

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293092

研究課題名(和文) TGF- の標的遺伝子TMEPAIとMafKの発がん促進能に関する研究

研究課題名(英文) Roles of TGF-beta target genes TMEPAI and MafK on cancer development

研究代表者

加藤 光保 (Kato, Mitsuyasu)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20194855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：トランスフォーミング増殖因子 (TGF-)は、がん遺伝子で分泌が誘導され、TGF- と共に軟寒天上での足場非依存性増殖を誘導する分子として発見された。本研究では、TGF- によって誘導される標的遺伝子で、足場非依存性増殖や腫瘍形成を誘導する分子としてTMEPAIとMafKを同定し、その作用機序を解析した。その結果、TMEPAIはTGF- /Smadシグナルの抑制とAKTの活性化作用、MafKには上皮間葉転換と膜タンパク質GPNMBの誘導能によって足場非依存性増殖と腫瘍形成を誘導していた。さらにTMEPAIとMafKに対する抗体を作製し、臨床病理学的研究を行う材料を開発した。

研究成果の概要(英文)：Transforming Growth Factor- (TGF-) was discovered as a factor expressed by oncogenes and induces anchorage-independent soft agar colony formation together with TGF- . In this study, we identified TMEPAI and MafK as target genes expressed by TGF- and induces anchorage-independent growth and tumor formation. TMEPAI suppresses TGF- /Smad signaling and activates AKT. MafK induces epithelial-mesenchymal transition and transmembrane glycoprotein GPNMB. These activities are essential for their tumorigenic activities. We further made antibodies for TMEPAI and MafK for further clinic-pathological studies.

研究分野：実験病理学、腫瘍学

キーワード：がん 足場非依存性増殖 がん幹細胞 トランスフォーミング増殖因子

1. 研究開始当初の背景

トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) は、多細胞生物の発生や成体組織の維持と損傷修復において多彩な機能を果たすサイトカインで、ほとんど全ての細胞から分泌され、ほとんど全ての細胞にコンテキスト依存的な種々の作用を示す。がんにおいても腫瘍形成抑制作用と促進作用の2面性をもつことが知られており、細胞増殖抑制作用、上皮間葉転換誘導作用、血管新生誘導作用などに関する研究が活発に行われてきた。

私は、がんに関係する多彩な TGF- β 作用の一部を担う特定の標的遺伝子を同定し、その機能を解析して、がん治療の新たな分子標的を見出すことを研究目的としてきた。これまでに、TGF- β によって発現が制御される遺伝子として、c-myc (Yagi, J. Biol. Chem. 2002; Sasaki, Cancer Res. 2003), ELAC2 (Noda, Oncogene 2006), podoplanin (Suzuki, FEBS letters 2008), ephrin-A1 (Shi, Oncogene 2008), TMEPAI (Watanabe, Mol. Cell 2010; Nakano J. Biol. Chem. 2010) に注目し、その機能や発現制御機構について報告してきた。また、TGF- β の血管新生促進作用に注目し、遺伝子改変マウスによる個体レベルの解析 (Itoh, Blood 2012; Lab. Invest. 2009; J. Cell Sci. 2007) や、培養細胞を用いた解析 (Yang, Cancer Sci. 2011; Tanaka, Blood 2010; Itoh, EMBO J. 2004) を行ってきた。このような経緯の中で、がん細胞の本質的な特性で 1970 年代から多くのがん遺伝子の発見に貢献しながら、その本態についてはいまだ十分に理解されていない足場非依存性増殖を誘導する TGF- β 関連分子の探索を行い、本計画で研究対象とする TMEPAI と MafK/GpnmB の腫瘍形成促進作用を発見した。

TMEPAI は、TGF- β によって発現が誘導される遺伝子で、TGF- β のシグナル分子である Smad2, Smad3 に特異的に結合し、ネガティブフィードバック分子として TGF- β シグナルを抑制する (Watanabe, Mol. Cell 2010; Nakano J. Biol. Chem. 2010)。また、HaCaT 等の正常細胞では TGF- β シグナル依存性に発現が誘導されるが、がん細胞では恒常的な発現が見られ、ノックダウンすると腫瘍形成能が大きく低下することを見いだしている。MafK は、血球分化や酸化ストレス応答に関わることが知られている転写因子である。私達は、化学発がん物質の解毒代謝に対する TGF- β の作用を検討する過程で、MafK が TGF- β によって誘導される遺伝子であることを見いだした。

