

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570185
 研究課題名（和文） ミトコンドリア由来活性酸素種に依存した新規 TGF シグナルとその生物学的意義
 研究課題名（英文） A novel cascade of TGF- β signaling dependent on mitochondrial reactive oxygen species and its biological significance
 研究代表者
 柴沼 質子（SHIBANUMA MOTOKO）
 昭和大学・薬学部・教授
 研究者番号：60245876

研究成果の概要：TGF β による悪性化形質関連遺伝子 MMP-9 の転写制御機構について、主にマウス乳腺上皮細胞を用い、関与する転写因子を siRNA によるスクリーニングにより検索した。その結果、cAMP 応答配列結合因子（CREB）が MMP9 の転写を HDAC 3 などその他の転写共役因子とともに負に制御する可能性が示唆された。また、TGF β 刺激によりミトコンドリアからの活性酸素産生が上昇し細胞内が酸化状態に傾くが、この変化がシグナルとして重要であった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：TGF β 、マトリックスメタロプロテアーゼ、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

【背景】我々は、上皮（乳腺）細胞を TGF β で刺激すると、ミトコンドリア電子伝達系の活性が変化して細胞質への活性酸素種（ROS）の放出が促進され、それが二次シグナルとなって遺伝子発現が誘導されることを見出した。DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、TGF β 誘導性遺伝子のうち約 15% の誘導がこの経路に依存しており、その中には細胞の接着、運動、浸潤の制御に関わるものが多く含まれていた。また、この新規経路は従来の Smad を介する経路とは独立しており、TGF β の細胞増殖抑制機能には関与せず、TGF β に

よる細胞の悪性化形質の誘導に特異的に寄与する経路であることが示唆された。

[特色・独創性]

細胞内 redox 変化をメディエーターとした新たな転写制御メカニズム：細胞内 redox 変化による遺伝子発現制御機構に関しては、xenobiotics などに対する酸化ストレス応答を中心にこれまで解析されてきた。本課題の redox 応答は、TGF β シグナルという内因性シグナルの一翼を担うものであり、従来の制御機構とは性質、意味合いともに異なる。これまでの redox による転写制御機構には、AP-1/TRE、NF κ B を中心に Nrf1/ARE などの転写

因子の関与が示唆されているが、本課題で対象とする応答配列、転写関連因子とこれら従来のメカニズムには、共通点とともに相違点が存在する。特に、細胞内redox変化が転写抑制機構のde-repressionを制御する例は過去にないものである。

Redox感受性転写共役因子Hic-5のTGF β /ROSシグナルへの関与：Hic-5はパキシリン類似のLIM蛋白質で、間葉系細胞では主に接着斑に局在することから、インテグリンシグナルのアダプター分子として注目されたが、我々は単離当初より、Hic-5が細胞質-核間をシャトルしていることに着目し、核で転写共役因子として機能する可能性を報告してきた。最近、他の研究室からも同様の報告が相次いでいる。また、我々は独自に、そのシャトル能が特異的なシステイン残基による制御を受けて、酸化的環境ではHic-5が核に局在化することを見出し、その意義の一端として今回TGF β /ROSシグナルによる転写制御への関与に注目した。

本課題は、これら細胞内redoxシグナルに関する我々独自の成果をもとに、それをさらに包括的に発展させるものである。

[意義・貢献]TGF β は、がん細胞の上皮から間葉系細胞への転換(EMT)・メタロプロテアーゼ発現誘導などを通して悪性化の促進に働く。なかでも基底膜の主成分collagen type I分解能をもつMMP-9の誘導は、がんの浸潤・転移に重要な役割を果たす。しかし一方、正常上皮細胞に対しては、TGF β は増殖を抑制し、アポトーシスを誘導して癌化を抑制する方向に働く。従ってTGF β によるがんの悪性化過程を抑制的に制御するストラテジーを立てるに当たっては、この相反する二面性を念頭に、TGF β シグナルに関して両経路の共通項と相違項を明確にし、EMT促進に特異的な経路・分子を抽出して選択的な抑制手段を講じることが重要なポイントとなる。本課題はまさにこの相違項を明らかにしようとするものであり、社会的には、TGF β シグナルが関与するがん悪性化過程の抑制のための特異的かつ有効な分子標的の提唱に貢献が期待される。これまでのところ、がんの化学療法には非特異的抗がん剤が用いられているが、それに代わって、近年、血管新生過程、増殖因子レセプター関連分子などを特異的標的とする薬物の開発が進んでいる。しかし、がんによるmortalityを決めているのはその悪性化(浸潤・転移)であることを考えれば、悪性化過程の抑制を標的とするアプローチにより重点が置かれるべきである。悪性化過程(転移、再発)を抑制できれば、早期発見、一次的外科的治療の進歩と相まって、死亡率の低下に大きく寄与できると考える。

