

博士論文

癌の進展における TGF- β シグナルの機能解析

星野 佑香梨

目次

TGF-βシグナル総論	2
1) 乳癌細胞のアポトーシス回避における TGF-βの役割	
要旨.....	11
序論.....	12
材料と方法.....	14
結果.....	20
考察.....	44
2) 膵癌幹細胞の維持における TGF-βの役割	
要旨.....	48
序論.....	49
材料と方法.....	55
結果.....	63
考察.....	89
総括.....	96
参考文献.....	97

TGF- β シグナル総論

TGF- β シグナル伝達機構

Transforming growth factor (TGF)- β は TGF- β ファミリーの代表的なサイトカインであり、12.5 kD のポリペプチドが S-S 結合した 25 kD の二量体である。TGF- β は 390~412 アミノ酸からなる前駆体としてつくられた後、C 末端側の 112 アミノ酸からなる部分が切断される。この部分は9個のシステインが保存された活性を持つペプチドとなる。哺乳類では構造上非常に類似した TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3 の 3 種類のアイソフォームが存在するが、これらは同じ受容体を介してシグナルを伝達する (1,2)。これらは受容体に対する親和性が若干異なるものの、受容体およびその下流では同じシステムを共有してシグナルを伝達しており、*in vitro* での活性は類似している (1,3)。

TGF- β は、膜貫通型セリンスレオニンキナーゼ受容体である I 型受容体と II 型受容体に結合することで細胞内へとシグナル伝達を開始する (図 1)。II 型受容体は単独で TGF- β と結合することが可能で、この結合により II 型受容体の安定的な二量体が形成される。活性化した II 型受容体は I 型受容体とともに複合体を作り、2 分子の II 型受容体と 2 分子の I 型受容体から構成されるヘテロ四量体を形成する。II 型受容体のキナーゼにより I 型受容体がリン酸化を受けることで、I 型受容体のキナーゼが活性化され、細胞内へとシグナルが伝達される (4)。なお、TGF- β の II 型受容体は TGF- β type II receptor (T β RII) の 1 種類のみであるのに対し、I 型受容体は 2 種類が同定されており、そのうち多くの上皮細胞では TGF- β type I receptor (T β RI; Activin receptor-like

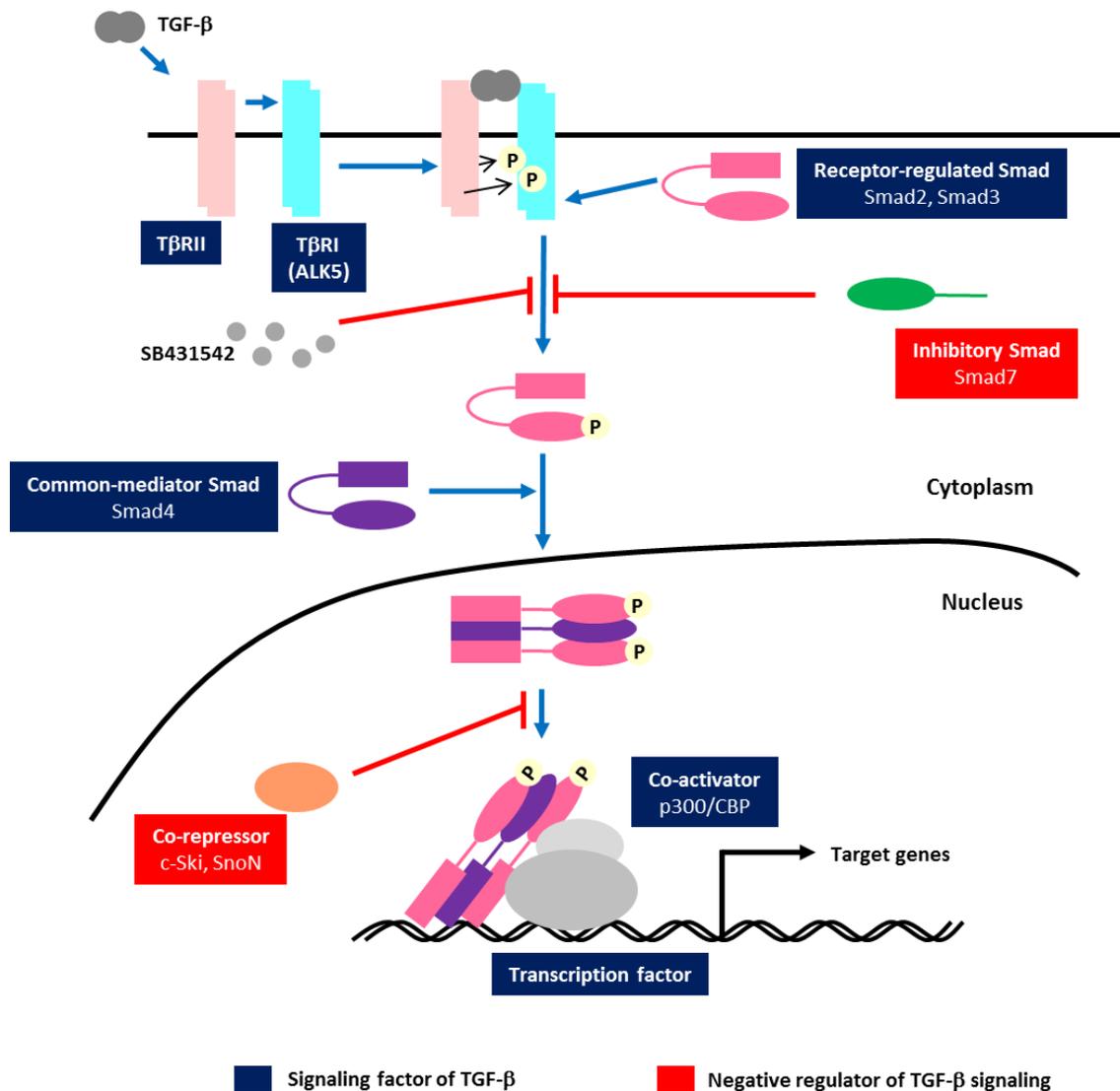


図 1. Smad を介した TGF-βシグナル伝達機構

TGF-βが II 型受容体 (TβRII) に結合すると、TβRII が I 型受容体 (TβRI) をリン酸化し、活性化する。活性化した TβRI は TGF-β の特異型 Smad (Receptor-regulated Smad) である Smad2/3 をリン酸化し、活性化する。活性化した Smad2/3 は共役型 Smad (Common-mediator Smad) である Smad4 と複合体を形成した後、核内へ移行し、種々の転写因子や転写共役因子 p300/CBP などと標的遺伝子の転写を制御する。

kinase (ALK)5)を介してシグナルを伝達する。

細胞内での TGF- β シグナル伝達は、主に Smad と呼ばれるタンパク質を介して行われる (Smad pathway) (図 1)。Smad は特異型 Smad (Receptor-regulated Smad)、共役型 Smad (Common-mediator Smad)、抑制型 Smad (Inhibitory Smad)の 3 種類に分類される。特異型 Smad、共役型 Smad は、N 末領域に Mad homology (MH)1 ドメイン、C 末領域に MH2 ドメインを持っている。TGF- β の特異型 Smad は Smad2 と Smad3 であり、Smad2/3 が MH2 ドメインを介して I 型受容体に結合することで、I 型受容体の有するキナーゼ活性により Smad2/3 が直接リン酸化される。リン酸化された Smad2/3 は共役型 Smad である Smad4 と複合体を形成し、核内へと移行する。これらの複合体は直接 DNA と結合、もしくは Runt-related transcription factor (Runx)3 などの他の転写因子や p300/CREB-binding protein (CBP)などの転写コアクチベーターと相互作用し、標的遺伝子の転写を制御する (1,2,4)。一方で、典型的な MH1 ドメインを欠く抑制型 Smad は I 型受容体に結合することにより特異型 Smad の受容体への結合を競合的に阻害し、シグナルを負に制御する。TGF- β の抑制型 Smad は Smad7 であるが、Smad7 は TGF- β によって誘導されることで、負のフィードバック機構を介してシグナルの強度を調節している (5,6)。同様に、転写リプレッサーである c-Ski や SnoN などは Smad に結合することで TGF- β シグナルによって誘導される転写を抑制し、シグナルを負に制御する (7)。

TGF- β シグナルには Smad を介さない non-Smad pathway も存在し、それらには Extracellular signal-regulated kinase (Erk)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38 などの Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway や Rho-like GTPase pathway、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway が含まれる (8-10)。

TGF- β の古典的な二大作用

TGF- β はさまざまな機能が報告されているが、なかでも細胞増殖の抑制と細胞外マトリックス (Extracellular matrix; ECM)の産生はTGF- β のもつ古典的な二大作用といえる。TGF- β は、上皮細胞、血管内皮細胞、血球細胞などの細胞に対して Cyclin-dependent kinases (CDK)インヒビターである p15^{Ink4} や p21^{Cip1} の発現を誘導、もしくはCDK アクチベーターである Myelocytomatosis oncogene (c-MYC)や cdc25a の発現を抑制する (11)。この結果、多くの細胞では TGF- β により CDK のリン酸化などが抑制され、細胞周期が G1 期に停止し、細胞増殖が抑制される (図 2)。さらに TGF- β は ECM を構成する collagen や fibronectin などの産生を促進するとともに、protease の産生を抑制することで ECM の分解を抑制し、ECM の蓄積を促進する。

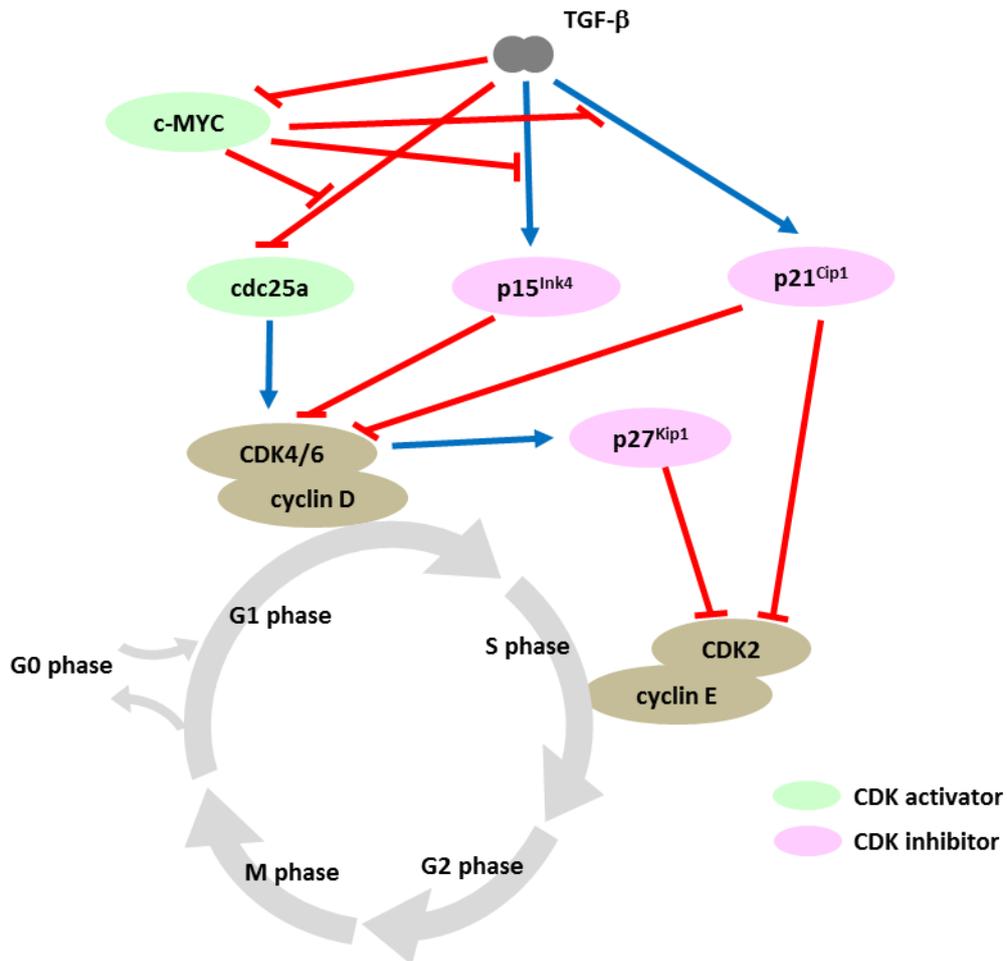


図 2. TGF-βによる細胞増殖抑制作用

上皮細胞、血管内皮細胞、血球細胞、初期の癌細胞など多くの細胞に対して TGF-βは CDK インヒビター (p15^{Ink4}、p21^{Cip1})の発現を誘導もしくは CDK アクチベーター (c-MYC、cdc25a)の発現を抑制する。これにより CDK のリン酸化が抑制され、細胞周期が G1 期に停止する。

TGF- β の癌細胞に対する作用の二面性

TGF- β は様々な細胞に対して増殖抑制作用を示すが、同様に、TGF- β は初期の癌細胞も抑制することから、腫瘍抑制因子として作用することが報告されている (図 2)。TGF- β が腫瘍抑制因子として作用していることを示唆する腫瘍の例として、遺伝性非ポリポーシス性大腸癌 (Hereditary non-polyposis colorectal cancer; HNPCC)、胃癌、神経膠種、子宮体癌、膵癌、肝癌、乳癌などがあるが、これらの症例では T β RII の不活性化を伴う突然変異による TGF- β シグナル伝達異常が見つかっている (12)。さらに、膵癌や若年性大腸癌における *SMAD4* の突然変異による TGF- β シグナル伝達異常も報告されている (13)。

一方で、進行期の癌においては、TGF- β は多くの腫瘍組織で産生され、癌細胞、さらに癌細胞をとりまく微小環境に対して様々な働きをしていることも明らかになっている(14,15)。この場合、癌細胞に発現している受容体や Smad に変異が確認されるものもあるが、これらのシグナル分子に明らかな異常を認めない場合の方がむしろ多い。こうした癌細胞の中には TGF- β シグナルは伝達されているが、細胞増殖抑制は受けず、それ以外の応答を示すものがある (図 3)。例えば、TGF- β は乳癌、悪性黒色腫などのいくつかの癌細胞の Epithelial-mesenchymal transition (EMT)を誘導し、癌細胞の運動や浸潤を促進する (16-18)。同時に、TGF- β は癌微小環境、すなわち宿主の多くの細胞に作用して、血管新生、細胞外基質の産生、免疫抑制などを引き起こす (図 3) (19)。

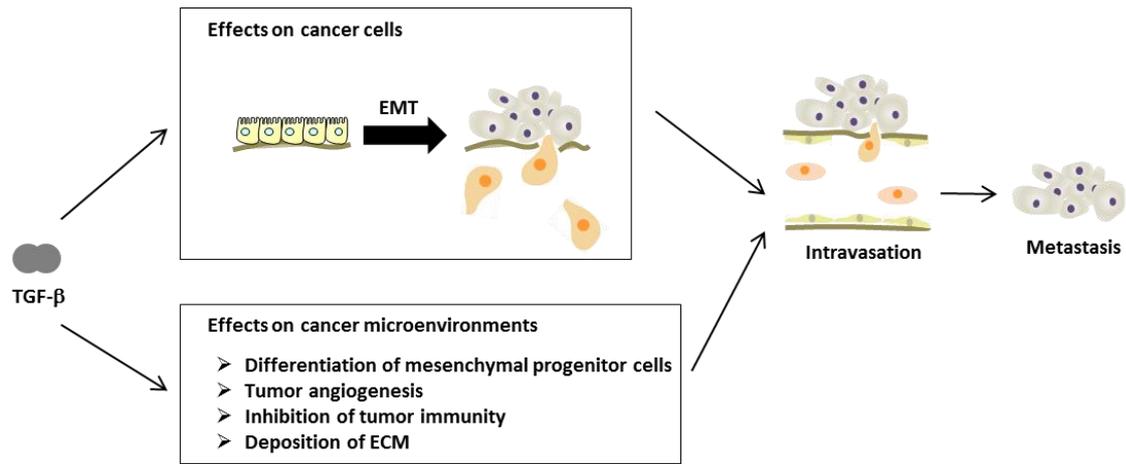


図 3. 進行期の癌に対する TGF-β の作用

進行癌において TGF-β は癌細胞 (Cancer cells) と癌微小環境 (Cancer microenvironments) に作用する。TGF-β は癌細胞の EMT を誘導し、細胞の運動・浸潤能を高めるとともに、癌周囲の微小環境に対して ECM の蓄積、免疫抑制、腫瘍血管の新生を促すことで癌の転移に有利に働く。

さらに乳癌の骨転移においては、TGF- β が副甲状腺ホルモン関連ペプチド(Parathyroid hormone related peptide; PTHrP)の乳癌細胞での遺伝子発現を誘導し、破骨細胞の分化を促進することも知られている (20)。以上のことから進行癌においては、TGF- β は様々なメカニズムを介して、腫瘍促進因子として作用している (図 4)。

このように、癌の進展において、TGF- β は腫瘍抑制作用と腫瘍促進作用の二面的な作用を有していると考えられる (12,21)。しかしながら、TGF- β のこの二面性が何によって決定されているかはいまだに明らかにされていない。そこで本研究では乳癌、膵癌という 2 種類の癌に焦点を当てて、それぞれの癌細胞に対する TGF- β の作用を個々に調べることにした。

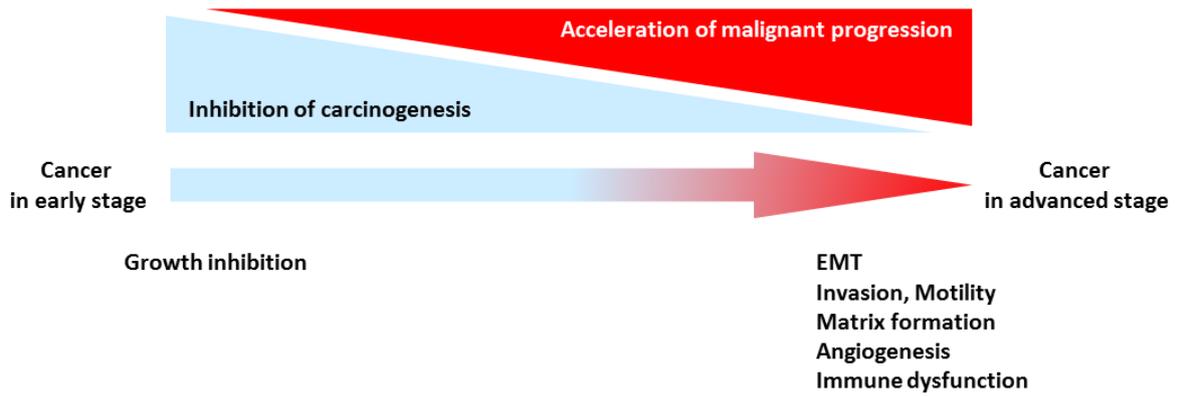


図 4. TGF-βの癌に対する作用の二面性

TGF-βは、正常細胞や初期の癌細胞の細胞増殖を抑制することから、腫瘍抑制因子として作用する。しかしながら一方で、癌細胞の悪性度が増すと、増殖抑制作用はなくなる。このような細胞に対して、TGF-βは EMT を誘導し、運動・浸潤能を獲得させる。さらに、TGF-βは癌微小環境に作用し、血管新生、ECM の産生、免疫抑制なども誘導する。これらの作用により、TGF-βは癌の転移を促進させるなど、腫瘍促進因子としても作用する。

1) 乳癌細胞のアポトーシス回避における TGF- β の役割

要旨

マウス乳癌細胞は TGF- β を自己分泌し、内因性 TGF- β シグナルによりアポトーシス耐性を獲得している。この TGF- β によるアポトーシス耐性にはアポトーシス誘導因子である Bim の発現制御が関与していることが示唆された。さらにこの制御には、TGF- β による転写因子 Foxc1 の発現性制御を介した Bim の発現抑制が関わっていると考えられた。

序論

癌転移とアポトーシスにおける TGF- β シグナル

転移は癌の進展における最終段階であり、固形腫瘍に関連した死の 90%は転移によるものである (22,23)。癌の転移は、癌細胞の周囲組織への侵入、毛細血管への播種、血管外への遊走、新たな微小環境への適応、異なる臓器での腫瘍の形成などの多段階のステップを経なければならない (24)。しかしながら、これらのステップの過程では、癌細胞は周囲の微小環境からの脱離、血管内でのメカニカルストレス、栄養の枯渇、低酸素状態など、常に多くのストレスに晒されており、様々なメカニズムによって癌細胞のアポトーシスが誘導されやすい状況にある。最近の *in vivo* や *in vitro* での研究結果により、特に、隣接する細胞や細胞外基質からの遊離により誘導されるアノイキスに対して癌細胞が耐性を獲得することや、血管内に存在する免疫細胞による除去やメカニカルストレスによる破壊から癌細胞が回避することが、癌転移の成立を規定する重要なメカニズムとして示されており、アポトーシス耐性を獲得した癌細胞の存在が重要であると考えられている (22)。

このような状況の下、TGF- β は様々な細胞のアポトーシスを誘導するシグナルとして着目されてきた。ヒト胃癌細胞では、TGF- β が Smad pathway を介して B-cell leukemia/lymphoma (Bcl-2)ファミリーの発現を抑制し、アポトーシスを誘導することが分かっている (25)。また Smad3、Smad4 の発現量とアポトーシス誘導性の相関や、Smad3 の機能抑制によるアポトーシス耐性の獲得も報告されている (26-28)。このよ

うに、多くの細胞では TGF- β によるアポトーシスの誘導が知られているが、一方ではその逆の作用として、癌細胞をアポトーシスから回避させる作用があることも見出されている (29-32)。当研究室の先行研究では、一部の乳癌細胞は自己分泌的に TGF- β を産生しており、このような癌細胞では TGF- β が転写因子 Basic helix-loop-helix domain containing class-B2 (Bhlhb2; Dec1)の発現を誘導し、アポトーシス耐性を獲得させることが示されている (33)。

材料と方法

細胞培養

マウス乳癌細胞 JygMC(A)、JygMC(B)、4T1、およびヒト胎児腎細胞 293、293A は 10% fetal bovine serum (FBS; Thermo Scientific)と 50 U/ml penicillin (GIBCO)、50 µg/ml streptomycin (Gibco)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)培地 (Gibco)で 37°C、5% CO₂ インキュベーターを使用し培養した。

増殖因子と阻害剤

TGF-β3 は 0.1% bovine serum albumin (BSA; Sigma)を含む 4 mM HCl にて溶解し、使用した。TGF-β I 型受容体キナーゼ阻害剤 (ALK5 阻害剤)には SB431542 (Sigma)、LY364947 (Calbiochem)、A-44-03 (京都薬科大学野出研究室より供与)を使用した。MAPK 阻害剤には U0126 (Promega)、SB203580 (Calbiochem)、SP600125 (Calbiochem)を使用した。PI3K 阻害剤には LY294002 (Calbiochem) を使用した。A-44-03 のみ蒸留滅菌水で溶解し、それ以外の全ての阻害剤は dimethyl sulfoxide (DMSO)で溶解し、使用した。新規タンパク質合成阻害剤には cyclohexymide (CHX; Sigma)を使用した。

核抽出

細胞を phosphate buffered saline (PBS)で洗浄、回収、4°C 1500 rpm 3 分間遠心し細胞を回収した。細胞の沈殿に Buffer I (10 mM HEPES-KOH (pH7.9), 400 mM KCl, 0.1 mM

EGTA, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF))を加えて4°C 15 分間静置した。その後 10% Nonidet P-40 (NP-40)を加え 10 秒間混合し、4°C 15000 rpm 30 秒遠心して、その上清に 1/10 量の 2 M KCl を加えて細胞質抽出液とした。核の沈殿を Buffer II (20 mM HEPES-KOH (pH7.9), 400 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF)で再懸濁し、4°C、15 分間振とうした後、4°C、15000 rpm、5 分間遠心し、上清を核抽出液とした。

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)と Western blot

細胞を PBS で洗浄後、1% aprotinin (Bayer)を含む Lysis Buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1% NP-40)で融解させ、氷上で 15 分間静置した後、4°C、15000 rpm、10 分間遠心し上清を回収した。BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)によりタンパク質濃度を測定し、Lysis Buffer で濃度をそろえたサンプルを作製した。SDS Sample Buffer (170 mM Tris-HCl (pH8.8), 44% glycerol, 8.7% SDS, 22 mM 1,4-dithiothreitol, 0.05% Bromophenol Blue)をサンプルの 1/2 量加えて 98°C、3 分間ボイルし、8.5%もしくは 12% polyacrylamide gel で電気泳動、分離後、セミドライ法にて Fluoro Trans W Membrane (Pall)に転写した。メンブレンを Blocking Buffer (5% スキムミルク (Snow Brand Milk Products)、もしくは 5% BSA, 50 mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)にて室温で 3 時間インキュベーションした後、一次抗体を 4°C、overnight、二次抗体を室温で 30 分間インキュベーションした。バンドの検出には Enhanced

Chemiluminescence (ECL) Solution (50 mM Tris-HCl (pH8.5), 0.01% H₂O₂, 90 mM p-Coumaric acid, 50 mM Tris-HCl (pH8.5), 1.25 mM Luminol)を用い、Luminescent Image Analyzer / LAS-4000 (Fujifilm)を使用して行った。使用した一次抗体と二次抗体を以下に示す。

一次抗体	二次抗体
抗 Bim 抗体 (Cell Signaling)	anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase (HRP)-linked antibody (Cell Signaling)
抗 HDAC 抗体 (Sigma)	
抗 phospho-Smad2 (Ser465/467)抗体 (Cell Signaling)	
抗 phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)抗体 (Cell Signaling)	
抗 phospho-Akt (Ser473)抗体 (Cell Signaling)	
抗 phospho-c-jun (Ser 63)抗体 (Cell Signaling)	
抗 phospho-ATF-2 (Thy69/71)抗体 (Cell Signaling)	
抗 Akt 抗体 (Cell Signaling)	
抗 Smad2/3 抗体 (BD Biosciences)	anti-mouse IgG, HRP-linked antibody (Cell signaling)
抗 MAP-Kinase2/Erk2 抗体 (Millipore)	
抗 α -tubulin 抗体 (Sigma)	
抗 FLAG 抗体 (M2; Sigma)	
抗 Foxc1 抗体 (Abcam)	anti-goat IgG, HRP-linked antibody (Jackson ImmunoResearch)

Cytosolic DNA ladder assay

細胞を 1×10^6 cells/well の細胞密度で 10 cm dish に播種した。翌日無血清培地に交換し、TGF- β 3 (1 ng/ml)もしくは SB431542 (10 μ M)を添加した。48 時間後に、浮遊している細胞と付着している細胞を共に回収し、Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100)にて細胞を融解した。室温で 10 分間静置後、4°C、15000 rpm、5 分間遠心して上清を回収し、0.2 mg/ml Proteinase K と 0.1 mg/ml RNase A を加えて 42°C、1 時間インキュベーションした。その後 phenol-chloroform 抽出、ethanol 沈殿を行い、DNA を精製し、0.01% ethidium bromide を含む 2% agarose gel を用いて電気泳動を行い、DNA を分離した。

TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)染色

細胞を 1×10^5 cells/well の細胞密度で 4 well chamber に播種した。翌日無血清培地に交換し、TGF- β 3 (1 ng/ml)もしくは SB431542 (10 μ M)を添加した。48 時間後に 3.7% formaldehyde で固定し、0.1% Triton X-100 にて透過処理した。その後、*In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche)を用いて断片化した DNA を染色した。Sytox Green Nucleic Acid Stain (Invitrogen)を室温で 10 分間インキュベートして核染色を行い、Axiovert 200M (Carl Zeiss)にて観察した。細胞は独立した 10 視野で観察し、Sytox Green 陽性細胞に対して TUNEL 陽性細胞の比率を定量化した。2 グループ間の陽性細胞数の比較検定には、Student の *t*-test を用い、 $p < 0.05$ である場合に有意であると判定し

た。

RNA 調製

ISOGEN (Nippon Gene)を用いて RNA を回収し、プロトコールに従い抽出を行った。抽出した RNA の濃度は Diethylpyrocarbonate (DEPC)処理水でそろえ、oligo(dT)₂₀ プライマーを用いて PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis (Takara)で cDNA を合成した。cDNA は蒸留滅菌水にて 20 倍に希釈して使用した。

