

がん進展過程を制御する TGF- β ファミリーの二面性メカニズム解明

《研究の概要》

TGF- β は、細胞増殖抑制、アポトーシス、細胞分化、血管新生、免疫抑制、細胞遊走等多様な作用を持つサイトカインであり、BMP やアクチビンと共にファミリーを形成し、TGF- β ファミリーとよばれている。がん進展において、TGF- β は初期がんでは、細胞増殖抑制作用を介してがん増殖を抑えることでがんの進展を阻害することが知られている。一方、悪性化したがんでは、TGF- β による細胞増殖抑制への感受性喪失に加え、TGF- β による運動能亢進や上皮間葉転換 (epithelial mechencymal transition; EMT) 亢進が起こり、結果として転移能を獲得し、がんがさらに悪性化する。悪性化したがん細胞から大量の TGF- β を分泌することでがん細胞を排除する細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞の活性を抑制したり、血管新生を促進することで、腫瘍組織への酸素や栄養素の供給を増大させる。このように TGF- β ががんのステージに依存してがん進展に対して二面性を有していることが知られている。

研究代表者の伊東は、TGF- β シグナルを抑制する TMEPAI と類似構造を持つ C18ORF1 の TGF- β シグナルに対する作用と TMEPAI と C18ORF1 のがん進展に関する研究を TMEPAI ファミリー欠損マウスを用いて解析した。本研究で、C18ORF1 が TMEPAI と同様に TGF- β シグナルを抑制することを見出した。また、TMEPAI 欠損マウスと $Apc^{\Delta 716/+}$ を交配した TMEPAIKO; $Apc^{\Delta 716/+}$ マウスは、 $Apc^{\Delta 716/+}$ マウスに比較して著しく腫瘍数が減少した。加えて、TGF- β による TMEPAI 遺伝子の転写活性化に TCF/LEF ファミリーの TCF7L2 の C 末端が必要であることもわかり、TGF- β /Wnt シグナルの制御下に TMEPAI 遺伝子がおかれていることがわかった。さらに、血管内皮細胞特異的に TGF- β II 型受容体を欠損させると肺への腫瘍転移が抑制されたことから、血管内皮細胞における TGF- β シグナルが腫瘍生着に重要な役割を示していることを見出した。

共同研究者の宮澤は、mRNA のスプライシング調節因子 epithelial splicing regulatory protein 1 (ESRP1) が TGF- β による EMT を抑制することをすでに報告しているので、がん悪性化の過程における ESRP の発現変化とその意義および制御機構の解明を行った。患者由来の口腔扁平上皮がん検体および培養細胞を用いて、ESRP が細胞の運動性や浸潤に抑制的に機能していることを明らかにした。さらに ESRP ファミリーの ESRP1 はアクチン細胞骨格に、ESRP2 は細胞接着に作用し、がん細胞の運動性を抑制していることを見出した。共同研究者の前田は、軟骨肉腫の分化度規定における TGF- β ファミリーシグナルの役割と分子作用点 (標的遺伝子) について探求し、軟骨肉腫細胞株で TGF- β 刺激により発現が変動する paternally expressed gene 10 (PEG10) と Myctarget 1 (MYCT1) を見出したので、これらの遺伝子について軟骨肉腫細胞の分化度や浸潤・運動能との関係について検討した。その結果 MYCT1 は TGF- β により強力に発現誘導され、また PEG10 は逆に TGF- β により発現抑制されたが、PEG10 は BMP- β によって発現促進する興味深い発現パターンを確認した。特に PEG10 のノックダウンを行うと、MMP1/13 発現が増加し、結果として細胞浸潤能が亢

進した。逆に PEG10 の過剰発現は、9XCAGA-luc レポーターアッセイで TGF- β シグナルを抑制した。また、PEG10 の下流因子候補として SLC14A1 を見出した。したがって、高グレード軟骨肉腫に PEG10 発現を人工的にレスキューすることで、TGF- β シグナルレベルが低いグレード状態に導くことができる可能性を示唆した。

宮澤 恵二	山梨大学医学部・大学院 総合研究部・教授	ESRP とがん悪性化の分子機構
前田 真吾	鹿児島大学大学院医歯学 総合研究科・特任准教授	TGF- β ファミリーの軟骨 肉腫細胞分化制御における分子機構

