

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871241

研究課題名(和文) マルチオミックス解析によるTGF- β 癌促進作用機序の解明研究課題名(英文) Differential proteome analysis identifies TGF- β related pro-metastatic proteins in a 4T1 murine breast cancer model

研究代表者

松原 三佐子(佐藤三佐子)(Matsubara, Sato, Misako)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：00635120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、乳癌におけるTGF- β 癌促進作用機構を明らかにすることを目的とし、転移性乳癌モデルを用いて、TGF- β 阻害剤の投与により転移巣より採取したRNAおよびタンパク質のトランスクリプトミクスとプロテオミクスを組み合わせたマルチオミックス解析を実施した。結果、TGF- β 阻害剤で有意に発現が抑制されるタンパク質を調べ、新規TGF- β 標的因子を同定した。

研究成果の概要(英文)：Although TGF- β antagonists have been proposed as anti-metastatic therapies for patients with advanced stage cancer, how TGF- β mediates metastasis-promoting effects is poorly understood. In the present study, we found that systemic administration of the TGF- β receptor kinase inhibitor, SB-431542, significantly inhibited lung metastasis from transplanted 4T1 mammary tumors in Balb/c mice. The differentially expressed proteins in the comparison of lung metastases from SB-431542 treated and control vehicle-treated groups were analyzed by proteomics analysis. Our proteomic approach newly identified eIF pathway proteins as novel potential mediators of TGF- β tumor-promoting activity.

研究分野：分子生物学

キーワード：TGF- β Proteomics eIF signaling metastatic mouse model Breast cancer

1. 研究開始当初の背景

炎症性サイトカインの一つである

Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta) は、増殖抑制因子として発癌初期では抑制作用を呈する。しかし、進行癌で発現上昇とTGF-betaシグナル分子の活性化が認められ、癌の悪性度に正の相関を示す。この進行癌でのTGF-betaの特徴的作用は、上皮間葉分化転換 (EMT) の誘発(Sato M, *et al. J Clin Invest* 2003) や癌幹細胞の維持およびがん化であり、乳癌の転移促進に寄与していると予想される。興味深いことに、TGF-beta阻害剤は悪性黒色腫や腎臓癌に対する治療薬として臨床試験が行われ、良好な結果を示している。こうして、TGF-betaが乳癌転移の決定因子であると考えられ、TGF-betaシグナルの遮断が進行性乳癌治療として期待されている。しかし、上述したようにTGF-betaは癌抑制因子および促進因子の二面性を有し、また、TGF-betaシグナルは多分子のリン酸化修飾により複雑に制御されたものであり、特にTGF-betaの癌促進因子としての作用機構は明確にされていない。申請者はTGF-betaの作用機序を理解し、臨床現場でのTGF-beta阻害剤の有用性を確立するために、留学中、乳癌転移モデルを用いた研究を行った。まず、培養細胞を用いたChIP-on-chipとRNAアレイによる網羅的解析を行い、TGF-betaに転写制御される遺伝子群を同定した。さらに、乳癌の臨床データを用いた統計学的解析により、遺伝子発現プロファイルが乳癌患者の予後と相関があることを見出した。この遺伝子群はTGF-beta阻害剤治療に適切・不適切である患者を識別する薬効予測マーカー候補となりうる。この結果より、TGF-betaの癌の転移を制御する作用機序は下流のシグナル分子により決定されることが示された。

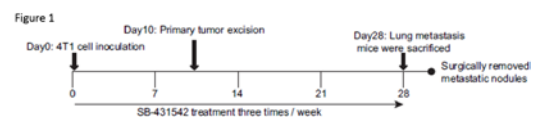
2. 研究の目的

本研究では、既存の乳癌転移モデルを用い

た実験データに、新たにRNA/タンパク質発現の解析を統合し、複雑なTGF-beta癌促進作用機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

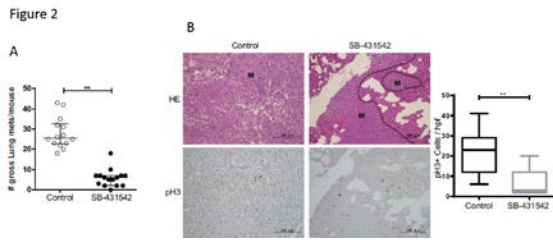
TGF-betaシグナル関連因子を選別するため、転移性乳癌細胞 (4 T1細胞) を用いたマウス異種移植実験でTGF-beta阻害剤を処理する (Figure 1)。転移巣から組織を採取しタンパク質をショットガン解析 (LTQ Orbitrap Velos) し、TGF-beta阻害剤投与群とコントロール群 (Vehicle) で発現が有意に変動タンパク質をTGF-betaシグナル標的因子とする。また、リン酸化タンパク質の濃縮法 (IMAC法) を用いてTGF-betaに活性が誘導されるリン酸化タンパク質を同定し、TGF-betaシグナルパスウェイマップを作成した。ショットガン解析については、トリプシン消化したペプチドに安定同位体標識 (ジメチル化ラベル法) を導入し、比較相対定量解析を行った。同サンプルよりRNAも同時に採取し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現量を測定する。トランスクリプトーム解析の結果をプロテオームおよびリン酸化プロテオームと統合し、パスウェイ解析 (IPA) や多変量解析を行い、TGF-betaに誘導されるシグナル経路や癌転移関連因子の探索を行った。また、ウエスタンブロット法および免疫染色法による検証実験も行った。



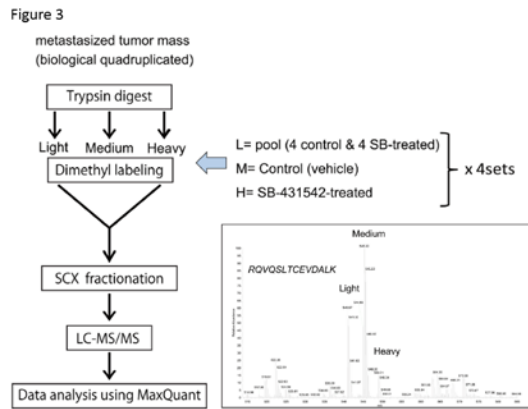
4. 研究成果

4 T1 細胞を用いたマウス異種移植実験でTGF-beta 阻害剤 (SB-431542) を施したところ肺転移が有意に抑制された (Figure 2A)。SB- SB-431542 投与群では、CD31 陽性とPhospho-histone H3 (pH3)陽性細胞の減少が見られ、血管新生と細胞の増殖抑制にSB-431542 の誘導により、転移が抑制され

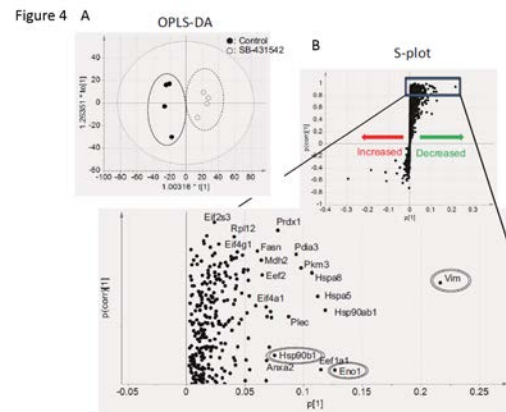
ると考えられた (figure 2B)。



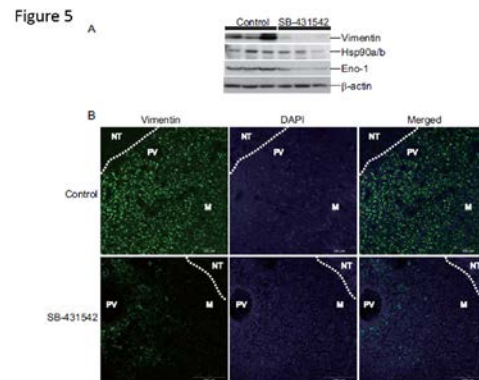
次に、トリプシン消化したペプチドに安定同位体標識 (ジメチル化ラベル法) を導入し、ショットガン法による比較相対定量解析を行った。この方法は還元ジメチル化によるペプチド安定同位体標識を行い異なる同位体タグ (Light, Medium, Heavy) を各試料中のタンパク質に標識し、群間の定量比較を可能にする (Figure 3)。



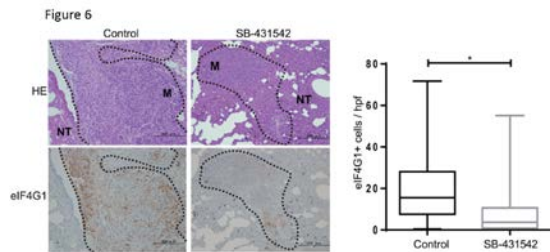
LC-MS/MS の結果を多変量解析し、2群間で有意に差があるタンパク質を同定した。主成分解析によるコントロール群と SB-431542 投与群の2群を分けることができたため (Figure 4A)、群間内で最も発現量に差があるタンパク質の同定を試みた。結果、TGF-beta の標的遺伝子である Vimentin の発現が有意に減少していることが分かった。Vimentin は転移に関与する EMT を起こした細胞のマーカーであるが、このことから SB-432542 による TGF-beta 阻害により転移巣に EMT 細胞が減少している可能性が示唆された。さらに、転移に高発現していると報告される Heat Shock Protein (HSP) や Eno1 などの発現抑制が確認された (Figure 4B)。



それらのタンパク質はウエスタンブロット法による相対定量比較検証を行い、SB-431542 処理群で発現量の減少を認めた (Figure 5A)。また、Vimentin 陽性細胞も有意に減少していることが確認され、これにより他の報告同様 EMT が癌の転移に深く関わり、TGF-beta 阻害剤は EMT を抑制することで転移を阻害していると考えられた (Figure 5B)。



次に、転移に重要と考えられるシグナル経路を明らかにするために、パスウェイ解析を行った。結果、Eukaryotic translation initiation factors の EIF2 および eIF4 シグナルの関与が見られた。eIF 遺伝子は転移で高値であること、また、患者の予後との相関があること、が報告されているが、本研究では転移巣でのみ発現すること、また、TGF-beta が eIF の発現を直接制御している可能性が示唆された (Figure 6)。



本研究では最新のプロテオーム解析法を用いて新規 TGF- β 標的因子が同定され、TGF- β 癌転移促進作用の分子機序の一端が明らかとなった。また、これらタンパク質は転移巣の発現量に差異があることから TGF- β 阻害剤の薬効予測マーカーとなりうると考える。

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 5 件)

- ① Sato M, Matsubara T, Adachi J, Hashimoto Y, Fukamizu K, Kishida M, Yang YA, Wakefield LM, Tomonaga T. Differential Proteome Analysis Identifies TGF- β -Related Pro-Metastatic Proteins in a 4T1 Murine Breast Cancer Model. *PLoS One*. May 18;10(5):e0126483. doi: 10.1371/journal.pone.0126483. eCollection (2015) 査読有
- ② Bae E, Sato M, Kim RJ, Kwak MK, Naka K, Gim J, Kadota M, Tang B, Flanders KC, Kim TA, Leem SH, Park T, Liu F, Wakefield LM, Kim SJ, Ooshima A. Definition of smad3 phosphorylation events that affect malignant and metastatic behaviors in breast cancer cells. *Cancer Res*. Nov 1;74(21):6139-49. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0803. Epub Sep 9 (2014) 査読有
- ③ Sato M, Kadota M, Tang B, Yang HH, Yang YA, Shan M, Weng J, Welsh

MA, Flanders KC, Nagano Y, Michalowski AM, Clifford RJ, Lee MP, Wakefield LM. An integrated genomic approach identifies persistent tumor suppressive effects of transforming growth factor- β in human breast cancer. *Breast Cancer Res*. Jun 2;16(3):R57. doi: 10.1186/bcr3668 (2014) 査読有

- ④ Kuga T, Kume H, Kawasaki N, Sato M, Adachi J, Shiromizu T, Hoshino I, Nishimori T, Matsubara H, Tomonaga T. A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase Ia and FAM83H in colorectal cancer. *J Cell Sci*. Oct 15;126(Pt 20):4721-31 (2013) 査読有

[学会発表] (計 1 件)

Sato M, Matsubara T, Adachi J, Yang YA, Wakefield LM, Tomonaga T. HUPO 12th Annual World Congress, Poster presentation “Quantitative proteome analysis with isotope dimethyl labeling to identify TGF- β -mediated tumor proteins using the metastatic mouse breast cancer model” 14-18 Sep, 2013, Pacifico Yokohama, 横浜 (日本)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 三佐子 (Matsubara, Sato, Misako)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号：00635120

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者