

令和元年5月24日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05150

研究課題名(和文) がん悪性化に関与するSmad cofactorの同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of Smad cofactors involved in tumor progression

研究代表者

宮澤 恵二 (MIYAZAWA, KEIJI)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：40209896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞を題材に、TGF- β による多様な細胞応答を可能にするSmad cofactorの研究を行った。マウス乳がん細胞でTGF- β の抗アポトーシス作用に関与するSmad cofactorとしてOlig1を同定した。また、がん細胞で機能するSmad cofactorの系統的な探索法を開発し、2つの新規Smad cofactorを同定した。さらに、SmadとSmad cofactorの協調作用に依存した転写活性化の必要条件を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TGF- β の多様な作用の一部のみを選択的に抑制する次世代のTGF- β 阻害薬開発のためには、個々の作用に密接に結びついたSmad cofactorを同定し、その機能の発現メカニズムを明らかにする必要がある。本研究では新規Smad cofactorの探索法を開発するとともに、Smad cofactorの作用を効率的にブロックする手法を開発するための基礎として、SmadとSmad cofactorによる協調的な転写活性化の必要条件を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we worked on Smad cofactors in cancer cells, which enable a wide variety of cell responses induced by TGF- β . We identified Olig1 as a Smad cofactor involved in anti-apoptotic function of TGF- β in murine breast cancer cells. We also developed a strategy to screen Smad cofactors that operate in cancer cells and identified two novel Smad cofactors. Furthermore, we found minimal requirements for transcription activation by cooperation of Smad and Smad cofactors.

研究分野：基礎医学、生化学、腫瘍生物学

キーワード：シグナル伝達 TGF- β Smad 転写活性化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

TGF- β (transforming growth factor- β) は体内に広く分布し、広範な細胞種を標的として多様な細胞応答を惹起する細胞増殖因子である。TGF- β は個体発生から成体における恒常性維持にいたるまで、細胞間コミュニケーションを媒介する重要な機能を担っている。また、その過剰作用は、がん悪性化、線維症、免疫異常等、様々な疾病につながる事が知られている^[1]。そこで、TGF- β の作用を抑制する手法の開発が進められているが、生理的に重要な機能も抑制されることが問題となっている。したがって、疾病に關与する TGF- β の作用を選択的に抑制できるような次世代の TGF- β 標的薬の開発が待たれている。

2. 研究の目的

TGF- β による多様な細胞応答は下流因子 Smad と Smad 結合性転写因子 (Smad cofactor) の協調的作用により惹起される。我々は、すでに bHLH 型転写因子 Olig1 (oligodendrocyte transcription factor 1) が一部の細胞で TGF- β による細胞運動性亢進作用に關与すること、Smad と Olig1 の相互作用をブロックすると、TGF- β の細胞運動性亢進作用を選択的に阻害できることを見出している^[2]。そこで本研究では、がん悪性化につながる TGF- β シグナル伝達を明らかにする目的で、これに關与する Smad cofactor の同定を進める。本研究を進めることにより、TGF- β の過剰作用に起因する疾病の治療法開発、TGF- β の多様な細胞応答の分子的基盤の理解に有用な知見が得られると期待される。

3. 研究の方法

(1) Smad3 の部分ペプチドはペプチドトランスフェクション試薬を用いて培養細胞に導入し、細胞応答への影響を検討した。

(2) 内因性の Smad タンパク質と結合する配列は CASTing (cyclic amplification of selected target) 法により収集した。具体的には、TGF- β で 1 時間刺激した培養細胞の核抽出液と、30 塩基対のランダム配列部分を含む二本鎖 DNA オリゴヌクレオチドライブラリーを混合し、抗 Smad2/3 抗体で免疫沈降した。共沈した DNA を PCR により増幅し、濃縮操作を数回反復後、次世代シーケンサーを用いて収集した DNA の配列を決定した。

4. 研究成果

(1) TGF- β の抗アポトーシス作用に關与する Smad cofactor の同定

マウス乳腺由来の正常上皮細胞株 NMuMG は低血清条件で培養するとアポトーシスを起こして死滅する。一方、マウス乳がん細胞株 JygMC(A) は同条件下でも生存できるが、これは自己分泌する TGF- β の作用に依存することが報告されている^[3]。