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

半定量的 RT-PCR 解析は、Ex Taq polymerase (Takara)を用いて、Program Temp Control System (Astec)により行った。PCR の条件は 94°C、30 秒、50°C、30 秒、72°C、1 分に設定し、これを 30 サイクル行った。Negative control として蒸留滅菌水を使用した。PCR 産物を 1% agarose gel を用いて泳動し、ethidium bromide にてバンドの検出を行った。使用したプライマーの配列を以下に示す。

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Tgfb1</i>	CGGTGCTCGCTTTGTACAAC	TTCCAACCCAGGTCCTTCCT
<i>Tgfb2</i>	TTTATGCGCAAGAGGATCGA	TCTGATCACCCTGGCATATGTAG
<i>Tgfb3</i>	TGGCCACAATCAGCCTCTCT	GCTGCTTGGCTATGTGCTCAT
<i>Gapdh</i>	TGCAGTGGCAAAGTGGAGATT	TTGAAGTCGCAGGAGACAACCT

定量的 RT-PCR 解析は、FastStart Universal Sybr Green Master (Roche)を用いて、ABI PRISM 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)により行った。使用したプライマーの配列を以下に示す。

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Serpine1</i>	CCACAAAGGTCTCATGGACCAT	TGAAAGTGTGTGCCCCTCCAC
<i>Bcl2l1l</i>	CGACAGTCTCAGGAGGAACC	CCTTCTCCATACCAGACGGA
<i>Foxc1</i>	CGGCACTCTTAGAGCCAAAT	TTTGAGCTGATGCTGGTGAG
<i>Hprt1</i>	CTGGTTAAGCAGTACAGCCCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT

RNA interference

3.2 x 10⁵ cells/well の細胞密度で 6 well plate に播種した JygMC(A)細胞に small interfering RNA (siRNA)を導入し、遺伝子発現のノックダウンを行った。トランスフェクションには Lipofectamine 2000 (Invitrogen; 20 μl)、Bim に対する siRNA (Stealth siRNA /Bim (以下 siBim); Invitrogen; 60 nM)、Foxc1 に対する siRNA (Stealth siRNA /Foxc1 (以下 siFoxc1); Invitrogen; 60 nM)、およびコントロールの siRNA (Stealth RNAi negative control medium GC duplex (以下 siNTC); Invitrogen; 60 nM)を使用した。siRNA 導入後 12 時間で無血清培地に交換し、同時に SB431542 (10 μM)を添加した。さらに 24 時間後に RNA を回収した。使用した siRNA の標的配列を以下に示す。

Stealth RNAi	標的配列
siBim	CAAGGAGGGUGUUUGCAAUAUGAUUA
siFoxc1	GGAAUAGUAGCUGUCAGAUGGCUUU

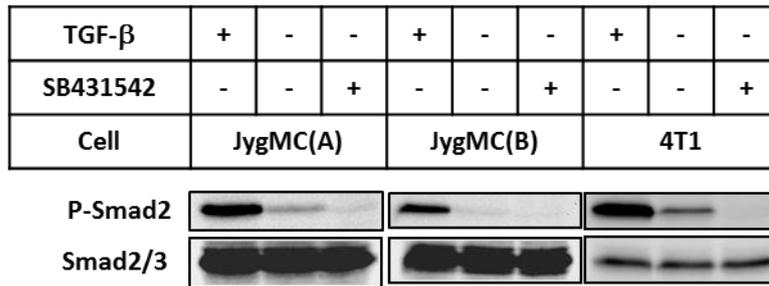
結果

乳癌細胞の TGF- β 応答性

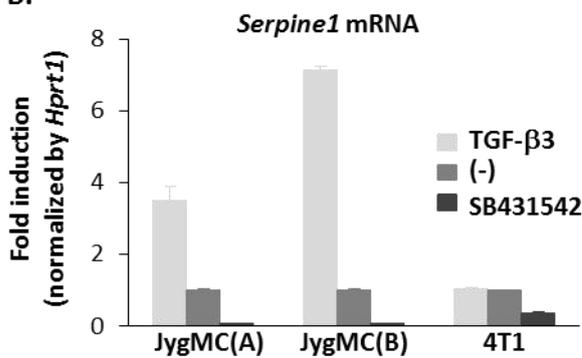
まず 3 種類のマウス乳癌細胞、JygMC(A)、JygMC(B)、4T1 において TGF- β に対する応答性を調べるために、シグナル伝達の指標である Smad2 のリン酸化を Western blot により検討した。全ての細胞において TGF- β による Smad2 のリン酸化と、TGF- β I 型受容体キナーゼ阻害剤 (ALK5 阻害剤) である SB431542 によるリン酸化の減弱を認めた (図 5A)。

次に、これらの細胞において、TGF- β の代表的な標的遺伝子である Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1; *Serpine1*) の発現量の変化を定量的 RT-PCR で調べた (図 5B)。JygMC(A)細胞、JygMC(B)細胞では TGF- β による PAI-1 の発現上昇と、SB431542 による PAI-1 の発現抑制を確認した。一方、4T1 細胞では、TGF- β による PAI-1 の発現上昇は認めなかったが、SB431542 による PAI-1 の発現抑制は確認された。これは、4T1 細胞での TGF- β による PAI-1 の発現誘導は短時間で終息することが分かっており、今回の条件では外因性の TGF- β による PAI-1 の発現誘導が認められなかったことが原因と考えられる。さらに、半定量的 RT-PCR の結果により、JygMC(A)細胞および JygMC(B)細胞は TGF- β 1、TGF- β 3 を、4T1 細胞はすべてのアイソフォームの TGF- β を発現していることが分かった (図 5C)。以上から、これらの乳癌細胞は外因性の TGF- β に応答し、さらに自己分泌的に TGF- β を産生することで内在性に TGF- β シグナルを伝達していること、SB431542 は効果的に内因性の TGF- β シグナルを阻害できる

A.



B.



C.

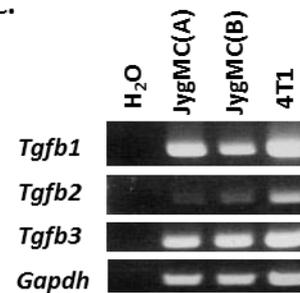


図 5. 乳癌細胞における外因性および内因性の TGF- β シグナル伝達

JygMC(A)細胞、JygMC(B)細胞、4T1 細胞に、無血清条件下で TGF- β 3 (1 ng/ml)で刺激、もしくは SB431542 (10 μ M)を添加した。

(A) 1 時間後にタンパク質を回収し、SDS-PAGE を行った。抗 phospho-Smad2 抗体および、抗 Smad2/3 抗体を用いて Western blot を行った。

(B) 24 時間後に mRNA を回収し、PAI-1 (*Serpine1*)の発現変化を定量的 RT-PCR にて評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control として *Hprt1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *Hprt1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

(C) JygMC(A)細胞、JygMC(B)細胞、4T1 細胞における TGF- β 1 (*Tgfb1*)、TGF- β 2 (*Tgfb2*)、TGF- β 3 (*Tgfb3*)の発現を半定量的 RT-PCR により評価した。PCR の loading control として *Gapdh* を使用した。

ことが分かった。なお、乳癌細胞が自己分泌している TGF- β は細胞膜表面に存在する受容体の一部に結合することで、シグナルを伝達する。細胞表面に存在する TGF- β 受容体の一部はリガンドが結合しない状態で、外因性の TGF- β が結合する余地があると考えられ、そのため外因性の TGF- β により Smad2 のリン酸化が亢進し、Serpine1 の発現上昇が確認できたものと考えられる。

乳癌細胞の TGF- β シグナルとアポトーシス

多くの癌細胞では TGF- β によりアポトーシスが誘導されることが知られているが、反対に一部の乳癌細胞では TGF- β がアポトーシスを抑制していることも知られている (31-34)。そこで、JygMC(A)細胞、JygMC(B)細胞、4T1 細胞の TGF- β シグナルの強弱と細胞の生死との関係を調べることにした。まず、TGF- β リガンドでシグナルを亢進させた場合、もしくは SB431542 処理によりシグナルを阻害した場合に、これらの乳癌細胞の生存に対する影響を形態学的に観察した (図 6)。その結果、無血清条件下で TGF- β 刺激を行っても細胞に明らかな変化は見られないが、SB431542 によって内因性の TGF- β シグナルを阻害することにより、細胞死が誘導されることがわかった。次に、SB431542 によって誘導される細胞死がアポトーシスであることを確認するために、細胞死を誘導した各乳癌細胞を用いて TUNEL 染色を行い、断片化 DNA の染色を行った。SB431542 を加えることにより、3 種類全ての細胞で TUNEL 陽性細胞が顕著に増加することが確認された (図 7A)。さらに、これらの細胞で cytosolic DNA

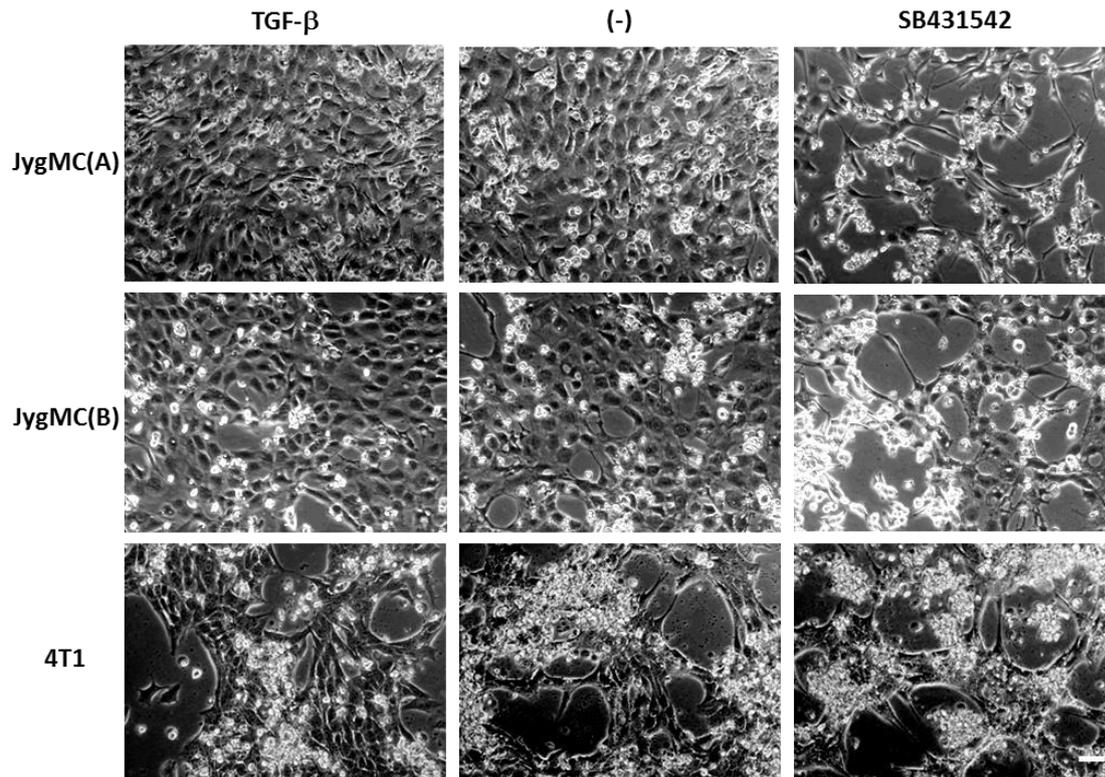
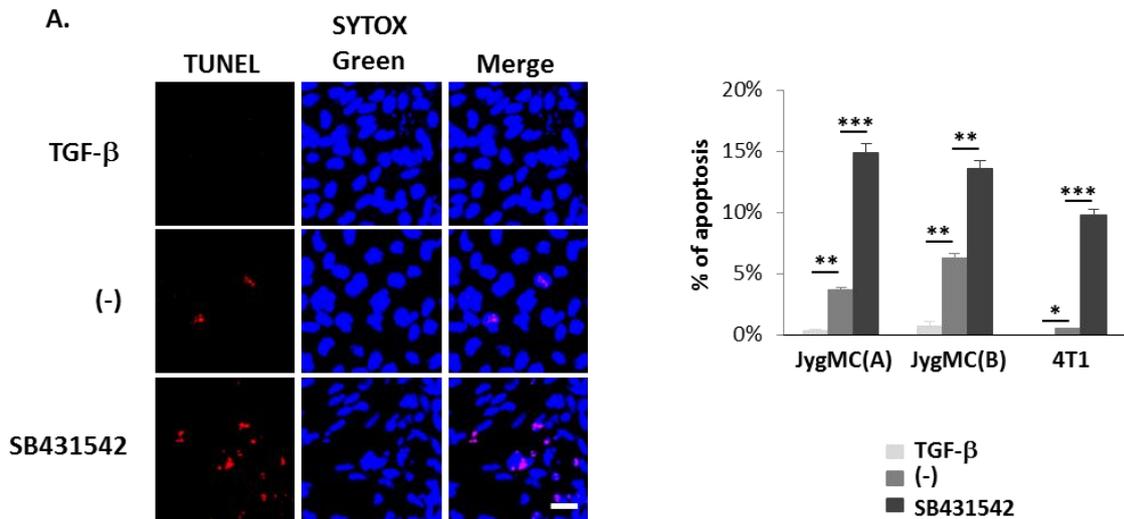


図 6. 乳癌細胞の生存に対する TGF- β シグナルの影響

JygMC(A)細胞、JygMC(B)細胞、4T1 細胞に、無血清条件下で TGF- β 3 (1 ng/ml)で刺激、もしくは SB431542 (10 μ M)を添加し、48 時間後の細胞の形態を顕微鏡下で観察、写真を撮影した。Scale bar; 60 μ m



B.

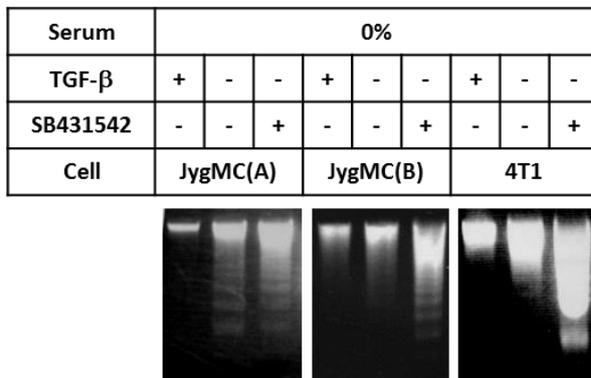


図 7. 乳癌細胞のアポトーシスに対する TGF- β シグナルの影響

(A) (左) JygMC(A)細胞に、無血清条件下で TGF- β 3 (1 ng/ml)で 48 時間刺激し、DNA 断片に TUNEL 染色を行った。核は Sytox Green によって対比染色した。赤は TUNEL、青は Sytox Green を示す。Scale bar; 20 μ m (右) 各細胞において、Sytox Green 陽性細胞に対する TUNEL 陽性細胞の比率を定量化した。細胞は独立した 10 視野で観察し、平均と標準偏差をグラフ化した。グラフの縦軸は、全体の細胞に対してアポトーシスを起こしている細胞の比率を表す。*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$

(B) (A)の各細胞の細胞質から、断片化された DNA を抽出し、電気泳動を行った。

ladder assay を行ったところ、無血清条件下での SB431542 による DNA ladder の形成が
増強した (図 7B)。以上の結果から、これらの乳癌細胞では、内因性の TGF- β シグナ
ルを抑制すると、アポトーシスが誘導されることが確認できた。

アポトーシス関連遺伝子の探索

次に、JygMC(A)細胞の内因性の TGF- β シグナルを阻害し、アポトーシスが誘導さ
れた場合の遺伝子発現の変化を把握するために、以前に当研究室の江幡らによって行
われた JygMC(A)細胞の Microarray のデータセットを再解析した (33)。このデータセ
ットは、未処理の細胞“cont”、24 時間 TGF- β 刺激をした細胞“Tb24”、抑制型 Smad で
ある *Smad7* 遺伝子を導入することで内因性の TGF- β シグナルを阻害した細胞“Smad7”、
さらに遺伝子導入時の遺伝子変化を把握するためのコントロールとして *LacZ* 遺伝子
を導入した細胞“LacZ”を用意し、それぞれの細胞の遺伝子発現を網羅的に解析したも
のである (図 8)。今回は、JygMC(A)細胞の内因性の TGF- β シグナルを阻害すること
でアポトーシス誘導性の遺伝子の発現が亢進すると考え、“Smad7”で発現が亢進してい
る候補遺伝子の抽出を試みた。最終的な候補遺伝子の数が 20 以下になるような条件
で候補遺伝子の抽出を行ったところ (表 1)、内因性の TGF- β シグナルを阻害すると最
終的に 18 種の遺伝子の発現が誘導されることがわかった。さらにこの遺伝子群の中
には、アポトーシスに関連する遺伝子として BCL2-like 11 (*Bcl2l11*; *Bim*)が含まれてい
た。*Bim* の翻訳産物は BH3-only protein に属し、ミトコンドリア膜上の種々の抗アポ

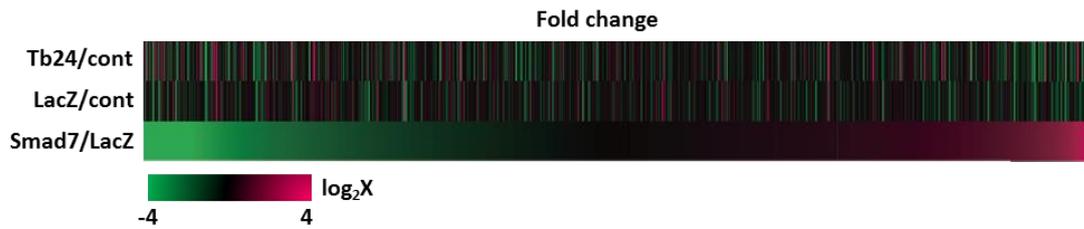


図 8. TGF-βシグナルにより発現変動する遺伝子の網羅的解析

4 条件の JygMC(A)細胞 (何も処理していないコントロール細胞; “cont”、TGF-β3 (1 ng/ml) 24 時間刺激した細胞; “Tb24”、*LacZ* 遺伝子を導入した細胞; “LacZ”、*Smad7* 遺伝子を導入した細胞; “Smad7”)の遺伝子発現を、GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix)を用いて評価した。“cont”と比較して“Smad7”および“Tb24”において発現が上昇している遺伝子は赤、減少している遺伝子は緑で示す。

Probe Set	Accession	Gene		Fold change			
		Symbol	Name	LacZ/cont	Smad7/cont	Smad7/LacZ	Tb24/cont
11415996_at	AF173681	<i>Txnip</i>	thioredoxin interacting protein	0.821	1.278	1.556	0.739
21417500_a_at	BC016492	<i>Tgm2</i>	transglutaminase 2, C polypeptide	1.004	1.889	1.881	0.722
31419735_at	NM_007786	<i>Csn3</i>	casein kappa	0.901	6.674	7.405	0.560
41421153_at	NM_053083	<i>Loxl4</i>	lysyl oxidase-like 4	0.995	1.691	1.699	0.652
51422510_at	NM_133710	<i>Ctdspl</i>	CTD small phosphatase-like	0.987	1.638	1.659	0.776
61424921_at	BC008532	<i>Bst2</i>	bone marrow stromal cell antigen 2	1.010	1.838	1.821	0.659
71427447_a_at	BC003984	<i>Triobp</i>	TRIO and F-actin binding protein	1.014	1.795	1.770	0.736
81433428_x_at	AW321975	<i>Tgm2</i>	transglutaminase 2, C polypeptide	0.993	1.517	1.529	0.665
91435448_at	BM120925	<i>Bcl2l11</i>	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	0.872	1.799	2.063	0.787
101437277_x_at	BB550124	<i>Tgm2</i>	transglutaminase 2, C polypeptide	0.940	1.428	1.520	0.793
111448830_at	NM_013642	<i>Dusp1</i>	dual specificity phosphatase 1	0.964	1.723	1.787	0.548
121448991_a_at	BC018383	---	---	1.038	1.877	1.809	0.634
131450264_a_at	NM_013490	<i>Chka</i>	choline kinase alpha	1.172	2.440	2.081	0.684
141455900_x_at	BB041811	<i>Tgm2</i>	transglutaminase 2, C polypeptide	1.079	1.764	1.635	0.765
151460287_at	M93954	<i>Timp2</i>	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	0.890	1.541	1.731	0.694
161429863_at	AK016522	<i>Lonrf3</i>	ring finger protein 127	1.301	2.998	2.305	1.048
171436200_at	BE956940	<i>A830039N02Rik</i>	RIKEN cDNA A830039N02 gene	1.039	2.360	2.272	0.756
181443832_s_at	AV064339	<i>Sdpr</i>	serum deprivation response	1.270	2.824	2.223	0.795

表 1. TGF- β シグナルの抑制により発現変動する遺伝子の探索

図 8 で発現解析した 45102 probe sets に相当する全遺伝子から、“Smad7”において発現が誘導され、“Tb24”において発現が抑制される遺伝子を抽出するため、以下の条件で絞り込みを行ったところ、表に示す 18 遺伝子が抽出された。

- i “Smad7” > 50
- ii “cont” = ”LacZ”
- iii “Tb24” / “cont” < 2^{-0.3}
- iv “Smad7” / “LacZ” > 2^{0.7}

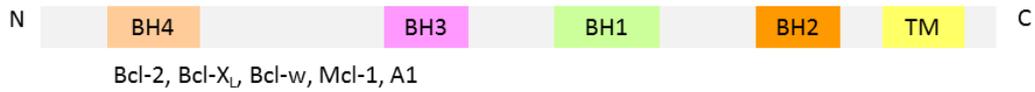
トーンシス作用を有するタンパク質の機能を阻害することで、細胞のアポトーシスを亢進することが知られている (図 9) (34-36)。なお、近年の研究結果により、*Bim* 遺伝子の欠損やエピジェネティックサイレンシングがバーキットリンパ腫の発生に関与することが分かってきており、また悪性黒色腫や腎細胞癌でも *Bim* の発現欠失が確認されている (37,38)。さらに、*Bim* 発現の減弱している腎細胞癌の症例においては、転移が亢進していることが分かっている (39)。

乳癌細胞での TGF- β による *Bim* の発現制御

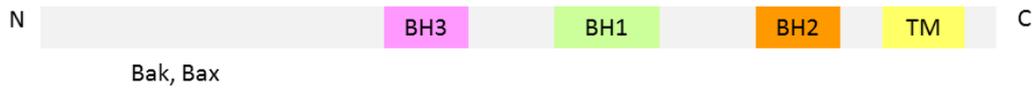
SB431542 は TGF- β I 型受容体以外のキナーゼ活性も機能も阻害しうることから (40)、*Bim* 発現調節における他の因子の関与を排除する為に、TGF- β I 型受容体の他のキナーゼ阻害剤を用いることで、キナーゼ活性の特異性を検討した。A-44-03、LY364947 を用いた場合でも、SB431542 と同様に *Bim* の発現上昇を確認できたことから (図 10A)、SB431542 のアポトーシス促進効果は TGF- β シグナルを阻害したことによるものであると考えられた。

次に JygMC(A)細胞において TGF- β シグナルの阻害が *Bim* の発現に影響を及ぼすことが確認されたが、JygMC(B)細胞、4T1 細胞でも同様の発現調節機構が存在するか否かを調べるために、定量的 RT-PCR により *Bim* の発現を調べた (図 10B)。JygMC(B)細胞では JygMC(A)細胞と同様に SB431542 による *Bim* の発現上昇が確認されたが、4T1 細胞においては、内在性の *Bim* 発現が前述の細胞と比較すると低く、TGF- β シグナルと *Bim* 発現との関連性は乏しいと思われた。同様に、Western blot にて JygMC(A)

Bcl-2 subfamily



Bax subfamily



BH3-only protein

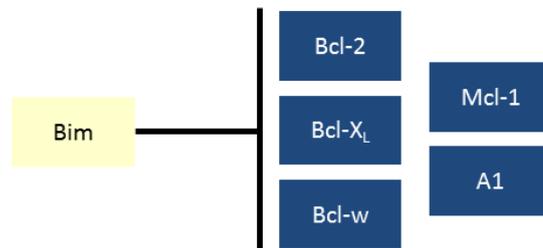
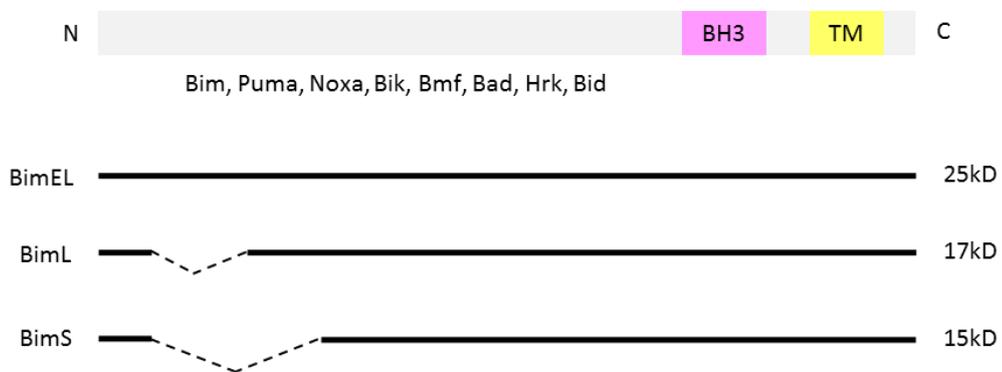


図 9. Bcl-2 ファミリータンパクの構造と機能

Bcl-2 ファミリータンパクは、特徴的なアミノ酸配列からなる BH ドメイン (BH1、BH2、BH3、BH4) をもつタンパクであり、ミトコンドリア外膜の膜透過性を制御することで細胞のアポトーシス誘導を制御する。

Bcl-2 ファミリータンパクは Bcl-2 サブファミリー (Bcl-2 や Bcl-X_L など、アポトーシス抑制的に作用)、Bax サブファミリー (Bax と Bak を含む、アポトーシス促進的に作用)、BH3-only protein の 3 種に分類される。このうち BH3-only protein は BH3 ドメインのみを有するグループであり、Bcl-2 サブファミリーと結合してその機能を負に制御、もしくは Bax サブファミリーと結合してその機能を正に制御することで、アポトーシスを促進する。

Bim は Puma、Noxa、Bid などと同様に BH3-only protein に属し、分子量の大きいものから BimEL、BimL、BimS の 3 つのアイソフォームが存在する。

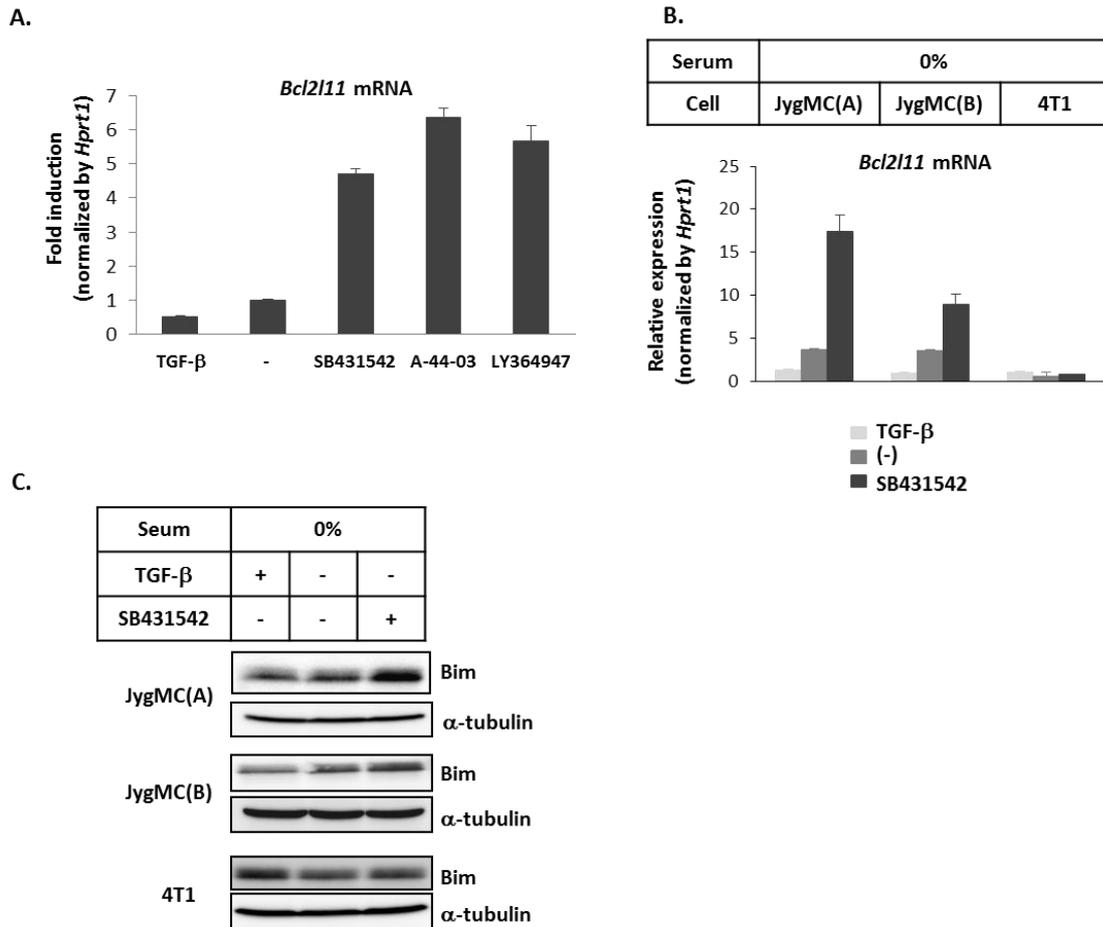


図 10. TGF- β シグナルによる乳癌細胞の Bim の発現調節

(A) JygMC(A)細胞を無血清条件下で TGF- β 3 (1 ng/ml)刺激、もしくは SB431542 (10 μ M)、A-44-03 (1 μ M)、LY364947 (1 μ M)を添加した。24 時間後に mRNA を回収し、Bim (*Bcl2l1*)の発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *Hprt1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *Hprt1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