また、細胞の悪性化形質誘導シグナルとしてのROSシグナルの役割は、がんのみならず、

種々の病態の分子基盤として、サイトカインシグナルの環境要因による攪乱の観点からも注目すべきものである。

生物学的には、発生過程等で、ROSが上皮-間葉系形質転換機構誘導のシグナルの一つとして機能している可能性を示唆するものであり、この可能性については、将来の研究課題としたい。

2. 研究の目的

本課題では、この新規TGF β シグナルの全容を分子レベルで明らかとするため、第一にTGF β によるミトコンドリア電子伝達系の活性制御について、ミトコンドリアBcl-2機能類似タンパク質prohibitinに着目した検討を行う。最近我々は、TGF β 処理によりミトコンドリアから細胞質へと局在を変化させる蛋白質として、prohibitinを同定した。第二に電子伝達系の活性変化の結果ミトコンドリアから放出されるROSが核内の遺伝子発現を制御する機構について、標的遺伝子の代表としてMMP-9を取り上げ、分子レベルの解析を行う。検索の結果、注目すべき上流配列としてAP-1/TRE、antioxidant response element (ARE)及びMAREの重複配列、及びRedox感受性転写因子HNF4 α の結合配列を見出した。また、我々がTGF β /H₂O₂誘導性遺伝子として単離し、別途解析を続けてきたRedox感受性転写アダプターHic-5がSmad3と結合能を有ることが報告され、且つ細胞の悪性化形質制御に関与することがわかってきた。以上のような知見を手掛かりとして関与因子を同定し、それら因子の発現を人為的に制御して、細胞の悪性化形質(遊走能・浸潤能)への影響を観察し、本経路の生物学的意義を評価する。

3. 研究の方法

(1) TGF β によるprohibitinの局在制御を介したミトコンドリア呼吸鎖機能の制御：TGF β による呼吸鎖機能の制御メカニズムの解析のために、prohibitin相互作用因子をミトコンドリア画分からTAP(tandem-affinity purification)法/MS解析により同定し、TGF β がそれらの相互作用や局在を制御することで、電子伝達系の活性を変化させ、ROSの産生を亢進する可能性を検討する。

(2) ARE/MARE結合因子の単離・同定と細胞内redox変化をメディエーターとした転写制御：TGF β 応答性ARE/MARE配列に結合する可能性のある転写因子について、検索を行い、その後それら因子がROSに反応して遺伝子発現誘導に至るメカニズムを解析する。

(3) Redox感受性転写共役因子Hic-5の遺伝子発現制御への関与：TGF β によるMMP-9の発現制御は抑制の解除と促進の両

方に担われている。Hic-5、HNF4、MTA1は、通常の状態ではMMP-9遺伝子の発現を抑制していることが想定され、TGFはその抑制をde-repressすると考えられる。そのメカニズムについて、(2)で同定した因子との相互作用・機能的連関を含め解析する。MMP-9のTGFによる誘導にはHDACが必要とされることを把握しており、ヒストン、または転写因子の修飾変化を伴う転写複合体の変化が考えられる。

4. 研究成果

第一の目的としたTGFによるミトコンドリア呼吸鎖活性の制御機構については、最近、ミトコンドリアの呼吸鎖活性維持に働くmTORがTGFにより活性化されることが新たな知見として報告され、私たちが観察していたミトコンドリア活性化はmTORの活性化よることがわかった。そこで、本研究においては、主に第二の目的であるミトコンドリア呼吸鎖活性に由来する活性酸素種(ROS)による遺伝子発現機構の解析に重点を置いた。

