合していた。そのため、プロモーター近傍の H4K20 がモノメチル化され、クロマチン構造が凝集もしくは何らかの構造変化を伴い、転写が OFF にされていると考えられた。TGF- β 刺激によって、プロモーター上にはコアクチベーターを含んだ Smads 複合体が結合し、SET8 は解離した。すなわち、多くの固形がんにおいて過剰発現が見られる SET8 は、TGF- β の増殖抑制作用に関わる遺伝子群のプロモーター上にリクルートされ、そのクロマチン構造を変化させることで、Smads 複合体のリクルートを抑え、その転写活性化を阻害していることが想定された。その結果、TGF- β の悪性化促進作用に関わる遺伝子群に対しては優位に Smads 複合体による転写活性化が促進されると考えられた (manuscript in preparation)。

一方、SET8 に加えて、がん抑制遺伝子として知られる p53 が TGF- β のがん抑制的な作用をフォローアップするコファクターであることも見いだした。前述した PAI-1 は細胞老化を誘導してがんの増殖を抑制する作用を持つ分泌タンパク質であり、TGF- β により強力に発現誘導されることが

知られている。PAI-1 のプロモーターレポーターをモデルとして両者の作用を検討したところ、p53 の存在は TGF- β により誘導されるためには欠かせないことがわかった。がんで見られる p53 の変異や、p53 のノックダウンはこの協調的に作用するのを抑制していた。分子メカニズムを検討したところ、p53 は Smad 複合体にヒストンアセチルトランスフェラーゼである p300/CBP をリクルートすることで、Smad による PAI-1 転写を促進させていた。重要なことに、p53 は TGF- β による増殖抑制作用に欠かせない分子であり、また PAI-1 も TGF- β による増殖抑制作用に必須であることを見いだした。PAI-1 のノックダウンは、TGF- β による増殖抑制を打ち消すことが明らかとなった (Kawarada et al, *Sci Rep*, 2016)。以上の知見は、がんにおける p53 の遺伝的ステータスは、TGF- β 中和抗体や TGF- β 受容体阻害剤を使用したがん治療の際に考慮する必要があることを明示しており、がんのプレシジョン医療を促進する上で有意義な知見になると思われた。

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)

Inoue Y, Abe K, Onozaki K, Hayashi H. TGF- β decreases the stability of IL-18-induced IFN- γ mRNA through the expression of TGF- β -induced tristetraprolin in KG-1 cells. *Biol Pharm Bull*, **38**: 536-544, 2015. doi: 10.1248/bpb.b14-00673 査読有.

Miyajima C, Inoue Y, Hayashi H. Pseudokinase tribbles 1 (TRB1) negatively regulates tumor-suppressor activity of p53 through p53 deacetylation. *Biol Pharm Bull*, **38**: 618-624, 2015. doi: 10.1248/bpb.b15-00003 査読有.

Miyajima C, Itoh Y, Inoue Y, Hayashi H. Positive regulation of interleukin-2 expression by a pseudokinase, tribbles 1, in activated T cells. *Biol Pharm Bull*, **38**: 1126-1133, 2015. doi: 10.1248/bpb.b15-00002 査読有.

Sakai S, Miyajima C, Uchida C, Itoh Y, Hayashi H, Inoue Y. Tribbles-related protein family members as regulators or substrates of the ubiquitin-proteasome system in cancer development. *Curr Cancer Drug Target*, **16**: 147-156, 2016. doi: 10.2174/1568009616666151112122645 査読有.

Inoue Y, Itoh Y, Sato K, Kawasaki F, Sumita C, Tanaka T, Morishita D, Hayashi H. Regulation of epithelial-mesenchymal transition by E3 ubiquitin ligases and deubiquitinase in cancer. *Curr Cancer Drug Target*, **16**: 110-118, 2016. doi: 10.2174/1568009616666151112122126 査読有.

Kawarada Y, Inoue Y, Kawasaki F, Fukuura K, Sato K, Tanaka T, Itoh Y, Hayashi H. TGF- β induces p53/Smads complex formation in the PAI-1 promoter to activate transcription. *Sci Rep*, **6**: 35483, 2016. doi: 10.1038/srep35483 査読有.

