

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860042

研究課題名(和文) TRB1によるTGF- β シグナル制御を介した発がん機構の解明研究課題名(英文) Regulation of oncogenic activities by TRB1 through TGF- β signaling

研究代表者

伊藤 友香 (Itoh, Yuka)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40454326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：TRB1はショウジョウバエTribblesのホ乳類でのオルソログである。TRB1はTRB2やTRB3と同様、キナーゼの基質結合ドメインをもっているが、ATP結合ドメインおよびキナーゼ活性化ドメインをもたないシュードキナーゼである。最近、TRB1ががんの進展に関与することが報告されているが、未だに十分には解明されていない。本研究では、ある種のがん細胞株においてTRB1はTGF- β のシグナル伝達分子であるSmadのDNA結合を阻害することで、Smadの活性を抑制することを明らかにした。また、TRB1はSmadの活性依存的にTGF- β によってその発現が誘導されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：TRB1 is a mammalian ortholog of Tribbles in drosophila. TRB1 has a conserved substrate-binding domain of a protein kinase, but not ATP-binding and kinase-activation domains, as well as other TRB family proteins (TRB2 and TRB3). While some reports including our study have suggested that TRB1 plays important roles on cancer progression, the function of TRB1 has not been fully elucidated. In this study, we found that TRB1 represses TGF- β signaling by inhibiting interaction between Smad and DNA and expression of TRB1 protein is induced by TGF- β in a manner dependent of Smad activation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：TGF- β TRB1 がん シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

TRB1 はショウジョウバエの *Tribbles* のヒトでの ortholog であり、TRB2、TRB3 と共に TRB ファミリータンパク質を構成しているタンパク質である。TRB1 は、基質結合部位を持つがキナーゼ活性を持たない pseudokinase であり、アダプタータンパク質として細胞内の様々なシグナル伝達を調節している。また、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスの解析から、脂質代謝や M2 マクロファージの分化、急性骨髄性白血病の発症に関与することが報告されているが、生体内における TRB1 の機能の全容はつかめていない。

TGF- β は細胞増殖や分化、アポトーシスなど多彩な細胞応答に関与するサイトカインであり、特に上皮細胞に対して強い細胞増殖抑制作用を示すことが知られている。がんにおいては、消化器系のがんなどにおいて TGF β のシグナル伝達に関わる因子の変異や欠損が見つかったことから、これらのがんにおいて TGF- β はがん抑制シグナルとしてがんの発症や進展に関与すると考えられている。

申請者は最近、TRB1 を過剰発現させると TGF- β シグナル伝達因子 Smad3 の転写活性化能が抑制され、また逆に TRB1 の発現を抑制すると Smad3 の活性が上昇することを発見していた。さらに、抗炎症性サイトカインである TGF- β が TRB1 の発現を誘導することを明らかにしていた。

以上の予備的な検討から、TRB1 の異常発現が TGF- β シグナルを過剰に抑制することで細胞がん化を促すことが推察された。そしてより詳細な解析を進めることで、がんの新たな分子標的を見つけることにもつながると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、TRB1 が TGF- β シグナルを抑制する分子メカニズムを解明し、TRB1 の細胞がん化に対する作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TGF- β による TRB1 の発現制御

TRB1 mRNA の発現変化については全 RNA を抽出し逆転写後、リアルタイム PCR 法あるいは半定量的 PCR 法により検討した。タンパク質発現変化はウエスタンブロッティングを行った。TRB1 プロモーター活性は種々の長さや変異を持つレポータープラスミドを作製し、ルシフェラーゼアッセイにより評価

した。

(2) TRB1 による TGF- β シグナルの制御

TGF- β による Smad の活性化はレポーターアッセイにより評価した。タンパク質間相互作用は免疫沈降法により、DNA とタンパク質の結合はクロマチン免疫沈降法により検討した。mRNA の発現変化は(1)と同様の手法で検討した。