(B) JygMC(A)細胞、JygMC(B)細胞、4T1 細胞を無血清条件下で TGF- β 3 (1 ng/ml)刺激、もしくは SB431542 (10 μ M)を添加した。24 時間後に mRNA を回収し、Bim (*Bcl2l1*)の発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *Hprt1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *Hprt1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

(C) 24 時間後にタンパク質を回収し、SDS-PAGE を行い、抗 Bim 抗体にて Western blot を行った。Loading control として抗 α -tubulin 抗体を用いた。

細胞、JygMC(B)細胞、4T1 細胞の Bim タンパクの発現を調べた (図 10C)。mRNA での変化と同様に、JygMC(A)細胞、JygMC(B)細胞では SB431542 による Bim タンパクの発現上昇が確認された。また、4T1 細胞ではタンパク質レベルでも TGF- β シグナルとの関連性は認められなかった。以上のことから、4T1 細胞では TGF- β による Bim の発現制御機構は存在していないが、少なくとも JygMC(A)細胞、JygMC(B)細胞では内因性の TGF- β によって Bim の発現が抑制されることが確認された。

乳癌細胞のアポトーシスにおける Bim の機能

乳癌細胞が実際にアポトーシスを起こす際に Bim が中心的な機能を担っているかを調べるために、JygMC(A)細胞の Bim 発現を siRNA によりノックダウンさせ、アポトーシス誘導性に対する影響を調べた。siRNA を導入していない細胞、および negative control (siNTC)を導入した細胞では、SB431542 の添加 24 時間後には Bim の発現が誘導されているのに対し、Bim を標的とした siRNA (siBim)を導入した細胞ではその発現誘導が顕著に抑制されていることが分かった (図 11A)。そこで次に、Bim の発現がノックダウンされた細胞のアポトーシスに対する影響をみるために、SB431542 添加後 48 時間まで細胞の培養を継続し、TUNEL 染色を行った (図 11B)。SB431542 によって、siRNA 未導入群やコントロール群ではいずれもアポトーシスが誘導されているのに対し、Bim の発現を抑制したものではアポトーシスの誘導が抑えられていた。従って、JygMC(A)細胞で SB431542 により誘導されるアポトーシスには、Bim の発現誘導

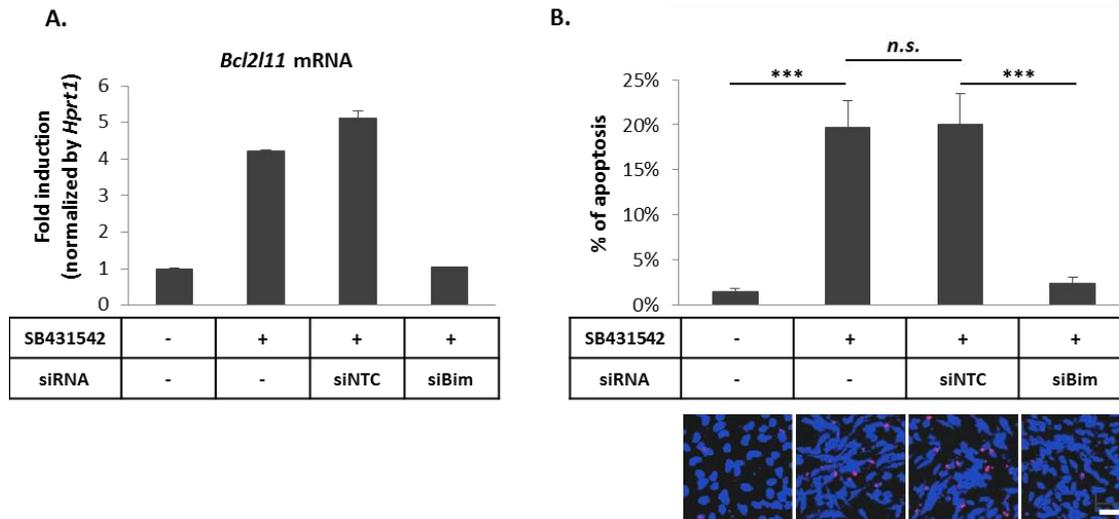


図 11. Bim ノックダウンのアポトーシスに対する効果

(A) JygMC(A)細胞に siNTC もしくは siBim をトランスフェクションした。12 時間後に無血清培地に交換し、SB431542 (10 μ M)を添加した。さらに 24 時間後に mRNA を回収し、Bim (*Bcl2l11*)の発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *Hprt1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *Hprt1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

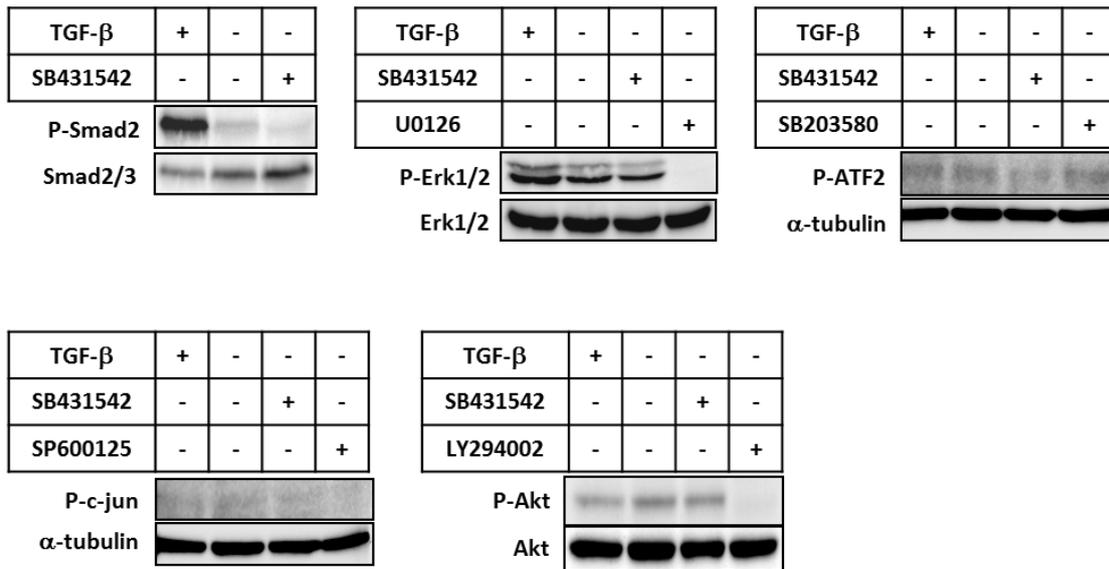
(B) (A)でノックダウンを行った JygMC(A)細胞に対し TUNEL 染色を行った。赤は TUNEL、青は Sytox Green を示す。また、Sytox Green 陽性細胞に対する TUNEL 陽性細胞の比率を定量化した。細胞は独立した 10 視野で観察し、平均と標準偏差をグラフ化した。Scale bar; 20 μ m, *n.s.*; not significant, ***; $p < 0.001$

が必要であることが示唆された。

Bim 発現調節経路の探索

TGF- β による遺伝子の発現調節には Smad pathway と non-Smad pathway があるが、Bim の発現調節には PI3K/Akt、Erk、p38、JNK などの non-Smad pathway が関与していることが報告されている (41-44)。従って、乳癌細胞において、TGF- β の下流で non-Smad pathway が関与している可能性について検討した。今回はこれらのシグナルに対する阻害剤として、Erk の上流の Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)を阻害する U0126、p38 の活性を直接阻害する SB203580、JNK の下流の c-jun の活性を直接阻害する SP600125、Akt の上流の PI3K を阻害する LY294002 を使用し、それぞれ Erk1/2、ATF2、c-jun、Akt のリン酸化を調べた (図 12A)。その結果、JygMC(A)細胞においては、TGF- β の下流で p38 と JNK シグナルはほとんど伝達していないことがわかり、PI3K/Aktシグナルも伝達されているが、TGF- β 依存的ではないことが確認された。一方で、Erk シグナルに関しては、SB431542 によって活性が減弱していることから、JygMC(A)細胞においては、TGF- β の下流で Erk シグナルが伝達していることが示唆された。しかしながら、JygMC(A)細胞での U0126 による Bim の発現変化を定量的 RT-PCR により検討したが、U0126 による Bim の発現上昇は SB431542 ほど明らかではなかった (図 12B)。このことから、Erk を含めた non-Smad pathway が Bim の発現調節に関与している可能性は低く、TGF- β による Bim の発現制御には Smad pathway を介した経

A.



B.

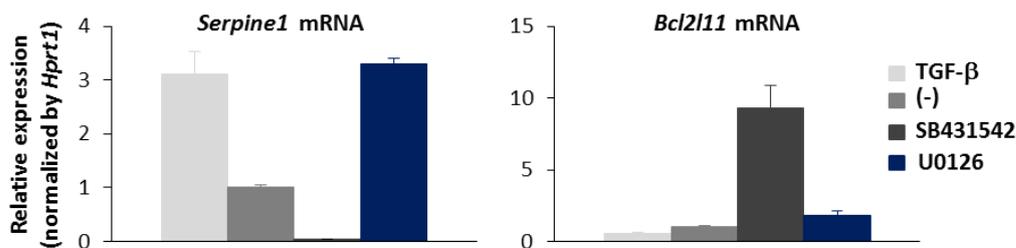


図 12. Bim 発現制御における non-Smad pathway の関与の可能性

(A) JygMC(A)細胞を TGF- β 3 (1 ng/ml)刺激、もしくは SB431542 (10 μ M)、U0126 (10 μ M)、SB203580 (10 μ M)、SP600125 (10 μ M)、LY294002 (10 μ M)添加後 1 時間のタンパク質を回収した。回収したタンパク質に SDS-PAGE を行い、Smad2、Erk1/2、ATF-2、c-jun、Akt に対するリン酸化抗体と、抗 Smad2/3 抗体、抗 Erk2 抗体、抗 Akt 抗体を用いて Western blot を行った。c-jun、ATF-2 に対しては、loading control として抗 α -tubulin 抗体を用いた。

(B) JygMC(A)細胞を TGF- β 3 (1 ng/ml)刺激、もしくは SB431542 (10 μ M)、U0126 (10 μ M) 添加後 24 時間後の mRNA を回収し、PAI-1 (*Serpine1*)および Bim (*Bcl2l11*)の発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *Hprt1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *Hprt1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

路が関係していることが示唆された。

Bim 発現を調節する転写因子の探索

TGF- β 刺激後 0、2、8、24 時間の Bim の発現を定量的 RT-PCR により評価したところ、刺激後 2 時間では未だ発現が抑制されていないのに対し、刺激後 24 時間では発現が抑制されていた (図 13A)。このことから、TGF- β による Bim の発現調節は間接的であると仮定し、cycloheximide を用いて新規タンパク質の合成を阻害した後、Bim の発現変動を定量的 RT-PCR により評価した (図 13B)。Cycloheximide で処理した JygMC(A)細胞では、TGF- β 刺激したものと同程度まで Bim の発現が減少している一方で、cycloheximide と TGF- β を同時に作用させたサンプルでは Bim の更なる発現減少は確認できなかった。このことから、TGF- β シグナルによる Bim の発現制御は、既存のタンパク質を介した間接的なものであると推測され、以降は Bim の発現調節を担っている転写因子の探索を試みることにした。

そこで、前述の Microarray のデータセット (33)を再び解析し、TGF- β によって刺激後 2 時間程度の早期から発現が抑制され、なおかつ Bim の発現調節を担う候補遺伝子を探索した (表 2)。今回は TGF- β 刺激後 2 時間“Tb2”、ならびに刺激後 24 時間“Tb24”の遺伝子発現のデータセットを解析に用いた。最終的な候補遺伝子の数が 20 以下になるように表 2 のような解析条件を設定し、絞り込みを行ったところ、最終的に 17 種の遺伝子が抽出された。得られた遺伝子群の中には、DNA に結合し、転写因子と

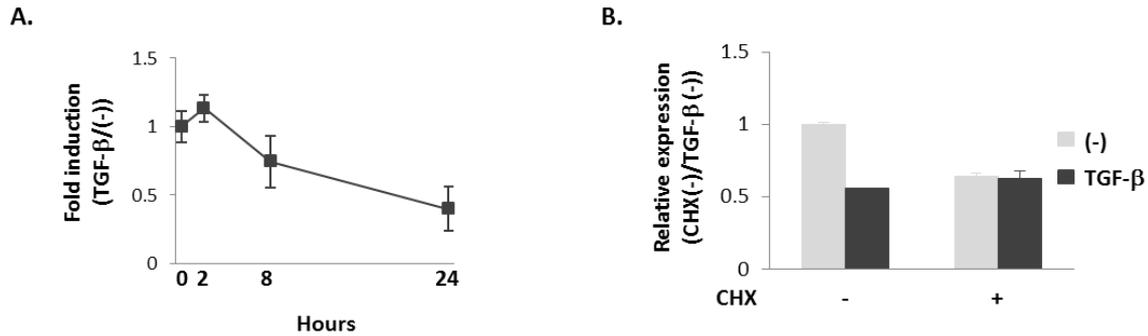


図 13. TGF-βによる間接的な Bim 発現調節

(A) JygMC(A)細胞を無血清条件下で TGF-β3 (1 ng/ml)刺激後 0、2、8、24 時間の mRNA を回収し、Bim (*Bcl2l1l*)発現の経時的変化を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *Hprt1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *Hprt1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

(B) JygMC(A)細胞に無血清条件下で cycloheximide (CHX; 2 mg/ml)を添加し、2 時間後に TGF-β3 (1 ng/ml)で刺激後 24 時間の mRNA を回収、Bim (*Bcl2l1l*)発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *Hprt1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *Hprt1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

Probe Set	Accession	Gene		Fold change	
		Symbol	Name	Tb2/cont	Tb24/cont
1 1417395_at	BG069413	<i>Klf4</i>	Kruppel-like factor 4 (gut)	0.688	0.695
2 1419486_at	BB759833	<i>Foxc1</i>	forkhead box C1	0.627	0.611
3 1422782_s_at	NM_126166	<i>Tlr3</i>	toll-like receptor 3	0.658	0.696
4 1423017_a_at	NM_031167	<i>Il1rn</i>	interleukin 1 receptor antagonist	0.608	0.627
5 1423450_a_at	AV226060	<i>Hs3st1</i>	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1	0.526	0.371
6 1423891_at	BC003903	<i>Gstt3</i>	glutathione S-transferase, theta 3	0.784	0.708
7 1424647_at	BC027245	<i>Gabrp</i>	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, pi	0.549	0.358
8 1424647_at	BC027245	<i>Gabrp</i>	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, pi	0.583	0.421
9 1425416_s_at	BC008994	<i>Psrc1</i>	proline/serine-rich coiled-coil 1	0.600	0.676
10 1425675_s_at	M77196	<i>Ceacam1</i>	CEA-related cell adhesion molecule 1	0.677	0.518
11 1427443_at	BF162286	---	---	0.691	0.532
12 1448494_at	BB550400	---	---	0.515	0.459
13 1449146_at	NM_010929	<i>Notch4</i>	Notch gene homolog 4 (Drosophila)	0.601	0.442
14 1450784_at	NM_016678	---	---	0.658	0.511
15 1433837_at	AV365503	<i>8430408G22Rik</i>	RIKEN cDNA 8430408G22 gene	0.547	0.831
16 1433868_at	AV028445	<i>Btbd3</i>	BTB (POZ) domain containing 3	0.642	0.720
17 1453448_at	AK010086	<i>2310067E19Rik</i>	RIKEN cDNA 2310067E19 gene	0.715	0.661

表 2. TGF- β 刺激により早期に発現が誘導される遺伝子の探索

3条件の JygMC(A)細胞 (何も処理していない細胞; “cont”、TGF- β 3 (1 ng/ml) 2時間刺激した細胞; “Tb2”、TGF- β 3 (1 ng/ml) 24時間刺激した細胞; “Tb24”)の遺伝子発現を、GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix)を用いて調べた。発現解析した45102 probe sets に相当する全遺伝子から、“Tb2”かつ“Tb24”において発現が抑制されている遺伝子を抽出するため、以下の条件で絞り込みを行ったところ、表に示す 17 遺伝子が抽出された。

- i “cont” > 50
- ii “Tb2” / “cont” < $2^{-0.3}$
- iii “Tb24” / “cont” < $2^{-0.3}$

して機能することが知られているものとして、Forkhead box C1 (Foxc1)が存在した。

Foxc1 は Fox ファミリーに属する転写因子であり、これまでに眼の発生に重要な因子であることが示されているが、癌細胞におけるアポトーシスに関する機能は報告されていない (45)。TGF- β の下流で、Bim の発現制御に関わる転写因子の候補として Foxc1 が機能しうるか調べるため、まず JygMC(A)細胞を用いて、経時的な Foxc1 の発現量の変化を定量的 RT-PCR により評価した (図 14)。TGF- β による Bim の発現減少は刺激後 24 時間で初めて顕在化するのに対し、Foxc1 は TGF- β 刺激後 2 時間ですでに発現減少が認められており、Foxc1 の発現抑制が Bim の発現抑制に先行していることが判明した。さらに、JygMC(A)細胞、JygMC(B)細胞、4T1 細胞において TGF- β 、もしくは SB431542 が Foxc1 の発現に影響を及ぼすか否かについて定量的 RT-PCR を用いて検討した (図 15A)。JygMC(A)細胞、JygMC(B)細胞では、TGF- β 刺激によって Foxc1 の発現が抑制され、一方で SB431542 によって Foxc1 の発現上昇が起こることが確認された。しかし、4T1 細胞では、TGF- β シグナルと Foxc1 発現との関係性は見出せなかった。同様に、タンパク質レベルでの発現変化を確認したところ、mRNA と同様 JygMC(A)細胞では SB431542 による発現上昇が確認されたが、4T1 細胞ではタンパク質レベルでも TGF- β との関連性は認められなかった (図 15B)。

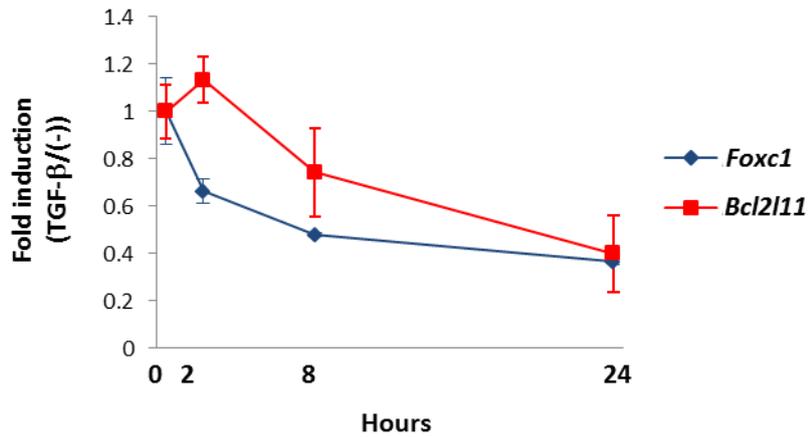


図 14. TGF- β による Bim、Foxc1 の発現調節の経時的変化

図 12A のサンプルを使用し、Bim (*Bcl2l11*)、Foxc1 の発現の経時的変化を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control として *Hprt1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *Hprt1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

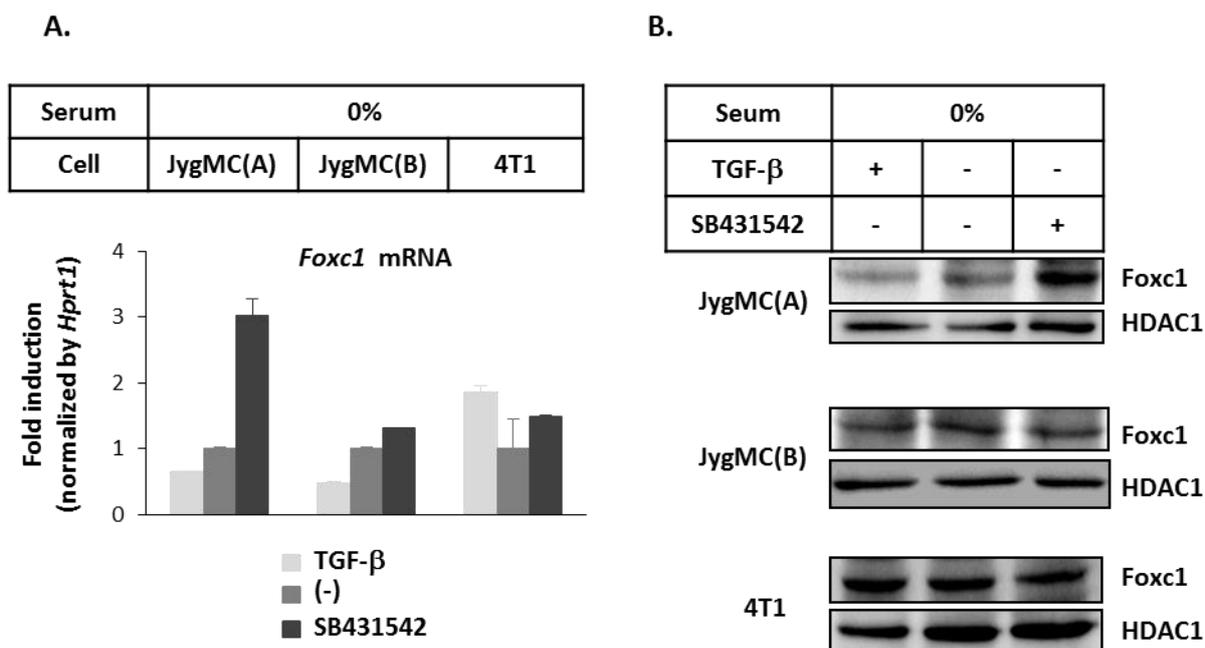


図 15. TGF- β シグナルによる乳癌細胞の Foxc1 の発現調節

JygMC(A)細胞、JygMC(B)細胞、4T1 細胞を無血清条件下で TGF- β 3 (1 ng/ml)刺激、もしくは SB431542 (10 μ M)添加後 24 時間の mRNA (A)、およびタンパク質 (B)を回収した。

(A) *Foxc1* の発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *Hprt1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *Hprt1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

(B) 核抽出により回収したタンパク質に SDS-PAGE を行い、抗 Foxc1 抗体にて Western blot を行った。核分画の loading control として抗 HDAC1 抗体を用いた。

Foxc1 による Bim 発現調節の可能性

次に、Foxc1 が Bim の発現調節に関わっているか否かを調べるために、JygMC(A)細胞を使用して、siRNA を用いた Foxc1 のノックダウンを行った。JygMC(A)細胞に siFoxc1 を導入した後、SB431542 を含む無血清培地に交換し、Foxc1 の発現量を定量的 RT-PCR により評価した (図 16A)。siRNA 未導入の細胞および negative control を導入した細胞では Foxc1 の発現に変化は見られないのに対し、siFoxc1 を導入した細胞では Foxc1 の発現の抑制が認められ、十分なノックダウン効果であると考えた。この条件において、Bim 発現を調べたところ、siFoxc1 を導入した細胞では Bim の発現が抑制されていることから、Foxc1 は Bim の発現調節に必要であることが考えられた。さらに、siFoxc1 導入細胞では、無血清条件下での SB431542 によるアポトーシス誘導が抑制されていることから、JygMC(A)細胞において Foxc1 がアポトーシスに関与することが分かった (図 16B)。以上より、JygMC(A)細胞には TGF- β -Foxc1-Bim pathway が存在し、TGF- β がアポトーシス誘導因子である Foxc1 と Bim の発現を負に制御することで、細胞の生存を促進していることが示唆された (図 17)。

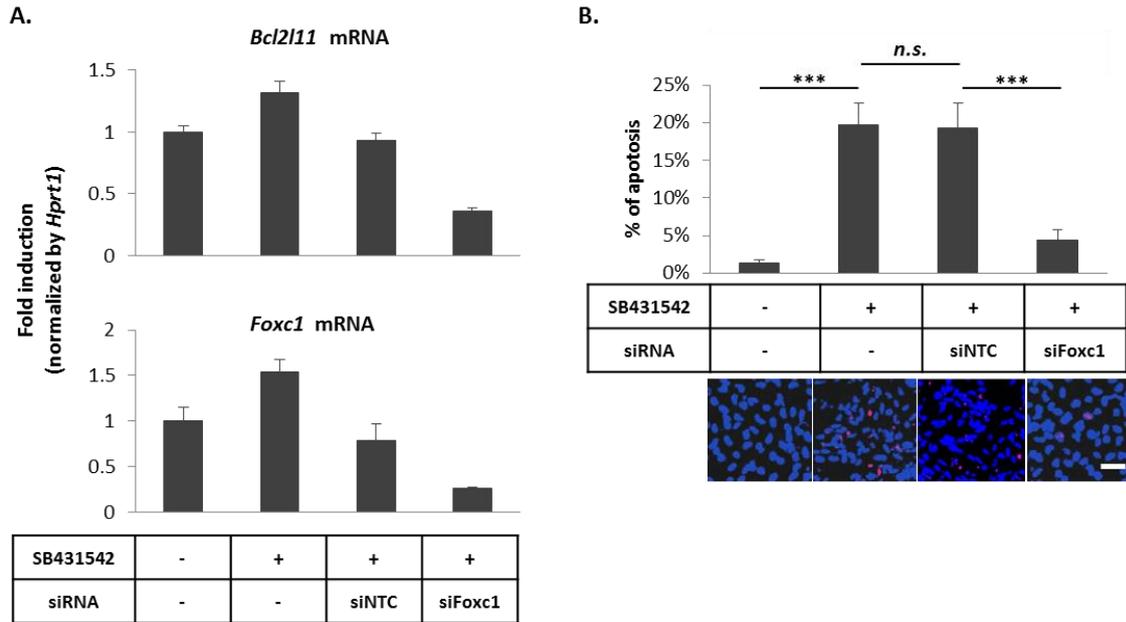


図 16. Foxc1 による Bim の発現調節およびアポトーシスへの関与

(A) JygMC(A)細胞に siNTC、もしくは siFoxc1 をトランスフェクションした。12 時間後に無血清培地に交換し、SB431542 (10 μ M)を添加した後、さらに 24 時間後に mRNA を回収した。Bim (*Bcl2l11*)および *Foxc1* の発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *Hprt1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *Hprt1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

(B) (A)でノックダウンを行った JygMC(A)細胞に対し TUNEL 染色を行った。赤は TUNEL、青は Sytox Green を示す。また、Sytox Green 陽性細胞に対する TUNEL 陽性細胞の比率を定量化した。細胞は独立した 10 視野で観察し、平均と標準偏差をグラフ化した。Scale bar; 20 μ m, *n.s.*; not significant, ***; $p < 0.001$