研究報告

I 研究目的

TGF- β はがんに対して抑制・促進の二面性をもつ細胞増殖因子であり、細胞内 TGF- β シグナル経路により標的遺伝子の転写を調節し、多様な生理活性を現している。TGF- β の作用として細胞増殖抑制作用が知られており、がん化初期の段階では、TGF- β によりがん細胞の増殖が抑制される。一方、がん化の後期過程では、がん細胞から大量に分泌された TGF- β が EMT を引き起こし、転移・浸潤能を亢進するだけでなく、免疫監視システムの低下、血管新生亢進により、がん細胞自身が育ちやすいがん微小環境を作り出している。また、がんの悪性度を規定する因子に分化度があり、がん腫や肉腫では分化度と悪性度は一般的に反比例することが知られている。がん細胞が究極的に分化度を低下させた姿が cancer stem cell であるという説もある。実際軟骨肉腫においても、悪性度と軟骨分化マーカーの発現が反比例している。加えて、TGF- β ファミリーシグナルががんの分化度決定に関与している報告もあるが、その詳細なメカニズムは未だ不明のままである。これらの背景から、がん化の進行ステージ特異的に、標的組織（又は細胞）で TGF- β ファミリーシグナルの強さと作用の方向性（標的遺伝子選別）を制御する分子メカニズムを解明できれば、その制御メカニズムに関与する生体内分子をターゲットとした新規抗がん剤開発に繋がる。このような観点からも TGF- β シグナルによるがん化制御機構を解明する。

(1) TMEPAI ファミリーによるがん化制御機構

2003 年に TGF- β の直接の標的遺伝子として同定した TMEPAI (J. Biol. Chem., 2003) は、TGF- β シグナルのネガティブフィードバック機構に関わる分子である (Mol. Cell, 2010)。また、TMEPAI 遺伝子は、TGF- β /Smad および Wnt/ β -catenin/TCF7L2 間のクロストークにより発現制御を受けること、がんの悪性化に伴い TMEPAI の発現が上昇すること (Mol. Cell 2010; J. Biol. Chem., 2010)、TMEPAI 類似分子 C18ORF1 が存在することを見出してきた。そこで、TMEPAI 類似分子 C18ORF1 の TGF- β シグナルへの影響について詳細に検討した。さらに TMEPAI ががん化に関与すると推測されるが、その詳細な分子機構について未解明であるため、TMEPAI 及びその類似分子 C18ORF1 を含めた TMEPAI ファミリーのがん進展への影響を調べるために、TMEPAI ファミリー遺伝子欠損マウスを中心に解析を行った。

(2) TGF- β シグナルによる腫瘍血管・腫瘍リンパ管新生制御機構

血管内皮細胞 (BEC) 特異的 TGF- β I 型受容体 (ALK5) および II 型受容体 (T β RII) 欠

損マウス (J. Cell Sci, 2007)、ALK5 ノックインマウス (Lab. Invest., 2009)、BEC 特異的 Smad2/3 ダブル KO マウス (Blood, 2012) を用いて、血管系における TGF- β シグナルの重要性について研究を行い、現在まで TGF- β /Smad2/3 シグナルが血管安定性に必須であることを明らかにしている。今回 TGF- β シグナル系のコンディショナルノックアウト (CKO) マウスを用いて、BEC 特異的に遺伝子を欠損させ、腫瘍血管新生における TGF- β シグナルの役割を解明するとともに、腫瘍への影響を検証した。

(3) ESRP とがん悪性化の分子機構

EMT は、上皮細胞が間葉細胞様の形質を獲得するプロセスであり、がん細胞は、この EMT のプログラムを利用して転移・浸潤能を高め、アポトーシス抵抗性、抗がん剤抵抗性、幹細胞性を獲得する。したがって、がん細胞における EMT の制御機構を明らかにすることは、がん悪性化の過程を理解し、新たな診断・治療戦略を策定する上で重要である。

TGF- β によるがん悪性化には EMT の誘導が深く関わっていると考えられている。細胞に EMT を引き起こす因子は TGF- β 以外のサイトカインや細胞外マトリクスによる刺激、低酸素環境など多様であるが、共通して、その実行段階には δ EF1、SIP1、Snail、Twist などの転写因子が中心的な役割を担っている。実際に、これらの転写因子は過剰発現するだけで細胞に EMT を誘導できることが証明されており、その発現調節や翻訳後修飾による機能制御は盛んに研究されている。しかし、これら因子の下流で機能する分子の解析は進んでいない。

mRNA のスプライシング調節因子 ESRP1 および ESRP2 は FGFR2、CD44、MENA などの pre-mRNA を標的として、上皮細胞特有の RNA スプライシングに関与している。これまでに ESRP の発現が TGF- β による EMT に関与する δ EF1 や SIP1 により低下すること、また、ESRP の発現低下が TGF- β による EMT の進行そのものに必須であることを明らかにしてきた (Oncogene, 2012)。一方、海外の研究グループにより、ESRP の発現が Snail によっても抑制されることが報告されている (J. Biol. Chem., 2012)。したがって、ESRP の発現抑制は EMT の過程に共通した必要条件であると考えられる。また、悪性度が高い basal-like 型の乳がん細胞株 MDA-MB-231 に ESRP1/2 を強制発現すると足場非依存性増殖が抑制され、E-カドヘリンの発現も回復して細胞形態が正常上皮様に変化することを見いだしている (Oncogene, 2012)。この結果は、ESRP ががん悪性化を抑制的に制御している可能性を示唆している。本研究では、がん悪性化における ESRP の発現変化とその意義、および制御機構の解明を目的として検討を行った。

