

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15749

研究課題名(和文) TGF- β 型受容体機能欠損大腸癌における細胞死機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the cell death mechanism in TGF-beta type II receptor-dysfunctional colorectal cancer

研究代表者

辻井 芳樹 (Tsujii, Yoshiki)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：80795170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円

研究成果の概要(和文)：TGF- β 型受容体機能欠損大腸癌において、TGF- β 発現抑制により、p53・p21発現の有意な上昇を認め、細胞増殖の有意な抑制とアポトーシスを認めた。また、TGF- β 発現抑制によりTGF- β 型受容体の発現上昇を認めた。TGF- β -R 選択的阻害剤添加により、TGF- β 発現抑制によるp53とp21の上昇は減弱し、アポトーシスが抑制された。また、TGF- β -R 抑制にてTGF- β 発現抑制によるp53上昇は減弱し、細胞増殖とアポトーシスの抑制を認めた。これらのことから、TGF- β -R 機能欠損大腸癌ではTGF- β がTGF- β -R を介してp53を抑制し腫瘍促進に働いている可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、TGF- β 型受容体機能欠損大腸癌ではTGF- β が 型受容体を介してp53を抑制し腫瘍促進に働いている可能性が示唆された。TGF- β の作用転換機序の詳細はいまだ明らかでないが、本研究の結果は受容体の変異や不活性化が、本来は細胞増殖を抑制するはずのTGF- β が癌細胞を増殖させる作用に転じるひとつの契機になっていることを支持しており、学術的意義があったと考える。今後TGF- β 型受容体の機能が欠損した大腸癌においては、 型受容体を介したp53への経路詳細の解明が望まれるとともに、それを標的とした個別化治療への発展が臨床的に期待される。

研究成果の概要(英文)：In colorectal cancer deficient in TGF- β -RII function, suppression of TGF- β expression increased the expression of p53, p21 and type I receptor (TGF- β -R). TGF- β -R selective inhibitor attenuated the increased p53 and p21 expression that were induced by TGF- β suppression. In addition, suppression of TGF- β -R I attenuated p53 elevation due to TGF- β suppression, and cell proliferation and suppression of apoptosis was observed. These results indicated that in TGF- β -RII-dysfunctional colorectal cancer cells, endogenous TGF- β 1 has the potential to suppress p53 expression via reduced TGF- β -RI expression, leading to resistance to apoptosis.

研究分野：消化管癌

キーワード：TGF- β 大腸癌 アポトーシス p53 受容体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Transforming Growth Factor beta (TGF- β)は細胞の増殖や分化などを調節するサイトカインであるが、正常上皮ではTGF- β /Smad signaling pathwayを介して細胞増殖を抑制する。TGF- β が細胞膜上のTGF- β -R IIへ結合するとI型受容体(TGF- β -R I)が活性化し細胞内のSmadがリン酸化複合体となって他の因子とともに標的遺伝子の転写を制御する。TGF- β は癌組織においても細胞の増殖や血管増生、線維化、上皮間葉転換などにおいて重要な働きを有するが、正常組織や早期癌では細胞増殖を抑制するのに対して、進行癌や転移性癌では腫瘍促進に働く傾向があることが知られている。しかし、その作用転換(TGF- β switch)の機序に関してはまだ詳細は明らかにされていない。大腸癌においては、TGF- β -R IIの不活性化がMSI大腸癌の90%にみられ、またMSSの大腸癌でも進行をきたした後期の段階ではTGF- β -R IIの転写抑制等によりTGF- β 刺激に不応性になっていることが多いとされる¹。また、Smadの変異は大腸癌の20-30%で見られる。しかし、そのような状況でも、組織中TGF- β の発現上昇が見られ、その濃度上昇と悪性度との関連が報告されている²ことから、受容体を介する古典的なTGF- β /Smadのシグナル経路が破綻した大腸癌においてもTGF- β が何らかの役割を果たしている可能性が示唆される。

我々は、TGF- β -R IIが機能欠損している複数の大腸癌細胞株において、リコンビナントTGF- β による刺激によってp53の発現や細胞増殖は変化しないが、siRNAを用いてTGF- β を抑制するとp53が上昇しアポトーシスが誘導されて細胞数が減少するという現象を見出した。このことからTGF- β -R IIが機能欠損した大腸癌ではTGF- β がp53を抑制し癌細胞の増殖を促進している可能性が疑われた。TGF- β とp53の関係性については、正常肝においてTGF- β がp38MAPキナーゼ活性を介してp53を活性化するという報告がある³。しかし逆に、HCT116においてTGF- β -R IIをコードする遺伝子を再導入すると、TGF- β 刺激がMDM2上昇を介してp53を抑制したという結果も報告されている⁴。後者の研究はTGF- β がp53を抑制する点では同じ方向性であるが、あくまでTGF- β -R IIを介した検討であった。TGF- β -R IIが機能欠損した大腸癌においてTGF- β がp53を抑制し癌細胞の増殖を誘導していることが実証できれば、内視鏡生検や外科手術による検体を用いて受容体の変異や発現の解析結果をもとにした個別化治療への応用が期待できると考えられる。さらに、TGF- β -R IIの不活性化した大腸癌においては、TGF- β -R Iを介したTGF- β に対する感受性が報告されている⁵。しかし、これまでにTGF- β -R Iとp53の関係性についての検討は見られない。p53は発癌や癌の進行において鍵となる分子であり、TGF- β -R Iを含めたTGF- β の受容体機能の温存あるいは破綻とp53との関係性が究明できれば、TGF- β switchの解明に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