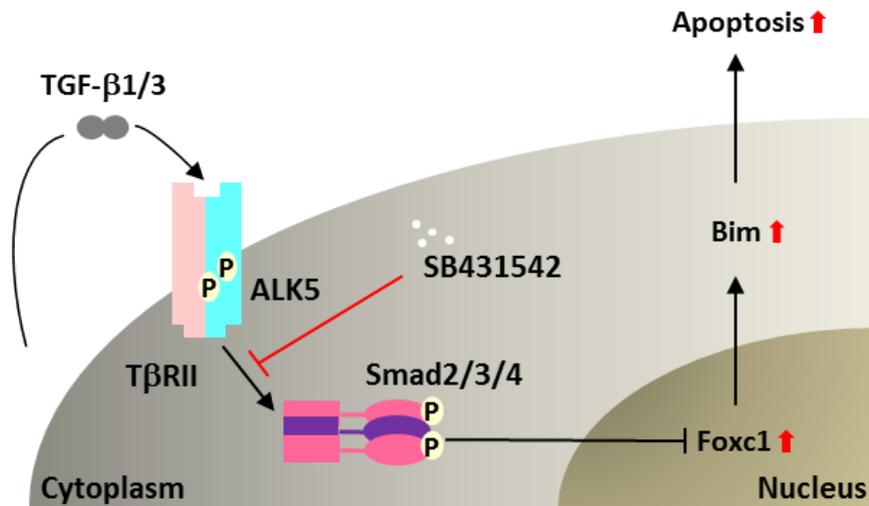


図 17. TGF-β-Foxc1-Bim を介した乳癌細胞のアポトーシス回避

乳癌細胞は TGF-β を自己分泌し、Foxc1 の発現を抑制する。Foxc1 はアポトーシス実行因子である Bim の発現を正に制御するため、細胞の生存が促進する。TGF-β シグナルの阻害剤である SB431542 を添加すると下流のシグナルが阻害され、赤矢印のような発現変動を示し、アポトーシスが誘導される。

考察

癌細胞のアポトーシス回避は転移において重要なステップであり、そのメカニズムを解明することは治療において非常に重要であるが、未解明な部分が多い。本研究では乳癌細胞の内因性の TGF- β シグナルが抗アポトーシス作用を有すること、そしてその分子メカニズムとして TGF- β の下流で Foxc1 を介した Bim の発現制御が関与していることが示唆された。

乳癌細胞における内因性 TGF- β シグナルの機能

TGF- β は正常上皮細胞や初期の癌細胞に対してアポトーシスを誘導することで、腫瘍抑制因子として機能する。一方、進行期の癌細胞に対しては反対に抗アポトーシス効果を示し、腫瘍促進因子として機能することが分かっている (12)。このような TGF- β の作用の違いは何に起因しているのか、についてはこれまで未解明であったが、その違いは癌細胞の悪性度に応じるのではないかとということが考えられた。TGF- β が癌の進展抑制因子として機能する初期の癌細胞では TGF- β を産生しておらず、外因的に TGF- β が作用してはじめて細胞増殖抑制ならびにアポトーシス誘導を起こす。一方で、進行期の癌細胞においては、TGF- β による細胞増殖抑制がかからず、アポトーシス誘導もされない。高転移株として樹立されている JygMC(A)細胞のような進行癌では、悪性化の過程で TGF- β の自己分泌能を獲得し、アポトーシスを回避する為に合目的な形質を獲得したと考えることができる。近年、TGF- β に対する中和抗体や低分子

化合物の開発が進み、ある種の癌細胞の転移を抑制する効果が報告されている (46-49)。さらに当研究室でも、TGF- β シグナルを負に制御する Smad7 や c-Ski の過剰発現により、JygMC(A)細胞の肺肝転移が抑制すると報告しているが、この時、癌細胞の浸潤能に影響する多くの因子の発現減少が確認されている (21)。TGF- β シグナル阻害による転移抑制では、EMT が重要なメカニズムとして考えられるが、それに加えて、本研究においては、TGF- β シグナル阻害がアポトーシスを誘導することが分かった。

乳癌細胞での TGF- β による Bim 発現調節

Bim はアポトーシス関連遺伝子群である Bcl-2 ファミリーに属し、分子量の大きい順に BimEL、BimL、BimS と 3 つのアイソフォームを有する。また、抗アポトーシス作用をもつ Bcl-2 や Bcl-X_L に結合することでその機能を阻害し、細胞にアポトーシス誘導を導く因子である (34-36)。このことは、*Bcl2l1l1* (Bim をコード)ノックアウトマウスを用いた研究からも証明されている。*Bcl2l1l1*(-/-)マウスは、多くが胎生致死であり、わずかながら生まれた場合でも、免疫系細胞の蓄積により、1 年以内に全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus; SLE)を発症し死亡する (50)。さらに、Bim は様々な癌細胞のアノイキスの誘導に関わっており、Bim を介したアポトーシスをいかに回避するかが、癌細胞の転移の成立に重要であると考えられている (51)。Bim が活性化される要素として、細胞内への Ca イオンの流入や、抗癌剤である Taxol

の添加などが知られている (52)。さらに、Hepatocyte growth factor (HGF)の枯渇によって Bim が発現誘導されることや、Epidermal growth factor (EGF)シグナルにより Bim が翻訳後修飾を受けることなども報告されている (53)。本研究では TGF- β シグナルの阻害による Bim の発現誘導を見出しており、アポトーシスにおける TGF- β シグナルの新たな機能を発見することができたと考えている。

癌細胞における Foxc1 のアポトーシスに関する機能

転写因子である Dec1 は TGF- β 下流の標的遺伝子であり、乳癌細胞の生存を促進することが分かっている (33)。当初は TGF- β による Dec1 の発現誘導が Bim の発現制御に重要であると考えたが、Dec1 の過剰発現系による Bim の発現抑制を確認することはできなかった(data not shown)。更には、Foxc1 を過剰発現しても、Dec1 の発現に変動は見られなかったため、TGF- β -Dec1 pathway と TGF- β -Foxc1-Bim pathway は独立して乳癌細胞の生存に寄与していることが考えられた。

Microarray によって抽出された Foxc1 は Fox ファミリーに属している転写因子であり、110 アミノ酸からなる DNA 結合配列である Forkhead domain (FHD)を有している (54)。発生期に重要な因子として報告されており、Foxc1 ノックアウトマウスは、眼瞼や頭蓋骨の欠失、角膜の形成不全、水頭症などにより胎生致死、もしくは出生直後に死亡する (45,55,56)。さらに、Foxc1 は TGF- β の下流で眼の発達に重要な機能を担っており、角膜上皮細胞の生存を促進する作用をもつことが報告されている (57)。こ

れまで、Foxc1 の機能は発生過程における言及にとどまっていたが、近年、癌進展における機能も報告され始めている。Zhou らは、子宮内膜癌および卵巣癌で TGF- β によって Foxc1 の発現が正に制御され、細胞増殖抑制を誘導すると報告している (58)。

また、Foxc1 プロモーターのメチル化は乳癌の治療に対するバイオマーカーとして有用であることが分かっている (59,60)。遺伝子発現解析から Basal like に分類される乳癌細胞では、Foxc1 の発現が予後不良因子として重要であり、細胞の運動能、浸潤能を上昇させると報告されている (61)。これらは本研究で述べた Foxc1 の機能とは逆の機能を報告しているが、この違いは、細胞の種類や実験条件の差異によるものであると考えられる。Foxc1 は様々な因子と転写複合体を形成し、それにより異なる標的遺伝子の発現を制御することから、状況依存的に異なる応答を示すと考えられる。

2) 膵癌幹細胞の維持における TGF- β の役割

要旨

膵癌細胞中には一定の割合で ALDH1 活性の高い細胞が存在する。これらの細胞は腫瘍形成能が高く、膵癌幹細胞を濃縮している画分である。また膵癌細胞では Smad4 が TGF- β 依存的に *ALDH1A1* ゲノムに結合し、ALDH1 の発現と活性を負に制御することで、癌幹細胞活性を抑制している。膵癌細胞では *SMAD4* 遺伝子に変異や欠失することで、この抑制機構が破綻し、腫瘍が進展する可能性が示唆された。

序論

癌幹細胞

癌組織は形質の異なる不均一な細胞集団から構成されている。従来、その不均一性は異なった遺伝子変異をもついくつかのクローンが存在することに起因していると考えられてきた。ところが 1994 年に Dick らが、マウスに移植して白血病を発症させることができるのは、白血病細胞の一部の分画にすぎないこと見出してから、癌の多様性を説明するモデルとして癌幹細胞理論が提唱されるようになった (62)。このモデルでは腫瘍組織内の階層性が重視され、癌幹細胞(Cancer stem cell; CSC)もしくは癌始原細胞 (Cancer-initiating cell; CIC)のような「腫瘍内に存在し、自己を複製する能力と腫瘍組織を構成するさまざまな系統の癌細胞を生み出す能力を併せ持つ細胞」と定義される細胞群の存在が重要であると想定されている (63)。つまり、癌幹細胞は自己複製によって未分化な癌幹細胞分画を増加させるだけでなく、非癌幹細胞も供給する。これにより、腫瘍組織中には高い腫瘍形成能をもつ癌細胞ともたない癌細胞が存在し、この階層性に基づいて癌細胞の多様性・不均一性が生じる (図 18) (64)。この事実は、癌細胞集団に抗癌剤を作用させても一様な治療効果が得られず、一部に治療抵抗性の癌細胞が残存することで、腫瘍の再発・転移の原因となるという臨床的事実を説明するものであり、治療戦略を考えるうえで非常に重要である。近年では、乳癌、脳腫瘍、大腸癌、膵癌、悪性黒色腫、前立腺癌、頭頸部癌、肝癌などの固形腫瘍でも癌幹細胞の存在が報告され、近年はその性状解明が研究対象として注目されている

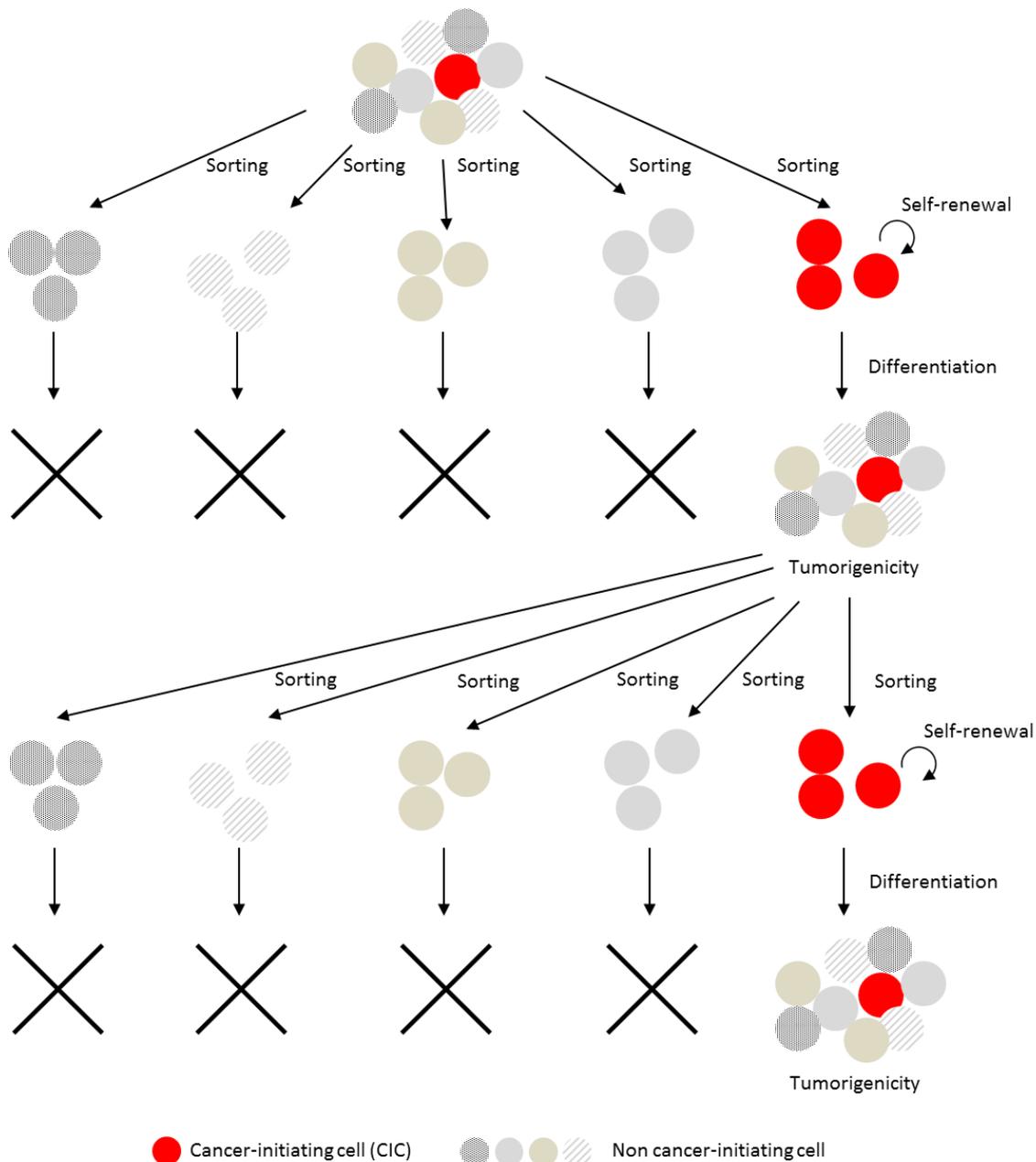


図 18. 癌幹細胞モデル

癌幹細胞 (Cancer stem cell; CSC) もしくは癌始原細胞 (Cancer-initiating cell; CIC) は腫瘍全体の数%のみに存在する高い造腫瘍性 (Tumorigenicity) をもった細胞集団である。また、癌幹細胞は腫瘍形成に必要な自己複製能 (Self-renewal) と多分化能 (Differentiation) を有し、この 2 つの生物学的特性により自らを残しつつ、非癌幹細胞 (Non cancer-initiating cell) を生み出し腫瘍の不均一性を形成する。

(65-73)。この癌幹細胞を濃縮するマーカーとしては、現在までに CD133 (prominin 1)、CD44、CD24、Epithelial cell adhesion molecule (EPCAM)、Aldehyde dehydrogenase (ALDH)1 などが同定されている。また、薬剤耐性に関わる ATP-binding cassette (ABC) transporter である ABC sub-family G member 2 (ABCG2)の発現が高く、Hoechst 33342 色素の排出能をもつ Side Population (SP)細胞も癌幹細胞が濃縮されていることが報告されている (74,75)。

ALDH1

ALDH は細胞内の acetaldehyde を acetic acid へと分解する酵素であり、これまでに 17 種以上のメンバーが ALDH ファミリーに属する遺伝子として報告されている。ALDH1 ファミリーには ALDH1A1、ALDH1A2、ALDH1A3 の 3 種類のアイソフォームが属しており、このうち幹細胞活性を有するものとして ALDH1A1、ALDH1A3 が報告されている (76)。ALDH1 は retinal を主な基質とし、細胞増殖や分化に関わる retinoic acid を産生し、cyclophosphamide に対する抵抗性に重要な役割を担っている (77)。

1995年に Jones らが ALDH1 の酵素活性を Flow cytometry で検出する方法を確立し、造血系幹細胞が ALDH1 酵素活性の高い細胞集団であることを示した (78)。その後、造血幹細胞や神経幹細胞、神経前駆細胞で ALDH1 酵素活性の高い細胞集団が同定され、さらに多発性骨髄腫や急性骨髄性白血病の造腫瘍活性の高い細胞群は ALDH1 活

性が高いことが報告された (79-82)。また、ALDH1 によって酸化された retinoic acid が核内へ移行し、幹細胞の分化に関与することも分かっている (83)。ヒトの正常乳腺上皮細胞や乳癌細胞においても ALDH1 活性の高い細胞集団は高い腫瘍形成能を有することが示された (84)。さらには、肺癌、大腸癌、肝臓癌、胃癌、膵癌などにおいて癌幹細胞集団が高い ALDH1 活性を有することが報告されている (85-88)。ヒト乳癌症例においては高い ALDH1 発現が予後不良や全生存期間の短縮、放射線化学療法に対する高い抵抗性に関連することが知られている (89)。

膵癌発症過程における TGF- β シグナル

膵癌は解剖学的に早期発見や治療が困難な難治癌であり、5 年生存率は約 5% と極めて低い。根治的切除をおこなった場合でも 1 年ほどで再発することが多く、非常に死亡率の高い癌である (90,91)。多くの癌では、正常組織より *de novo* に癌が発生するとは限らず、良性腫瘍、前癌病変を経て段階的に癌化することが知られており、膵癌においても膵管上皮から前癌病変を経て段階的に癌化すると考えられている (図 19) (91)。膵管内異型上皮と上皮内癌は膵上皮内腫瘍性病変 (Pancreatic intraepithelial neoplasia; PanIN) とよばれ、この PanIN が通常型膵癌の前駆病変と考えられている。PanIN の grade は PanIN-1A、PanIN-1B、PanIN-2、PanIN-3 とあり、初期の前癌病変である PanIN-1A から段階的に遺伝子に変異が入ることで PanIN-3、癌化へとつながる。この過程の初期には癌遺伝子 *KRAS* の活性化がおこり、次いで癌抑制遺伝子とされる

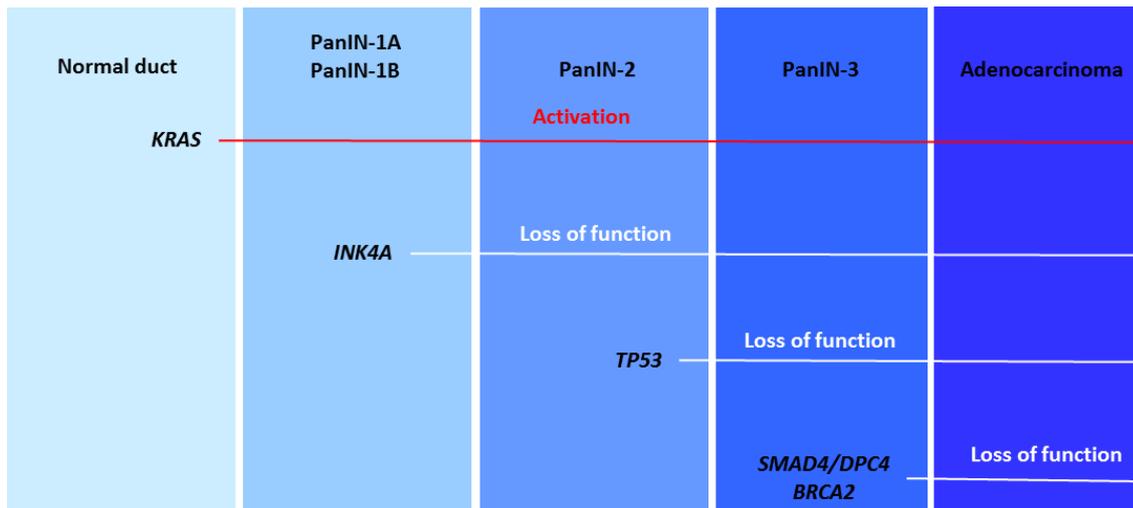


図 19. 膵臓の多段階発癌

膵臓における多段階発癌の初期では *KRAS* 遺伝子に変異が起こり、Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN)が発症するとされるが、その変異体は膵癌症例の約 90% において認められる。また、多段階発癌の中期過程でおこる *INK4A* 遺伝子、*TP53* 遺伝子の変異は約 50~70%の膵癌症例で、後期過程でおこる *SMAD4* 遺伝子、*BRCA2* 遺伝子の変異は約 50%の膵癌症例で認められる。

INK4A 遺伝子 ($p16^{\text{Ink4a}}$ をコード)の欠失または異常メチル化が関与し、最終的な癌化の過程では *TP53* 遺伝子 ($p53$ をコード)、*SMAD4* 遺伝子の機能喪失が関与する (92,93)。

他臓器癌と比較して膵癌では *SMAD4* の変異が高頻度であることや、*SMAD4* 遺伝子の異常、あるいは Smad4 タンパク発現の低下のある膵癌患者では有意な遠隔転移、全生存期間の短縮が示されたことから、Smad4 を介した TGF- β シグナル伝達の破綻が膵癌の悪性化と強く関わっていることが示唆される (94)。

材料と方法

細胞培養

ヒト膵癌細胞 Panc-1、SUIT-2 は 10% FBS と 50 U/ml penicillin、50 µg/ml streptomycin を含む DMEM 培地で 37°C、5% CO₂ インキュベーターを使用し培養した。ヒト膵癌細胞 BxPC-3 は 10% FBS と 50 U/ml penicillin、50 µg/ml streptomycin を含む Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 培地 (Gibco) で 37°C、5% CO₂ インキュベーターを使用し培養した。ヒト胎児腎細胞 293FT (Invitrogen) は 0.1 mM minimal essential medium (MEM) non-essential amino acid (Gibco)、1 mM sodium pyruvate (Gibco)、10% FBS および 50 U/ml penicillin、50 µg/ml streptomycin を含む DMEM 培地で 37°C、5% CO₂ インキュベーターを使用し培養した。

増殖因子

TGF-β3 と Bone morphogenetic protein (BMP)-4 は 0.1% BSA を含む 4 mM HCl にて溶解し、使用した。

SDS-PAGE と Western blot

膵癌細胞からのタンパク質抽出、SDS-PAGE、Western blot は前述のとおり行った。一次抗体と二次抗体には前述のもの以外に以下を使用した。

一次抗体	二次抗体
抗 ALDH1 抗体 (BD Biosciences)	anti-mouse IgG, HRP-linked antibody
抗 Smad4 抗体 (Santa Cruz)	
抗 phospho-Rb (Ser807/811)抗体 (Cell Signaling)	anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody
抗 PARP 抗体 (Cell Signaling)	

定量的 RT-PCR

膀胱癌細胞からの RNA 調整および定量的 RT-PCR は前述のように行った。使用した

プライマーを以下に示す。

Gene	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (3'→5')
<i>ALDH1A1</i>	ACCCAGGAGTCACTCAAGG	ACTGTGGGCTGGACAAAGTAG
<i>ALDH1A3</i>	TCTCGACAAAGCCCTGAAGT	TATTCGGCCAAAGCGTATTC
<i>CDKN1A</i>	AGTGGACAGCGAGCAGCTGA	CGAAGTTCATCGCTCACGG
<i>CDKN1B</i>	CGGTGGACCACGAAGAGTTAA	GGCTCGCCTCTTCCATGTC
<i>CDKN2B</i>	CCGCCACAACGACTTTATT	CAGCCTTCATCGAATTAGGTG
<i>CDC25A</i>	GCCTGTCACCAACCTGAC	CCAGGAGAATCTAGACAGAAACC
<i>MYC</i>	CCACACATCAGCACAACACTACGC	CGGTTGTTGCTGATCTGTCTCA
<i>CCNE1</i>	GCACTTTCTTGAGCAACACCCT	GTGTCGCCATATACCGGTCAA
<i>SMAD4</i>	AAAACGGCCATCTTCAGCAC	AGGCCAGTAATGTCCGGGA
<i>NANOG</i>	ATTCAGGACAGCCCTGATTCTTC	TTTTTGCGACTCTTCTCTGC
<i>POU5F1</i>	GTGGAGAGCAACTCCGATG	TGCTCCAGCTTCTCCTTCTC
<i>SOX2</i>	CGAGTGGAACCTTTTGTCGGA	TGTGCAGCGCTCGCAG
<i>PROM1</i>	TGGATGCAGAACTTGACAACGT	ATACCTGCTACGACAGTCGTGGT
<i>CXCR4</i>	CCTGCCCTCCTGCTGACTATT	TCATCTGCCTCACTGACGTTG
<i>EPCAM</i>	CGGCGACGGCGACTTTTG	GAGCCATTCATTTCTGCCTTCATC
<i>CD44</i>	TCAGAGGAGTCGGAGAGAGGAA AC	GAAAAGTCAAAGTAACAATAACG TGG
<i>CD24</i>	TGTTCTCTTGGGAACCTGAACTC	ACCTAAAAGGTCAAATGCAATG
<i>HPRT1</i>	TTTGCTTTCCTTGGTCAGGC	GCTTGCGACCTTGACCATCT

RNA interference

膵癌細胞における *SMAD4* 遺伝子発現のノックダウンは、前述と同様に Stealth siRNA/*SMAD4* (si*SMAD4*; Invirogen; 60 nM)を用いて行った。使用した標的配列は UUACAUCCAACUGCACACCUUUGC とした。

Aldefluor Assay を用いた ALDH1^{hi} 細胞の単離

ALDH1 酵素活性の高い細胞と低い細胞を単離するため、Aldefluor Assay Kit (Stem Cell Technology)を用いた (54)。反応はプロトコールに従って行った。細胞を ALDH の基質である Bodipy-aminoacetaldehyde (BAAA, 5 µg/1 ml)を含む Aldefluor Assay Buffer に 1×10^6 cells/ml の濃度で懸濁し、37°Cで 45 分間インキュベートした。Fluorescent activated cell sorting (FACS)解析と細胞のソーティングは EPICS XL flow cytometer (Bechman Coulter)及び MoFlo Astrios cell sorter (Bechman Coulter)によって行った。細胞はまず、前方錯乱光 (Forward Scattered Light; FSC)と側方錯乱光 (Side Scattered Light; SSC)により単一の生細胞を gating した。BAAA は、細胞内の ALDH1 によって緑色蛍光を放出する Bodipy-aminoacetate (BAA)に酸化されるため、ALDH1^{hi}細胞は 520~540 nm のフィルター下で強い緑色蛍光を放つ細胞集団として検出された。Negative control として ALDH1 酵素活性阻害剤である diethylaminobenzaldehyde (DEAB; Stem Cell Technology; 50 µM) (95)を反応液中に加えた細胞を使用し、緑色蛍光の消失の有無をも

とに、ALDH1^{hi}細胞と ALDH1^{lo}細胞を設定した。グラフの作成は FlowJo software (Tomy Digital Biology)を用いて行った。

細胞増殖試験

細胞を 1×10^4 cells/well の密度で 12 well plate に播種し、1、3 日後に細胞数を測定した。細胞は trypan blue で染色後、血球計算盤を用いて生細胞のみを測定し、独立した 3 well の細胞数で定量化した。

Colony formation assay

0.5% 寒天培地を 6 well plate に分注し、下層ゲルとした。下層ゲルがゲル化した後、0.3%寒天培地中に細胞を 1×10^4 cells/well の密度で懸濁し、下層ゲルの上に播種した。寒天培地中の細胞懸濁液をゲル化させた後、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で 2 週間培養した。独立した 2 視野から計 10 個以上のコロニーの直径を Cellsens Standard (Olympus)を用いて計測した。

Luciferase assay

pGL4.10 luc2 (Promega)で Thymidine kinase (TK) promoter で renilla luciferase (Rluc)を発現する construct、および pGL4.10 luc2 で、Human *ALDH1A1* の転写開始点上流 (-25060~-27715 bp)および下流 (+124970~+123530 bp)を応答配列とし、minimal

promoter (MLP)で firefly luciferase (Fluc)を発現させる construct を作製した。Panc-1 細胞を 5×10^4 cells/well の密度で 24 well plate に播種し、翌日に FuGENE 6 (Roche; 6 μ l) を用いて上記の 2 種類の promoter-reporter constructs をトランスフェクションした。トランスフェクションの翌日に TGF- β 3 (1 ng/ml)で刺激し、24 時間後に細胞を溶解、回収した。ルシフェラーゼ活性は Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega)により、Mithras LB 940 (Berthold Technologies)を用いて測定した。ルシフェラーゼ活性は Fluc 活性を Rluc 活性により補正して算出した。

レンチウイルスベクターによる Short hairpin RNA (shRNA)の導入

shRNA を導入するレンチウイルスベクターを作成するため、75 cm² flask (Iwaki)に 6×10^6 の 293FT 細胞を撒き、同時に発現ベクターと pCAG-HIVgp および pCMV-VSV-G-RSV-Rev (理研バイオリソースセンター)を Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションした。翌日に培養液を交換し、トランスフェクションから 4 日後に培養上清を回収した。ウイルス力価を向上させるため、Lenti-X concentrator (Clontech)を用いて各ウイルス液を 10 倍に濃縮し、細胞に感染させた。shRNA の配列を以下に示す。