(4) TGF- β ファミリーの軟骨肉腫細胞分化制御における分子機構

軟骨肉腫は化学療法や放射線治療がほぼ無効な難治腫瘍で、外科的広汎切除術が主な治療法である。その良性カウンター・パートである内軟骨腫は、骨と周囲組織に障害をきたす場合には搔爬・骨移植が行われるが、それ以外は経過観察となる。したがって、これらの鑑別診断は患者の予後や生活の質に極めて重要な影響を及ぼす。しかしながら、grade 1 軟骨肉腫と内軟骨腫は、病理学的にはよく似た像を呈するために鑑別は困難で、整形外科腫瘍医のジレンマとなっている。さらに grade 1 軟骨肉腫は遠隔転移しないとされるが、遠隔転移をきたす grade 2 と病理学的に鑑別することも困難な場合が多い。これら軟骨肉腫の組織像は、多様性に富む細胞や基質が複雑に絡み合っている事が要因の一つだが、形態学とは独立した悪性 status に特異的な分子マーカーが明らかになっていないことも大

きな要因となっていると考えられる。したがって悪性度鑑別分子マーカーと、その機能解析の結果としての分子標的の開発が、喫緊の課題である。

がん一般論として、その悪性度と分化度が反比例することがよく知られている。我々は、軟骨細胞分化マーカー（II型/X型コラーゲン）の発現が内軟骨腫で高く、軟骨肉腫の悪性度が進むにつれて低下すること、また *in vitro* でもヒト正常軟骨細胞株に比べて、ヒト軟骨肉腫細胞株の分化度が低いことを確認している（未発表）。軟骨肉腫は軟骨細胞の悪性化表現型であるが、軟骨細胞の分化度に密接に関わる TGF- β ファミリーシグナルとその標的遺伝子が、軟骨肉腫の悪性度/分化度を規定していても不思議ではない。すでに、TGF- β シグナルが骨芽細胞において、抑制型 Smad の誘導による BMP シグナル抑制を介して分化成熟を抑制すること（EMBO J., 2004）、軟骨細胞においては転写抑制因子 SnoN の誘導により、BMP シグナルを抑制して分化成熟を抑えること（J. Biol. Chem., 2012）を明らかにしている。本研究はこれらを踏まえて、軟骨肉腫の分化度規定における TGF- β ファミリーシグナルの役割と分子作用点（標的遺伝子）について探求した。同時に、TGF- β ファミリーシグナル関連分子以外でも、内軟骨腫と軟骨肉腫 grade 1、そして grade 1 と grade 2 の間で発現に差がある分子マーカーを同定し、その機能解析につなげた。TGF- β シグナル標的遺伝子の候補としては、既に軟骨肉腫細胞株で TGF- β 刺激により発現が変動することをマイクロアレイで確認している Paternally expressed gene 10 (PEG10) と Myc target 1 (MYCT1) を選定した。PEG10 はリンパ腫等のがんで高発現しており、しかも *in vitro* で TGF- β I 型受容体に結合してシグナルを抑制することが報告されている。MYCT1 は c-MYC の直接標的誘導遺伝子として、c-MYC の働きの一部を担うとされているが、TGF- β シグナルとの関わりは不明であった。この2つの遺伝子について、軟骨肉腫細胞の分化度や浸潤・運動能への関わりについて検討した。

II 研究計画および材料と方法

代表研究者：伊東 進

(1) TMEPAI ファミリーによるがん化制御機構

- TMEPAI に類似した C180RF1 の TGF- β シグナル抑制作用について検討を行った。さらに、C180RF1 内の TGF- β シグナル抑制に重要な領域の同定を C180RF1 の様々な変異体を作製し、免疫沈降ウエスタンブロット解析及びルシフェラーゼ法により行った。次に、C180RF1 を大量発現並びに発現抑制した細胞を HaCaT 細胞並びに A5491 細胞で樹立し、TGF- β シグナルへの影響を Smad2 のリン酸化、TGF- β シグナル標的遺伝子の発現並びに上皮間葉葉転換促進により調べた。
- Wnt シグナルによって、TMEPAI 遺伝子の発現上昇が起こるメカニズムを解明するために、Wnt シグナル下流転写因子 TCF/LEF ファミリーと Smad3 との関係について検討した。
- TMEPAI ノックアウト (KO) マウス、C180RF1KO マウスまたはダブルノックアウト (DKO) マウスと自然発症消化管腫瘍モデルマウスである *Apc* ^{Δ 716/+}マウスを掛け合わせて、小腸での腫瘍形成実験を行った。
- TMEPAI ファミリーが YAP シグナルを抑制する機構として、Lats に着目し、Lats と TMEPAI ファミリーが協調して、YAP シグナルを抑制する機構について検討した。TMEPAI