Inoue Y, Kawachi S, Ohkubo T, Nagasaka M, Oto S, Fukuura K, Itoh Y, Ohoka N, Morishita D, Hayashi H. The CDK inhibitor p21 is a novel target gene of ATF4 and contributes to cell survival under ER stress. *FEBS Lett*, **591**: 3682-3691, 2017. doi: 10.1002/1873-3468.12869 査読有.

[学会発表](計48件)

井上靖道. 細胞がん化における TRB1 の生理機能とがん分子標的としての可能性. 第19回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2015年6月12日, 松山

川崎文寛, 川原田祐貴, 井上靖道, 伊藤友香, 林秀敏. PAI1 遺伝子発現制御における Smad と p53 とのクロストーク. 第61回日本薬学会東海支部大会, 2015年7月4日, 名古屋

佐藤晃一, 井上靖道, 伊藤友香, 林秀敏.

脱コピキチン化酵素による EMT 関連転写因子 Snail タンパクの発現制御．第 61 回日本薬学会東海支部大会，2015 年 7 月 4 日，名古屋

野原匠，杉山和弥，宮嶋ちはる，伊藤友香，井上靖道，林秀敏．T 細胞における TRB3 を介したインターロイキン 2 発現の制御機構．第 16 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム，2015 年 6 月 13 日，東京

三田村佳奈，井上靖道，鈴木千晶，伊藤友香，林秀敏．転写共役因子 TAZ による p53 活性制御機構の解析．フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー，2015 年 9 月 17 日，神戸

川崎文寛，川原田祐貴，井上靖道，伊藤友香，林秀敏．PAI1 遺伝子発現制御における Smad と p53 とのクロストーク．フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー，2015 年 9 月 18 日，神戸

佐藤晃一，井上靖道，伊藤友香，林秀敏．脱コピキチン化酵素による EMT 関連転写因子 Snail タンパクの発現制御．フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー，2015 年 9 月 18 日，神戸

林秀敏，井上靖道．スキヤッフオードタンパク質による p53 活性の制御機構の解析．第 74 回日本癌学会学術集会，2015 年 10 月 10 日，名古屋

鈴木千晶，宮嶋ちはる，井上靖道，岩中広美，伊藤友香，林秀敏．細胞がん化における TRB1 の生理機能とがん分子標的としての可能性．BMB2015，2015 年 12 月 2 日，神戸

田中孝仁，西尾愛梨紗，井上靖道，隅田ちひろ，伊藤友香，林秀敏．Lox12 による TGF- β 誘導性上皮間葉転換制御の解析．BMB2015，2015 年 12 月 2 日，神戸

宮嶋ちはる，井上靖道，伊藤友香，北川雅敏，林秀敏．p53 活性に対する pseudokinase TRB1 の負の制御．BMB2015，2015 年 12 月 1 日，神戸

都築香里，伊藤友香，井上靖道，林秀敏．pseudokinase TRB1 によるインスリンを介

した糖代謝関連因子の新たな発現制御機構．日本薬学会第 136 年会，2016 年 3 月 27 日，横浜

井上靖道，宮嶋ちはる，鈴木千晶，伊藤友香，林秀敏．細胞がん化における TRB1 の生理機能とがん分子標的としての可能性．日本薬学会第 136 年会，2016 年 3 月 27 日，横浜

井上靖道．脱コピキチン化酵素による EMT 関連転写因子 Snail タンパクの発現制御．第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会，2016 年 5 月 31 日，別府

田中孝仁，西尾愛梨紗，井上靖道，隅田ちひろ，伊藤友香，林秀敏．Lox12 による TGF- β 誘導性上皮間葉転換制御の解析．第 62 回日本薬学会東海支部大会，2016 年 7 月 9 日，名古屋

鈴木千晶，宮嶋ちはる，井上靖道，岩中広美，伊藤友香，林秀敏．細胞がん化における TRB1 の生理機能とがん分子標的としての可能性．第 62 回日本薬学会東海支部大会，2016 年 7 月 9 日，名古屋

都築香里，伊藤友香，井上靖道，林秀敏．pseudokinase TRB1 による糖代謝関連因子の発現制御機構．第 62 回日本薬学会東海支部大会，2016 年 7 月 9 日，名古屋

中平桂子，石井陽子，伊藤友香，山田莉香子，加藤一雲，井上靖道，水谷隆治，林秀敏．TGF- β による UDP グルクロン酸転移酵素 UGT1A1 の転写制御機構の解析．第 62 回日本薬学会東海支部大会，2016 年 7 月 9 日，名古屋