SMAD4	Forward	GATCCCC-AAGCAATGGAACACCAATACTCAGG-GTGTGCTGTCC-C CTGAGTATTGGTGTTCATTGCTT-TTTTT-GGAAAT
	Reverse	CTAGATTTCC-AAAAA-AAGCAATGGAACACCAATACTCAGG-GGAC AGCACAC-CCTGAGTATTGGTGTTCATTGCTT-GGG
ALDH1A1	Forward	GATCCCC-GTAGCCTTCACAGGATCAA-ACGTGTGCTGTCCGT-TTGA TCCTGTGAAGGCTAC-TTTTT-GGAAAT
	Reverse	CTAATTTCC-AAAAA-GTAGCCTTCACAGGATCAA-ACGGACAGCAC ACGT-TTGATCCTGTGAAGGCTAC-GGG
control	Forward	GATCCCC-GCGCGCTTTGTAGGATTCG-GTGTGCTGTCC-CGAATCCT ACAAAGCGCGC-TTTTT-GGAAAT
	Reverse	CTAGATTTCC-AAAAA-GCGCGCTTTGTAGGATTCG-GGACAGCACA C-CGAATCCTACAAAGCGCGC-GGG

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

15 cm dish に約 8 割コンフルエントになった細胞を TGF- β 3 (1 ng/ml) で 1.5 時間刺激した。1% formaldehyde により固定した後、0.125 M Glycine でクロスリンク反応を終了させ回収した。細胞は SDS Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.1), 1% SDS, 10 mM EDTA, protease inhibitor (Roche)) で再懸濁し、密閉式超音波細胞破碎装置 Bioruptor (Cosmobio) を用いて、power high、on、30 秒、off、30 秒のサイクルで 2 分間、冷却しながら超音波処理を行った。8°C、14000 rpm、10 分間遠心して上清を回収し、一部を ChIP のコントロールである Input 分画とした。回収した上清は ChIP dilution buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton X-100, Complete EDTA-free protease inhibitors (Roche)) で希釈し、Dynabeads protein G (Invitrogen) と結合させた抗 Smad4 抗体 (R&D System) もしくは抗 Smad2/3 抗体 (BD Biosciences) と共に 4°C で一晩インキュベートした。免疫沈降サンプルは ChIP wash buffer (50 mM HEPES-KOH (pH

7.0), 0.5 M LiCl, 1 mM EDTA, 0.7% deoxycolate, 1% Igepal CA630)および TE buffer で洗
 浄後、elution buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 10 mM EDTA, 1% SDS)で 65°C、一晩溶出
 した。Genome DNA は PCR purification kit (Quiagen)により抽出した。抽出した Genome
 DNA は定量的 RT-PCR により解析した。使用したプライマーを以下に示す。

Gene		Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (3'→5')
<i>HPRT1</i>		TGTTTGGGCTATTTACTAG TTG	ATAAAATGACTTAAGCCC AGAG
<i>ALDH1A1</i>	+25060 ~ +27715 bp	TGCAACAGGGCATACTCC TT	CAGGGCAGAAGAATCACA GA
	promoter	ACTGTGGTGCAAACAGCA ACACC	TTGGTGTGGTGGTACCCAT AAGAGC
	intron5	TGCCACGTGGAGAGCAGT GA	GGCCTGCACTGAGCTGT GG
	intron11	CCAAGCAGCTATTAGGTC TGGGACA	CACCCCACTGAGGGTCTT GGGA
	-124970 ~ -123530 bp	CCATCTGGTGAAACATGC TG	TACTGCGAGGCTTTCTGT GA

皮下移植

腫瘍細胞の皮下移植には、4 週令のオスの Balb/c nu/nu マウス (Oriental Yeast)を使用
 した。50 µl の培地に懸濁した細胞と等量の Matrigel (BD Biosciences)と混合し、1 ml
 の注射器および 26 G の注射針を用いてマウスの側腹部皮下に移植した。原発腫瘍の
 径はノギスを用いて週に 2 度計測し、腫瘍の体積は以下の計算式に従い算出した。

$$v = (ab^2) / 2$$

v; 腫瘍の体積、a; 腫瘍の長径、b; 腫瘍の短径

皮下腫瘍体積のグループ間の継時的比較の検定には、重複測定分散分析 (Repeated measures analysis of variance)を用いた。2グループ間の比較検定には Student の *t*-test を用い、 $p < 0.05$ である時に有意であると判定した。

免疫組織学染色

膵癌の原発腫瘍の formalin 固定、paraffin 包埋標本は東京大学医学部附属病院において膵癌症例の治療の過程で得られた。Hematoxylin-eosin (HE)染色した切片において腫瘍と間質を含む部分を確認し、連続切片で抗 ALDH1 抗体 (BD Biosciences)、抗 Smad4 抗体 (Santa Cruz)の染色性を確認した。抗原の賦活化は、10 mM sodium citrate (pH6.0)中で 121°Cにて 15 分間処理することにより行った。その後、Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories) を用いて添付のプロトコールに従い染色を行い、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) Liquid System (DakoCytomation)を用いて検出した。全ての研究は東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認を受けて行った (審査番号: 10004)。染色性の評価は、予め設定した濃染細胞を含む病変を高発現組織、予め設定した濃染細胞を含まない病変を低発現組織とした。

結果

膵癌の腫瘍形成に対する Smad4 の機能解析

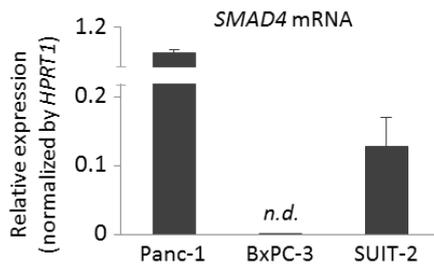
本研究では *SMAD4* の欠失が膵癌細胞に及ぼす影響を検討するため、野生型 Smad4 タンパク質を発現もしくは欠損しているヒト膵癌細胞を使用することを考えた。ただし、膵癌の大半を占める通常型膵癌では、約 50% で *SMAD4* 遺伝子に異常が確認されており、野生型 *SMAD4* を発現するヒト膵癌細胞は多くないと予想された。これまでの報告から、ヒト膵癌細胞である Panc-1 細胞、SUIT-2 細胞は野生型の Smad4 タンパク質を有するが、BxPC-3 細胞では homozygous deletion により *SMAD4* の発現がないことが分かっている (図 20A) (96,97)。まず、各膵癌細胞での Smad4 発現を定量的 RT-PCR と Western blot により評価した。mRNA レベルでは Panc-1 細胞および低いながらも SUIT-2 細胞でも *SMAD4* 発現を認めた (図 20B)。一方で、BxPC-3 細胞では発現が確認されなかった。タンパク質レベルでは mRNA と同様、BxPC-3 細胞での Smad4 発現は確認できなかったが、Panc-1 細胞、SUIT-2 細胞で Smad4 の発現を認めた (図 20C)。これらの結果から Smad4 発現に関して既報の結果が再現されたと考え、Panc-1 細胞、SUIT-2 細胞を Smad4 発現株、BxPC-3 細胞を Smad4 非発現株と分類して、以降の実験を行った。

つぎに膵癌細胞における Smad4 の機能を検討する為に、レンチウイルスを用いて Panc-1 細胞に shSMAD4 を導入し、恒常的に Smad4 発現をノックダウンした細胞株 (Panc-1-shSMAD4) とコントロール細胞 (Panc-1-shNTC) を樹立した。Panc-1-shSMAD4

A.

Name	Histology	Origin	SMAD4
Panc-1	Undifferentiated carcinoma	Pancreas	Wild type
SUIT-2	Moderately differentiated carcinoma	Liver metastasis	Wild type
BxPC-3	Moderately differentiated carcinoma	Pancreas	Homozygous deletion

B.



C.

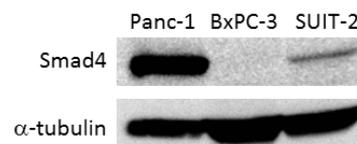


図 20. ヒト膵癌細胞における Smad4 の発現

(A) ヒト膵癌細胞 Panc-1 は、未分化癌の原発巣から樹立されており、ヒト膵癌細胞 SUIT-2、BxPC-3 はそれぞれ中分化腺癌の肝転移巣もしくは原発巣から樹立された。Panc-1 および SUIT-2 には野生型の *SMAD4* 遺伝子が発現しているが、BxPC-3 細胞の *SMAD4* 遺伝子はホモ欠損しており、発現が抑制されている (文献 96 を改変)。

(B,C) Panc-1 細胞、BxPC-3 細胞、SUIT-2 細胞の Smad4 の発現を調べた。

(B) 各細胞から mRNA を回収し、*SMAD4* の発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *HPRT1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *HPRT1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。n.d.; not detected

(C) 各細胞からタンパク質を回収し、SDS-PAGE を行い、抗 Smad4 抗体にて Western blot を行った。Loading control として抗 α -tubulin 抗体を用いた。

細胞では Panc-1-shNTC 細胞と比較して、mRNA レベル (図 21A)およびタンパク質レベル (図 21B)で高いノックダウン効率を確認した。この Panc-1-shNTC 細胞と Panc-1-shSMAD4 細胞をそれぞれヌードマウスの皮下に移植して腫瘍体積を継時的に計測したところ、Panc-1-shSMAD4 細胞は高い腫瘍形成能を有することが分かった (図 22)。一方で、*in vitro* の細胞増殖試験では Panc-1-shNTC 細胞と Panc-1-shSMAD4 細胞の間で細胞増殖速度に明確な差は確認できなかった (図 23A)。また、多くの細胞では、TGF- β によって直接的もしくは間接的に細胞周期関連遺伝子の発現が制御されるが (11)、これらの遺伝子の発現が Panc-1-shNTC 細胞と比較して Panc-1-shSMAD4 細胞で変動していることも認められなかった (図 23B)。同様に、細胞周期において G1 期から S 期への移行を制御するタンパク質である Retinoblastoma protein (Rb)のリン酸化に関する変化は見られなかった (図 23C)。さらに、いくつかの癌細胞においては、TGF- β シグナルがアポトーシスを促進することが報告されているため (26-29)、Panc-1-shSMAD4 細胞において、TGF- β シグナルが阻害された状態で、アポトーシスが抑制されている可能性を調べた。Caspase 依存的なアポトーシスの誘導においては Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の cleavage が見られるが、Panc-1-shSMAD4 細胞では Panc-1-shNTC 細胞と比較しても cleavage に明らかな差は確認できなかった (図 23C)。これらの結果より、膵癌細胞では、Smad4 が *in vitro* での細胞増殖の速度を変えないことなく、*in vivo* の腫瘍形成能に影響を及ぼしていると考えられた。

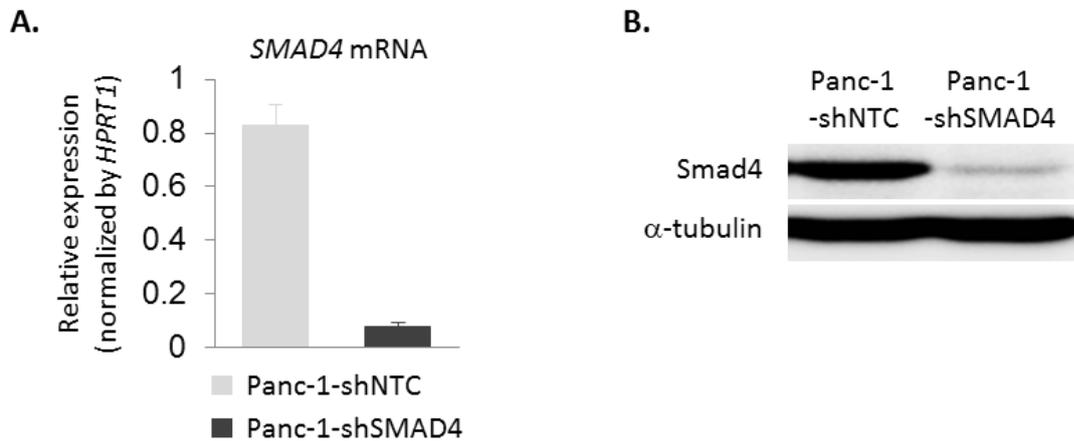


図 21. Smad4 ノックダウン膵癌細胞の樹立

Panc-1 細胞にレンチウイルスベクターを用いて shSMAD4 を導入し、恒常的に *SMAD4* 発現をノックダウンした細胞 (Panc-1-shSMAD4) を樹立し、コントロール細胞 (Panc-1-shNTC) とノックダウン効率を比較した。

(A) *SMAD4* の発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *HPRT1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *HPRT1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

(B) SDS-PAGE を行い、抗 Smad4 抗体にて Western blot を行った。Loading control として抗 α -tubulin 抗体を用いた。

A.

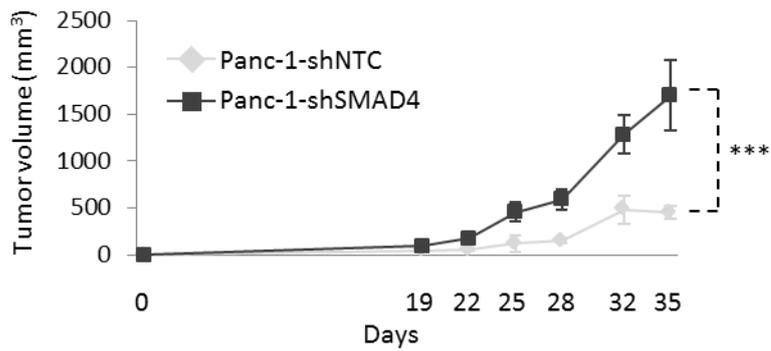


図 22. 腫瘍形成における Smad4 の機能解析

Panc-1-shNTC 細胞と Panc-1-shSMAD4 細胞の腫瘍形成能を比較した。各細胞を 100,000 cells/body でヌードマウスの皮下に移植し、皮下腫瘍の体積を継時的に評価した (Panc-1-shNTC; n=4, Panc-1-shSMAD4; n=5)。平均と標準偏差のグラフを示す。***; $p < 0.001$

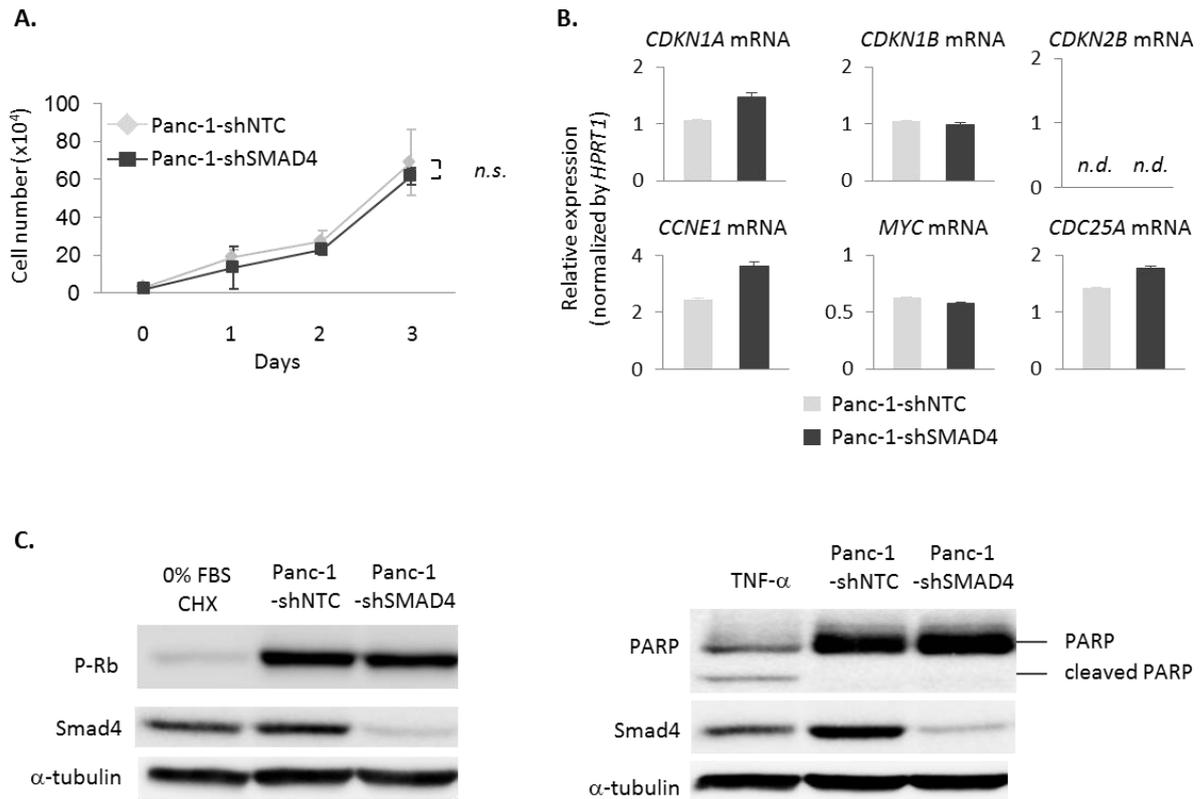


図 23. 膵癌細胞の増殖、細胞周期、アポトーシスに対する Smad4 の関与

Panc-1-shNTC 細胞と Panc-1-shSMAD4 細胞の (A) 細胞増殖、(B) 細胞周期関連遺伝子の発現、(C) PARP および Rb の発現を評価した。

(A) 各細胞を播種してから 0、1、2、3 日後の細胞数を計測した。測定は triplicate で行い、平均と標準偏差をグラフ化した。n.s.; not significant

(B) p21 (*CDKN1A*)、p27 (*CDKN1B*)、p15 (*CDKN2B*)、cyclinE1 (*CCNE1*)、c-myc (*MYC*) Cdc25A (*CDC25A*) の発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *HPRT1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *HPRT1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。n.d.; not detected

(C) SDS-PAGE を行い、抗 phospho-Rb 抗体、抗 PARP 抗体、抗 Smad4 抗体にて Western blot を行った。黒線はそれぞれ全長の PARP (PARP) と cleavage を受けた PARP (cleaved PARP) を示す。Loading control として抗 α -tubulin 抗体を用いた。phospho-Rb の positive control として CHX (100 μ g/ml) で処理した Panc-1 細胞を、PARP の positive control として TNF- α (10 ng/ml) で処理した Panc-1 細胞を使用した。

Smad4 による膵癌幹細胞の制御

細胞の未分化性維持に関与するマーカー遺伝子として *NANOG*、*OCT4A* (*POU5F1*)、*SRY*-box containing gene 2 (*SOX2*)が広く知られている。これらの遺伝子は人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPS 細胞)を樹立する際に、体細胞に導入することで細胞に脱分化を誘導し、未分化な状態に戻すことのできる遺伝子群である (98)。さらに最近では、*OCT4A* と *NANOG* のノックダウンにより膵癌細胞の抗癌剤耐性が増強し、*in vivo* での腫瘍形成が抑制していることが報告されたため (99)、iPS 細胞様の形質を獲得することが癌幹細胞性の獲得に重要ではないかと考えた。

Panc-1-shSMAD4 細胞におけるこれら未分化性マーカーの発現を確認したところ、*Panc-1-shNTC* 細胞と比較して顕著な発現上昇を認めた (図 24A)。さらに、*Smad4* 非発現株である *BxPC-3* 細胞に *Smad4* を過剰発現させ、未分化性マーカーの発現を調べたところ、*Smad4* 過剰発現によりこれら未分化性マーカーの発現が減少することが分かった (図 24B)。以上のことから、*in vivo* で *Panc-1-shSMAD4* が高い腫瘍形成能を示すのは、*Smad4* が膵癌細胞の細胞周期やアポトーシスを制御するのではなく、膵癌細胞の未分化性を制御するためであると仮定した。つまり、*Panc-1-shSMAD4* 細胞では、より未分化な癌細胞、癌幹細胞が増えているのではないかと考えた。

膵癌の幹細胞を濃縮するマーカーはこれまでにいくつか報告されているが (68,73,100,101)、その中で *Panc-1-shSMAD4* 細胞において実際に発現が上昇している癌幹細胞マーカーを定量的 RT-PCR により探索した。すると *ALDH1A1* の発現が

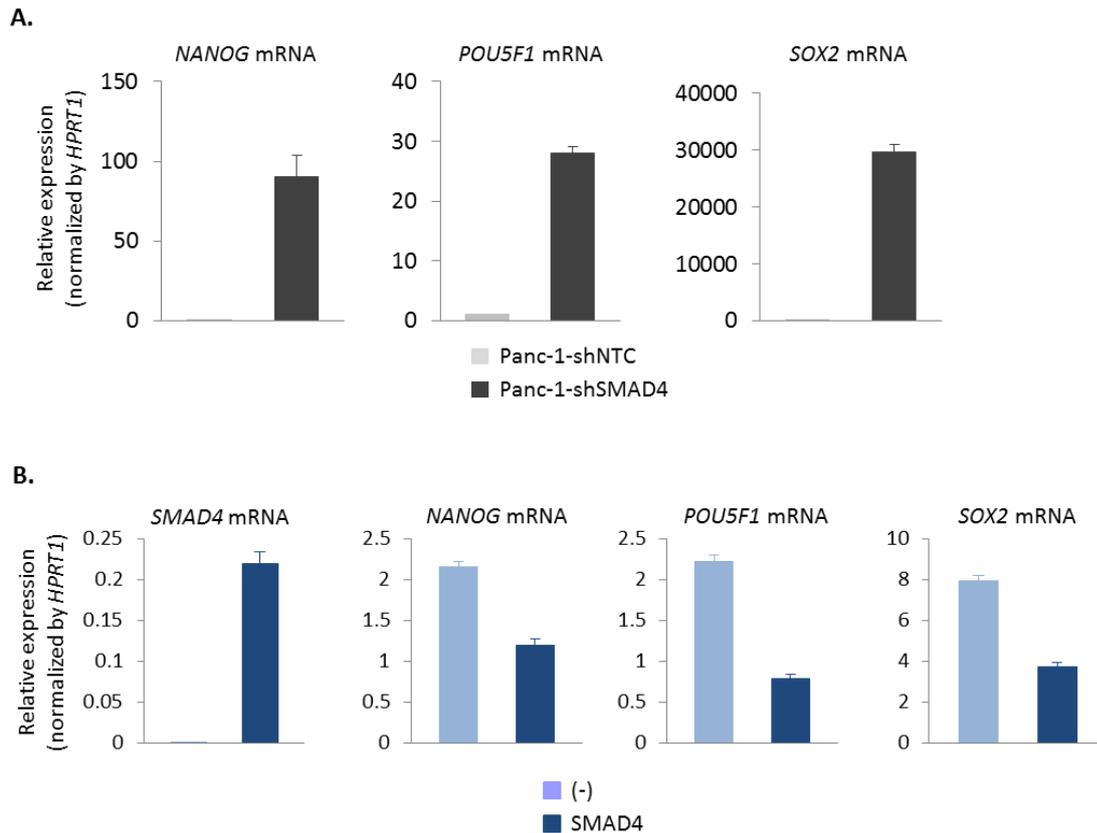


図 24. Smad4 の未分化性マーカー発現への関与

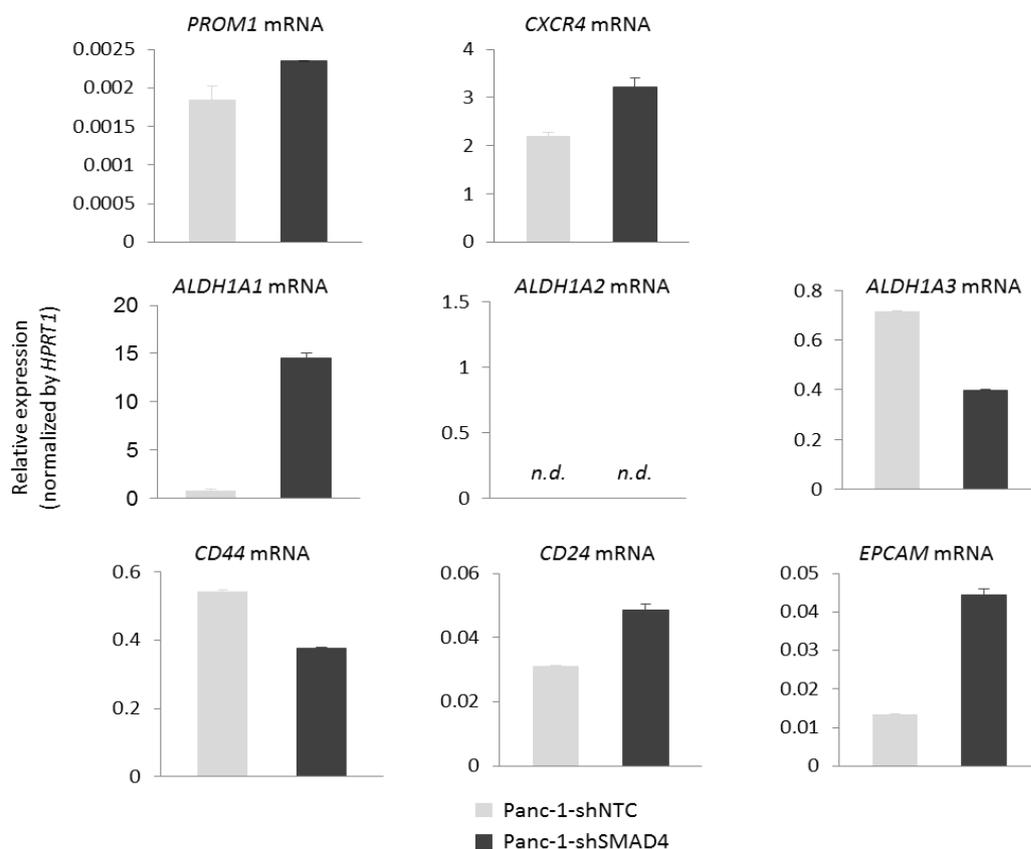
(A) Panc-1-shNTC 細胞と Panc-1-shSMAD4 細胞の *NANOG*、*OCT4A* (*POU5F1*)、*SOX2* の発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *HPRT1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *HPRT1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

(B) BxPC-3 細胞に *SMAD4* 発現 construct をトランスフェクションした。24 時間後に mRNA を回収し、*SMAD4*、*NANOG*、*OCT4A* (*POU5F1*)、*SOX2* の発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *HPRT1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *HPRT1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

Panc-1-shSMAD4 細胞において顕著に亢進していることが分かった (図 25A)。ALDH1 ファミリーには ALDH1A1、ALDH1A2、ALDH1A3 が属するが、このうち癌幹細胞マーカーとしては ALDH1A1 のほかに ALDH1A3 も重要であるという報告がある (76,102)。本研究では Panc-1-shSMAD4 細胞において ALDH1A2 の発現は確認できず、ALDH1A3 の発現には明確な変化を認めなかった (図 25A)。また、Panc-1 細胞における ALDH1 の翻訳産物の発現量を調べたところ、Panc-1-shNTC 細胞では内因的に ALDH1 タンパク発現を欠いていたが、Panc-1-shSMAD4 細胞では ALDH1 タンパクの発現が回復していた (図 25B)。これらの結果より、膵癌細胞では Smad4 が癌幹細胞のマーカーのひとつである ALDH1A1 の発現を制御していると考え、以降の実験では ALDH1A1 に焦点をあてた。

次に、Smad4 が ALDH1 の活性を制御するか否かを検討するため、まず、膵癌細胞における ALDH1 活性の高い細胞群の割合を測定した。Flow cytometry を用いた Aldefluor Assay では、ALDH 活性の高い細胞群は強い緑色蛍光を放つ細胞集団として検出される (ALDH1^{hi} 細胞)。Panc-1 細胞、BxPC-3 細胞、SUIT-2 細胞は、それぞれ約 3%、5%、10%の ALDH1^{hi} 細胞を含むことが分かった (図 26A)。また、DEAB は ALDH の酵素活性部位もしくはその近傍に結合することにより、ALDH と基質との結合を阻害することが知られているが (95)、ALDH1^{hi} 細胞は ALDH 阻害剤である DEAB の処理により消失している。次に Smad4 発現の ALDH1 の活性に対する影響を調べるため、まず、Smad4 に対する siRNA (siSMAD4) を Panc-1 細胞にトランスフェクションし、

A.



B.

