

がん細胞の増殖・浸潤における TGF- β シグナルの役割に関する研究

《研究の概要》

本文

TGF- β は強力な増殖抑制因子であり、レセプターやシグナル伝達分子 Smad の異常が大腸がんや膵臓がんなど多くの難治性がんを引き起こすことが知られている。一方、スキルス胃がんなど予後の悪いがんにおいて、TGF- β の発現ががんの発生や浸潤、悪性化に関与していることが明らかにされ、がんにおける TGF- β の作用の二面性が注目されている。がんには個性があり、それぞれのがん細胞にあった適切な治療を行うことが重要と考えられることから、難治性がんの新たな診断・治療法を開発するためには、TGF- β の新しいシグナル関連因子の検索や、TGF- β シグナルの詳細な分子メカニズムの研究が急務であると考えられる。本研究では、1) TGF- β シグナル伝達異常によるがんの発生と浸潤・転移の分子メカニズムの解明と 2) TGF- β シグナルを抑制する方法の開発のための基礎的研究の 2 つに焦点を絞り研究事業を開始した。

まず、TGF 位のレセプターや Smad が作用を調節する新しい E3 ユビキチンリガーゼを同定した。E3 ユビキチンリガーゼの作用の詳細な分子メカニズムを明らかにするとともに、癌細胞での発現亢進を示した。さらに、マウス乳癌転移モデルに Smad7 などのアデノウイルスを投与して転移を抑制させることに成功し、癌転移における TGF- β シグナルの役割を明らかにした。また、TGF- β や BMP の受容体の発現をコントロールできる前立腺がん細胞を樹立し、マウス移植実験系を用いて、前立腺がんの増殖における BMP シグナルの重要性を明らかにした。

TGF- β の増殖抑制活性については、c-myc が TGF- β による増殖抑制の標的遺伝子として重要であることを示し、c-myc 遺伝子の TGF- β 反応領域を同定し、LEF1 が TGF- β による c-myc 遺伝子の転写調節に重要な働きを担っていることを明らかにした。さらに、c-Ski の転写抑制効果の分子メカニズムを解析し、c-Ski を含む不活性型 Smad 複合体が強く DNA に結合し、新たな転写因子のプロモーターへのリクルートを阻害していることを明らかにした。

血管新生に関する TGF- β の作用については、ES 細胞由来の Flk-1 陽性細胞が血管細胞へ分化する系において、血管内皮細胞においては ALK1 レセプターと Id-1 が、平滑筋細胞においては ALK5 レセプターと PAI-1 が優位に発現しており、TGF- β 添加や活性型 ALK1/5 レセプターの発現により血管内皮細胞と平滑筋細胞の数や割合が変化することを明らかにした。さらに TGF- β 添加みより血管内皮細胞での claudin-5 の発現が低下し、内皮シート構造の形成が阻害されることを明らかにし、血管形成における TGF- β の役割を明らかにした。

TGF- β シグナルの詳細な分子メカニズムが解明されると、がんの遺伝子診断や病理組織診断が飛躍的に進歩することが期待される。さらに、新たな TGF- β シグナルを抑制する方法の検索は、がんの浸潤や転移に対する新しい治療法の開発につながる可能性がある。本

研究により得られた基礎的知見は難治性癌の診断・治療体系の構築のために役立つと期待される。

研究者氏名及び所属機関

<u>氏名</u>	<u>所属機関名</u>	<u>分担研究テーマ</u>
宮園浩平	(財) 癌研究会 癌研究所 所長補佐	研究の総括、抗体の作製
今村健志	(財) 癌研究会 癌研究所 生化学部部長	抑制型 Smad の作用機序の解明
加藤光保	筑波大学基礎医学系 病理学教授	Smad シグナルによる増殖・細胞浸潤機構の検証
渡部徹郎	東京大学大学院医学系研究科 分子病理学助手	前立腺がん細胞における TGF- β シグナルの解析