ファミリーが YAP シグナルを抑制する分子メカニズムを解明するために TMEPPAI ファミリーである C180RF1 を大量発現した中皮腫細胞を樹立して、軟寒天培地を用いた腫瘍形成実験を行った。

(2) TGF- β シグナルによる腫瘍血管新生制御機構

- ルシフェラーゼ遺伝子を安定的に導入した B16 細胞 (B16-luc) を pdgfb-CreER マウスと T β RII コンディショナル KO (CKO) とを交配させたマウス (タモキシフェン依存的に血管内皮細胞で TGF- β シグナルが伝わらなくなる) の尾静脈または足蹠に移植後のがん転移変化をインビボイメージングにより検出した。

共同研究者 1. 宮澤 恵二

(3) ESRP とがん悪性化の分子機構

- 山梨大学医学部附属病院および東京医科歯科大学との共同研究により、口腔扁平上皮がんの患者由来検体 (49 検体) について、悪性度との対応を考慮しながら、ESRP1 および ESRP2 の発現を免疫組織化学的に検討した。
- 頭頸部扁平上皮がん細胞株 (SAS、HSC-4) を使い、ESRP1 および ESRP2 を各々、2 種類の siRNA オリゴヌクレオチドでノックダウンした。細胞挙動の変化を光学顕微鏡による細胞形態観察、ファロイジン染色、E-カドヘリンの蛍光免疫染色、定量的 PCR による遺伝子発現解析、イムノプロット法によるタンパク質発現解析により検討した。細胞増殖能は細胞数計測により、細胞運動性は wound closure assay により評価した。
- 細胞のがん化にともなう ESRP1/2 の発現上昇の意義とその機構を明らかにするために、ヒト乳腺上皮由来の正常不死化細胞株 MCF10A、これを H-Ras (G 12V) で形質転換した細胞株 MCF10AT を使用した。また、MCF10AT 細胞において、ESRP2 の発現に影響を与える因子のスクリーニング系を構築した。具体的には ESRP2 のプロモーター領域 (転写開始点を基準として-1,000 から+200) を高検出感度のルシフェラーゼを発現するベクター-pNluc に組み込み、レポーターを作成した。このレポーターを安定発現する MCF10AT 細胞株を 2 ライン樹立し、siRNA ライブラリー (siPerfect transcription factor library, Sigma-Aldrich 社、995 の転写因子に対する siRNA のライブラリー) を導入して、レポーター活性に影響する転写因子のスクリーニングを行った。2 つの独立したレポーター細胞で再現性よく活性に影響する転写因子を単離し、ノックダウンによる内因性 ESRP2 mRNA 発現への影響を検討して二次スクリーニングとした。

共同研究者 2. 前田真吾

(4) TGF- β ファミリーの軟骨肉腫細胞分化制御における分子機構

- 内軟骨腫と軟骨肉腫の臨床組織サンプルの grade ごとの組織免疫染色、in vitro ではヒト正常軟骨細胞株 (C28/I2) とヒト軟骨肉腫細胞株 (Hs819.T [悪性度不明]、SW1353 [grade 2]、OUMS27 [grade 3]) の軟骨細胞分化系を用いて、リン酸化 Smad2/3 と Smad1/5/8、そして抑制型 Smad6/7 や SnoN 等の TGF- β ファミリーシグナル制御分子群の発現を検討した。
- ヒト軟骨肉腫細胞株を BMP-2 で刺激すると、正常軟骨細胞に比較して分化反応性が弱い (未発表) ので、その阻害機構を検索した。BMP 誘導性の軟骨細胞分化マスター因子 Sox9 の発現レベルと BMP シグナルの強度を検討した。他に Sox9 機能抑制因子群 (Twist1 等) と BMP シグナルの直接標的遺伝子であり分化抑制因子として知られる Id

ファミリーの発現を、BMP シグナル抑制剤を用いて検証した。

- 分化抑制候補分子の siRNA を導入し、軟骨肉腫細胞の成長・運動・浸潤・等の悪性表現型の減弱に繋がる可能性を評価した。また軟骨肉腫細胞の定常状態と TGF- β 及び BMP リガンド刺激時における mRNA 発現を正常細胞と比較しながらマイクロアレイ解析した。
- PEG10 と MYCT1 の発現導入及びノックダウン実験を通して、肉腫細胞の分化度のみならず、増殖能、運動能、浸潤能、そしてアポトーシスについて詳細に検討した。ノックダウンは siRNA のトランスフェクションを基本とした。PEG10 と MYCT1 の正常軟骨細胞と軟骨肉腫細胞における発現動態の違いについて、TGF- β 1 刺激と BMP-6 刺激の両分化誘導系を比較した。TGF- β と BMP それぞれに特異的なレポーターアッセイや Smad のリン酸化、標的遺伝子発現を評価した。細胞増殖については、WST assay と cell count、PCNA 免疫染色や BrdU 取り込みを検討した。細胞運動は wound closure assay、細胞浸潤能は matrigel assay、アポトーシスは TUNEL assay で検討した。浸潤能に深く関わる matrix metalloproteinase (MMP)、細胞分化マーカーである SOX9、COL2A1、aggrecan、Indian Hedgehog、COL10A1 について、mRNA レベルは定量的 RT-PCR で、蛋白レベルはウエスタンブロットや免疫染色で評価した。
- 鹿児島大学整形外科が保管する軟骨肉腫と内軟骨腫の病理組織サンプル及び凍結標本を用いて、PEG10 と MYCT1 の発現パターンと臨床像の比較を行い、その治療標的分子としての可能性について、上記実験データと照らし合わせて検証した。