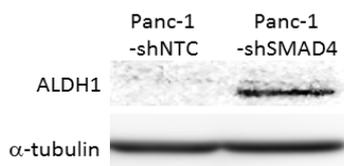


図 25. Smad4 により発現制御を受ける癌幹細胞マーカーの探索

(A) Panc-1-shNTC 細胞と Panc-1-shSMAD4 細胞の CD133 (*PROM1*)、*CXCR4*、*ALDH1A1*、*ALDH1A2*、*ALDH1A3*、*CD44*、*CD24*、*EPCAM* の発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *HPRT1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *HPRT1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。n.d.; not detected

(B) Panc-1-shNTC 細胞と Panc-1-shSMAD4 細胞のタンパク質を回収し、SDS-PAGE を行い、抗 ALDH1 抗体にて Western blot を行った。Loading control として抗 α -tubulin 抗体を用いた。

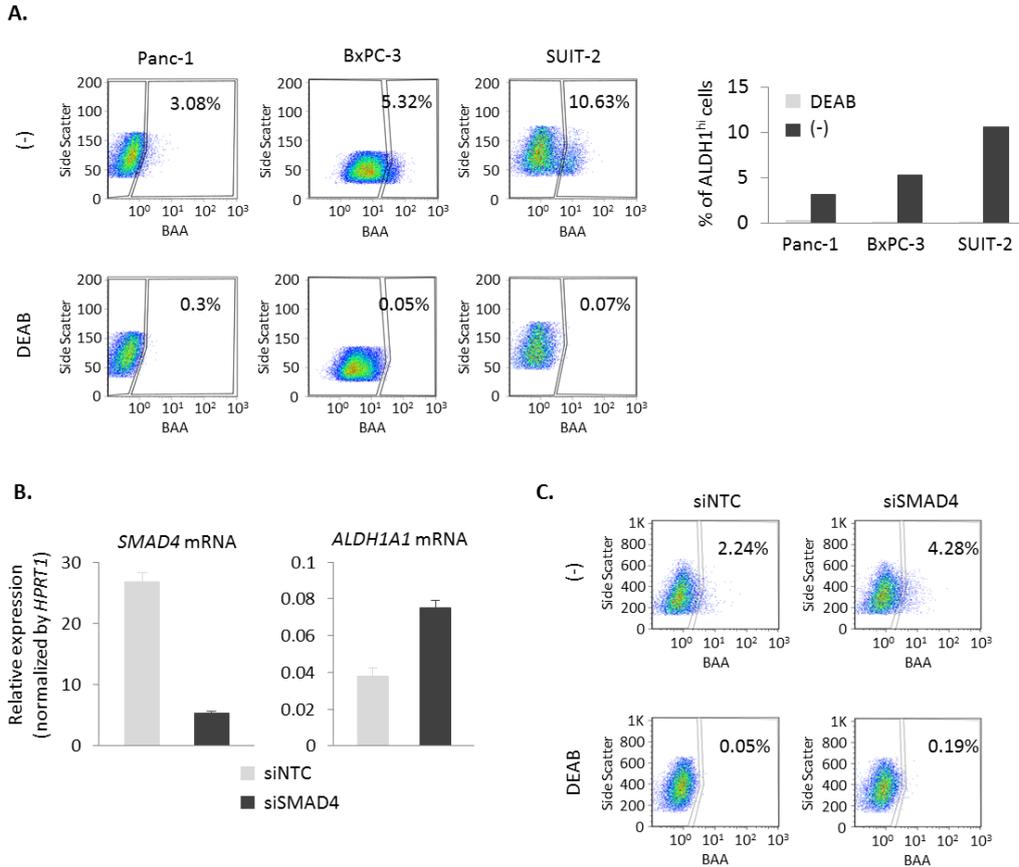


図 26. 膵癌細胞中に存在する ALDH1^{hi} 細胞の検出

(A) Panc-1 細胞、BxPC-3 細胞、SUI2-2 細胞を Aldefluor Assay と Flow cytometry により解析した。(左) ALDH1 の基質である Bodipy-aminoacetaldehyde (BAAA)は、細胞内の ALDH1 によって緑色蛍光を放出する Bodipy-aminoacetate (BAA)に酸化されるため、ALDH1^{hi} 細胞は強い緑色蛍光を放つ細胞集団として検出された。Negative control として ALDH1 酵素活性阻害剤である DEAB を反応液中に加えた細胞を使用し、緑色蛍光の消失の有無をもとに、ALDH1⁻細胞と ALDH1^{hi}細胞を設定した。図中の数字は全細胞に対する ALDH1^{hi}細胞の割合を示す。(右) 検出された各膵癌細胞における ALDH1^{hi}細胞の割合をグラフ化した。

(B, C) Panc-1 細胞に siNTC もしくは siSMAD4 をトランスフェクションした。

(B) 48 時間後の *SMAD4* と *ALDH1A1* の発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *HPRT1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *HPRT1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

(C) 72 時間後に Aldefluor Assay と Flow cytometry により ALDH1^{hi} 細胞の変化を評価した。図中の数字は全細胞に対する ALDH1^{hi}細胞の割合を示す。

ノックダウンを行った。siSMAD4を導入したPanc-1細胞では、Smad4の発現が効率よくノックダウンされており、さらにこれらの細胞ではALDH1A1の発現が上昇していることを確認した(図26B)。さらにまた、ALDH1^{hi}細胞の割合の変化をAldefluor AssayとFlow cytometryにより評価したところ、siSMAD4を導入したPanc-1細胞では、ALDH1^{hi}細胞の割合が増加しており(図26C)、Smad4がALDH1の発現のみでなく、ALDH活性も制御することが明らかとなった。

これまでの結果に基づき、膵癌組織における両者の発現の検討を行った。8症例のヒト膵癌(中分化型腺癌)原発腫瘍組織のそれぞれ癌辺縁部と癌中心部の計16病変に対し、抗Smad4抗体による免疫組織化学染色を行った。代表的な写真を図27に示す。拡大写真で示すような濃染細胞を含む病変をSmad4高発現組織(Smad4-high case)、予め設定した濃染細胞を含まない病変をSmad4低発現組織(Smad4-low case)とした。次いでこれらの組織に対して抗ALDH1抗体による免疫組織化学染色を行い、評価した。Smad4と同様、図27に示すような細胞を含む病変をALDH1-high、含まない病変をALDH1-lowとし、Smad4発現とALDH1発現の相関性を評価したところ、16病変中11病変については両タンパクの発現に逆相関関係がある傾向が確認された(図27、表3)。この結果から、膵癌腫瘍組織内に存在する癌細胞においても、Smad4の発現がALDH1の発現を負に制御している可能性が示唆された。

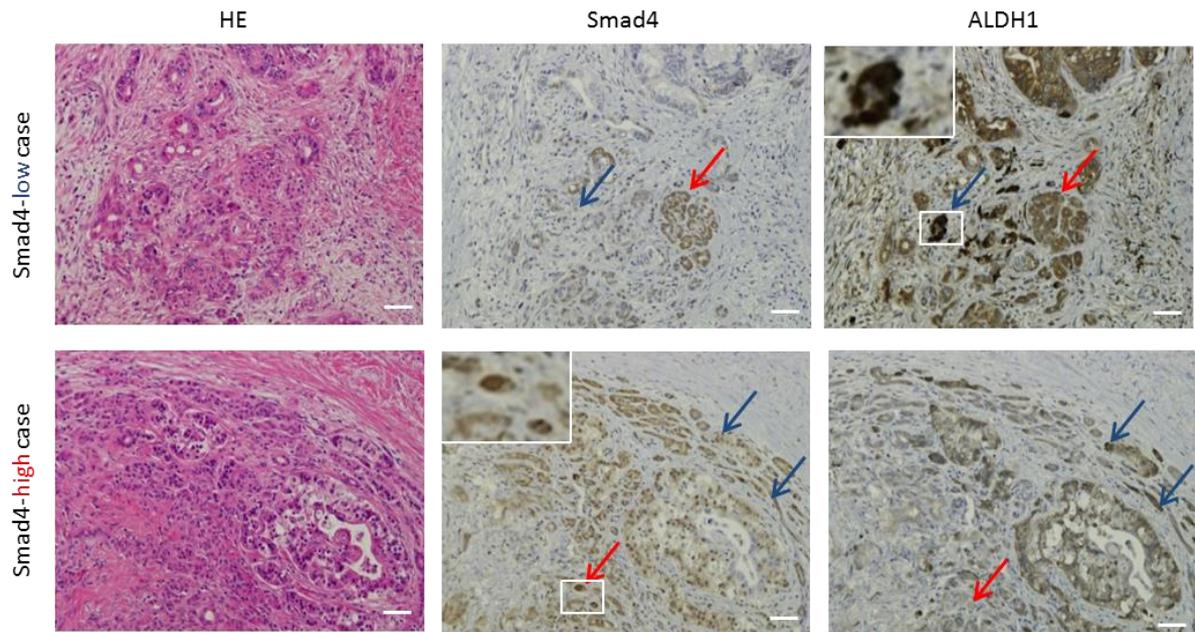


図 27. 膵癌の原発腫瘍における Smad4 と ALDH1 の発現

膵癌組織に対し、HE 染色と抗 Smad4 抗体、抗 ALDH1 抗体による免疫組織学的染色を行った。拡大した濃染細胞と同程度の染色細胞を含む病変を高発現組織、含まない病変を低発現組織とし、Smad4 発現の低い組織 (Smad4-low case) と Smad4 発現の高い組織 (Smad4-high case) に大別した。Scale bar; 30 μ m

赤矢印は高い Smad4 発現癌細胞、青矢印は低い Smad4 発現癌細胞を示す。

Histological type	Patient	Invasive front		Center	
		Smad4	ALDH1	Smad4	ALDH1
Moderately differentiated adenocarcinoma	1	low	high	low	high
	2	high	high	low	high
	3	high	high	high	high
	4	high	low	low	high
	5	low	low	low	high
	6	high	low	high	low
	7	low	high	high	low
	8	high	high	high	low

表 3. 膵癌の原発腫瘍組織に対する Smad4 と ALDH1 の免疫組織学的染色

膵癌組織に対し、HE 染色と Smad4、ALDH1 の免疫組織学的染色を行った。膵癌組織は中分化腺癌の癌辺縁部 (Invasive front; 8 例)、中分化型腺癌の癌中心部 (Center; 8 症例)である。それぞれの症例での Smad4、ALDH1 の染色性を示す。表中の背景を灰色で塗りつぶした病変は Smad4 発現と ALDH1 発現に逆相関が確認できた病変を示す。

ALDH1 の癌幹細胞マーカーとしての有用性と腫瘍形成に対する機能

ALDH1^{hi} 膵癌細胞が自己複製能と多分化能を持ち、細胞集団を形成する能力があるか明らかにするため、Aldefluor Assay により ALDH1^{lo}細胞と ALDH1^{hi}細胞を単離し、1週間後に再び Aldefluor Assay を行った。ALDH1^{hi}細胞から生み出された細胞集団には sort する前の SUIT-2 細胞と同じく、約 10%の ALDH1^{hi}細胞が含まれており、腫瘍内では常に一定の割合で ALDH1^{hi}細胞が存在するような階層性が構築されていると考えられた (図 28A)。次に、ALDH1^{lo}細胞と ALDH1^{hi}細胞の *in vitro* での増殖能を検討するため、colony formation assay を行い、それぞれの細胞集団のコロニー形成能の違いを調べた。ALDH1^{hi}細胞は ALDH1^{lo}細胞と比較して大きなコロニーを形成することが分かった (図 28B)。正常上皮細胞と異なり、ALDH1^{hi}細胞は浮遊状態でも増殖が停止することなく足場非依存的に増殖し、コロニーを形成したと考えられる。さらに、*in vivo* における腫瘍形成能を検討するため、SUIT-2 細胞から単離した ALDH1^{lo}細胞と ALDH1^{hi}細胞をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍形成の有無を検討した。ALDH1^{hi}細胞は ALDH1^{lo}細胞と比較して大きな腫瘍を形成することが分かった (図 28C)。以上の結果から、膵癌細胞において ALDH1^{hi}細胞は高い腫瘍形成能、自己複製能と多分化能を示し、癌幹細胞の性質を有することが分かった。

膵癌細胞において、ALDH1 が癌幹細胞マーカーだけでなく、何らかの機能をもつか検討するために、レンチウイルスを用いて Panc-1 細胞に shALDH1A1 を導入し、恒常的に ALDH1A1 発現をノックダウンした細胞 (Panc-1-shALDH1A1 細胞)を樹立した。

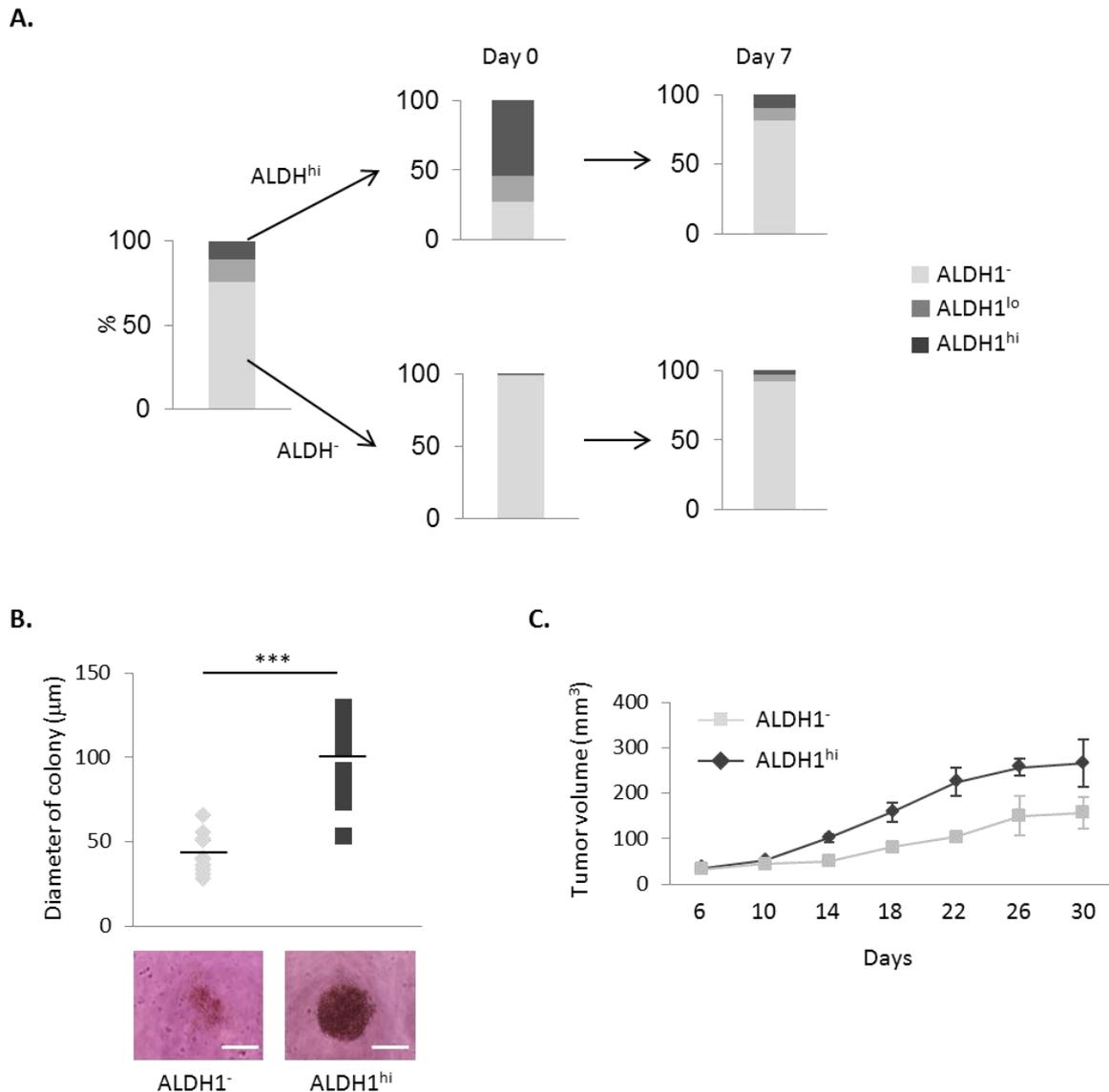


図 28. ALDH1⁻および ALDH1^{hi} 腫瘍細胞の *in vitro*、*in vivo* における自己複製能、多分化能、腫瘍形成能

Aldefluor Assay と FACS sorting により SUIT-2 細胞から単離した ALDH1⁻および ALDH1^{hi} 細胞の癌幹細胞活性を評価した。

(A) それぞれ 1 週間培養した後、再び Aldefluor Assay と Flow cytometry により解析した。

(B) 寒天中で培養し、コロニー形成能を比較した。(上) 2 週間後に各コロニーの直径を測定した (ALDH1⁻; n=10, ALDH1^{hi}; n=16)。***; $p < 0.001$ (下) 代表的なコロニーの写真を示す。Scale bar; 100 μm

(C) 10,000 cells/body でヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍体積を継続的に評価した。平均と標準偏差をグラフに示す。

定量的 RT-PCR や Aldefluor Assay により、Panc-1-shALDH1A1 細胞では ALDH1A1 の発現が抑制され、さらに効率よく ALDH 活性が低下していることが確認された (図 29A、29B)。同時に ALDH1A3 の発現には影響を及ぼさないことを確認した。そこでまず、細胞増殖に対する影響を確認したが、Panc-1-shNTC 細胞と比較しても Panc-1-shALDH1A1 細胞の細胞増殖の速度に明確な差は確認できなかった (図 29C)。しかし一方で、それぞれの細胞の腫瘍形成能を調べたところ、Panc-1-shALDH1A1 細胞ではほとんどコロニーが形成されず、形成されたとしても非常に小さいことが分かった (図 29D)。Panc-1-shALDH1A1 細胞は通常の培養条件下では増殖を続けるものの、足場非依存的な増殖能を喪失したため、コロニー形成能に差が出たと解釈された。以上の結果から、ALDH1 は膵癌幹細胞を濃縮するマーカーとして有用であると同時にエフェクターとしても機能しており、ALDH1 が発現していること自体が膵癌細胞の造腫瘍活性に重要であることが示唆された。

ALDH1 と未分化性マーカー、他の癌幹細胞マーカーとの関係性

ALDH1 が膵癌幹細胞のマーカーとして妥当であることがわかったため、ALDH1^{hi} 細胞の未分化性を評価した。Flow cytometry を用いた Aldefluor Assay により SUI-2 細胞から ALDH1^{lo}細胞と ALDH1^{hi}細胞を単離し、それぞれの未分化性マーカーの発現を調べた。ALDH1^{hi}細胞では NANOG、OCT4A、SOX2 の発現が高いことから、ALDH1^{hi}膵癌細胞はより未分化な状態にあると考えた (図 30)。膵癌幹細胞を濃縮するマーカー

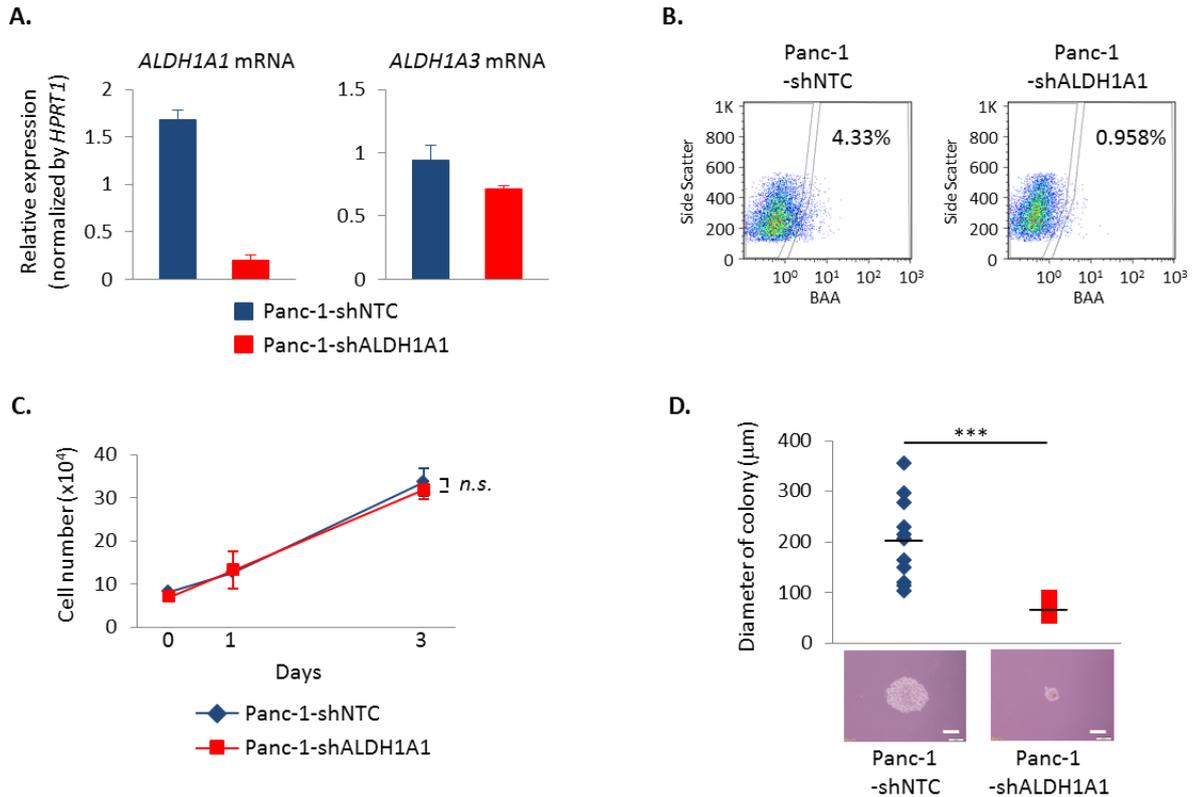


図 29. ALDH1A1 の *in vitro* における細胞増殖、コロニー形成能への関与

Panc-1-shNTC 細胞と Panc-1-shALDH1A1 細胞を使用し、以下の解析を行った。

(A) *ALDH1A1*、*ALDH1A3* の発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *HPRT1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *HPRT1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

(B) Aldefluor assay と Flow cytometry により ALDH1^{hi} 細胞の変化を評価した。図中の数字は全細胞に対する ALDH1^{hi} 細胞の割合を示す。

(C) 各細胞を播種してから 0、1、3 日後の細胞数を計測した。測定は triplicate で行い、平均と標準偏差をグラフ化した。n.s.; not significant

(D) 各細胞を寒天中で培養し、コロニー形成能を比較した。(上) 2 週間後に各コロニーの直径を測定した (Panc-1-shNTC; n=11, Panc-1-shALDH1A1; n=8)。***; p < 0.001

(下) 代表的なコロニーの写真を示す。Scale bar; 100 μm

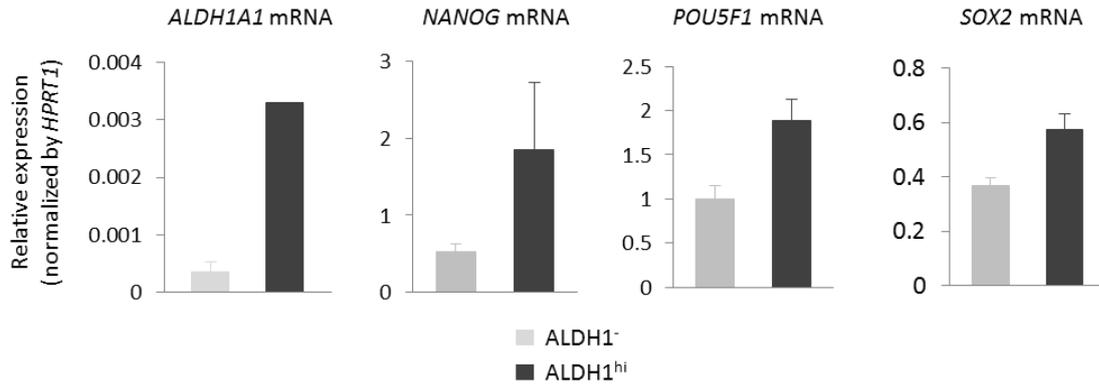


図 30. ALDH1⁻および ALDH1^{hi}細胞における未分化性マーカーの発現

Aldefluor Assay と Flow cytometry により Panc-1 細胞から単離した ALDH1⁻細胞と ALDH1^{hi}細胞の *ALDH1A1*、*NANOG*、*OCT4A (POU5F1)*、*SOX2* の発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *HPRT1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *HPRT1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

一は多数存在するが、もし腫瘍内にこれらのマーカーで濃縮できる膀胱癌幹細胞がそれぞれ存在し、相互に関係しているのならば、その関係性を理解することが臨床の治療において非常に重要である (103)。そこで、単離した ALDH1⁺細胞と ALDH1^{hi}細胞の各癌幹細胞マーカーの発現を定量的 RT-PCR により評価した。しかしながら、ALDH1⁺細胞と ALDH1^{hi}細胞を比較しても各マーカーの発現に変化は見られなかった (図 31)。以上の結果から、未分化性を保っている ALDH1^{hi}細胞と他の癌幹細胞マーカー陽性細胞は相互に干渉し合うわけではなく、独立して存在していると考えられた。

TGF- β シグナルによる ALDH1^{hi}膀胱癌細胞の制御

Smad4 は共役型 Smad であり、特異型 Smad と複合体を形成し、核内へと移行することで、TGF- β や BMP などの TGF- β ファミリーシグナルを伝達する。これまでの実験で Smad4 が ALDH1^{hi}膀胱癌細胞の維持に重要であることが分かったが、この Smad4 の作用には TGF- β シグナルもしくは BMP シグナルのどちらのシグナル伝達が関与しているか、検討した。SUIT-2 細胞に対して TGF- β もしくは BMP で刺激を行い、ALDH1A1 mRNA の発現変動を経時的に測定したところ、TGF- β は刺激後 24 時間から ALDH1A1 の発現を低下させ、刺激後 72 時間では ALDH1A1 の発現量が約 50%まで低下していた (図 32A)。一方で BMP-4 刺激でも ALDH1A1 の発現量が低下する傾向はみられたが、低下の度合は TGF- β より弱く、また遅れて低下することがわかった。同様にタンパク質レベルでも TGF- β 刺激による ALDH1 発現の低下を認めたが、BMP 刺

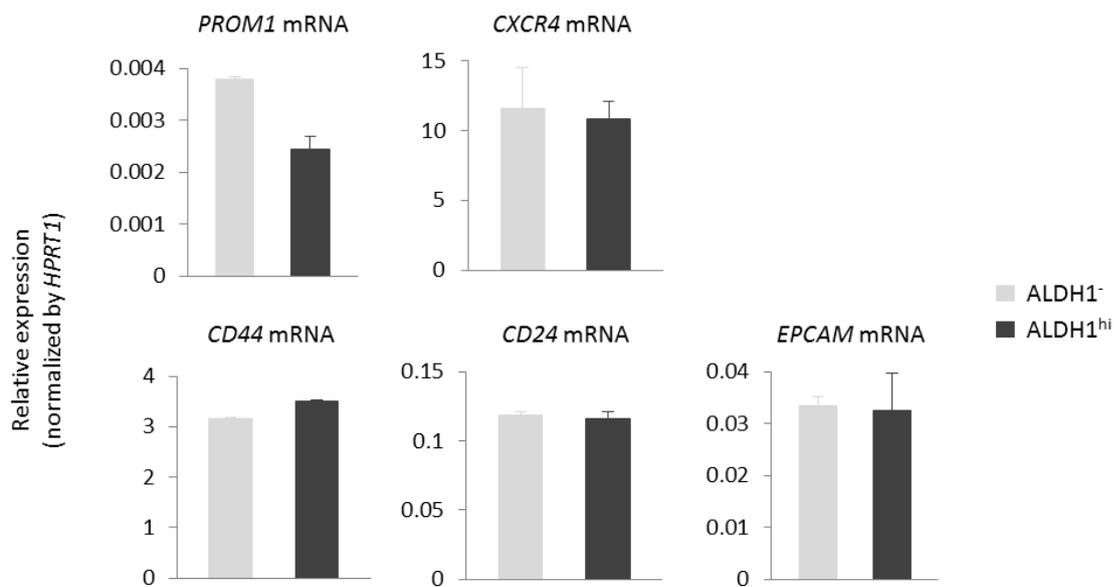


図 31. ALDH1⁻および ALDH1^{hi}細胞における癌幹細胞マーカーの発現

Aldefluor Assay と Flow cytometry により Panc-1 細胞から単離した ALDH1⁻細胞と ALDH1^{hi}細胞の CD133 (*PROM1*), *CXCR4*, *CD44*, *CD24*, *EPCAM* の発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *HPRT1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *HPRT1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