研究報告

I 研究目的

TGF- β は強力な増殖抑制因子であり、大腸がんや膵臓がんなど多くの難治性がんにおいて TGF- β のレセプターやシグナル伝達分子 Smad の異常が知られている。しかし、TGF- β レセプターや Smad のシグナルの異常がおこった場合に、種々のがん細胞がどのような機構で増殖し、さらに組織への浸潤能を獲得していくか、その分子メカニズムについては不明な点が多い。また、TGF- β は、血管新生や免疫抑制、細胞外マトリックスの産生などの作用により、がんの増殖の際の母地の形成に関わっており、がんの治療において、TGF- β のシグナルを抑制する方法を開発することが重要である。本研究では、

- 1) TGF- β シグナル伝達異常によるがんの発生と浸潤・転移の分子メカニズムの解明、
- 2) TGF- β シグナルを抑制する方法の開発のための基礎的研究、

の2つに焦点を絞り研究事業を開始した。

II 研究計画および材料と方法

本研究においては、難治性がんの発生や進展に密接に関与するとされる TGF- β のレセプターやシグナル伝達分子 Smad のシグナル伝達機構について解析をおこなった。

抑制型 Smad のシグナルの研究

抑制型 Smad の作用機構の研究にはこれを補助する分子群の役割を明らかにすることが極めて重要であり、とくにタンパク質のユビキチン化によって分解する機構を明らかにすることは極めて重要である。本研究では抑制型 Smad である Smad6、Smad7 について、その作用を調節する分子の研究を分子生物学的手法にておこなった。具体的には、抑制型 Smad を介して TGF- β シグナルを制御する E3 ユビキチンリガーゼ Smurf1 と Arkadia の作用メカニズムを解析した。さらに、酵母 two-hybrid 法を用いて抑制型 Smad7 に結合する分子の探

索をおこなった。得られた分子について TGF- β シグナルに対する影響を中心に機能解析をおこなった。

また抑制型 Smad の発現の膵臓がんでの発現上昇を報告した論文がいくつか見られるが、今後は抑制型 Smad やその補助分子の癌における発現を調べるのが重要である。そこで、39 癌細胞株を用いて、抑制型 Smad やその補助分子の mRNA の発現レベルをリアルタイム PCR 法で調べた。加えて、特異的な抗体を作製して詳細な解析をおこなうことが必須であるので、免疫組織染色をおこなうための抗 Smurf1/2 抗体や抗 Arkadia 抗体など作製を試みた。

細胞増殖、細胞浸潤に関する Smad シグナルの研究

Smad2 や Smad3 の変異は TGF- β のシグナルを遮断することによって細胞の無制限な増殖などに繋がる。TGF- β の増殖抑制機構の中で c-myc 遺伝子の誘導抑制に関わる Smad の作用を、特に WNT シグナルとのクロストークに着目し、生物学的手法で調べた。さらに、c-myc 遺伝子の TGF- β 反応領域の同定を試み、その制御に関わる分子を探索した。また、TGF- β の細胞内シグナル抑制因子である c-Ski について、特に Smad の DNA 結合に対する c-Ski の作用を解析した。

前立腺がん細胞における TGF- β シグナルの解析

前立腺がん細胞に Tet-off システムを導入し、TGF- β や BMP の受容体の発現をコントロールできる細胞株の作製を試みた。得られた細胞株をマウスに移植し、in vivo で前立腺がん細胞の増殖に対する、TGF- β /BMP シグナルの役割とその分子メカニズムの解析をおこなった。

血管新生に関する Smad シグナルの研究

癌の進展には血管系が密接に関与している。TGF- β や BMP の血管新生における作用の分子メカニズムを明らかにするために、まず原発性肺高血圧症 (PPH) で見つかった II 型 BMP 受容体の変異の機能を解析し、血管新生における BMP シグナル伝達の分子メカニズムを解析した。

