

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成30年度研究進捗評価用〕

平成27年度採択分  
平成30年3月9日現在

**TGF-β シグナルによる転写調節とがん悪性化機構**  
Transcriptional regulation by TGF-β signaling and  
its relation to progression of cancer

課題番号：15H05774

宮園 浩平 (MIYAZONO KOHEI)

東京大学・大学院医科学系研究科・教授



研究の概要

本研究は TGF-β が腫瘍促進因子として作用する分子機構を明らかにすることを旨とする。TGF-β が Ras がん遺伝子と協調して転写調節を行うことをゲノムワイドに明らかにした。また TGF-β によって発現が制御され、がんの進展に関わる因子として TUFT1 などを同定した。さらに組織透明化技術を用いてがん転移を1細胞レベルで可視化し、EMT の転移における役割を示した。

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：細胞内シグナル伝達、細胞医化学、がん微小環境、がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

TGF-β (transforming growth factor-β)は多くの細胞の増殖を抑制して腫瘍抑制因子として働く一方で、上皮細胞の間葉系細胞への分化 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) を促進することから、進行したがんでは腫瘍促進因子として働く。本研究は長年にわたって議論となってきた、TGF-β が腫瘍抑制作用を失い、腫瘍促進因子として作用する分子機構を明らかにし、TGF-β の有する多彩な腫瘍促進作用を解明することを目指す。研究遂行にあたっては次世代 DNA シーケンス技術を駆使しつつ、革新的ながん治療のシーズとなる知見を見いだすことを目指す。

2. 研究の目的

本研究は TGF-β が腫瘍抑制作用を失い、腫瘍促進因子として作用する分子機構を明らかにし、かつ TGF-β の有する多彩な腫瘍促進作用を解明することを目指す。研究は、(課題1) TGF-β-Smad のダイナミックな転写調節機構の解明、(課題2) TGF-β による EMT の調節機構と多彩な表現型の解析、(課題3) がんの浸潤・転移を促進する TGF-β の多彩な作用の解明、の3つの柱で行う。これらの研究によりがんの悪性化に伴い Smad による転写調節機構がゲノム全体でどのように変化するか、どのような分子が EMT やがんの浸潤・転移に Key となる役割を果たすかを明らかにする。

3. 研究の方法

(課題1) TGF-β-Smad のダイナミックな転写調節機構の解明では、クロマチンのダイナ

ミックな変化に伴う Smad 結合パターンの変動、がん遺伝子・がん抑制遺伝子による Smad の結合パターンの変化と標的遺伝子の同定を目指す。(課題2) TGF-β による EMT の調節機構と多彩な表現型の解析では、転写因子 ZEB1 と Smad2/3 の ChIP-seq による EMT の分子機構の研究、スプライシング制御因子 ESRP による EMT の調節機構の研究を行う。

(課題3) がんの浸潤・転移を促進する TGF-β の多彩な作用の解明では、新規の TGF-β 標的分子の機能を研究し、がんの浸潤・転移との関連を明らかにする。さらに組織透明化技術を用いてがんの浸潤・転移機構を1細胞レベルで可視化し、解析する。

4. これまでの成果

(課題1) TGF-β-Smad のダイナミックな転写調節機構の解明：TGF-β と Ras-MAP キナーゼシグナル経路との協調作用により EMT が誘導され、細胞の浸潤能や運動能が亢進することから、TGF-β と Ras の協調作用は発がんの過程で極めて重要である。我々はマウス乳線上皮細胞 EpH4 と、その Ras 形質転換細胞である EpRas を用いて、TGF-β によるクロマチンの開閉状況の変化を FAIRE-seq によって網羅的に解析した。TGF-β は EpH4 細胞には EMT を誘導しないが、EpRas 細胞に対しては EMT を誘導する。我々は Ras および TGF-β 刺激がそれぞれクロマチンの開閉状況を変化させ、協調的に作用することを見出した。TGF-β と Ras は *Cdh1* (E-cadherin) や *Esrp2* などの上皮細胞関連遺伝子、*Fnl1* (fibronectin)、*Cdh2* (N-cadherin) などの間葉系細胞関連遺伝

子などのクロマチンの開閉状況に特徴的な影響を与えた。Ras 存在下では ETS ファミリー転写因子 Etv4 や Etv5 の発現上昇が認められ、EMT 誘導過程でのクロマチンへの結合が示唆された。さらに Etv4 と Etv5 が *Mmp13* の発現や細胞浸潤能に関与していることが明らかとなった。