TGFによるMMP-9の転写制御機構をモデルケースとし、細胞としては主にマウス乳腺上皮細胞を用いて検討を行った。まず、MMP9上流配列のうち注目したAP-1/TRE配列への結合能があり、関与が疑われた転写因子についてsiRNAを用いたスクリーニングを行った結果、核とともにミトコンドリアにも局在が示唆されているCREBの関与が示唆された。CREBの発現を低下させるとTGFによるMMP-9の誘導が特異的、且つ顕著に促進され、逆に過剰発現によってはその発現が抑制された。これらのことからCREBが抑制的にMMP-9の発現制御に関わっていることがわかった。一方、TGFの主要なシグナル伝達因子であるSmadについて、MMP-9誘導への関与を同様に検討したところ、Smad3、4が促進的に関与していることがわかった。そこで、CREBによる抑制的制御の標的がSmad複合体の転写活性である可能性について、Smad結合配列レポーターを用いて調べたところ、CREBがSmadの転写活性を抑制することがわかった。さらにCREBの変異体を用いた検討から、MMP-9の発現抑制、Smadの転写活性の抑制機能にはCREBのDNA結合能とともにSer-133のリン酸化が必要であることが示唆された。実際、TGF処理によりCREBのSer-133のリン酸化が10時間以降促進されることが観察された。さらにCREB以外の関与因子としてHDAC3がTGFによるMMP-9の転写に抑制的に関与する可能性を見出した。

一方、TGFによるMMP-9の発現はmTORの阻害剤であるrapamycin、および抗酸化剤(N-acetylcysteine)の存在により

顕著に促進され、mTORの活性化とそれに続く細胞内の酸化状態がMMP9の発現を抑制的に制御していることを確認した。したがって、CREBのリン酸化、或いは転写抑制活性を制御する上流のシグナルとして、TGFによるmTORを介したミトコンドリア呼吸鎖の活性化とそれに基づく活性酸素産生上昇、細胞内レドックスの酸化状態へのシフトが重要であることが考えられた。実際細胞内が酸化状態にシフトしていることについては、細胞内の代表的還元剤であるグルタチオン量を定量し、TGF処理により経時的に減少することを観察した。

Hic-5と細胞悪性化形質との関連については、Hic-5が細胞の足場依存性増殖に関与することを見出し、報告した。今後、細胞内の酸化状態に応答したMMP9を中心とする遺伝子の発現制御とその機能との関連について、Smad3共役因子としてのHic-5機能に着目して検討する予定である。

今後は細胞質の酸化状態が如何に核内の転写因子の活性制御に至るのか、CREBのリン酸化を主な手掛かりとして、CREBとHDAC3、その他の転写関連因子による具体的なMMP-9転写抑制機構を解析する予定である。その成果として、がんの転移に深く関与するMMP-9の発現抑制手段の提案とともに、マウス転移モデルを用いて、転移過程の抑制を目指したい。

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3件)

Fumihiro Ishikawa, Kiyoshi Nose, Motoko Shibamura

Gene expression profiling identifies a role for CHOP during inhibition of the mitochondrial respiratory chain. J. Biochem., Mar 20 [Epub ahead of print]

Kazunori Mori, Etsuko Hirao, Yosuke Toya, Yukiko Oshima, Fumihiro Ishikawa, Kiyoshi Nose, Motoko Shibamura

Competitive nuclear export of cyclin D1 and Hic-5 regulates anchorage-dependence of cell growth and survival. Mol. Biol. Cell., 20: 218-232 (2009)

Fumihiro, Ishikawa, Takashi Akimoto, Haruka Yamamoto, Yuri Araki, Toshihiko Yoshie, Kazunori Mori, Hidetoshi Hayashi, Kiyoshi Nose, Motoko Shibamura

Downregulation of hepatocyte nuclear factor-4 α and its role in regulation of gene expression by TGF- β in mammary epithelial cells. Exp. Cell Res., 314: 2131-2141 (2008)

なし

〔学会発表〕(計3件)

Fumihito Ishikawa, Emi Kaneko, Toshihiko Yoshie, Kiyoshi Nose, and Motoko Shibamura

Transcriptional induction of MMP10 by TGF β mediated by MEF2 and class IIa HDACs. Keystone Symposia, Mar 17 (2009), Vancouver, British Columbia, Canada.

三瓶瑠利子、石川文博、野瀬清、柴沼質子

MMP9 の発現制御に特異的に関わる新規 TGF 転写制御機構の解析

第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会

2008 年 12 月 9 日～12 日、神戸ポートアイランド

石川文博、野瀬清、柴沼質子

TGF による MEF2 と ClassIIaHDAC を介した MMP10 転写制御機構

第 67 回日本癌学会学術総会

2008 年 10 月 28 日～30 日、名古屋国際会議場

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴沼 質子 (SHIBANUMA MOTOKO)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：60245876

(2) 研究分担者

金山 朱里 (KANEYAMA SYURI)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：10338535

森 一憲 (MORI KAZUNORI)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：60349040

野瀬 清 (NOSE KIYOSHI)

昭和大学・薬学部・客員教授

研究者番号：70012747

(3) 連携研究者