2. 研究の目的

(1) 分子作用機序の解明

TMEPAI 並びにそのファミリー分子である C18orf1 の作用機構、特に、腫瘍形成促進の機序を明らかにする。また、MafK による腫瘍形成促進作用の分子機構、GPNMB の発現制御誘導、ならびに GPNMB の腫瘍形成促進作用の分子メカニズムはいまだ不明である。そこでこれらの分子の作用機構の解

明を行う。

(2) 足場非依存性増殖とは

TMEPAI, MafK, GPNMB は、組織幹細胞やがん幹細胞の特性とされる足場非依存的なスフェア形成を誘導するが、その細胞生物学的本態はいまだ解明されていない。そこで、これらの分子による足場非依存性増殖の誘導機序を明らかにする。

(3) 臨床病理学研究

TMEPAI, MafK, GPNMB ともにヒト病理組織で発現を検出できる信頼性の高い抗体がないため、ヒトがん組織における発現解析が進んでいない。そこで、通常のパラフィンブロック標本で免疫組織化学解析を可能にする抗体等を作製する。

3. 研究の方法

TMEPAI, MafK, GPNMB の腫瘍形成能について、肺がん細胞、乳がん細胞を用いて、ノックダウン細胞、CRISPR/Cas9 を用いたノックアウト細胞を作製し、足場非依存性スフェア形成、Transwell assay、Matrigel invasion assay、免疫不全マウスへの移植実験を行って解析した。また、TMEPAI とそのファミリー分子である C18orf1 については、ノックアウトマウスを作製し、Apc^{Min/+} マウスを交配して大腸腺腫の形成に対する作用についても検討している。また、分子メカニズムの解析については、種々の変異体を作製して、その機能変化を検討した。さらに、幹細胞に対する作用を検討する目的で幹細胞や Ki67 を発現している増殖期の細胞を蛍光でラベルし、ビデオ観察が可能なイメージングシステムを構築した。

足場非依存性スフェア形成時の細胞動態の解析には、前出のイメージング技術と共に、固定したスフェアの連続切片を作製し、定量解析ができる系を構築して解析した。

TMEPAI と MafK に対しては、モノクローナル抗体を作製し、その反応特性について、ウエスタンブロッティング、蛍光染色、酵素抗体法による組織染色を行って解析した。また、GPNMB の細胞外ドメインに特異的に結合する特殊環状ペプチドを作製し、FITC を付加して、細胞表面への GPNMB の発現の検討や GPNMB 細胞表面発現細胞を FACS で分取することを可能にした。

4. 研究成果

(1) 分子作用機序の解明

TMEPAI は、TGF- β シグナルによって誘導されることをすでに報告しているが、EGF シグナルが加わると TMEPAI の発現が協調的に増加することを示した。また、がん細胞では、TMEPAI の発現亢進に EGF シグナルが関与していた (論文)。TGF- β による TMEPAI の発現誘導には、TCF7L2 が関与しているが、ファミリー分子の LEF1 にはこの作用がない。TCF7L2 の分子構造の解析から LEF1 にはない C 末端領域が TMEPAI の発現誘導に必要で

あることが示された(論文)。肺腺がん細胞には、TMEPAIの持続的な発現があり、これをノックダウンすると足場非依存的なスフェア形成能、皮下腫瘍形成能、尾静脈注射による肺腫瘍形成能が低下することを示した(論文)。また、TMEPAIとC18orf1のノックアウトマウスとApc^{Min/+}マウスを交配し、大腸腺腫の発生に対するTMEPAIファミリーの作用に関する検討を行っている。TMEPAIはTGF-β/Smad経路を抑制する活性があり、TMEPAIのノックダウンはTGF-βによる細胞増殖抑制を解除することで腫瘍形成を促進することが示唆されたが、他の分子機構も働いていることを示すデータが得られ、さらに解析を続けている。また、TMEPAIのファミリー分子であるC18orf1にもTMEPAIと同様のTGF-β/Smadシグナル経路の抑制活性があることを示した(論文)。TGF-βシグナル以外に対する作用についても、TMEPAIと同時に解析を進めている。さらに、TMEPAI自身にも4種類のアイソフォームがあることが知られるようになり、アイソフォーム間での機能の違い、腫瘍形成能の違いに関する検討も開始した。