(課題2) TGF-β による EMT の調節機構と多彩な表現型の解析 : 転写因子 ZEB1 は TGF-β によって誘導され、がん細胞に EMT を引き起こす。我々は乳がん細胞株を用いて ZEB1 の転写制御機構を網羅的に明らかにした。ZEB1 はこれまで知られていた *CDH1* などに加えて、炎症関連遺伝子群の発現を制御した。さらに細胞培養上清の抗体アレイによる解析により、ZEB1 制御分子として IL-6 や IL-8 を同定した。ZEB1 誘導性サイトカインのがん進展における役割を検討したところ、ZEB1 は IL-6 依存的に乳がん細胞の増殖と、マウス移植モデルでの腫瘍形成を促進した。マウス乳がん細胞 4T1 では、ZEB1 過剰発現により MDSC などの細胞群が腫瘍に集積していることが観察され、EMT 誘導転写因子と炎症との関連が明らかとなった。

(課題3) がんの浸潤・転移を促進する TGF-β の多彩な作用の解明 : 次世代シーケンサーの導入と EMT 誘導機構の詳細な解析を通じて、我々は新規の TGF-β 標的遺伝子を同定した。マウス乳腺上皮細胞 NMuMG 細胞で TGF-β による EMT 誘導過程で発現が減少する分子として、我々は RNA binding motif protein 47 (RBM47) を見出した。さらに TGF-β 刺激により発現が誘導され、肺腺がんなどの予後不良因子として働く因子として TUFT1 を見出した。TUFT1 制御遺伝子の発現を検討した結果、mTORC1 によって翻訳制御を受ける遺伝子群であることが明らかとなった。TUFT1 は RABGAP1 の GAP 活性を上昇させることで mTOR シグナルを活性化すると考えられた。

我々は組織透明化試薬 CUBIC を用いた臓器透明化を応用してマウスモデルでのがん転移機構を観察し、肺への転移を 1 細胞レベルで可視化することに成功した。肺腺がん細胞 A549 をマウス尾静脈から投与して転移形成能を経時的に確認したところ、TGF-β 処理した A549 細胞は投与 24 時間後における肺への集積が非処理細胞に比べて有意に増加していた。さらに投与 14 日後の転移巣形成能も TGF-β 処理した A549 細胞は非処理細胞に比べて有意に亢進していた。以上からがん転移のプロセスにおいて、TGF-β はこれまで知られていた intravasation に加えて、遠隔臓器での血管での生着と extravasation にも寄与していることが明らかとなった。

#### 5. 今後の計画

本研究課題の申請時にあげた 3 つの課題については当初の計画通り進めていく。3 つ

の課題それぞれについて、これまでの研究のさらなる発展や新たな研究の展開を目指す。とくに、当初の予定に加え、新規透明化技術を用いたがん転移機構の解析のほか、アクチビンシグナルによる転写調節機構の解明、長期 TGF-β 刺激によって活性化されるシグナル経路の解析を行う。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Kawasaki N, Isogaya K, Dan S, Yamori T, Takano H, Yao R, Morishita Y, Taguchi L, Morikawa M, Heldin CH, Noda T, Ehata S, \*Miyazono K, Koinuma D. TUFT1 interacts with RABGAP1 and regulates mTORC1 signaling. **Cell Discov.** 2018; 4: 1.
2. Kubota SI, Takahashi K, Nishida J, Morishita Y, Ehata S, Tainaka K, \*Miyazono K, \*Ueda HR. Whole-body profiling of cancer metastasis with single-cell resolution. **Cell Rep.** 2017; 20 (1): 236-250.
3. Katsura A, Tamura Y, Hokari S, Harada M, Morikawa M, Sakurai T, Takahashi K, Mizutani A, Nishida J, Yokoyama Y, Morishita Y, Murakami T, Ehata S, Miyazono K, \*Koinuma D. ZEB1-regulated inflammatory phenotype in breast cancer cells. **Mol Oncol.** 2017; 11 (9): 1241-1262.
4. Arase M, Tamura Y, Kawasaki N, Isogaya K, Nakaki R, Mizutani A, Tsutsumi S, Aburatani H, \*Miyazono K, Koinuma D. Dynamics of chromatin accessibility during TGF-β-induced EMT of Ras-transformed mammary gland epithelial cells. **Sci Rep.** 2017; 7 (1): 1166.
5. Vasilaki E, Morikawa M, Koinuma D, Mizutani A, Hirano Y, Ehata S, Sundqvist A, Kawasaki N, Cedervall J, Olsson AK, Aburatani H, Moustakas A, \*Miyazono K, \*Heldin CH. Ras and TGF-β signaling enhance cancer progression by promoting the ΔNp63 transcriptional program. **Sci Signal.** 2016; 9 (442): ra84.
6. Sakurai T, Isogaya K, Sakai S, Morikawa M, Morishita Y, Ehata S, \*Miyazono K, Koinuma D. RNA binding motif protein 47 inhibits Nrf2 activity to suppress tumor growth in lung adenocarcinoma. **Oncogene.** 2016; 35 (38): 5000-5009.

ホームページ等

<http://beta-lab.umin.ac.jp>