III 研究成果

代表研究者：伊東 進

(1) TMEPAI ファミリーによるがん化制御機構

- C18ORF1 の細胞内 SIM (Smad interacting motif) 領域が TGF- β /Smad シグナル抑制に重要であることを見出した。さらにこの SIM ドメインに Smad2/3 が結合することがわかった。加えて培養細胞を用いて、C18ORF1 を大量発現または発現抑制を行ったところ、C18ORF1 を大量発現させた細胞では、TGF- β シグナルが抑制され、TGF- β シグナルによって誘導される分子の発現も抑制された。一方、C18ORF1 の発現を抑制した細胞では、TGF- β シグナルの亢進、それに伴う EMT の促進が認められた。したがって、C18ORF1 が TGF- β シグナルを抑制していることを見出した。この研究成果は、J. Biol. Chem., 289, 12680-12692 (2014) に掲載された。
- TCF7L2 は TMEPAI 遺伝子の転写を活性化できるが、LEF1 にはその能力を有していないことをすでに明らかにしている。そこで、TMEPAI 遺伝子の転写活性化に対する TCF7L2 と LEF1 相違を検討した結果、TCF7L2 の C-clamp を含む C 末端領域が TMEPAI 遺伝子の転写活性化や Smad3 との結合に重要であった。また、LEF1 や TCF7 と対照的に TCF7L2 の C 末端部位を LEF1 や TCF7 と融合したタンパク質である TCF7/TCF7L2 や LEF1/TCF7L2 キメラタンパク質も TCF7L2 と同様の転写活性化能と Smad3 結合能を示した。この研究成果は、J. Biochem., 159, 27-30 (2016) に掲載された。
- TMEPAI KO マウスと Apc Δ 716/+マウスを掛け合わせた TMEPAIKO;Apc Δ 716/+マウスは、Apc Δ 716/+、古マウスや C18ORF1 KO;Apc Δ 716/+マウスに比較して著しく腫瘍数が減少し、1年

以上生存する個体も認められた。現在消化管上皮細胞内の各種細胞集団の挙動を調べており、TMEPAI 遺伝子欠損が腸管腫瘍形成を抑制するメカニズムの解明を進めている。

- TMEPAI ファミリーががん遺伝子 YAP と結合し、YAP の機能を抑制することを YAP で活性化されるルシフェラーゼレポーターによって証明した。また、YAP の過剰発現によってがん化が進行することが知られている中皮腫細胞株を用いて、TMEPAI ファミリーの C18ORF1 を過剰発現させると軟寒天培地での *in vitro* 腫瘍形成が抑制された。現在、詳細に TMEPAI ファミリーによる YAP 抑制機構のメカニズムを追及している。

(2) TGF- β シグナルによる腫瘍血管新生制御機構

- TGF- β RII^F/PDGF β -CreER マウスにルシフェラーゼレポーターを安定発現させた B16 細胞を静脈内から移植し、タモキシフェン投与後に肺転移実験を行ったところ、コントロールに比較して、TGF- β RII^F/PDGF β -CreER マウスでは肺転移が著しく抑制された。実際、*in vivo* イメージングを用いて継時的にマウスの腫瘍の大きさを比較検討しても同様な結果が得られた。したがって、血管内皮細胞における TGF- β シグナルが腫瘍生着に重要な役割を示していることを見出した。