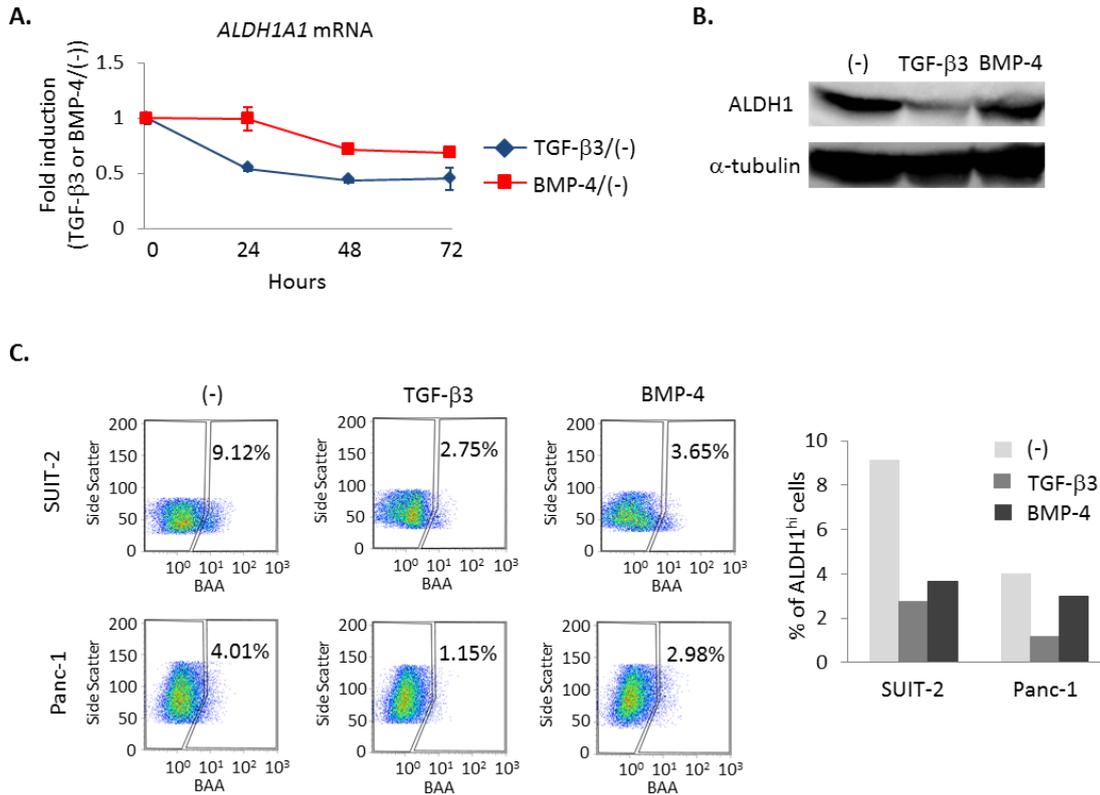


図 32. TGF-βおよび BMP による ALDH1 発現および活性の制御

SUIT-2 細胞を TGF-β3 (1 ng/ml) および BMP-4 (30 ng/ml) で刺激し、ALDH1 発現および活性を調べた。

(A) 刺激後 0、24、48、72 時間の mRNA を回収し、*ALDH1A1* の発現を定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは duplicate で測定し、その平均を遺伝子発現の値とした。PCR の internal control には *HPRT1* を使用し、目的の遺伝子の発現量を *HPRT1* の発現量で補正した値と標準偏差をグラフ化した。

(B) 48 時間後のタンパク質を回収、SDS-PAGE を行い、抗 ALDH1 抗体にて Western blot を行った。Loading control として抗 α-tubulin 抗体を用いた。

(C) SUIT-2 細胞、Panc-1 細胞を TGF-β3 (1 ng/ml) および BMP-4 (30 ng/ml) で刺激し、(左) 72 時間後に Aldefluor Assay と Flow cytometry により ALDH1^{hi} 細胞の変化を評価した。図中の数字は全細胞に対する ALDH1^{hi} 細胞の割合を示す。(右) 検出された各膵癌細胞における ALDH1^{hi} 細胞の割合をグラフ化した。

激では明らかな ALDH1 発現の低下を確認できなかった (図 32B)。次に、膵癌細胞の ALDH 活性に対する TGF- β と BMP の影響を調べるために、Aldefluor Assay と Flow cytometry を行ったところ、SUIT-2 細胞では TGF- β および BMP 刺激により、ALDH1^{hi} 細胞の割合が減少していた (図 32C)。Panc-1 細胞では TGF- β 刺激により ALDH1^{hi} 細胞の割合が減少したが、BMP 刺激では顕著な差を確認できず、細胞種によって異なる反応を示すと判断できた。これらの結果から、BMP シグナルが ALDH1^{hi} 膵癌細胞を制御している可能性は否定できないが、細胞種依存的な傾向があり、その関与の程度は TGF- β シグナルほど大きなものではないと考えられた。Smad4 を介した ALDH1^{hi} 膵癌細胞の制御機構は、おもに TGF- β に依存的であると示唆され、以降 *ALDH1A1* mRNA 転写制御における TGF- β の機能について、生化学的な解析を行った。

TGF- β による *ALDH1A1* mRNA の転写制御には、Smad が *ALDH1A1* ゲノムに直接的に結合する必要があるか検討する為に、ChIP を行った。なお、当研究室のヒトスキルス胃癌細胞 OCUM-2MLN 細胞を用いた抗 Smad2/3 抗体による ChIP-Sequence の先行研究の結果から、ヒト癌細胞では *ALDH1A1* ゲノムの 4 つの領域 (転写開始点上流 (-25060~-27715 bp)、intron5、intron11、下流領域 (+124970~+123530 bp) に Smad2/3 が結合していることが予想されている (unpublished data)。よって今回は Panc-1 細胞および SUIT-2 細胞を TGF- β で刺激し、1.5 時間後の時点でこれら 4 領域や *ALDH1A1* promoter 領域に対する Smad4 および Smad2/3 の結合の有無を調べた。この結果、SUIT-2 細胞においては TGF- β 刺激により *ALDH1A1* intron11 と下流領域に Smad2/3 が

結合する可能性が示唆されたが、Panc-1 細胞では Smad2/3 が TGF- β 依存的に結合していると思われた *ALDH1A1* ゲノムの領域は見つからず、一定した傾向を見出すことはできなかった (図 33A)。一方、Smad4 の結合に関しては、それぞれの細胞で TGF- β 依存的な Smad4 の結合が示唆された領域が同定された。なかでも *ALDH1A1* ゲノム上流領域 (-25060~-27715 bp) と下流領域(+124970~+123530 bp) への Smad4 の結合は、両細胞間に共通して観察されたため、膵癌細胞での TGF- β による *ALDH1A1* の転写制御は、これらの領域に対する Smad4 の結合を介していると予想された (図 33B)。ただし Panc-1 細胞では、*ALDH1A1* ゲノムの intron5 領域に Smad4 が結合しており、さらに TGF- β 依存的にその結合が解除されることも見出されるなど、一部の膵癌細胞では、上流領域と下流領域に限定されない部位を介した *ALDH1A1* の転写制御機構が存在していることも想定された。次に、これらの *ALDH1A1* ゲノムの上流領域と下流領域を含む promoter-reporter constructs を Panc-1 細胞に導入し、TGF- β による promoter 活性の変化を検討した (図 34)。特に下流領域の promoter 活性が TGF- β 刺激により著明に減少していることが分かった。以上の結果から、TGF- β の下流で Smad4 が *ALDH1A1* ゲノムの上流もしくは下流領域に結合することで *ALDH1A1* 発現を抑制する可能性が示唆された。

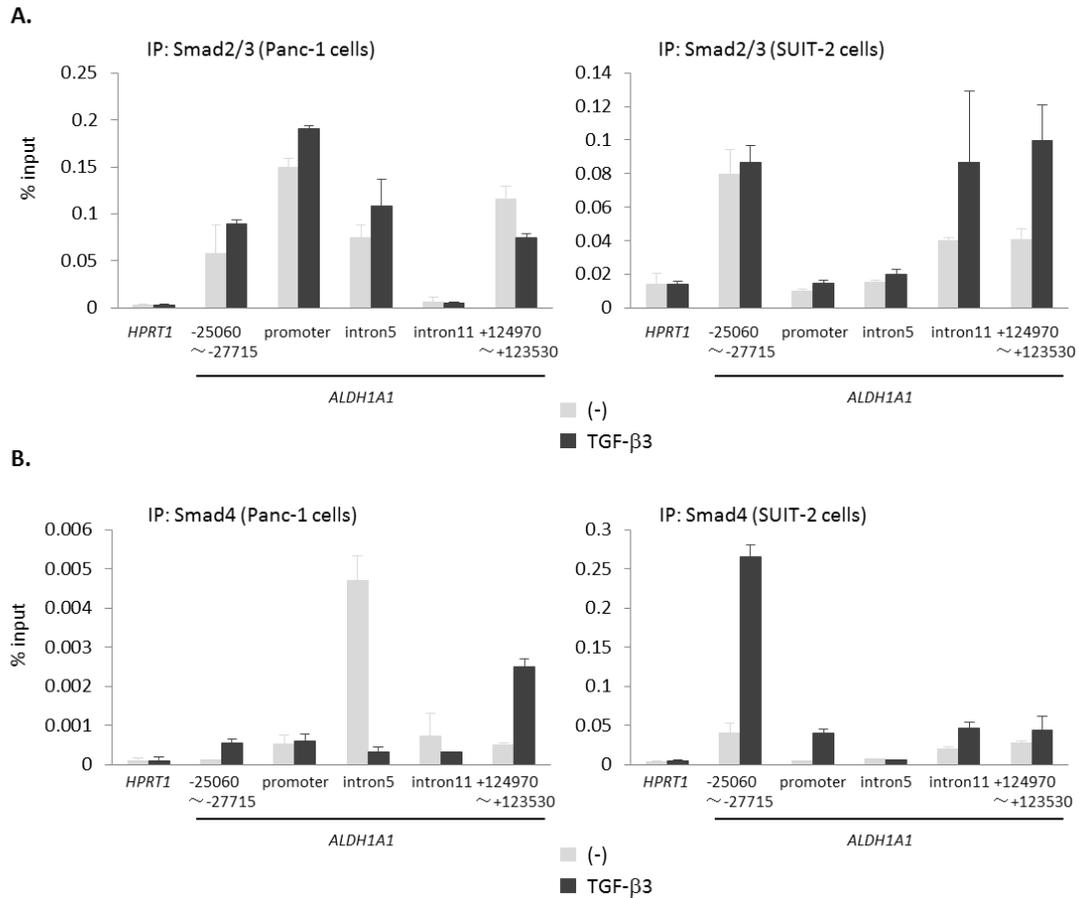


図 33. 肺癌細胞における *ALDH1A1* ゲノムに対する Smad の結合

(A, B) Panc-1 細胞、SUIT-2 細胞を TGF-β3 (1 ng/ml) で刺激し、1.5 時間後に細胞を formalin 固定、回収した。(A) 抗 Smad2/3 抗体、(B) 抗 Smad4 抗体により ChIP を行い、得られたゲノム断片の *HPRT1* promoter、*ALDH1A1* の転写開始点より上流 (-25060 ~ -27715 bp)、下流 (+124970 ~ +123530 bp)、promoter、intron5、intron11、に関して定量的 RT-PCR により評価した。各サンプルは triplicate で測定し、その平均を値とした。Input DNA により補正した値と標準偏差をグラフ化した。

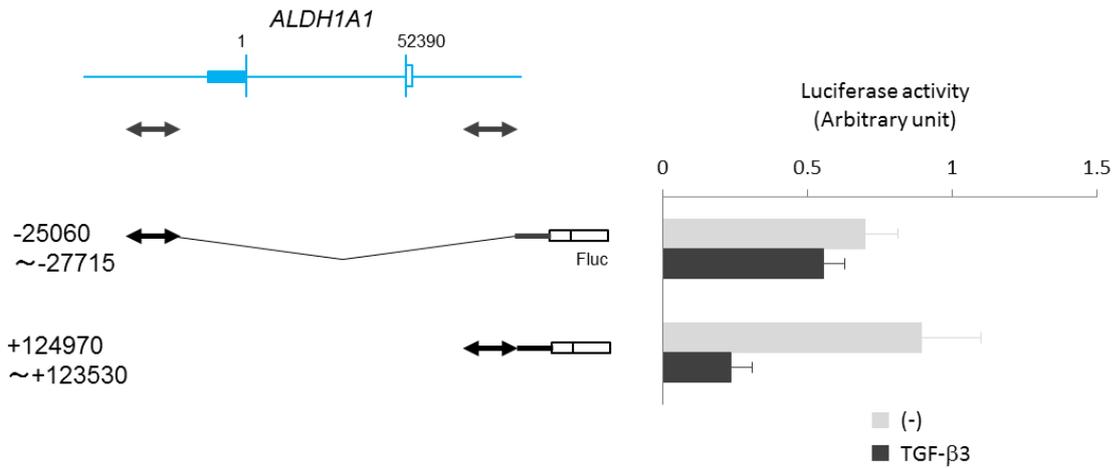


図 34. *ALDH1A1* ゲノムに対する TGF-β3 依存的な Smad4 結合領域の同定

Panc-1 細胞に reporter-promoter constructs をトランスフェクションした。24 時間後に TGF-β3 (1 ng/ml) で刺激し、さらに 24 時間後に細胞を回収し Firefly luciferase (Fluc) 活性を測定した。各サンプルは duplicate で行い、その平均を reporter-promoter 活性の値とした。Renilla luciferase (Rluc) 活性の値により補正した値と標準偏差をグラフ化した。

考察

近年、腫瘍内に存在している癌幹細胞が、癌の再発や転移に深く関与することを示唆する結果が多数報告されているが、それら癌幹細胞の制御については未解明な部分が多い。本研究では、癌幹細胞を濃縮している ALDH1^{hi} 膵癌細胞の維持が Smad4 を介した TGF- β シグナルにより制御を受ける可能性について解析を行った。

膵癌悪性化と膵癌幹細胞における Smad4 の機能

多くの癌では、発癌の過程でさまざまな遺伝子に変異・欠失が起こるが、TGF- β シグナルの主な伝達因子である *SMAD4* もそれらの遺伝子のひとつである。若年性ポリポーシス (Juvenile polyposis syndrome) のおよそ 17~56% の患者で *SMAD4* の突然変異が確認されており、*Smad4* heterozygous knockout mice では生後 1 年で組織学的に若年性ポリポーシスと類似の胃ポリープを発症することが知られている (104,105)。大腸癌においては、*SMAD4* の変異と発現喪失は腺腫から浸潤性の癌への進行を促進し、およそ 22~46% の浸潤癌で *SMAD4* の変異が確認されている (106,107)。これは、マウスを用いた実験によっても証明されており、Adenomatosis polyposis coli (*Apc*) ^{Δ 716}(+/-) マウスでは腸管腺腫を発症するに留まるが、*Smad4*(+/-) *Apc* ^{Δ 716}(+/-) マウスでは大腸癌が発症する (108)。頭頸部扁平上皮癌や散発性大腸癌では *SMAD4* の変異と転移との関係が示唆され (106,109,110)、*Smad4* は多くの癌で癌抑制因子として機能することが分かっている。

膵癌の発症において、*SMAD4* は後期過程で変異・欠失する。Bardeesy らは、*Kras* ノックアウトによって発症した膵癌が *Smad4* のノックアウトにより悪性化することを報告している (111)。さらに、Xu らは、*Smad4* 単独のノックアウトマウスでは膵臓から癌が発症することはないが、*Smad4* と Phosphatase and tensin homolog (*Pten*)とのダブルノックアウトにより膵癌が悪性化すると報告している (112)。これは、*Smad4* が膵癌の発症ではなく、既に癌化した細胞の悪性化に強く寄与し、癌の進行を加速化させる因子である可能性を示唆する。また膵癌細胞において *Smad4* が癌細胞の運動能や浸潤能の抑制をすることが分かっているが (113)、本研究のような *Smad4* の膵癌幹細胞における維持や機能に着目した研究はほとんどない。本研究では、*SMAD4* 遺伝子の発現を抑制することにより、膵癌幹細胞マーカーである *ALDH1A1* mRNA の転写が亢進し、*ALDH1^{hi}* 膵癌細胞の割合が増えることを見出した (図 25、図 26)。これは臨床検体を用いた実験によっても支持され、膵癌組織においても、*Smad4* 発現が *ALDH1^{hi}* 膵癌細胞の維持に対して負に作用している可能性が示唆された (図 27、表 3)。このことから、膵癌細胞で *Smad4* が欠失することにより、膵癌幹細胞に対する抑制機構が破綻することで、より悪性化が高まり、高確率で転移・再発する予後不良の膵癌となることが考えられた。本研究では、癌幹細胞自身に対する *Smad4* に着目したが、癌幹細胞を維持する微小環境、すなわち癌幹細胞ニッチが癌幹細胞の維持に重要であることも知られている。特に、サイトカインやケモカインなどを介した癌幹細胞とニッチ細胞の相互作用は、癌幹細胞集団の制御に深く関与する。膵癌細胞に *Smad4*

を過剰発現させると転写因子 v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (ETS-1)を介した vascular endothelial growth factor (VEGF)の産生が低下し、血管新生が抑制されることが報告されており (114)、膵癌幹細胞自身のみならず、膵癌幹細胞周囲の微小環境の維持の制御に対しても、膵癌細胞における Smad4 の発現重要な役割を果たしている可能性も予想された。

ALDH1 の癌幹細胞マーカーおよびエフェクターとしての機能

膵癌幹細胞を濃縮するマーカーはこれまでにいくつか報告されてきたが (68,73,100)、本研究では、アルデヒド分解酵素である ALDH1 が膵癌幹細胞を濃縮する有用なマーカーであることが明らかとなった (図 28)。さらに、ALDH1^{hi} 膵癌細胞では NANOG、OCT4A、SOX2 の発現が上昇しており、より未分化な状態にあることが分かった (図 30)。Panc-1-shSMAD4 細胞ではこれら未分化性マーカーの発現が上昇していることから、膵癌細胞では、ALDH1 だけでなく、NANOG、OCT4A、SOX2 も TGF- β シグナルにより負に発現制御を受ける可能性が示唆された。ただし、Panc-1-shALDH1A1 細胞では未分化性マーカーの発現に顕著な変化を確認できなかったため (data not shown)、少なくとも、膵癌細胞では ALDH1 の下流で NANOG、OCT4A、SOX2 の発現が制御されている可能性は低いと思われた。

癌幹細胞は高い抗癌剤耐性を有していることから、従来の抗癌剤治療では腫瘍内に癌幹細胞が残存してしまい、将来的な腫瘍の再発につながる。近年、この問題を解決

するために、癌幹細胞を標的としたいくつかの治療戦略が提唱されてきている。そのうちのひとつに、薬剤耐性機構の破壊によって癌幹細胞の治療感受性を増強させ、抗癌剤による治療を行うことにより、腫瘍の根絶を達成しようというものがある。本研究では、Panc-1-shALDH1A1 細胞を用いた colony formation assay により、ALDH1A1 が膵癌幹細胞マーカーとしてだけでなく、細胞の造腫瘍活性に直接的に関与することが分かった (図 29)。ALDH1 は細胞増殖や分化、薬剤代謝能に関与することが分かっているが (83,115,116)、造腫瘍活性に対して直接的な機能を有するという報告はない。本研究では、膵癌細胞における ALDH1 の新たな機能を見出しており、ALDH1 自体を分子標的とみなし、DEAB 等の ALDH 活性を阻害する薬剤により、膵癌幹細胞を制御し得る可能性が示唆された。

TGF- β による ALDH1A1 発現制御

本研究では癌幹細胞マーカーさらには分子標的として ALDH1 に着目しており、その発現と活性の制御を解析した。これまでも ALDH1 の発現制御に関する知見がいくつか報告されている。ALDH1 により産生された retinoic acid は核内へ移行し、標的遺伝子の発現を制御するが、細胞内の retinoic acid が増えると、*GADD153* mRNA が上昇し、C/EBP β と複合体を形成する。これにより、C/EBP β の CCAAT Box への結合能が減少し、*ALDH1A1* の転写が抑制されるフィードバック機構が存在すると報告されている (117,118)。また、これまでに、乳癌細胞では miR-146a を介して ALDH1^{hi} 細胞

が制御されることや (119)、マウス骨肉腫細胞では Notch signaling の阻害により ALDH1 の発現がタンパク質レベルで減少し、ALDH1^{hi} 細胞も減少することが分かっている (120)。Moreb らは、骨髄細胞を Interleukin (IL)-1 と Tumor necrosis factor (TNF)- α で刺激すると、mRNA レベルおよびタンパク質レベルで ALDH1 の発現が上昇し、抗癌剤である 4-hydroperoxycyclophosphamide (4-HC) への感受性が増強すると報告したが (121,122)、TGF- β 依存的な Smad4 による ALDH1 の発現制御を本研究のように生化学的に検証した報告は見当たらない。膵癌は間質が多く、線維化が進行しており、癌細胞を取り巻く微小環境から TGF- β が産生されている (123)。このことから、TGF- β が Smad4 を介して ALDH1A1 の発現を制御し、ALDH1^{hi} 膵癌細胞をも制御する可能性が示唆された。

TGF- β は幹細胞の分化や増殖を制御するが、近年、正常幹細胞と類似した性質をもつ癌幹細胞の制御においても重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。スキルス胃癌幹細胞である SP 細胞および ALDH1^{hi} 細胞は腫瘍微小環境からの TGF- β により減少することが報告されている (88,124)。また、TGF- β は $\alpha 6 \beta 1^{\text{hi}} \text{CD}34^{\text{hi}}$ 扁平上皮癌幹細胞の自己複製能を負に制御することが分かっている (125)。TGF- β は Inhibitor of differentiation (ID)1 の発現制御を介して分化を制御するが、乳癌幹細胞において ID1 の発現を抑制することで分化を促進し、癌幹細胞数を減少させることが示されている (126)。これらの報告は、本研究で明らかにされた癌幹細胞の維持に対する TGF- β の抑制的な作用と一致する。しかしながら一方で、TGF- β が癌幹細胞の維持に対して促進

的な作用をする報告もされている。グリオーマ幹細胞では、TGF- β -Smad 依存的に誘導された Leukemia inhibitory factor (LIF)の下流で活性化される JAK-STAT pathway を介して細胞の自己複製が亢進されることや (127)、TGF- β の下流で SOX4 を介して SOX2 が発現誘導され、未分化性維持に働くことが報告されている (128)。また、TGF- β は EMT を誘導するが、乳癌や卵巣癌において EMT を起こした細胞は幹細胞様の性質を維持することが示されている (129-131)。さらに、TGF- β ファミリーに属する Nodal/Activin が CD133⁺膵癌幹細胞の未分化性を維持し、腫瘍形成能を増強することも報告されており (132)、各癌幹細胞においても TGF- β ファミリーのシグナルは複雑な役割を持つと考えられた。これらの作用の違いが何に起因するのか、については今後の検討課題であるが、着目している癌の種類、測定している癌幹細胞マーカーの種類、使用しているリガンドの種類などが統一されておらず、作用が異なっていることが予想される。今回の実験では、Panc-1-shSMAD4 細胞では CD133 の発現に顕著な変化は見られなかったことや (図 25)、Activin 刺激によって ALDH1^{hi} 細胞の数に変化がなかったことから (data not shown)、TGF- β -ALDH1 経路は Nodal/Activin-CD133 経路とは独立して、癌幹細胞活性を制御していると考えられた。また、TGF- β と同様、Smad4 を介してシグナルを伝達する BMP についても検討を行ったが、細胞種によって反応が異なり、細胞種間で保存された結果を得られなかったことから (図 32)、膵癌幹細胞の制御において BMP は TGF- β ほど重要な機能を果たさないと考えた。ChIP により Smad4 が TGF- β 依存的に *ALDH1A1* ゲノムの上流領域と下流領域に結合する可能性が

考えられたが、この領域への Smad4 の結合には他の転写因子の関与が必要であることも考えられる。ChIP-Seq により Smad4 が Activator protein (AP)-1 サイトや GC-rich モチーフに結合することが予想されている (133)。また、Smad3/4 と転写因子 Polyomavirus enhancer binding protein 2/core binding factor (PEBP2/CBF)の複合体が標的遺伝子の転写を活性化することが分かっている (134)。あるいは、Zinc finger E box binding homeobox (Zeb2/SIP1)のように Smad 複合体と結合し、プロモーターから離れることで転写活性化を担うような因子も存在することが分かっている (135)。本研究で着目した *ALDH1A1* ゲノムの上流領域には AP-1 および SIP1 結合配列が、下流領域には AP-1 結合配列が含まれていることもわかっており (data not shown)、これら転写因子の関与により Smad4 が選択的に上流および下流領域に結合している可能性が考えられた。

癌幹細胞を標的とした治療は、根本的な治癒の乏しい癌治療に新たな打開策を見出すものであり、すでに白血病においては、癌幹細胞特異的な分子を標的とし、分化を促す分化誘導療法が奏功する可能性が示されている。本研究では TGF- β が ALDH1^{hi} 膵癌幹細胞の維持に負に作用することを明らかにしており、TGF- β が膵癌幹細胞の分化に関わることを強く示唆するものである。この結果は難治癌である膵癌の新たな治療法の開発にもつながる重要な知見であると考えられる。

総括

本研究では乳癌、膵癌の2種類の癌に焦点を当てて、それぞれの癌細胞に対する TGF- β の作用を調べた。乳癌においては TGF- β は腫瘍促進的に作用し、一方で膵癌においては TGF- β は腫瘍抑制的に作用するなど、癌の進展において TGF- β が相反する作用を有していることが再現された。この二面性が何によって規定されているかを解明するに至らなかったが、癌の悪性度や癌の発生源の違いによって TGF- β の作用の違いを説明できることが予想された。

参考文献

1. Heldin, C. H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465-471, 1997
2. Shi, Y., and Massagué, J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700, 2003
3. Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massagué, J. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* **370**, 341-347, 1994
4. Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T., and Miyazono, K. Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signalling. *Genes Cells* **7**, 1191-1204, 2002
5. Nakao, A., Afrakhte, M., Morén, A., Nakayama, T., Christian, J. L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N. E., Heldin, C. H., and ten Dijke, P. Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature* **389**, 631-635, 1997
6. ten Dijke, P., and Hill, C. S. New insights into TGF- β -Smad signalling. *Trends Biochem Sci* **29**, 265-273, 2004
7. Miyazono, K., Suzuki, H., and Imamura, T. Regulation of TGF- β signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci* **94**, 230-234, 2003
8. Derynck, R., and Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* **425**, 577-584, 2003
9. Moustakas, A., and Heldin, C. H. The regulation of TGF β signal transduction.