TGF- β の抗アポトーシス作用は Smad3 の MH2 ドメインに存在する L3 ループに該当する部分ペプチドで抑制されることを見出した。

このペプチドが Smad3 と Olig1 の相互作用を阻害することを手掛かりとして、siRNA を用いたノックダウン実験により、Olig1 が抗アポトーシス作用に關与する Smad cofactor であることを明らかにした。

(2) 細胞運動性亢進作用に關与する Smad3 上の領域の同定

ヒト肺がん細胞株 A549 では Olig1 はほとんど発現しておらず、細胞運動性亢進作用に關与する Smad cofactor が他にありと考えられた。A549 細胞で Smad3 をノックアウトすると TGF- β 刺激しても運動性が亢進しなくなる。そこで、Smad3 ノックアウト A549 細胞に Smad3 あるいはその変異体を発現させ、Smad3 の MH1 ドメインの 2 アミノ酸の領域に責任部位を絞り込んだ。この領域は TGF- β 刺激された細胞が Rac1 を活性化してラメリポディアを形成するのに必要で

あった。以上の結果は、がん細胞で細胞運動性亢進に関与する新たな Smad cofactor を同定するための手掛かりになると期待される。

(3) 次世代シーケンサーを用いた内因性 Smad 結合配列の収集

本研究の開始前にヒト正常角化細胞株 HaCaT を用いて、内因性 Smad 結合配列の収集を予備的に進めていた。引き続き、ヒト肺腺がん細胞株 A549 と肝がん細胞株 HepG2 を用いて解析を進めた。また、マウス乳がん細胞株 JygMC(A)および 4T1、比較対象としてマウス正常乳腺上皮細胞 NMuMG についても解析を行なった。

得られた配列のレポーター活性の測定および転写因子結合モチーフ解析により、新たな Smad cofactor 候補として CUX1 と TBX3 を見出した。どちらのタンパク質も TGF- β で誘導され、細胞の浸潤能に関与することが報告されていたが、Smad と協調的に作用することは知られていなかった。今回、Smad3 との結合も確認できたので、典型的な Smad cofactor の条件を満たしていることがわかった。

この他の Smad cofactor 候補の中に TGF- β のシグナル伝達を顕著に増強するタンパク質を見出した。このタンパク質は消化器がんが発現が低下することが報告されており、がん抑制因子の候補と見なされている。したがって、TGF- β の腫瘍抑制作用に関与している可能性が示唆された。

(4) Smad3 と Ets 転写因子の協調作用の解析

ヒト正常角化細胞株 HaCaT 細胞を用いて収集した内因性 Smad 結合配列中に、Smad 結合モチーフと Ets ファミリー転写因子の結合モチーフを共にもつ配列を見出した。この配列はレポーターベクターに組み込むと TGF- β 依存的に強力に活性化された。このレポーターの一連の改変体を用いて、Smad と協調作用する Ets 転写因子の至適応答配列が標的細胞によって変化することを明らかにした。また、Smad と Ets 転写因子の協調作用には両者の結合が必ずしも必要でないことを示す結果を得た。これは Smad タンパク質と Smad cofactor との協調作用には結合が重要であるとの従来の考えに合致しない例である。

(5) Smad 依存的な転写活性化の必要条件の解析

(4)の結果を受けて、Smad cofactor の関与なしに転写が活性化される人工的なレポーター系を用いて、Smad の DNA 結合と転写活性化の対応について検討を行なった。その結果、シグナル依存的に活性化した Smad タンパク質が DNA に単独で結合しても、転写を誘導するには十分でないことを見出した。この結果により、活性化した Smad タンパク質は転写に必要な half unit であるとの新たなモデルが示唆された。

< 引用文献 >

“TGF- β in Human Disease”, Moustakas & Miyazawa eds. Springer Japan, 2013

Motizuki M, Isogaya K, Miyake K, Ikushima H, Kubota T, Miyazono K, Saitoh M, 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.* **288**, 18911-18922.

Ehata S, Hanyu A, Hayashi M, Aburatani H, Kato Y, Fujime M, Saitoh M, Miyazawa K, Imamura T, Miyazono K. (2007) Transforming growth factor-beta promotes survival of mammary carcinoma cells through induction of antiapoptotic transcription factor DEC1. *Cancer Res.* **67**, 9694-9703.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Sakai S, Ohhata T, Kitagawa K, Uchida C, Aoshima T, Niida H, Suzuki T, Inoue Y, Miyazawa K, Kitagawa M. (2019) Long noncoding RNA ELIT-1 acts as a Smad3 cofactor to facilitate TGF- β /Smad signaling and promote epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* in press, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3210. 査読有