共同研究者 1. 宮澤 恵二

(3) ESRP とがん悪性化の分子機構

- 患者由来の口腔扁平上皮がん検体について ESRP1 および ESRP2 の発現を免疫組織化学的に検討した。正常上皮の部分では基底部に弱い発現が認められたが、異型上皮、上皮内がん、進行がんでは ESRP1/2 の発現が徐々に亢進していた。検討した 49 例中、ESRP1 では 46 例、ESRP2 では 40 例で、正常上皮と比べて有意な発現上昇が見られた。一方、がん細胞が基底膜を破壊して浸潤している部分（浸潤先端）では、ESRP1/2 の発現が消失していた。連続切片を用いた検討により、同領域では E-カドヘリンの発現低下や局在変化など、EMT 様の変化が確認された。しかし、リンパ節の転移巣では ESRP1/2 の発現が回復していた。以上の結果から、ESRP1/2 はがん悪性化の進行にともなって、発現が可逆的に上昇・低下することが明らかとなった。
- ESRP の発現低下と細胞運動性の関係を明らかにするために、培養細胞を用いた実験を進めた。ESRP1/2 ともに発現の高い頭頸部扁平上皮がん細胞株 SAS、HSC4 について、細胞挙動への ESRP1/2 ノックダウンの影響を詳細に解析した。ESRP1 あるいは ESRP2 をノックダウンすると、細胞増殖には顕著な影響は見られなかったが、細胞の形態変化がおこり、運動性が亢進していた。ファロイジン染色により、ESRP1 をノックダウンしたときには long filopodia の形成が促進されること、一方、ESRP2 をノックダウンすると E-カドヘリンの発現が低下することを見いだした。したがって、ESRP1 と ESRP2 はともにがん細胞の運動性を抑制しているが、前者はアクチン細胞骨格に、後者は細胞接着に作用しており、分子メカニズムが異なることがわかった。
- 発がんにともなう ESRP 発現亢進機構を明らかにする目的で、ESRP2 の発現に影響する転写因子を、MCF10AT 細胞由来の 2 種類のレポーター細胞を用いて siRNA スクリーニングした。両方の細胞でレポーター活性を再現性よく 66% 以下に低下させた遺伝子 2 つ、1.5 倍以上に上昇させた遺伝子 4 つを得た。これらの遺伝子を MCF10AT 細胞でノックダウンして内因性 ESRP1/2 の mRNA 発現への影響を検討した。ノックダウンによりレポーター活性が低下した 2 因子はともに、mRNA 発現もよく低下させた。しかし、こ

れら 2 因子は MCF10AT よりも親株の MCF10A における発現の方が高く、MCF10AT における発現亢進に關与する可能性は低いと考えた。一方、ノックダウンによりレポーター活性を上昇させた 4 因子は、内因性 ESRP1/2 の mRNA 発現にはほとんど影響しなかった。

共同研究者 2. 前田 真吾

(4) TGF- β ファミリーの軟骨肉腫細胞分化制御における分子機構

- ヒト正常軟骨細胞株とヒト軟骨肉腫細胞株を比較しながら発現検討した結果、aggrecan や COL2A1 等の早期軟骨分化マーカーは steady-state の軟骨肉腫細胞株で著しく低下しており、TGF- β 、BMP-2 のリガンドによっても誘導がかからなかった。しかし後期分化マーカー COL10A1 は、軟骨肉腫細胞株において定常状態では正常レベルを下回っていたが、TGF- β 刺激時のみ強い誘導がかかった。COL10A1 の誘導に必要な RUNX2 の発現を調べると、COL10A1 と同様の挙動が観察され、TGF- β シグナルにより RUNX2 が誘導された結果と推察された。興味深い事に、Id1 発現でモニタリングした BMP シグナルは、定常状態では正常と差がなかったが、いずれの軟骨肉腫細胞においても BMP 刺激による誘導はほとんどかからなかった。注目すべきは PAI-1 発現を指標に観察した TGF- β シグナルで、軟骨肉腫細胞株は定常状態で著明に高いレベルを示し、TGF- β 刺激でさらに増強した。浸潤に重要な役割を果たす MMP-1 と MMP-13 が、軟骨肉腫細胞株において TGF- β に反応しないものの、BMP-6 により強く誘導され、正常軟骨細胞では誘導されないことから、軟骨肉腫の分化度と共に浸潤能も BMP によって制御される可能性が示唆された。
- 軟骨肉腫において BMP シグナル活性が TGF- β シグナルにより抑制されると仮定したが、Smad1/5/8 と Smad2/3 のリン酸化やシグナル・レポーターの解析において、その様なクロストークは検出されなかった。Smad6、Smad7、Ski1、Ski、Smurf1/2 等の発現をマイクロアレイと定量的 RT-PCR 法を駆使して検討したが、軟骨肉腫細胞で発現変動しなかった。MYCT1 は TGF- β により強力に発現誘導され、また PEG10 は逆に TGF- β により発現抑制された。PEG10 は BMP-6 によって発現促進することを確認した。PEG10 のノックダウンを行うと、MMP1/13 発現が増加し、結果として細胞浸潤能が亢進した。逆に PEG10 の過剰発現により TGF- β シグナルが抑制されることを 9XCAGA-luc レポーター・アッセイで観察した。
- 臨床サンプルにおける TGF- β シグナルをリン酸化 Smad2/3 の免疫組織化学染色で検討したところ、内軟骨腫ではほとんど染まらなかったが、軟骨肉腫では grade1、2、3 と悪性度が高まるにつれて、リン酸化 Smad2/3 の陽性率、シグナル強度が、共に増加することが分かった。一方 PEG10 はリン酸化 Smad2/3 とは全く逆で、正常軟骨組織では染まらなかったものの、内軟骨腫で最も強い染色性と陽性率を認め、軟骨肉腫では grade 1、2、3 と悪性度が高まるにつれて発現レベルは下がっていった。PEG10 発現は悪性度と逆相関した為、さらにその下流で発現が変動する遺伝子を探索した。軟骨肉腫細胞株で TGF- β 刺激で発現が下がり、かつベースの発現が正常軟骨細胞株より低い遺伝子群を、DNA マイクロアレイと qPCR による確認を経て抽出し、CCNE2 と SLC14A1 を得た。特に urea transporter B (UT-B) をコードする SLC14A1 に焦点を当て、UT-B 阻害剤を用いて軟骨肉腫細胞株の増殖能が低下することを見出している。一方