次に、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) における 2 種類の TGF- β 受容体 ALK1 と ALK5 の標的遺伝子を、DNA チップを用いて解析し、特異的に制御される遺伝子を同定した。

さらに、血管形成における種々の TGF- β のシグナル伝達分子の検討を行うために、ES 細胞から血管を形成する系を立ち上げ、ES 細胞からの血管形成や血管内皮シート構造形成に対する BMP や FGF の作用と TGF- β との関係について解析した。

III 研究成果

抑制型 Smad のシグナルの研究

Smurf と Arkadia の作用メカニズムについては、まず、Smurf1 が核内で Smad7 と結合し、両者が Smurf1 の NES に結合する CRM1 によって核外に輸送されるメカニズムを明らかにした。さらに、Smurf1-Smad7 複合体は、Smurf1 の N 末の C2 ドメインで細胞膜に局在し、Smurf1 は Smad7 を介して細胞膜の受容体に結合してそれを分解することを明らかにした。

次に、抑制型 Smad7 をベイトに用いた酵母 two-hybrid 法によって、Smad7 結合蛋白をスクリーニングした結果、Smurf1 と構造が類似した E3 ユビキチンリガーゼ NEDD4-2 と WWPI が Smad7 と結合することを明らかにした。Smad7 が NEDD4-2 や WWP1 と結合することは培養細胞でも確認し、レポーターアッセイを用いて NEDD4-2 や WWP1 が TGF- β /BMP シグナルを抑制することを明らかにした。NEDD4-2 や WWPI が TGF- β /BMP シグナルを抑制するメカニズムについては、両者が Smad7 を介してレセプターをユビキチン化分解することで TGF- β /BMP シグナルを抑制することを明らかにした、

さらに、39 癌細胞株を用いて、抑制型 Smad やその補助分子の mRNA の発現レベルをリアルタイム PCR 法で調べた結果、TGF- β /BMP シグナルを制御する Smurf1、Smurf2、NEDD4-2 と WWP1 がそれぞれ高発現している癌細胞を同定した。これらの癌細胞においては高発現した E3 ユビキチンリガーゼによって TGF- β シグナルが抑制されることが癌化に参与している可能性が示唆された。

Smurf1 と Smurf2 に対する抗体について、アフィニティーと特異性の検討をおこない、内因性 Smurf2 蛋白の検出に成功した。

さらに、マウス乳癌細胞株 JygMC(A) の癌転移モデルに Smad7 などのアデノウイルスを投与して転移を抑制させることに成功し、癌転移における TGF- β シグナルの役割を明らかにした。

細胞増殖、細胞浸潤に関する Smad シグナルの研究

ヒト角化細胞株 HaCaT に c-myc を恒常的に発現させると TGF- β の増殖抑制活性に応答しなくなることにより、c-myc が TGF- β による増殖抑制の標的遺伝子として重要であることを示した。さらに、c-myc 遺伝子の TGF- β 反応領域 (TIE:TGF- β inhibitory element) を同定し、LEF1 が TGF- β による c-myc 遺伝子の転写調節に重要な働きを担っていることを明らかにした。

c-Ski の転写抑制効果の分子メカニズムを解析し、c-Ski を含む不活性型 Smad 複合体が強く DNA に結合し、新たな転写因子のプロモーターへのリクルートを阻害していることを明らかにした。次に TGF- β による Epithelial mesenchymal transition (EMT) 誘導作用の一部は、Id や E2A など H1H 型転写因子が関与していることを明らかにした。

前立腺がん細胞における TGF- β シグナルの解析

前立腺がん細胞に Tet-off システムを導入した発現誘導細胞の作製を試み、TGF- β や BMP の受容体の発現をコントロールできる細胞株を樹立した。さらに、その発現誘導細胞を用いて、*in vivo* で前立腺がんの増殖における TGF- β スーパーファミリーレセプターの役割を解析し、BMP シグナルの重要性を明らかにした。