福浦啓史，井上靖道，長尾優始，伊藤友香，林秀敏．メチルトランスフェラーゼ SET8 の TGF- β 応答性転写調節における作用機構．フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー，2016 年 9 月 11 日，東京

山田莉香子，加藤一雲，伊藤友香，井上靖道，林秀敏．UDP グルクロン酸転移酵素 UGT1A1 の発現制御における転写因子 HNF4 α の機能．フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー，2016 年 9 月 11 日，東京

- ⑳ 井上靖道, 林秀敏. 脱ユビキチン化酵素による EMT 関連転写因子 Snail タンパクの発現制御. 第 75 回日本癌学会学術集会, 2016 年 10 月 7 日, 横浜
- ㉑ 井上靖道, 西尾愛梨紗, 田中孝仁, 隅田ちひろ, 伊藤友香, 林秀敏. リジルオキシダーゼ Lox12 による TGF- β 誘導性上皮間葉転換制御. 第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2016 年 11 月 17 日, 名古屋
- ㉒ 伊藤友香, 鈴木美沙紀, 楽怡, 井上万由美, 井上靖道, 斎藤昌之, 林秀敏. TGF- β による遺伝子発現制御を介した白色脂肪細胞の脂肪滴消失機構. 第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2016 年 11 月 17 日, 名古屋
- ㉓ 大久保翼, 伊藤彰悟, 川地志緒里, 井上靖道, 伊藤友香, 林秀敏. ATF4 による CDK インヒビター p21 発現制御機構の解析と小胞体ストレスチェックポイントにおけるその役割. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 1 日, 横浜
- ㉔ 佐藤晃一, 井上靖道, 伊藤友香, 駒田雅之, 林秀敏. 脱ユビキチン化酵素 USP28 は Snail を安定化し, がん細胞の浸潤に寄与する. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 2 日, 横浜
- ㉕ 鈴木千晶, 井上靖道, 三田村佳奈, 伊藤友香, 林秀敏. 転写共役因子 TAZ による p53 活性制御機構の解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 2 日, 横浜
- ㉖ 都築香里, 伊藤友香, 井上靖道, 林秀敏. pseudokinase TRB1 によるインスリンを介した糖代謝関連因子の新たな発現制御機構. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 2 日, 横浜
- ㉗ 田中孝仁, 西尾愛梨紗, 井上靖道, 隅田ちひろ, 伊藤友香, 林秀敏. Lox12 による TGF- β 誘導性上皮間葉転換制御の解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 2 日, 横浜
- ㉘ 川崎文寛, 隅田ちひろ, 田中孝仁, 井上靖道, 伊藤友香, 林秀敏. 上皮間葉転換 (EMT) 関連転写因子 Sox4 の分解制御. 日本病院薬剤師東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2016, 2016 年 10 月 30 日, 岐阜
- ㉙ 佐藤晃一, 井上靖道, 伊藤友香, 林秀敏. 脱ユビキチン化酵素による EMT 関連転写因子 Snail タンパクの発現制御. 日本病院薬剤師東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2016, 2016 年 10 月 30 日, 岐阜
- ㉚ 井上靖道, 佐藤晃一, 伊藤友香, 駒田雅之, 林秀敏. USP28 は Snail の脱ユビキチン化酵素としてがんの浸潤に寄与する. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 25 日, 仙台
- ㉛ 川崎文寛, 隅田ちひろ, 田中孝仁, 井上靖道, 伊藤友香, 林秀敏. 上皮間葉転換 (EMT) 関連転写因子 Sox4 の分解制御. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 27 日, 仙台
- ㉜ 長坂真衣, 橋本亮子, 伊藤友香, 石内勘一郎, 牧野利明, 水上元, 井上靖道, 林秀敏. がん抑制遺伝子 p53 再活性化作用を持つ化合物の同定とその作用機序の解析. 第 81 回日本生化学会中部支部例会, 2017 年 5 月 20 日, 名古屋
- ㉝ 鈴木千晶, 井上靖道, 三田村佳奈, 伊藤友香, 林秀敏. 転写共役因子 TAZ による p53 活性制御機構の解析. 第 81 回日本生化学会中部支部例会, 2017 年 5 月 20 日, 名古屋
- ㉞ 田中孝仁, 西尾愛梨紗, 井上靖道, 隅田ちひろ, 伊藤友香, 林秀敏. Lox12 による TGF- β 誘導性上皮間葉転換制御の解析. 第 81 回日本生化学会中部支部例会, 2017 年 5 月 20 日, 名古屋
- ㉟ 福浦啓史, 井上靖道, 長尾優始, 伊藤友香, 林秀敏. メチルトランスフェラーゼ SET8 の TGF- β 応答性転写調節における作用機構. 第 81 回日本生化学会中部支部例会, 2017 年 5 月 20 日, 名古屋
- ㊱ 徳川宗成, 伊藤友香, 石内勘一郎, 牧野利明, 水上元, 井上靖道, 林秀敏. 小胞体ストレス抑制作用をもつマンマー産植