TGF-βは乳腺上皮細胞などに上皮間葉転換(EMT)を誘導する(論文)。MafKは、TGF-βによって発現が誘導されたが(論文)、MafK単独の発現でEMTを誘導する活性を持ち、乳がん細胞の悪性化に伴って発現が亢進していた。また、強力な腫瘍形成促進作用をもつこと、膜タンパク質であるGPNMBの発現を誘導することで腫瘍形成を促進していることを見いだした(Okita et al., submitted)。MafKは、種々の上皮細胞でも発現し機能している(論文)。特に、幹細胞の機能を制御していることが乳腺上皮細胞や乳がん細胞でも明らかになってきた。

(2) 足場非依存性増殖とは

TMEPAI, MafK, GPNMBは、組織幹細胞やがん幹細胞の特性とされる足場非依存的なスフェア形成を誘導した。平面培養時とスフェア培養時では、幹細胞の寄与が異なり、これらの遺伝子は、スフェア培養時の幹細胞の増加を誘導していた。幹細胞数の増加誘導機序については、現在、さらに検討を加えているが、幹細胞の分裂速度に対する作用とは異なる機序が示唆された。

(3) 臨床病理学研究

TMEPAIとMafKに対する抗体を作製し、TMEPAIに対する抗体は企業に導出した。GPNMBに対する抗体は市販されたが、検討の結果、GPNMBは発現量よりも、その翻訳後修飾や細胞表面への発現が腫瘍形成能に重要な変化であ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 9 件)

Abdellatif AM, Oishi H, Itagaki T, Jung Y, Shawki HH, Okita Y, Hasegawa Y, Suzuki H, El-Morsy SE, El-Sayed MA, Shoaib MB, Sugiyama F, Takahashi S. β-Cell-Specific Mafk Overexpression Impairs Pancreatic Endocrine Cell Development. **PLoS One**. 11(2):e0150010, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0150010. 査読有

Valcourt U, Carthy J, Okita Y, Alcaraz L, Kato M, Thuault S, Bartholin L, Moustakas A. Analysis of Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Transforming Growth Factor β. **Methods Mol. Biol.** 1344:147-181, 2016. doi: 10.1007/978-1-4939-2966-5_9. 査読有

Nakano N, Kato M, Itoh S. Regulation of the TMEPAI promoter by TCF7L2: the C-terminal tail of TCF7L2 is essential to activate the TMEPAI gene. **J Biochem.** 159: 27-30, 2016. doi:10.1093/jb/mvv117. 査読有

Yoon JH, Sudo K, Kuroda M, Kato M, Lee IK, Han JS, Nakae S, Imamura T, Kim J, Ju JH, Kim DK, Matsuzaki K, Weinstein M, Matsumoto I, Sumida T, Mamura M. Phosphorylation status determines the opposing functions of Smad2/Smad3 as STAT3 cofactors in TH17 differentiation. **Nat. Commun.** 6: 7600, 2015. doi: 10.1038/ncomms8600. 査読有

Azami S, Vo Nguyen TT, Watanabe Y and Kato M. Cooperative induction of transmembrane prostate androgen induced protein TMEPAI/PMRPA1 by transforming growth factor-β and epidermal growth factor signaling. **Biochem Biophys Res Commun.** 456: 580-585, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.107. 査読有

Nakano N, Maeyama K, Sakata N, Itoh F, Akatsu R, Nakata M, Katsu Y, Ikeno S, Togawa Y, Vo Nguyen TT, Watanabe Y, Kato M and Itoh S. C18 ORF1: A Novel Negative Regulator of TGF-β Signaling. **J. Biol. Chem.** 289: 12680-12692, 2014. doi: 10.1074/jbc.M114.558981. 査読有

Vo Nguyen TT, Watanabe Y, Shiba A, Noguchi M, Itoh S and Kato M. TMEPAI/PMEPA1 enhances tumorigenic activities in lung cancer cells. **Cancer Sci.** 105: 334-341, 2014. doi: 10.1111/cas.12355. 査読有

Yoon JH, Jung SM, Park SH, Kato M, Yamashita T, Lee IK, Sudo K, Nakae S, Han JS, Kim OH, Oh BC, Sumida T, Kuroda M, Ju JH, Jung KC, Park SH, Kim DK, and Mamura M. Activin receptor-like kinase5 inhibition suppresses mouse melanoma by ubiquitin degradation of Smad4, thereby derepressing Eomesodermin in cytotoxic T lymphocytes. **EMBO Mol. Med.** 5:

1720-1739, 2013. doi: 10.1002/emmm.201302524. 査読有
Okita Y, Kamoshida A, Suzuki H, Itoh K, Motohashi H, Igarashi K, Yamamoto M, Ogami T, Koinuma D, and **Kato M**. Transforming Growth Factor- β induces transcription factors MafK and Bach1 to suppress expression of the heme oxygenase-1 gene. **J. Biol. Chem.** 288: 20658-20667, 2013. doi: 10.1074/jbc.M113.450478. 査読有