TGF- β は広範な組織で産生され、細胞の増殖や分化などを調節することで様々な生命現象に関わる。TGF- β は正常組織や早期癌では細胞増殖を抑制するが、進行癌や転移性癌では腫瘍促進に働く傾向があることが知られている。しかし、その作用転換(TGF- β switch)の機序に関してはまだ詳細は不明である。進行大腸癌においては、TGF- β のII型受容体(TGF- β -R II)の不活性化や転写抑制が認められる一方で、組織中TGF- β の発現上昇やその悪性度との関連が報告されており、受容体が機能欠損した大腸癌においてもTGF- β が役割を果たしている可能性が示唆される。本研究は、TGF- β -R IIが機能欠損した大腸癌におけるTGF- β の役割について検討し、TGF- β switchの機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

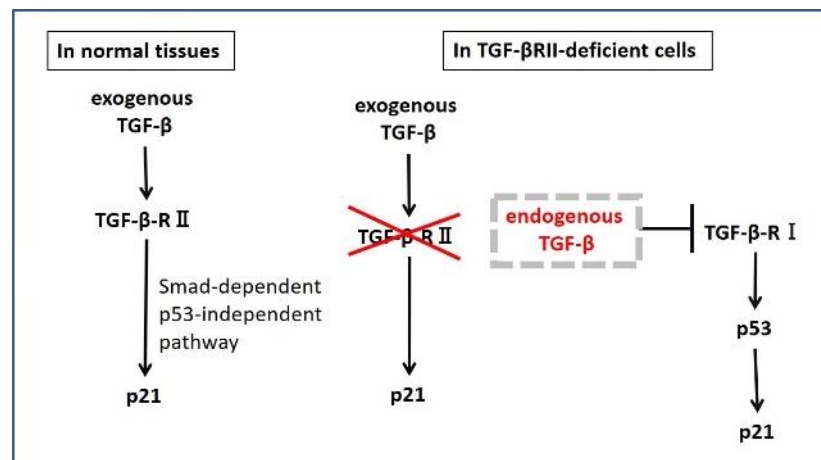
各種大腸癌細胞株を培養し、TGF- β が細胞増殖に及ぼす影響についてTGF- β の添加実験、抑制実験、強制発現実験を行い検討した。また、TGF- β -R II正常の細胞株でTGF- β -R IIの抑制実験を行い、TGF- β -R IIの機能欠損した細胞株と類似の表現型が見られるかどうかを検証した。TGF- β -R IIの機能欠損した細胞株においてはTGF- β 刺激がTGF- β -R Iなど他の受容体を介する可能性を念頭に、抑制実験や阻害剤投与を行い探索することとした。

4. 研究成果

TGF- β -R II機能欠損大腸癌細胞株培養上清中にTGF- β が分泌されていることをELISA法にて確認した上で、siRNAを用いてTGF- β 発現を抑制すると、複数の細胞株においてp53・p21発現の有意な上昇を認めた。コントロールに比して細胞増殖は有意に抑制され、Caspase3/7活性の有意な上昇を認めた。TGF- β -R II機能正常大腸癌細胞株ではTGF- β 発現抑制に伴うp53の上昇は認めなかった。一方、TGF- β -R II機能欠損大腸癌にTGF- β 中和抗体やRecombinant TGF- β を

添加した際に、Smad のリン酸化や p53 の発現上昇は認めなかった。TGF- β -R II 機能正常大腸癌細胞株で TGF- β 発現を抑制すると、コントロールでは p53 に発現変化を誘導しなかったが、TGF- β -R II 発現抑制細胞株では、p53 の有意な発現上昇を認めた。TGF- β -R II 機能欠損大腸癌において、TGF- β 発現抑制に伴い、I 型受容体 (TGF- β -R I) の発現上昇を認めた。そこで、TGF- β -R I 選択的阻害剤を添加すると、TGF- β 発現抑制による p53 と p21 の上昇は減弱し、アポトーシスが抑制された。さらに TGF- β -R I を抑制すると、TGF- β 発現抑制による p53 上昇は減弱し、細胞数増加とアポトーシスの抑制を認めた。

以上のことから TGF- β II 型受容体機能欠損大腸癌においては TGF- β が I 型受容体を介して p53 を抑制し腫瘍促進に働いている可能性が示唆された (下図)。本研究の結果は受容体の変異や不活性化が、本来は細胞増殖を抑制するはずの TGF- β が癌細胞を増殖させる方向に転じるひとつの契機になっていることを支持した。今後 TGF- β II 型受容体の機能が欠損した大腸癌においては、I 型受容体を介した p53 への経路詳細の解明が望まれるとともに、それを標的とした個別化治療への発展が期待される。



引用文献

1. Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, et al. Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.* 1999;59:320-324.
2. Friedman E, Gold LI, Klimstra D, et al. High levels of transforming growth factor beta 1 correlate with disease progression in human colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995;4:549-54.
3. Amelia Sánchez-Capelo. Dual Role for TGF-beta1 in Apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:15-34.
4. Araki S, Eitel JA, Batuello CN, et al. TGF-beta1-induced expression of human Mdm2 correlates with late-stage metastatic breast cancer. *J Clin Invest.* 2010 Jan;120:290-302.
5. Baker K, Raut P, Jass JR. Microsatellite unstable colorectal cancer cell lines with truncating TGF-beta RII mutations remain sensitive to endogenous TGF-beta. *J Pathol.* 2007;213:257 - 265.

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
--	---------------------------	-----------------------	----