SLC14A1 の siRNA 実験では、軟骨系統の分化レベルには影響しないことが分かった。

IV 考察

代表研究者：伊東 進

(1) TMEPAI ファミリーによるがん化制御機構

TMEPAI ファミリーは、2種類の異なるタンパク質から成っており、各々TMEPAI と C180RF1 とよばれている。TMEPAI は、TGF- β によって誘導されるタンパク質であり、TGF- β シグナルのネガティブフィードバック機構に関与している。一方、C180RF1 は恒常的に発現していることから、定常状態において TGF- β シグナルを抑制してと考えられ、今回の実験より、過剰な TGF- β シグナルに細胞が暴露された場合、C180RF1 のみではその反応を抑制することができないため、TMEPAI の誘導を介して 2つのタンパク質が協調して、TGF- β シグナルを抑制していると考えられる。また、TGF- β シグナル抑制には、TMEPAI ファミリー内に存在する SIM 領域が必要であることを認めた。

興味深いことに TMEPAI ファミリーは、がん遺伝子である YAP シグナルも抑制することを今回明らかにしている。これまでに中皮腫のがん進展亢進に YAP シグナルと TGF- β シグナルが必要であることが報告されていることから、両シグナルを抑制できる TMEPAI ファミリーの抑制機構の詳細を明らかにすることができれば、あらたな治療標的として利用できる可能性もある。

また、TMEPAI 遺伝子を欠損させると自然発症消化管腫瘍モデルマウスでの腫瘍形成が抑制された。一方、C180RF1 遺伝子欠損マウスでは、腫瘍形成数に変化が認められなかった。TMEPAI 遺伝子を欠損すると TGF- β シグナルがさらに強く伝達されることから、TGF- β が持つ細胞増殖抑制作用（もしくはアポトーシス活性）が増強され、がん細胞増殖が抑制されていると予想できる。消化管上皮細胞で発現が認められる TMEPAI ファミリーが共に TGF- β シグナルを抑制するにもかかわらず、ファミリー内の分子を欠損させた場合、異なる表現型が認められるのは非常に興味深い。実際の生体内では、ファミリー間で異なる作用を有している可能性もあるが、詳細は今後検討していく必要がある。

(2) TGF- β シグナルによる腫瘍血管・腫瘍リンパ管新生制御機構

今回、TGF- β シグナルを血管内皮細胞特異的に欠損させることによりがん細胞の肺転移が抑制されることを見出した。まだ、詳細なメカニズムは不明であるが、血管特異的に TGF- β シグナルを抑制することで、がんを抑制できる可能性を見出したことになる。

共同研究者 1. 宮澤 恵二

(3) ESRP とがん悪性化の分子機構

がん悪性化の過程における ESRP1/2 の発現変化とその意義について検討を進めた。口腔扁平上皮がんの患者検体を用いた検討により、ESRP1/2 とともに、がん化にともなう発現上昇と浸潤に際しての発現低下が認められた。また、培養細胞を用いた実験により ESRP1/2 の発現低下が細胞運動性を亢進させることも確認できた。ESRP1 は主としてアクチン細胞骨格に影響したのに対し、ESRP2 は細胞間接着に影響しており、ESRP1/2 は相同性の高いファミリー分子でありながら、両者の作用する分子機構が異なっていることは興味深い。なお、ESRP1/2 の発現低下を引き起こすシグナル因子として培養細胞系では TGF- β が知られているが、in vivo で機能する分子の同定は今後の課題である。

一方、発がんにもなう ESRP 発現亢進の機構とその意義については、十分な解明には至っていない。発現亢進機構については siRNA ライブラリーを用いて候補転写因子をスクリーニングしたが、有力な候補は残らなかった。ESRP の発現亢進が転写後レベルで調節されている可能性もあり、miRNA の関与等についても視野を広げて調節因子を探索する必要がある。

今回、ESRP1/2 の発現が、がんの進行にもなって可逆的に上昇・低下する現象が明らかになったが、これは ESRP1/2 の発現だけをもって、予後の診断に用いることが困難であることを予想させる。実際に ESRP1 の発現と予後については正反対の結果が報告されている (Int. J. Cancer, 2015; Oncogene, 2014; Nat. Commun., 2012)。また、ESRP2 については翻訳後修飾が活性発現に重要である可能性も報告された (Oncogene in press)。したがって、ESRP1/2 の下流エフェクター分+をマーカーに用いることが適切と考えられる。