[学会発表](計 18 件)

鈴木裕之. 扁平上皮がんの発生における THG-1 の機能. 第 23 回翠嶂会セミナー. 2015 年 10 月 31 日 ~ 2015 年 11 月 1 日. 筑波山ホテル青木屋 (茨城県つくば市)

渡邊幸秀. ADP リボース化による BMP シグナルの制御. 第 74 回日本癌学会学術総会. 2015 年 10 月 8 日 ~ 2015 年 10 月 10 日. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

沖田結花里. 乳がんにおける転写因子 MafK の働き. 第 74 回日本癌学会学術総会. 2015 年 10 月 8 日 ~ 2015 年 10 月 10 日. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
LING ZHENG. 腫瘍の血管新生における THG-1/Tsc22D4 の役割. 第 74 回日本癌学会学術総会. 2015 年 10 月 8 日 ~ 2015 年 10 月 10 日. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

Mitsuyasu Kato. Roles of MafK and Gpnmb in tumor development. TGF-meeting 2015. 2015 年 8 月 20 日 ~ 2015 年 8 月 22 日. Uppsala (Sweden)

Ling Zheng. Role of THG-1/Tsc22D4 in tumor angiogenesis. TGF-meeting 2015. 2015 年 8 月 20 日 ~ 2015 年 8 月 22 日. Uppsala (Sweden)

Yukari Okita. Transcription factor MafK induces epithelial-mesenchymal transition and malignant progression of breast cancer cells. FASEB Science Research Conferences. 2015 年 7 月 12 日 ~ 2015 年 7 月 17 日. Aspen (USA)

加藤光保. 大腸腫瘍の発生に置ける間欠性増殖細胞の動態に関する研究. 第 104 回日本病理学会総会. 2015 年 4 月 30 日 ~ 2015 年 5 月 2 日. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

小沼雅世. 扁平上皮がんの進展における

THG-1/Tsc22D4 の役割. 第 104 回日本病理学会総会. 2015 年 4 月 30 日 ~ 2015 年 5 月 2 日. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

木村美範. 乳がん細胞における Gpnmb 発現制御機構の解析. 第 104 回日本病理学会総会. 2015 年 4 月 30 日 ~ 2015 年 5 月 2 日. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

沖田結花里. 乳がんにおける転写因子 MafK の役割. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25 日 ~ 2014 年 11 月 27 日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

鄭 齡. 腫瘍の血管新生における THG-1/Tsc22D4 の役割. 2014 年 11 月 25 日 ~ 2014 年 11 月 27 日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Vo Nguyen Thanh Thao. TEMPAL enhances Tumorigenic Activities in Lung Cancer Cells. 第 73 回日本癌学会学術総会. 2014 年 9 月 25 日 ~ 2014 年 9 月 27 日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Mitsuyasu Kato. Tumorigenic activity of TMEPAI and MafK. The 3rd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program "Cooperative International Framework in TGF-Family Signaling". 2013 年 10 月 28 日 ~ 2013 年 10 月 29 日. 大和屋本店 (愛媛県松山市)

加藤光保. がんの発生と進展におけるトランスフォーミング増殖因子 の作用. 第 10 回日本病理学会カンファレンス. 2013 年 8 月 2 日 ~ 2013 年 8 月 3 日. 六甲山ホテル (兵庫県神戸市)

沖田結花里. 乳腺細胞の上皮間葉転換と腫瘍形成における転写因子 MafK の役割. 第 32 回分子病理学研究会. 2013 年 7 月 20 日 ~ 2013 年 7 月 21 日. 竹林院群芳園 (奈良県吉野町)

沖田結花里. 乳腺上皮細胞の上皮間葉転換と腫瘍形成における小 Maf 群転写因子の役割. 第 102 回日本病理学会総会. 2013 年 6 月 6 日 ~ 2013 年 6 月 8 日. ロイトン札幌 (北海道札幌市)

Mitsuyasu Kato. Tumorigenic activities of TGF- β target genes; TMEPAI and MafK. TGF-meeting 2013. 2013 年 5 月 30 日 ~ 2013 年 6 月 1 日. Uppsala (Sweden)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/epatho/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

加藤 光保 (KATO, Mitsuyasu)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20194855

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

渡邊 幸秀 (WATANABE, Yukihide)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：40618534

沖田 結花里 (OKITA, Yukari)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：30743710