物由来抽出液の生理活性成分の同定とその作用機序の解明．第 81 回日本生化学会中部支部例会，2017 年 5 月 20 日，名古屋

- ③⑧ 長坂真衣，橋本亮子，伊藤友香，石内勘一郎，牧野利明，水上元，井上靖道，林秀敏．がん抑制遺伝子 p53 再活性化作用を持つ化合物の同定とその作用機序の解析．第 63 回日本薬学会東海支部大会，2017 年 7 月 8 日，岐阜
- ③⑨ 加藤一雲，山田莉香子，伊藤友香，井上靖道，林秀敏．TGF- β による CAR を介した UDP グルクロン酸転移酵素 UGT1A1 の発現抑制．日本病院薬剤師東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2017，2017 年 11 月 26 日，鈴鹿
- ④⑩ 橋本亮子，長坂真衣，伊藤友香，石内勘一郎，牧野利明，松野倫代，水上元，井上靖道，林秀敏．がん抑制遺伝子 p53 再活性化作用を持つ化合物の同定とその作用機序の解析．日本病院薬剤師東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2017，2017 年 11 月 26 日，鈴鹿
- ④⑪ 田中仁美，佐藤晃一，伊藤友香，井上靖道，林秀敏．脱ユビキチン化による Snail のがん浸潤への寄与．日本病院薬剤師東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2017，2017 年 11 月 26 日，鈴鹿
- ④⑫ 徳川宗成，伊藤友香，石内勘一郎，牧野利明，松野倫代，水上元，井上靖道，林秀敏．小胞体ストレスを軽減する新規化合物の同定と作用機序の解明．日本病院薬剤師東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2017，2017 年 11 月 26 日，鈴鹿
- ④⑬ 鈴木千晶，井上靖道，三田村佳奈，伊藤友香，林秀敏．転写共役因子 TAZ による p53 活性制御機構の解析．日本病院薬剤師東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2017，2017 年 11 月 26 日，鈴鹿
- ④⑭ 林秀敏，井上靖道，大岡伸通．CDK1 p21 is a novel target gene of ATF4 and contributes to cell survival under endoplasmic reticulum stress. 第 76 回日本癌学会学術集会，2017 年 9 月 29 日，横浜

④⑮ 井上靖道，林秀敏．がんの浸潤・転移における脱ユビキチン化酵素の役割．日本薬学会第 137 年会，2018 年 3 月 27 日，金沢

④⑯ 都築香里，伊藤友香，井上靖道，林秀敏．pseudokinase TRB1 によるインスリンを介した糖代謝関連因子の新たな発現制御機構．日本薬学会第 137 年会，2018 年 3 月 27 日，金沢

④⑰ 徳川宗成，伊藤友香，石内勘一郎，牧野利明，松野倫代，水上元，井上靖道，林秀敏．小胞体ストレスを軽減する新規化合物の同定と作用機序の解明．日本薬学会第 137 年会，2018 年 3 月 27 日，金沢

④⑱ 田中孝仁，西尾愛梨紗，井上靖道，隅田ちひろ，伊藤友香，林秀敏．Lox12 による TGF- β 誘導性上皮間葉転換制御の解析．日本薬学会第 137 年会，2018 年 3 月 28 日，金沢

6．研究組織

(1)研究代表者

井上 靖道 (INOUE YASUMICHI)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：10450579

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

林 秀敏 (HAYASHI HIDETOSHI)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：80198853

(4)研究協力者

なし