Suzuki K, Kawataki T, Endo K, Miyazawa K, Kinouchi H, Saitoh M. (2018) Expression of ZEBs in gliomas is associated with invasive properties and histopathological grade. *Oncol Lett.* **16**, 1758-1764. doi: 10.3892/ol.2018.8852. 査読有

Nakamura R, Ishii H, Endo K, Hotta A, Fujii E, Miyazawa K, Saitoh M. (2018) Reciprocal expression of Slug and Snail in human oral cancer cells. *PLoS One.* **13**, e0199442. doi: 10.1371/journal.pone.0199442. 査読有

Itoh Y, Saitoh M, Miyazawa K. (2018) Smad3-STAT3 crosstalk in pathophysiological contexts. *Acta Biochim Biophys Sin.* **50**, 82-90. doi: 10.1093/abbs/gmx118. 査読有

Furuya S, Endo K, Takahashi A, Miyazawa K, Saitoh M. (2017) Snail suppresses cellular senescence and promotes fibroblast-led cancer cell invasion. *FEBS Open Bio.* **7**, 1586-1597. doi: 10.1002/2211-5463.12300. 査読有

Hayakawa A, Saitoh M, Miyazawa K. (2017) Dual Roles for Epithelial Splicing Regulatory Proteins 1 (ESRP1) and 2 (ESRP2) in Cancer Progression. *Adv Exp Med Biol.* **925**, 33-40. doi: 10.1007/5584_2016_50. 査読有

Sinh ND, Endo K, Miyazawa K, Saitoh M. (2017) Ets1 and ESE1 reciprocally regulate expression of ZEB1/ZEB2, dependent on ERK1/2 activity, in breast cancer cells. *Cancer Sci.* **108**, 952-960. doi: 10.1111/cas.13214. 査読有

Makino Y, Yoon JH, Bae E, Kato M, Miyazawa K, Ohira T, Ikeda N, Kuroda M, Mamura M. (2017) Repression of Smad3 by Stat3 and c-Ski/SnoN induces gefitinib resistance in lung adenocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* **484**, 269-277. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.093. 査読有

Miyazawa K, Miyazono K. (2017) Regulation of TGF- β Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **9**, a022095. doi: 10.1101/cshperspect.a022095. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

Keiji Miyazawa : Crucial role of Smad3 in protumorigenic TGF β signaling : STINT Special Symposium on the Sweden-Japan 150 Anniversary Grant "Pro-tumorigenic TGF β signaling", 2019/01/18 (Uppsala, Sweden)

Yuka Itoh, Kunio Miyake, Masao Saitoh, Keiji Miyazawa : Analysis of DNA binding properties of Smad proteins by cyclic amplification of selective target method : 12th International BMP Conference (poster), 2018/10/27 (Tokyo)

伊藤友香、宮澤恵二 : TGF- β による転写制御と Smad 結合配列の多様性 : 日本生化学会 (シンポジウム), 2018/9/25 (京都)

宮澤恵二 : Smad シグナルの canonical 経路と non-canonical 経路 : ConBio2017 (ワークショップ), 2017/12/08 (神戸)

伊藤友香、小俣千帆、望月光由、齋藤正夫、宮澤恵二 : CASTing (cyclic amplification of selective target)法による Smad 結合配列の探索と機能解明 : Conbio2017 (口頭発表), 2017/12/09 (神戸)

Keiji Miyazawa : Smad-dependent transcriptional activation : Ludwig Foundation TGF- β meeting, 2017/09/02 (Uppsala, Sweden)

宮澤恵二: 悪性脳腫瘍と TGF- β の機能: 第 18 回日本分子脳神経外科学会 (特別講演), 2017/08/26 (甲府)

Keiji Miyazawa : Smad binding proteins in context-dependent TGF- β signaling : 第 75 回日本癌学会学術総会 (コアシンポジウム), 2016/10/07 (横浜)

Keiji Miyazawa : Smad-dependent signaling and Smad binding cofactors : Ludwig Foundation TGF- β meeting, 2016/08/21 (Leiden, Nederland)

[その他]

ホームページ等

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

6 . 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名 : 伊藤 友香

ローマ字氏名 : (ITOH, yuka)

研究協力者氏名 : 望月 光由

ローマ字氏名 : (MOTIZUKI, mitsuyoshi)

研究協力者氏名 : 三宅 邦夫

ローマ字氏名 : (MIYAKE, kunio)