共同研究者 2. 前田 真吾

(4) TGF- β ファミリーの軟骨肉腫細胞分化制御における分子機構

TGF- β シグナル強度と PEG10 発現レベルの相反する現象について、in vitro の軟骨肉腫細胞株と臨床検体組織の両方で再現を得た。PEG10 はこれまで各種上皮系がん腫においては悪性度と共に発現が増えることと、悪性表現型に正に関わっていることが示唆されているが、今回の我々の軟骨肉腫における発現プロファイリング結果は逆の傾向を示すもので、肉腫における PEG10 の発現動態と機能は上皮がんとは全く異なる可能性を示唆する。この軟骨肉腫の悪性度と TGF- β シグナル/PEG10 発現比の増加を指標として、より正確な grading、すなわち内軟骨腫との精度の高い鑑別診断が可能となり、新たな診断分子マーカーとして提唱出来るかもしれない。PEG10 の分子作用点としては、TGF- β シグナルと互いに抑制し合うフィードバック機構を構成することが示唆され、したがって高グレード軟骨肉腫に PEG10 発現を人工的にレスキューすることで、TGF- β シグナルレベルの低い悪性グレード状態に導く治療が可能になるかもしれない。依然として PEG10 の下流因子はよくわからないが、その候補として SLC14A1 を同定できた。SLC14A1 は PEG10 と同様に分化度には影響しなかったものの、増殖には影響する可能性があり、今後は細胞運動・浸潤能、抗がん剤抵抗性や感受性にも影響する可能性も視野に、検討を進めていく。

IV 研究成果の発表

代表研究者：伊東 進

1. Nakano N, Maeyama K, Sakata N, Itoh F, Akatsu R, Nakata M, Katsu Y, Ikeno S, Vo Nguyen TT, Watanabe Y, Kato M, Itoh S. C18 ORF1: a novel negative regulator of TGF- β signaling. *J. Biol. Chem.*, 289, 12680-12692 (2014).
2. Sakata N, Kaneko S, Ikeno S, Miura Y, Nakabayashi H, Dong X-Y, Dong J-T, Tamaoki T, Nakano N, Itoh S. TGF- β signaling cooperates with AT motif-binding factor-1 for repression of the α -fetoprotein promoter. *J. Signal Transduc.*, 2014: 970346 (2014).
3. Hongu T, Funakoshi Y, Fukuhara S, Suzuki T, Sakimoto S, Takakura N, Ema M, Takahashi S, Itoh S, Kato M, Hasegawa H, Mochizuki N, Kanaho Y. Arf6 regulates tumor angiogenesis and growth through HGF-induced endothelial β 1 integrin

recycling. *Nat. Commun.*, 6:7925 (2015).

4. **Furuta C, Miyamoto T, Takagi T, Noguchi Y, Kaneko J, Itoh S, Watanabe T, Itoh F.** TGF- β signaling enhancement by long-term exposure to hypoxia in a tumor microenvironment composed of Lewis lung carcinoma cells. *Cancer Sci.*, 106: 1524-1533 (2015).
5. **Nakano N, Kato M, Itoh S.** Regulation of the TMEM16A promoter by TCF7L2: the C-terminal tail of TCF7L2 is essential to activate the TMEM16A gene. *J. Biochem.*, 159: 27-30 (2016).

共同研究者 1. 宮澤 恵二

1. **Ishii H, Saitoh M, Sakamoto K, Kondo T, Katoh R, Tanaka S, Motizuki M, Masuyama K, Miyazawa K.** Epithelial splicing regulatory proteins 1 (ESRP1) and 2 (ESRP2) suppress cancer cell motility via different mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 289: 27386-27399 (2014).
2. **Hayakawa A, Saitoh M, Miyazawa K.** Dual roles for epithelial splicing regulatory proteins 1 (ESRP1) and 2 (ESRP2) in cancer progression. *Adv. Exp. Med. Biol.*, in press (2016).

共同研究者 2. 前田 真吾

1. **Kakoi H, Maeda S, Shinohara N, Matsuyama K, Imamura K, Kawamura I, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Kamiya S.** Bone morphogenic protein (BMP) signaling up-regulates neutral sphingomyelinase 2 to suppress chondrocyte maturation via the Akt protein signaling pathway as a negative feedback mechanism. *J. Biol. Chem.*, 289: 8135-8150 (2014).
2. **Imamura K, Maeda S, Kawamura I, Matsuyama K, Shinohara N, Yahiro Y, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Kamiya S.** Human immunodeficiency virus type 1 enhancer-binding protein 3 is essential for the expression of asparagine-linked glycosylation 2 in the regulation of osteoblast and chondrocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, 289: 9865-9879 (2014).