血管新生に関する Smad シグナルの研究

肺動脈の過剰な細胞増殖を伴う原因不明の難治性疾患である原発性肺高血圧症 (PPH) の患者に於いて同定された II 型 BMP 受容体の変異の機能を解析し、変異体の全てが BMP シグナル伝達能を失っているわけではないが、そのメカニズムはリガンドとの結合の喪失、キナーゼ活性の喪失、さらに細胞内局在の変化に及ぶことを明らかにした。

HUVEC における DNA チップから、ALK1 レセプターでは、STAT1、endoglin、Id ファミリー、抑制型 Smad が特異的に誘導され、ALK5 レセプターでは claudin-5 の抑制が起こることを明らかにした。

また、ES 細胞から血管を形成する系については、ES 細胞由来の Flk-1 陽性細胞が血管細胞へ分化する系において、血管内皮細胞においては ALK1 レセプターと Id-1 が、平滑筋細胞においては ALK5 レセプターと PAI-1 が優位に発現しており、TGF- β 添加や活性型 ALK1/5 レセプターの発現により血管内皮細胞と平滑筋細胞の数や割合が変化することを明らかにした。さらに TGF- β 添加みより血管内皮細胞での claudin-5 の発現が低下し、内皮シート構造の形成が阻害されることを明らかにした。加えて、FITC-デキストランを用いて血管のインテグリティを *in vivo* で評価する方法を確立し、マウスを用いたマトリゲルブローグアッセイで VEGF-A と FGF2 の両者を投与した場合に成熟した血管が形成されることを示した。さらに、そこへ TGF- β の阻害剤を加えることで、成熟した血管の形成が抑制されることを示し、血管形成における TGF- β の役割を明らかにした。

IV 考察

がんには個性があり、それぞれのがん細胞にあった適切な治療を行うことが重要と考えられる。大腸がんや膵臓がんでは TGF- β のシグナルを伝達するレセプターの異常、Smad4 の欠失やシグナルを抑制する Smad6 や Smad7 の発現の上昇が知られている。最近、大腸がんや膵臓がんなど予後の悪いがんにおいて、TGF- β シグナルの異常ががんの発生や浸潤、悪性化に関与していることが明らかにされた。また、スキルス胃がんのように TGF- β の発現が癌の悪性化に関与している例もあり、がん関連遺伝子の中でも TGF- β シグナル伝達分子は特に注目されている。TGF- β のシグナル伝達においては、レセプターや Smad が重要な働きを担っているが、その作用は様々な分子によって調節されている。こうしたことから難治性がんの新たな診断・治療法を開発するためには、TGF- β の新しいシグナル関連因子の検索や、TGF- β シグナルの詳細な分子メカニズムの研究が急務であると考えられる。

本研究で我々は、TGF- β のレセプターや Smad が作用を調節する新しい E3 ユビキチンリガーゼを同定した。E3 ユビキチンリガーゼの作用の詳細な分子メカニズムを明らかにするとともに、癌細胞での発現亢進を示した。シグナル伝達の研究においては *in vivo* でその作用を検討することが重要であるので、マウス乳癌細胞株 JygMC(A) の癌転移モデルに Smad7 などのアデノウイルスを投与して転移を抑制させることに成功し、癌転移における TGF- β シグナルの役割を明らかにした。さらに TGF- β や BMP の受容体の発現をコントロールできる前立腺がん細胞を樹立し、マウス移植実験系を用いて、前立腺がんの増殖における BMP シグナルの重要性を明らかにした。また、TGF- β の増殖抑制活性や血管に対する作用についても、詳細な分子メカニズムを明らかにした。

TGF- β シグナルの詳細な分子メカニズムが解明されると、がんの遺伝子診断や病理組織診断が飛躍的に進歩することが期待される。さらに、新たな TGF- β シグナルを抑制する方法の検索は、がんの浸潤や転移に対する新しい治療法の開発につながる可能性がある。本研究により得られた基礎的知見は難治性癌の診断・治療体系の構築のために役立つと期待される。

V 研究成果の発表

1. Suzuki, S., Murakami, G., Fukuchi, M., Shimanuki, T., Shikauchi, Y., Imamura, T., and Miyazono, K. (2002) Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 277 (42), 39919-39925.
2. Nishihara, N., Watabe, T., Imamura, T., and Miyazono, K. (2002) Functional heterogeneity of bone morphogenetic protein receptor-II mutants found in patients with primary pulmonary hypertension. *Mol. Biol. Cell* 13(9), 3055-3063.
3. Ring, C., Ogata, S., Meek, L., Song, J., Ohta, T., Miyazono, K., and Cho, K.W.Y. (2002) The role of a Williams-Beuren syndrome-associated helix-loop-helix domain-containing transcription factor in activin/nodal signaling. *Genes Dev.* 16 (7), 820-835.
4. Ota, T., Fujii, M., Sugizaki, T., Ishii, M., Miyazawa, K., Aburatani, H., and Miyazono, K. (2002) Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor- in human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 199 (3), 299-318.
5. Hamamoto, T., Beppu, H., Okada, H., Kawabata, M., Kitamura, T., Miyazono, K., and Kato, M. (2002) Compound disruption of *Smad2* accelerates malignant progression of intestinal tumors .in *Apc* knockout mice. *Cancer Res.* 62(20), 5955-5961.
6. Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T., and Miyazono, K. (2002) Two major Smad pathways in TGF- superfamily signaling, *Genes Cells* 7(12), 1191-1204.
7. Miyazono, K. (2002) Regulation of transforming growth factor- signaling and vascular diseases. *Cornea* 21 (7 Suppl), S48-53.
8. Midorikawa, Y., Ishikawa, S., Iwanari, H., Imamura, T., Sakamoto, H., Miyazono, K., Kodama, T., Makuuchi, M., and Aburatani, H. (2003) Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling. *Int. J. Cancer* 103(4), 455-465.
9. Mizuide, M., Hara, T., Furuya, T., Takeda, M., Kusanagi, K., Inada, Y., Mori, M., Imamura, T., Miyazawa, K., and Miyazono, K. (2003) Two short segments of Smad3 are important for specific interaction of Smad3 with c-Ski and SnoN. *J. Biol. Chem.* 278 (1), 531-536.
10. Sasaki, T., Suzuki, H., Yagi, K., Furuhashi, M., Yao, R., Susa, S., Noda, T., Arai, Y., Miyazono, K., and Kato, M. (2003) Lymphoid enhancer factor 1 makes cells resistant to transforming growth factor- induced repression of c-myc. *Cancer Res.* 63 (4), 801-806.
11. Nishihara, A., Fujii, M., Sampath, T.K., Miyazono, K., and Reddi, A.H. (2003) Bone morphogenetic protein signaling in articular chondrocyte differentiation.

- Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301 (2), 617-622.
12. Tajima, Y., Goto, K., Yoshida, M., Shinomiya, K., Sekimoto, T., Yoneda, Y., Miyazono, K., and Imamura, T. (2003) Chromosomal region maintenance 1 (CRM1)-dependent nuclear export of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor- signaling by Smad7. *J. Biol. Chem.* 278 (12), 10716-10721.
 13. Murakami, G., Watabe, T., Takaoka, K., Miyazono, K., Imamura, T. (2003) Inhibition of BMP signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol. Biol. Cell* 14 (7), 2809-2817.
 14. Suh, N., Roberts, A.B., Birkey Reffey, S., Miyazono, K., Itoh, S., ten Dijke, P., Heiss, E.H., Place, A.E., Risingsong, R., Williams, C.R., Honda, T., Gribble, G.W., Sporn, M.B. (2003) Synthetic triterpenoids enhance transforming growth factor- /Smad signaling. *Cancer Res.* 63 (6), 1371-1376.
 15. Takebayashi-Suzuki, K., Funami, J., Tokumori, D., Saito, A., Watabe, T., Miyazono, K., Kanda, A., and Suzuki, A. (2003) Interplay between the tumor suppressor p53 and TGF- signaling shapes embryonic body axes in *Xenopus*. *Development* 130, 3929-3939.
 16. Yoshida, Y., von Bubnoff, A., Ikematsu, N., Blitz, I.L., Tsuzuku, J.K., Yoshida, E.H., Umemori, H., Miyazono, K., Yamamoto, T., and Cho, K.W.Y. (2003) Tob proteins enhance inhibitory Smad-receptor interactions to repress BMP signaling. *Mech. Dev.* 120 (5), 629-637.
 17. Matsuyama, S., Kondo, M., Saitoh, M., Shimizu, K., Aburatani, H., Mishima, H.K., Imamura, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2003) SB-431542 and Gleevec inhibit TGF- -induced proliferation of human osteosarcoma cells. *Cancer Res.* 63 (22), 7791-7798.
 18. Watabe, T., Nishihara, A., Mishima, K., Yamashita, J., Shimizu, K., Miyazawa, K., Nishikawa, S., and Miyazono, K. (2003) TGF- receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J. Cell Biol.* 163(6), 1303-1311.
 19. Koinuma, D., Shinozaki, M., Komuro, A., Goto, K., Saitoh, M., Hanyu, A., Ebina, M., Nukiwa, T., Miyazawa, K., Imamura, T., and Miyazono, K. (2003) Arkadia amplifies TGF- superfamily signalling through degradation of Smad7. *EMBO J.* 22 (24), 6458-6470.
 20. Ito, Y., and Miyazono, K. (2003) RUNX transcription factors as key regulators of TGF- superfamily signaling. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 13 (1), 43-47.
 21. Miyazono, K., Suzuki, H., and Imamura, T. (2003) Regulation of TGF- signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci.* 94 (3), 230-234.
 22. Ijichi, H., Otsuka, M., Tateishi, K., Ikenoue, T., Kawakami, T., Kanai, F., Arakawa, Y., Seki, N., Shimizu, K., Miyazono, K., Kawabe, T., and Omata, M. (2004) Smad4-independent regulation of p21/WAF1 by transforming growth

- factor- . *Oncogene* 23 (5), 1043-1051
23. Kahata, K., Hayashi, M., Asaka, M., Hellman, U., Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Kato, S., Imamura, T., and Miyazono, K. (2004) Regulation of transforming growth factor- and bone morphogenetic protein signaling by transcriptional co-activator GCN5. *Genes Cells* 9 (2), 143-151.
 24. Takeda, M., Mizuide, M., Oka, M., Watabe, T., Inoue, H., Suzuki, H., Fujita, T., Imamura, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2004) Interaction with Smad4 is indispensable for suppression of BMP signaling by c-Ski. *Mol. Biol. Cell* 15 (3), 963-972.
 25. Maeda, S., Hayashi, M., Komiya, S., Imamura, T., and Miyazono, K. (2004) Endogenous TGF- signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. *EMBO J.* 23(3), 552-563.
 26. Kondo, M., Suzuki, H., Takehara, K., Miyazono, K., and Kato, M. (2004) Transforming growth factor- signaling is differentially inhibited by Smad2D450E and Smad3D407E. *Cancer Sci.* 95, 12-17.
 27. Usui, M., Yoshida, Y., Tsuji, K., Oikawa, K., Miyazono, K., Ishikawa, I., Yamamoto, T., Nifuji, A., and Noda, M. (2004) Tob-deficiency super-enhances osteoblastic activity after ovariectomy to block estrogen deficiency-induced osteoporosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (17), 6653-6658.
 28. Horiki, M., Imamura, T., Okamoto, M., Hayashi, M., Murai, J., Myoui, A., Ochi, T., Miyazono, K., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N. (2004) Smad6/Smurf1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia. *J. Cell Biol.* 165 (3), 433-445.
 29. Mochizuki, T., Miyazaki, H., Hara, T., Furuya, T., Imamura, T., Watabe, T., and Miyazono, K. (2004) Roles for the MH2 domain of Smad7 in the specific inhibition of transforming growth factor- superfamily signaling. *J. Biol. Chem.* 279 (30), 31568-31574.
 30. Kondo, M., Cubillo, E., Tobiume, K., Fukuda, N., Suzuki, H., Takehara, K., Cano, A., Saitoh, M., and Miyazono, K. (2004) A role for Id in the regulation of TGF- -induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cell Death Differ.* 11 (10), 1092-1101.
 31. Suzuki, H., Yagi, K., Kondo, M., Kato, M., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2004) c-Ski inhibits the TGF- signaling pathway through stabilization of inactive Smad complexes on Smad-binding elements. *Oncogene* 23 (29), 5068-5076.
 32. Komuro, A., Imamura, T., Saitoh, M., Yoshida, Y., Yamori, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2004) Negative regulation of transforming growth factor- (TGF-) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene* 23 (41), 6914-6923.
 33. Brederlau, A., Faigle, R., Elmi, M., Zarebski, A., Sjoberg, S., Fujii, M., Miyazono, K., and Funahashi, K. (2004) The bone morphogenetic protein type Ib

- receptor is a major mediator of glial differentiation and cell survival in adult hippocampal progenitor cell culture. *Mol. Biol. Cell* 15 (8), 3863-3875.
34. Ikeda, Y., Imai, Y., Kumagai, H., Nosaka, T., Morikawa, Y., Hisaoka, T., Manabe, I., Maemura, K., Nakaoka, T., Imamura, T., Miyazono, K., Komuro, I., Nagai, R., and Kitamura, T. (2004) Vasorin, a transforming growth factor - binding protein expressed in vascular smooth muscle cells, modulates the arterial response to injury in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101 (29), 10732-10737.
 35. Miyazaki, H., Watabe, T., Kitamura, T., and Miyazono, K. (2004) BMP signals inhibit proliferation and in vivo tumor growth of androgen-insensitive prostate carcinoma cells. *Oncogene* 23 (58), 9326-9335.
 36. Miyazono, K., Maeda, S., and Imamura, T. (2004) Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF- superfamily and Runx proteins. *Oncogene* 23 (24), 4232-4237.
 37. Beppu, H., Ichinose, F., Kawai, N., Jones, R.C., Yu, P.B., Zapol, W.M., Miyazono, K., Li, E., and Bloch, K.D. (2004) BMPR-II heterozygous mice have mild pulmonary hypertension and an impaired pulmonary vascular remodeling response to prolonged hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 287 (6), 11 241-1247. .
 38. Kuratomi, G., Komuro, A., Goto, K., Shinozaki, M., Miyazawa, K., Miyazono, K., and Imamura, T. (2005) Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2 (NEDD4-2) negatively regulates transforming growth factor- (TGF-) signaling by inducing ubiquitin-mediated degradation of Smad2 and TGF- type I receptor. *Biochem. J.* 386 (3), 461-470.
 39. Yamamoto, K., Sokabe, T., Watabe, T., Miyazono, K., Yamashita, J.K., Obi, S., Ohura, N., Matsushita, A., Kamiya, A., and Ando, J. (2005) Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288 (4), H1915-1924.
 40. Suzuki, H., Watabe, T., Kato, M., Miyazawa, K., and Miyazono K. (2005) Roles of vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling in differentiation of mouse embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells into endothelial cells. *Blood* 105 (6), 2372-2379.