

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15252

研究課題名(和文) Phosphorylation status of TGF-beta receptor-regulated SMADs in the pathophysiology of triple negative breast cancers

研究課題名(英文) Phosphorylation status of TGF-beta receptor-regulated SMADs in the pathophysiology of triple negative breast cancers

研究代表者

裴 恩真 (BAE, Eunjin)

東京医科大学・医学部・兼任助教

研究者番号：40773388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：TGF-シグナルを伝達するSmad2とSmad3のリンカー領域リン酸化による非古典的シグナル伝達経路が、乳癌の化学療法抵抗性誘導する作用機序を明らかにした。エストロゲン受容体・プロゲステロン受容体・HER2に変異を有する乳癌においては、炎症性サイトカインがキナーゼを介してSmad2リンカー領域をリン酸化して抗癌剤抵抗性を誘導することを発見し、リンカー領域リン酸化Smad2標的遺伝子を各種Smad2変異体移入乳癌細胞株を用いたRNAシーケンシングによって同定した。一方、上記受容体に変異が無い乳癌においては、リンカー領域リン酸化Smad3が上皮間葉転換と抗癌剤抵抗性を誘導することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Smad2とSmad3のC末端リン酸化を介する古典的TGF-シグナル伝達経路による乳癌病態制御機構については多くが解明されてきたが、本研究では、Smad2とSmad3のリンカー領域リン酸化による非古典的シグナル伝達経路が乳癌の化学療法抵抗性を誘導する新規の作用とその分子病理学的機序を明らかにした。

本研究成果は、乳癌化学療法抵抗性を防ぐ治療方法の開発につながる可能性を有する。

研究成果の概要(英文)：Transforming growth factor (TGF)-receptor-regulated Smads: Smad2 and Smad3 are phosphorylated at their C-terminal serine residues, which transduce canonical TGF-signaling. This study has uncovered the novel roles of non-canonical signaling via linker phosphorylated Smad2 and Smad3 (pSmad2L and pSmad3L) in the pathogenesis of triple-positive breast cancer (TPBC) and triple-negative breast cancer (TNBC) in distinctive manners.

I have found that pSmad2L induced chemoresistance of TPBC. Inflammatory cytokines induced pSmad2L via the specific protein kinase and chemoresistance of TPBC. RNA sequencing of the TPBC cell line transfected with pSmad2L active and inactive mutants identified the target genes of pSmad2L to induce chemoresistance.

By contrast with pSmad2L, I have found that pSmad3L induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) and chemoresistance of TNBC cell lines.

研究分野：Cancer biology

キーワード：Breast Cancer Chemoresistance EMT TGF- Smad2 Smad3 Linker phosphorylation

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

TGF- $\beta$  は癌微小環境で高発現しており、乳癌の進行、化学療法抵抗性、予後を規定する。TGF- $\beta$  受容体により C 末端セリン残基がリン酸化されて古典的シグナル伝達経路を担う Smad2 と Smad3 が乳癌の病態に果たす役割は明らかにされてきたが、Smad2 と Smad3 リンカー領域のリン酸化の役割については不明であった。

### 2. 研究の目的

Smad2とSmad3リンカー領域リン酸化による乳癌制御機構を解明する。

### 3. 研究の方法

<1> MCF-7 TPBC細胞株とMDA-MB231 TNBC細胞株におけるSmad2とSmad3のC末端及びリンカー領域のリン酸化状態と局在をproximity-ligation assay (PLA)を用いた免疫細胞染色によって検討した。

<2> Smad2とSmad3のリン酸化状態と機能を解析する為、C末端及びリンカー領域リン酸化部位の恒常活性型と不活型変異体を作成し、MCF-7 TPBC細胞株、MDA-MB231 TNBC細胞株、MCF10CA1a TNBC細胞株に移入し、生存、細胞死、アポトーシス、細胞周期、EMT/METをフローサイトメトリー、免疫細胞染色、ウェスタンブロットングにて評価した。リンカー領域リン酸化Smad2とSmad3の標的遺伝子を同定する為、各変異体移入細胞株を用いてRNAシーケンシングを行った。

<3> Smad2とSmad3リンカー領域リン酸化を誘導する因子とシグナル伝達経路を同定する為、各種サイトカインをキナーゼ阻害薬の存在下または非存在下で培養乳癌細胞に添加して免疫細胞染色を行いスクリーニングした。

<4> Smad2とSmad3のリン酸化状態が化学療法感受性に及ぼす影響を検討する為、C末端及びリンカー領域リン酸化部位の各種変異体を移入したMCF-7 TPBC細胞株、MDA-MB231 TNBC細胞株、MCF10CA1a TNBC細胞株をパクリタキセルまたはタモキシフェンで刺激し、細胞周期とEMTをフローサイトメトリー、免疫細胞染色、ウェスタンブロットングにて評価した。

<5> アジア人乳癌患者組織アレイを用いて、Smad2とSmad3のリン酸化状態を免疫組織染色で評価した。

### 4. 研究成果

TPBC においては、炎症性サイトカインがキナーゼを介して Smad2 リンカー領域をリン酸化し、癌抑制遺伝子の発現を抑制して抗癌剤抵抗性を誘導することを発見した。乳癌患者検体において、治療抵抗性を示した患者の転移組織において Smad2 リンカー領域リン酸化が有意に亢進していた。

TNBC においては、C 末端ではなくリンカー領域がリン酸化された Smad3 が上皮間葉転換 (EMT) を誘導し、様々な薬剤感受性関連遺伝子の発現を制御することによって、抗癌剤抵抗性を促進することを発見した (図)。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### Smad2 and Smad3 linker phosphorylation related pathways and genes in breast cancer

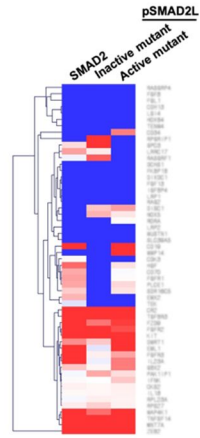
GO Network in pSmad2L inactive mutant related pathways



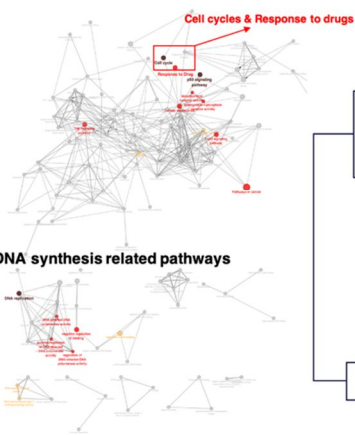
GO Network in pSmad2L active mutant related pathways



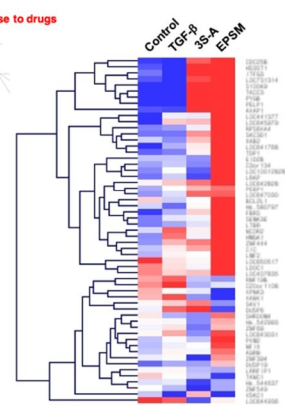
Cell death & cell proliferation related genes



GO Network in Smad3 EPSPM related pathways



Response to drug related genes



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----