4. 研究成果

(1) TGF- β による TRB1 の発現制御

TGF- β 応答性をもつがん細胞株を TGF- β で刺激すると、濃度依存的に TRB1 の発現が上昇すること、この発現上昇は TGF- β 刺激後 2 時間からみられることが明らかになった。また、TRB1 タンパク質と同様、mRNA の発現も上昇したことから、TGF- β による TRB1 の発現上昇は TRB1 の転写の亢進が関与している可能性が考えられた。そこで、TRB1 プロモーターの活性化に対する TGF- β の影響を調べたところ、TGF- β は TRB1 プロモーター活性を促進した。TRB1 の mRNA 安定性についても検討したところ、TGF- β による TRB1 mRNA の安定性の変化はなかった。TGF- β による TRB1 発現制御のメカニズムを検討するため各種阻害剤を用いた検討を行ったところ、TGF- β 受容体のひとつである ALK5 阻害剤および TGF- β シグナル伝達分子 Smad3 の阻害剤により TGF- β 依存的な TRB1 の発現上昇は抑制された。また、TGF- β シグナルを抑制する Smad7 の過剰発現により TGF- β による TRB1 プロモーター活性化が抑制された。以上の結果から、TGF- β は Smad を介して TRB1 の発現を誘導すると考えられた。

(2) MAPK による TRB1 の発現制御

TRB1 の発現制御を解明する過程において、MEK 阻害剤により TRB1 の発現が著しく減少することが明らかになった。MAPK 経路に関わる因子に変異を持ついくつかのがん細胞株を用いて TRB1 の発現を比較したところ、MAPK シグナルが恒常的に活性化した変異を持つがん細胞では TRB1 の発現が上昇している傾向がみられた。このことから、MAPK の活性亢進によって TRB1 が誘導されると TGF β シグナルを過剰に抑制し、細胞がん化を促進する可能性が考えられた。

(3) TRB1 による TGF- β シグナルの制御

TGF- β 応答性をもつがん細胞株に Smad 結合配列を 12 個つなげた配列を含むレポータープラスミド SBE₁₂-Luc を導入し、TGF- β による Smad の活性化に対する TRB1 の影響を

調べた。すると、TGF- β 依存的な Smad の活性化を TRB1 は用量依存的に抑制した。一方、TRB1 をノックダウンした場合、TGF- β による活性上昇は増強された。また、TRB1 は TGF- β の標的遺伝子 PAI-1 のプロモーター活性化も抑制した。そこで、TRB1 がどのように TGF- β シグナルを抑制するか検討したところ、TRB1 は Smad の DNA への結合を抑制することが明らかになった。一方、TRB1 は Smad の複合体形成や転写活性化には影響を与えなかった。

次に、TGF- β により上皮間葉転換 (EMT) が誘導されることが知られているがん細胞株を用いて TGF- β によるがん悪性化に対する TRB1 の影響について検討を行った。TRB1 のノックダウンにより EMT 関連転写因子の発現が低下することが明らかになった。以上の結果から、TRB1 は標的遺伝子や細胞に応じて TGF- β シグナルの異なる制御をすることでがんの進展や増悪に関与していることが示唆された。

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)

Inoue Y, Itoh Y, Sato K, Kawasaki F, Sumita C, Tanaka T, Morishita D, Hayashi H.

Regulation of epithelial-mesenchymal transition by E3 ubiquitin ligases and deubiquitinase in cancer.

Curr. Cancer Drug Targets 16: 110-118, 2016

Sakai S, Miyajima C, Uchida C, Itoh Y, Hayashi H, Inoue Y.

Tribbles-related protein family members as regulators or substrates of the ubiquitin-proteasome system in cancer development.

Curr. Cancer Drug Targets 16: 147-156, 2016

Miyajima C, Itoh Y, Inoue Y, Hayashi H.

Positive Regulation of Interleukin-2 Expression by a Pseudokinase, Tribbles 1, in Activated T Cells.

Biol Pharm Bull. 38: 1126-1133, 2015

[学会発表](計 19 件)

楽 怡, 鈴木 美沙紀, 井上 万由美, 伊藤友香, 岡山 敦子, 野口 祐美子, 舩田 悠介, 井上 靖道, 小野寄 菊夫, 斉藤 昌之, 林 秀敏

TGF β による PPAR γ 発現抑制と脂肪蓄積の制御. 第 15 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム, 2014 年 5 月 23 日, 名古屋

野原 匠, 杉山 和弥, 宮嶋 ちはる, 伊藤友香, 井上 靖道, 林 秀敏

ストレスセンサータンパク質 TRB3 を介した小胞体ストレスによるインターロイキン 2 の発現制御. 第 60 回 日本薬学会東海支部 総会・大会 2014, 2014 年 7 月 5 日, 鈴鹿