- Development* **136**, 3699-3714, 2009
10. Zhang, Y. E. Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Res* **19**, 128-139, 2009
 11. Massagué, J., Blain, S. W., and Lo, R. S. TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103**, 295-309, 2000
 12. Derynck, R., Akhurst, R., and Balmain, A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* **29**, 117-129, 2001
 13. Hata, A., Shi, Y., and Massagué, J. TGF- β signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol Med Today* **4**, 257-262, 1998
 14. Massagué, J. TGF β in Cancer. *Cell* **134**, 215-230, 2008
 15. Akhurst, R. J., and Derynck, R. TGF- β signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol* **11**, S44-51, 2001
 16. Miyazono, K. Transforming growth factor- β signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **85**, 314-323, 2009
 17. Miettinen, P. J., Ebner, R., Lopez, A. R., and Derynck, R. TGF- β induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol* **127**, 2021-2036, 1994
 18. Xu, J., Lamouille, S., and Derynck, R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* **19**, 156-172, 2009

19. De Wever, O., and Mareel, M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* **200**, 429-447, 2003
20. Roodman, G. D. Mechanisms of bone metastasis. *Discov Med* **4**, 144-148, 2004
21. Ikushima, H., and Miyazono, K. TGF β signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **10**, 415-424, 2010
22. Mehlen, P., and Puisieux, A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* **6**, 449-458, 2006
23. Padua, D., and Massagué, J. Roles of TGF β in metastasis. *Cell Res* **19**, 89-102, 2009
24. Yang, J., Mani, S. A., and Weinberg, R. A. Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res* **66**, 4549-4552, 2006
25. Kim, S. G., Jong, H. S., Kim, T. Y., Lee, J. W., Kim, N. K., Hong, S. H., and Bang, Y. J. Transforming growth factor- β 1 induces apoptosis through Fas ligand-independent activation of the Fas death pathway in human gastric SNU-620 carcinoma cells. *Mol Biol Cell* **15**, 420-434, 2004
26. Tachibana, I., Imoto, M., Adjei, P. N., Gores, G. J., Subramaniam, M., Spelsberg, T. C., and Urrutia, R. Overexpression of the TGF β -regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. *J Clin Invest* **99**, 2365-2374, 1997
27. Jang, C. W., Chen, C. H., Chen, C. C., Chen, J. Y., Su, Y. H., and Chen, R. H. TGF- β

- induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat Cell Biol* **4**, 51-58, 2002
28. Valderrama-Carvajal, H., Cocolakis, E., Lacerte, A., Lee, E. H., Krystal, G., Ali, S., and Lebrun, J. J. Activin/TGF- β induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nat Cell Biol* **4**, 963-969, 2002
29. Huang, Y., Hutter, D., Liu, Y., Wang, X., Sheikh, M. S., Chan, A. M., and Holbrook, N. J. Transforming growth factor- β 1 suppresses serum deprivation-induced death of A549 cells through differential effects on c-Jun and JNK activities. *J Biol Chem* **275**, 18234-18242, 2000
30. Shin, I., Bakin, A. V., Rodeck, U., Brunet, A., and Arteaga, C. L. Transforming growth factor β enhances epithelial cell survival via Akt-dependent regulation of FKHRL1. *Mol Biol Cell* **12**, 3328-3339, 2001
31. Sánchez-Capelo, A. Dual role for TGF- β 1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 15-34, 2005
32. Gingery, A., Bradley, E. W., Pederson, L., Ruan, M., Horwood, N. J., and Oursler, M. J. TGF- β coordinately activates TAK1/MEK/AKT/NF κ B and SMAD pathways to promote osteoclast survival. *Exp Cell Res* **314**, 2725-2738, 2008
33. Ehata, S., Hanyu, A., Hayashi, M., Aburatani, H., Kato, Y., Fujime, M., Saitoh, M., Miyazawa, K., Imamura, T., and Miyazono, K. Transforming growth factor- β

- promotes survival of mammary carcinoma cells through induction of antiapoptotic transcription factor DEC1. *Cancer Res* **67**, 9694-9703, 2007
34. Bouillet, P., and Strasser, A. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* **115**, 1567-1574, 2002
35. Lomonosova, E., and Chinnadurai, G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* **27 Suppl 1**, S2-19, 2008
36. Cory, S., and Adams, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**, 647-656, 2002
37. Labi, V., Erlacher, M., Kiessling, S., and Villunger, A. BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. *Cell Death Differ* **13**, 1325-1338, 2006
38. Mestre-Escorihuela, C., Rubio-Moscardo, F., Richter, J., Siebert, R., Climent, J., Fresquet, V., Beltran, E., Agirre, X., Marugan, I., Marín, M., Rosenwald, A., Sugimoto, K., Wheat, L., Karran, E., García, J., Sanchez, L., Prosper, F., Staudt, L., Pinkel, D., Dyer, M., and Martinez-Climent, J. Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood* **109**, 271-280, 2007
39. Zantl, N., Weirich, G., Zall, H., Seiffert, B., Fischer, S., Kirschnek, S., Hartmann, C., Fritsch, R., Gillissen, B., Daniel, P., and Häcker, G. Frequent loss of expression of the

- pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma: evidence for contribution to apoptosis resistance. *Oncogene* **26**, 7038-7048, 2007
40. Karaman, M. W., Herrgard, S., Treiber, D. K., Gallant, P., Atteridge, C. E., Campbell, B. T., Chan, K. W., Ciceri, P., Davis, M. I., Edeen, P. T., Faraoni, R., Floyd, M., Hunt, J. P., Lockhart, D. J., Milanov, Z. V., Morrison, M. J., Pallares, G., Patel, H. K., Pritchard, S., Wodicka, L. M., and Zarrinkar, P. P. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* **26**, 127-132, 2008
41. Harada, H., Quearry, B., Ruiz-Vela, A., and Korsmeyer, S. J. Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15313-15317, 2004
42. Cai, B., and Xia, Z. p38 MAP kinase mediates arsenite-induced apoptosis through FOXO3a activation and induction of Bim transcription. *Apoptosis* **13**, 803-810, 2008
43. Ramesh, S., Qi, X. J., Wildey, G. M., Robinson, J., Molkenin, J., Letterio, J., and Howe, P. H. TGF β -mediated BIM expression and apoptosis are regulated through SMAD3-dependent expression of the MAPK phosphatase MKP2. *EMBO Rep* **9**, 990-997, 2008
44. Rahmani, M., Anderson, A., Habibi, J. R., Crabtree, T. R., Mayo, M., Harada, H., Ferreira-Gonzalez, A., Dent, P., and Grant, S. The BH3-only protein Bim plays a

- critical role in leukemia cell death triggered by concomitant inhibition of the PI3K/Akt and MEK/ERK1/2 pathways. *Blood* **114**, 4507-4516, 2009
45. Kume, T., Deng, K., Winfrey, V., Gould, D., Walter, M., and Hogan, B. The forkhead/winged helix gene *Mf1* is disrupted in the pleiotropic mouse mutation congenital hydrocephalus. *Cell* **93**, 985-996, 1998
46. Yingling, J., Blanchard, K., and Sawyer, J. Development of TGF- β signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 1011-1022, 2004
47. Bandyopadhyay, A., Agyin, J. K., Wang, L., Tang, Y., Lei, X., Story, B. M., Cornell, J. E., Pollock, B. H., Mundy, G. R., and Sun, L. Z. Inhibition of pulmonary and skeletal metastasis by a transforming growth factor- β type I receptor kinase inhibitor. *Cancer Res* **66**, 6714-6721, 2006
48. Ge, R., Rajeev, V., Ray, P., Lattime, E., Rittling, S., Medicherla, S., Protter, A., Murphy, A., Chakravarty, J., Dugar, S., Schreiner, G., Barnard, N., and Reiss, M. Inhibition of growth and metastasis of mouse mammary carcinoma by selective inhibitor of transforming growth factor- β type I receptor kinase in vivo. *Clin Cancer Res* **12**, 4315-4330, 2006
49. Ehata, S., Hanyu, A., Fujime, M., Katsuno, Y., Fukunaga, E., Goto, K., Ishikawa, Y., Nomura, K., Yokoo, H., Shimizu, T., Ogata, E., Miyazono, K., Shimizu, K., and Imamura, T. Ki26894, a novel transforming growth factor- β type I receptor kinase

- inhibitor, inhibits in vitro invasion and in vivo bone metastasis of a human breast cancer cell line. *Cancer Sci* **98**, 127-133, 2007
50. Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D. C., Tarlinton, D. M., Kay, T. W., Köntgen, F., Adams, J. M., and Strasser, A. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* **286**, 1735-1738, 1999
51. Akiyama, T., Dass, C. R., and Choong, P. F. Bim-targeted cancer therapy: a link between drug action and underlying molecular changes. *Mol Cancer Ther* **8**, 3173-3180, 2009
52. Woods, N. T., Yamaguchi, H., Lee, F. Y., Bhalla, K. N., and Wang, H. G. Anoikis, initiated by Mcl-1 degradation and Bim induction, is deregulated during oncogenesis. *Cancer Res* **67**, 10744-10752, 2007
53. Piñon, J. D., Labi, V., Egle, A., and Villunger, A. Bim and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease. *Oncogene* **27 Suppl 1**, S41-52, 2008
54. Berry, F. B., Saleem, R. A., and Walter, M. A. FOXC1 transcriptional regulation is mediated by N- and C-terminal activation domains and contains a phosphorylated transcriptional inhibitory domain. *J Biol Chem* **277**, 10292-10297, 2002
55. Kidson, S., Kume, T., Deng, K., Winfrey, V., and Hogan, B. The forkhead/winged-helix gene, Mf1, is necessary for the normal development of the

- cornea and formation of the anterior chamber in the mouse eye. *Dev Biol* **211**, 306-322, 1999
56. Aldinger, K. A., Lehmann, O. J., Hudgins, L., Chizhikov, V. V., Bassuk, A. G., Ades, L. C., Krantz, I. D., Dobyms, W. B., and Millen, K. J. FOXC1 is required for normal cerebellar development and is a major contributor to chromosome 6p25.3 Dandy-Walker malformation. *Nat Genet* **41**, 1037-1042, 2009
57. Ittner, L. M., Wurdak, H., Schwerdtfeger, K., Kunz, T., Ille, F., Leveen, P., Hjalt, T. A., Suter, U., Karlsson, S., Hafezi, F., Born, W., and Sommer, L. Compound developmental eye disorders following inactivation of TGF β signaling in neural-crest stem cells. *J Biol* **4**, 11, 2005
58. Zhou, Y., Kato, H., Asanoma, K., Kondo, H., Arima, T., Kato, K., Matsuda, T., and Wake, N. Identification of FOXC1 as a TGF- β 1 responsive gene and its involvement in negative regulation of cell growth. *Genomics* **80**, 465-472, 2002
59. Bloushtain-Qimron, N., Yao, J., Snyder, E. L., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Mani, S. A., Hu, M., Chen, H., Ustyansky, V., Antosiewicz, J. E., Argani, P., Halushka, M. K., Thomson, J. A., Pharoah, P., Porgador, A., Sukumar, S., Parsons, R., Richardson, A. L., Stampfer, M. R., Gelman, R. S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., and Polyak, K. Cell type-specific DNA methylation patterns in the human breast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14076-14081, 2008

60. Dejeux, E., Rønneberg, J. A., Solvang, H., Bukholm, I., Geisler, S., Aas, T., Gut, I. G., Børresen-Dale, A. L., Lønning, P. E., Kristensen, V. N., and Tost, J. DNA methylation profiling in doxorubicin treated primary locally advanced breast tumours identifies novel genes associated with survival and treatment response. *Mol Cancer* **9**, 68, 2010
61. Ray, P. S., Wang, J., Qu, Y., Sim, M. S., Shamonki, J., Bagaria, S. P., Ye, X., Liu, B., Elashoff, D., Hoon, D. S., Walter, M. A., Martens, J. W., Richardson, A. L., Giuliano, A. E., and Cui, X. FOXC1 is a potential prognostic biomarker with functional significance in basal-like breast cancer. *Cancer Res* **70**, 3870-3876, 2010
62. Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., and Dick, J. E. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645-648, 1994
63. Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L., and Wahl, G. M. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* **66**, 9339-9344, 2006
64. Ebben, J. D., Treisman, D. M., Zorniak, M., Kutty, R. G., Clark, P. A., and Kuo, J. S. The cancer stem cell paradigm: a new understanding of tumor development and treatment. *Expert Opin Ther Targets* **14**, 621-632, 2010

65. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3983-3988, 2003
66. O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J. E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**, 106-110, 2007
67. Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111-115, 2007
68. Li, C., Heidt, D., Dalerba, P., Burant, C., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M., and Simeone, D. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* **67**, 1030-1037, 2007
69. Schatton, T., Murphy, G. F., Frank, N. Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A. M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L. M., Weishaupt, C., Fuhlbrigge, R. C., Kupper, T. S., Sayegh, M. H., and Frank, M. H. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* **451**, 345-349, 2008
70. Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., and Maitland, N. J. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* **65**, 10946-10951, 2005

71. Prince, M. E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G. T., Kaplan, M. J., Dalerba, P., Weissman, I. L., Clarke, M. F., and Ailles, L. E. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 973-978, 2007
72. Yang, Z. F., Ho, D. W., Ng, M. N., Lau, C. K., Yu, W. C., Ngai, P., Chu, P. W., Lam, C. T., Poon, R. T., and Fan, S. T. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* **13**, 153-166, 2008
73. Rasheed, Z. A., Yang, J., Wang, Q., Kowalski, J., Freed, I., Murter, C., Hong, S. M., Koorstra, J. B., Rajeshkumar, N. V., He, X., Goggins, M., Iacobuzio-Donahue, C., Berman, D. M., Laheru, D., Jimeno, A., Hidalgo, M., Maitra, A., and Matsui, W. Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* **102**, 340-351, 2010
74. Zhou, S., Schuetz, J. D., Bunting, K. D., Colapietro, A. M., Sampath, J., Morris, J. J., Lagutina, I., Grosveld, G. C., Osawa, M., Nakauchi, H., and Sorrentino, B. P. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* **7**, 1028-1034, 2001
75. Hirschmann-Jax, C., Foster, A. E., Wulf, G. G., Nuchtern, J. G., Jax, T. W., Gobel, U., Goodell, M. A., and Brenner, M. K. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**,

14228-14233, 2004

76. Marcato, P., Dean, C. A., Giacomantonio, C. A., and Lee, P. W. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle* **10**, 1378-1384, 2011
77. Russo, J. E., and Hilton, J. Characterization of cytosolic aldehyde dehydrogenase from cyclophosphamide resistant L1210 cells. *Cancer Res* **48**, 2963-2968, 1988
78. Jones, R. J., Barber, J. P., Vala, M. S., Collector, M. I., Kaufmann, S. H., Ludeman, S. M., Colvin, O. M., and Hilton, J. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood* **85**, 2742-2746, 1995
79. Armstrong, L., Stojkovic, M., Dimmick, I., Ahmad, S., Stojkovic, P., Hole, N., and Lako, M. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells* **22**, 1142-1151, 2004
80. Hess, D. A., Wirthlin, L., Craft, T. P., Herrbrich, P. E., Hohm, S. A., Lahey, R., Eades, W. C., Creer, M. H., and Nolta, J. A. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood* **107**, 2162-2169, 2006
81. Hess, D. A., Craft, T. P., Wirthlin, L., Hohm, S., Zhou, P., Eades, W. C., Creer, M. H., Sands, M. S., and Nolta, J. A. Widespread nonhematopoietic tissue distribution by

- transplanted human progenitor cells with high aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells* **26**, 611-620, 2008
82. Pearce, D. J., Taussig, D., Simpson, C., Allen, K., Rohatiner, A. Z., Lister, T. A., and Bonnet, D. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells* **23**, 752-760, 2005
83. Chute, J. P., Muramoto, G. G., Whitesides, J., Colvin, M., Safi, R., Chao, N. J., and McDonnell, D. P. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11707-11712, 2006
84. Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C. G., Liu, S., Schott, A., Hayes, D., Birnbaum, D., Wicha, M. S., and Dontu, G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* **1**, 555-567, 2007
85. Jiang, F., Qiu, Q., Khanna, A., Todd, N. W., Deepak, J., Xing, L., Wang, H., Liu, Z., Su, Y., Stass, S. A., and Katz, R. L. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res* **7**, 330-338, 2009
86. Ma, S., Chan, K. W., Lee, T. K., Tang, K. H., Wo, J. Y., Zheng, B. J., and Guan, X. Y. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations.

- Mol Cancer Res* **6**, 1146-1153, 2008
87. Huang, E. H., Hynes, M. J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., Fields, J. Z., Wicha, M. S., and Boman, B. M. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* **69**, 3382-3389, 2009
88. Katsuno, Y., Ehata, S., Yashiro, M., Yanagihara, K., Hirakawa, K., and Miyazono, K. Coordinated expression of REG4 and aldehyde dehydrogenase 1 regulating tumourigenic capacity of diffuse-type gastric carcinoma-initiating cells is inhibited by TGF- β . *J Pathol* **228**, 391-404, 2012
89. Ohi, Y., Umekita, Y., Yoshioka, T., Souda, M., Rai, Y., Sagara, Y., and Tanimoto, A. Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Histopathology* **59**, 776-780, 2011
90. Warshaw, A. L., and Fernández-del Castillo, C. Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med* **326**, 455-465, 1992
91. Ahrendt, S. A., and Pitt, H. A. Surgical management of pancreatic cancer. *Oncology (Williston Park)* **16**, 725-734, 2002
92. Bardeesy, N., and DePinho, R. A. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* **2**, 897-909, 2002
93. Koorstra, J. B., Hustinx, S. R., Offerhaus, G. J., and Maitra, A. Pancreatic

- carcinogenesis. *Pancreatology* **8**, 110-125, 2008
94. Blackford, A., Serrano, O. K., Wolfgang, C. L., Parmigiani, G., Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C., Leary, R. J., Eshleman, J. R., Goggins, M., Jaffee, E. M., Iacobuzio-Donahue, C. A., Maitra, A., Cameron, J. L., Olino, K., Schulick, R., Winter, J., Herman, J. M., Laheru, D., Klein, A. P., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., and Hruban, R. H. SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **15**, 4674-4679, 2009
95. Russo, J. E., Haugwitz, D., and Hilton, J. Inhibition of mouse cytosolic aldehyde dehydrogenase by 4-(diethylamino)benzaldehyde. *Biochem Pharmacol* **37**, 1639-1642, 1988
96. Carbone, C., and Melisi, D. NF- κ B as a target for pancreatic cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* **16 Suppl 2**, S1-10, 2012
97. Suzuki, A., Shibata, T., Shimada, Y., Murakami, Y., Horii, A., Shiratori, K., Hirohashi, S., Inazawa, J., and Imoto, I. Identification of SMURF1 as a possible target for 7q21.3-22.1 amplification detected in a pancreatic cancer cell line by in-house array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci* **99**, 986-994, 2008
98. Patel, M., and Yang, S. Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev* **6**, 367-380, 2010
99. Lu, Y., Zhu, H., Shan, H., Lu, J., Chang, X., Li, X., Fan, X., Zhu, S., Wang, Y., Guo,

- Q., Wang, L., Huang, Y., Zhu, M., and Wang, Z. Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* **340**, 113-123, 2013
100. Hermann, P., Huber, S., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J., Guba, M., Bruns, C., and Heeschen, C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* **1**, 313-323, 2007
101. Ishizawa, K., Rasheed, Z. A., Karisch, R., Wang, Q., Kowalski, J., Susky, E., Pereira, K., Karamboulas, C., Moghal, N., Rajeshkumar, N. V., Hidalgo, M., Tsao, M., Ailles, L., Waddell, T. K., Maitra, A., Neel, B. G., and Matsui, W. Tumor-initiating cells are rare in many human tumors. *Cell Stem Cell* **7**, 279-282, 2010
102. Mao, P., Joshi, K., Li, J., Kim, S. H., Li, P., Santana-Santos, L., Luthra, S., Chandran, U. R., Benos, P. V., Smith, L., Wang, M., Hu, B., Cheng, S. Y., Sobol, R. W., and Nakano, I. Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 8644-8649, 2013
103. Penchev, V. R., Rasheed, Z. A., Maitra, A., and Matsui, W. Heterogeneity and targeting of pancreatic cancer stem cells. *Clin Cancer Res* **18**, 4277-4284, 2012
104. Woodford-Richens, K. L., Rowan, A. J., Poulsom, R., Bevan, S., Salovaara, R., Aaltonen, L. A., Houlston, R. S., Wright, N. A., and Tomlinson, I. P. Comprehensive

- analysis of SMAD4 mutations and protein expression in juvenile polyposis: evidence for a distinct genetic pathway and polyp morphology in SMAD4 mutation carriers. *Am J Pathol* **159**, 1293-1300, 2001
105. Takaku, K., Miyoshi, H., Matsunaga, A., Oshima, M., Sasaki, N., and Taketo, M. M. Gastric and duodenal polyps in Smad4 (Dpc4) knockout mice. *Cancer Res* **59**, 6113-6117, 1999
106. Miyaki, M., Iijima, T., Konishi, M., Sakai, K., Ishii, A., Yasuno, M., Hishima, T., Koike, M., Shitara, N., Iwama, T., Utsunomiya, J., Kuroki, T., and Mori, T. Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* **18**, 3098-3103, 1999
107. Maitra, A., Molberg, K., Albores-Saavedra, J., and Lindberg, G. Loss of Dpc4 expression in colonic adenocarcinomas correlates with the presence of metastatic disease. *Am J Pathol* **157**, 1105-1111, 2000
108. Takaku, K., Oshima, M., Miyoshi, H., Matsui, M., Seldin, M. F., and Taketo, M. M. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell* **92**, 645-656, 1998
109. Ohtaki, N., Yamaguchi, A., Goi, T., Fukaya, T., Takeuchi, K., Katayama, K., Hirose, K., and Urano, T. Somatic alterations of the DPC4 and Madr2 genes in colorectal cancers and relationship to metastasis. *Int J Oncol* **18**, 265-270, 2001

110. Xie, W., Bharathy, S., Kim, D., Haffty, B. G., Rimm, D. L., and Reiss, M. Frequent alterations of Smad signaling in human head and neck squamous cell carcinomas: a tissue microarray analysis. *Oncol Res* **14**, 61-73, 2003
111. Bardeesy, N., Cheng, K. H., Berger, J. H., Chu, G. C., Pahler, J., Olson, P., Hezel, A. F., Horner, J., Lauwers, G. Y., Hanahan, D., and DePinho, R. A. Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev* **20**, 3130-3146, 2006
112. Xu, X., Ehdaie, B., Ohara, N., Yoshino, T., and Deng, C. X. Synergistic action of Smad4 and Pten in suppressing pancreatic ductal adenocarcinoma formation in mice. *Oncogene* **29**, 674-686, 2010
113. Zhao, S., Ammanamanchi, S., Brattain, M., Cao, L., Thangasamy, A., Wang, J., and Freeman, J. W. Smad4-dependent TGF- β signaling suppresses RON receptor tyrosine kinase-dependent motility and invasion of pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* **283**, 11293-11301, 2008
114. Duda, D. G., Sunamura, M., Lefter, L. P., Furukawa, T., Yokoyama, T., Yatsuoka, T., Abe, T., Inoue, H., Motoi, F., Egawa, S., Matsuno, S., and Horii, A. Restoration of SMAD4 by gene therapy reverses the invasive phenotype in pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene* **22**, 6857-6864, 2003
115. Dylla, S. J., Beviglia, L., Park, I. K., Chartier, C., Raval, J., Ngan, L., Pickell, K.,

- Aguilar, J., Lazetic, S., Smith-Berdan, S., Clarke, M. F., Hoey, T., Lewicki, J., and Gurney, A. L. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One* **3**, e2428, 2008
116. Muramoto, G. G., Russell, J. L., Safi, R., Salter, A. B., Himburg, H. A., Daher, P., Meadows, S. K., Doan, P., Storms, R. W., Chao, N. J., McDonnell, D. P., and Chute, J. P. Inhibition of aldehyde dehydrogenase expands hematopoietic stem cells with radioprotective capacity. *Stem Cells* **28**, 523-534, 2010
117. Elizondo, G., Corchero, J., Sterneck, E., and Gonzalez, F. J. Feedback inhibition of the retinaldehyde dehydrogenase gene ALDH1 by retinoic acid through retinoic acid receptor α and CCAAT/enhancer-binding protein β . *J Biol Chem* **275**, 39747-39753, 2000
118. Elizondo, G., Medina-Diaz, I. M., Cruz, R., Gonzalez, F. J., and Vega, L. Retinoic acid modulates retinaldehyde dehydrogenase 1 gene expression through the induction of GADD153-C/EBP β interaction. *Biochem Pharmacol* **77**, 248-257, 2009
119. Wang, X., Lu, H., Li, T., Yu, L., Liu, G., Peng, X., and Zhao, J. Kruppel-like factor 8 promotes tumorigenic mammary stem cell induction by targeting miR-146a. *Am J Cancer Res* **3**, 356-373, 2013
120. Mu, X., Isaac, C., Greco, N., Huard, J., and Weiss, K. Notch Signaling is Associated with ALDH Activity and an Aggressive Metastatic Phenotype in Murine

- Osteosarcoma Cells. *Front Oncol* **3**, 143, 2013
121. Moreb, J., Zucali, J. R., Zhang, Y., Colvin, M. O., and Gross, M. A. Role of aldehyde dehydrogenase in the protection of hematopoietic progenitor cells from 4-hydroperoxycyclophosphamide by interleukin 1 β and tumor necrosis factor. *Cancer Res* **52**, 1770-1774, 1992
122. Moreb, J. S., Turner, C., Sreerama, L., Zucali, J. R., Sladek, N. E., and Schweder, M. Interleukin-1 and tumor necrosis factor α induce class 1 aldehyde dehydrogenase mRNA and protein in bone marrow cells. *Leuk Lymphoma* **20**, 77-84, 1995
123. Omary, M. B., Lugea, A., Lowe, A. W., and Pandol, S. J. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest* **117**, 50-59, 2007
124. Ehata, S., Johansson, E., Katayama, R., Koike, S., Watanabe, A., Hoshino, Y., Katsuno, Y., Komuro, A., Koinuma, D., Kano, M. R., Yashiro, M., Hirakawa, K., Aburatani, H., Fujita, N., and Miyazono, K. Transforming growth factor- β decreases the cancer-initiating cell population within diffuse-type gastric carcinoma cells. *Oncogene* **30**, 1693-1705, 2011
125. Schober, M., and Fuchs, E. Tumor-initiating stem cells of squamous cell carcinomas and their control by TGF- β and integrin/focal adhesion kinase (FAK) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 10544-10549, 2011
126. Tang, B., Yoo, N., Vu, M., Mamura, M., Nam, J. S., Ooshima, A., Du, Z., Desprez, P.

- Y., Anver, M. R., Michalowska, A. M., Shih, J., Parks, W. T., and Wakefield, L. M. Transforming growth factor- β can suppress tumorigenesis through effects on the putative cancer stem or early progenitor cell and committed progeny in a breast cancer xenograft model. *Cancer Res* **67**, 8643-8652, 2007
127. Peñuelas, S., Anido, J., Prieto-Sánchez, R. M., Folch, G., Barba, I., Cuartas, I., García-Dorado, D., Poca, M. A., Sahuquillo, J., Baselga, J., and Seoane, J. TGF- β increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell* **15**, 315-327, 2009
128. Ikushima, H., Todo, T., Ino, Y., Takahashi, M., Miyazawa, K., and Miyazono, K. Autocrine TGF- β signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* **5**, 504-514, 2009
129. Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., and Weinberg, R. A. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704-715, 2008
130. Scheel, C., Eaton, E. N., Li, S. H., Chaffer, C. L., Reinhardt, F., Kah, K. J., Bell, G., Guo, W., Rubin, J., Richardson, A. L., and Weinberg, R. A. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* **145**, 926-940, 2011

131. Cao, L., Shao, M., Schilder, J., Guise, T., Mohammad, K. S., and Matei, D. Tissue transglutaminase links TGF- β , epithelial to mesenchymal transition and a stem cell phenotype in ovarian cancer. *Oncogene* **31**, 2521-2534, 2012
132. Lonardo, E., Hermann, P. C., Mueller, M. T., Huber, S., Balic, A., Miranda-Lorenzo, I., Zagorac, S., Alcala, S., Rodriguez-Arabaolaza, I., Ramirez, J. C., Torres-Ruíz, R., Garcia, E., Hidalgo, M., Cebrián, D., Heuchel, R., Löhr, M., Berger, F., Bartenstein, P., Aicher, A., and Heeschen, C. Nodal/Activin signaling drives self-renewal and tumorigenicity of pancreatic cancer stem cells and provides a target for combined drug therapy. *Cell Stem Cell* **9**, 433-446, 2011
133. Koinuma, D., Tsutsumi, S., Kamimura, N., Imamura, T., Aburatani, H., and Miyazono, K. Promoter-wide analysis of Smad4 binding sites in human epithelial cells. *Cancer Sci* **100**, 2133-2142, 2009
134. Hanai, J., Chen, L. F., Kanno, T., Ohtani-Fujita, N., Kim, W. Y., Guo, W. H., Imamura, T., Ishidou, Y., Fukuchi, M., Shi, M. J., Stavnezer, J., Kawabata, M., Miyazono, K., and Ito, Y. Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline C α promoter. *J Biol Chem* **274**, 31577-31582, 1999
135. Verschueren, K., Remacle, J. E., Collart, C., Kraft, H., Baker, B. S., Tylzanowski, P., Nelles, L., Wuytens, G., Su, M. T., Bodmer, R., Smith, J. C., and Huylebroeck, D.

SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J Biol Chem* **274**, 20489-20498, 1999

謝辞

本研究を行うにあたり、多大な御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻分子病理学分野の宮園浩平教授に厚く御礼申し上げます。また、研究全般において終始御指導、御助言をいただきました分子病理学分野の江幡正悟助教に心から御礼申し上げます。膵癌における遺伝子転写制御機構の解析にあたり御指導いただきました分子病理学分野の鯉沼代造准教授に深く感謝致します。腫瘍組織の解析にあたり御協力いただきました分子病理学分野の森下保幸技術専門員、東京大学医学部附属病院肝胆膵外科の青木琢講師、国土典宏教授に深く感謝致します。本研究で使用したプラスミドや阻害剤をいただきました理研バイオリソースセンター細胞運命情報解析技術開発サブチームの三好浩之博士、京都薬科大学創薬科学フロンティア研究センターの野出学教授に深く御礼申し上げます。研究遂行にあたり、多くの御支援をいただき、研究面から日常生活に至るまで大変お世話になりました分子病理学分野の皆様心から感謝申し上げます。

最後に、博士課程入学より温かく見守り、支えてくださった両親に深く感謝致します。