澤中 美希, 伊藤友香, 井上 靖道, 林 秀敏

シュードキナーゼ TRB1 の TGF- β による発現制御と機能解析. 第 60 回 日本薬学会東海支部 総会・大会 2014, 2014 年 7 月 5 日, 鈴鹿

野原 匠, 杉山 和弥, 宮嶋 ちはる, 伊藤友香, 井上 靖道, 林 秀敏

小胞体ストレス誘導性タンパク質 TRB3 によるインターロイキン 2 の発現制御. フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2014 年 9 月 20 日, つくば

澤中 美希, 伊藤友香, 井上 靖道, 林 秀敏

TGF- β シグナル制御因子としてのシュードキナーゼ TRB1 の機能. フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2014 年 9 月 20 日, つくば

松野 薫, 井上 靖道, 久保 知紗希, 伊藤友香, 林 秀敏

シトルリン化修飾酵素 PADI4 による TGF- β シグナル伝達制御機構の解析. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日, 横浜

宮嶋 ちはる, 井上 靖道, 岩中 広美, 伊藤友香, 林 秀敏

スキャフォールドタンパク TRB1 による p53 活性の制御. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 27 日, 横浜

川地 志緒里, 井上 靖道, 伊藤友香, 林 秀敏

細胞がん化における TRB3 の機能解析. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 27 日, 横浜

宮田 和弥, 森本 真宗, 伊藤友香, 井上 靖道, 林 秀敏

HepG2 細胞における CYP3A4 タンパク質の発現制御. 日本薬学会第 135 年会,

2015年3月27日,神戸

今井 和弘, 山田 莉香子, 伊藤 友香, 井上 靖道, 林 秀敏
小胞体ストレス誘導剤およびサイトカインによる CYP1A1 の発現制御. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 28 日, 神戸

野原 匠, 杉山 和弥, 宮嶋 ちはる, 伊藤 友香, 井上 靖道, 林 秀敏
T 細胞における TRB3 を介したインターロイキン 2 発現の制御機構. 第 16 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム, 2015 年 6 月 13 日, 東京

川崎 文寛, 川原田 祐貴, 井上 靖道, 伊藤 友香, 林 秀敏
PAI-1 遺伝子発現制御における Smad と p53 とのクロストーク. 第 61 回(平成 27 年度) 日本薬学会東海支部総会・大会, 2015 年 7 月 4 日, 名古屋

佐藤 晃一, 井上 靖道, 伊藤 友香, 林 秀敏
脱ユビキチン化酵素による EMT 関連転写因子 Snail タンパクの発現制御. 第 61 回(平成 27 年度) 日本薬学会東海支部総会・大会, 2015 年 7 月 4 日, 名古屋

三田村 佳奈, 井上 靖道, 鈴木 千晶, 伊藤 友香, 林 秀敏
転写共役因子 TAZ による p53 活性制御機構の解析. フォーラム 2015: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 9 月 17 日, 神戸

鈴木 千晶, 宮嶋 ちはる, 井上 靖道, 岩中 広美, 伊藤 友香, 林 秀敏
細胞がん化における TRB1 の生理機能とがん分子標的としての可能性. 第 38 回日本分子生物学会年会/第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 12 月 2 日, 神戸

田中 孝仁, 西尾 愛梨紗, 井上 靖道, 隅田 ちひろ, 伊藤 友香, 林 秀敏
Loxl2 による TGF- β 誘導性上皮間葉転換の制御機構の解析. 第 38 回日本分子生物学会年会/第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 12 月 2 日, 神戸

澤中 美希, 水川 絵理子, 伊藤 友香, 井上 靖道, 林 秀敏
TGF- β による TRB1 の発現制御と TGF- β シグナルにおける TRB1 の機能. 第 38 回日本分子生物学会年会/第 88 回日本生

学会大会 合同大会, 12 月 2 日, 神戸

井上 靖道, 宮嶋 ちはる, 鈴木 千晶, 伊藤 友香, 林 秀敏
細胞がん化における TRB1 の生理機能とがん分子標的としての可能性. 日本薬学会第 136 年会, 3 月 27 日, 横浜

都築 香里, 伊藤 友香, 井上 靖道, 林 秀敏
pseudokinase TRB1 によるインスリンを介した糖代謝関連因子の新たな発現制御機構. 日本薬学会第 136 年会 3 月 27 日, 横浜

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 友香 (ITO YUKA)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号: 40454326

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし