

論文の内容の要旨

論文題目 癌の進展における TGF- β シグナルの機能解析

星野佑香梨

Transforming growth factor (TGF)- β は TGF- β ファミリーに属するサイトカインである。TGF- β は、多くの細胞応答の制御を担っており、癌の進行においては二面的な役割を持つ。癌の初期においては、TGF- β は癌細胞の細胞増殖を抑制し、腫瘍抑制因子として機能する。一方で、進行期の癌に対しては、癌細胞の運動・浸潤の亢進や Epithelial-mesenchymal transition (EMT)を誘導し、癌の転移を促進するなど、腫瘍促進因子として作用する。本研究では乳癌、膀胱癌の二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 の作用を調べることにした。

1) 乳癌細胞のアポトーシス回避における TGF- β の役割

転移の成立には癌細胞がアポトーシス耐性を獲得することが重要である。一部の癌細胞では TGF- β が抗アポトーシス作用を示すことが報告されており、本研究では、マウス乳癌細胞を用いて、TGF- β によるアポトーシス制御機構を解明することを試みた。

本研究では JygMC(A)細胞、JygMC(B)細胞、4T1 細胞を用いており、これらの細胞は自己分泌的に TGF- β を産生していることを確認した。また無血清条件下で TGF- β I 型受容体キナーゼ阻害剤 SB431542 により内因性の TGF- β シグナルを阻害するとアポトーシスが誘導され、乳癌細胞では TGF- β がアポトーシス耐性を獲得させていることが分かった。

次に、Microarray 解析を行い、乳癌細胞における TGF- β の標的遺伝子を網羅的に検索したところ、JygMC(A)細胞では TGF- β シグナルの阻害によりアポトーシスの実行因子である Bim の発現が誘導されることが分かった。Bim 発現をノックダウンした JygMC(A)細胞では、SB431542 によるアポトーシスの誘導が抑制されることから、JygMC(A)細胞のアポトーシスには、TGF- β による Bim の発現制御が重要であると考えられた。

さらに Microarray のデータセットを再解析したところ、TGF- β で発現が減少する遺伝子のなかに転写因子 *Foxc1* が含まれていることが分かった。TGF- β による *Foxc1* の発現低下は Bim の発現低下に先行しており、*Foxc1* のノックダウンで SB431542 誘導性の Bim

発現誘導がキャンセルされたことから、TGF- β の下流で Foxc1 が Bim 発現を制御している可能性が示唆された。さらに、Foxc1 ノックダウン細胞では SB431542 誘導性のアポトーシスが抑制されたことから、Foxc1 が TGF- β の下流で Bim の発現を制御することで、アポトーシスを制御するという新たな機能が明らかとなった。

Foxc1 は発生時に重要な役割を果たすことが知られているが、癌における機能や TGF- β シグナルとの関連に関しては未解明な部分が多く、本研究で明らかとなった TGF- β -Foxc1-Bim-アポトーシス経路は癌の制御に新たな知見を与えるものであると考えられた。

2) 膵癌幹細胞の維持における TGF- β の役割

癌幹細胞は癌の転移や再発に深く関与すると考えられており、CD133、CD44、CD24、Epithelial cell adhesion molecule (EPCAM)、Aldehyde dehydrogenase (ALDH)1 などの癌幹細胞マーカーを発現していることが知られている。特に膵癌などの予後不良の癌においては、この癌幹細胞を制御することが、癌の根本的な治療の開発につながると考えられ、注目されている。近年、TGF- β はグリオーマや乳癌、胃癌の癌幹細胞の制御に関与しているとする報告がなされており、膵癌においても TGF- β シグナルによる癌幹細胞の制御の可能性が否定できない。特に、膵癌発症の後期過程では TGF- β シグナルの主な伝達因子である SMAD4 遺伝子の欠損や喪失が確認されている。本研究では膵癌幹細胞における TGF- β シグナルの機能の解析を行った。

Smad4 を発現するヒト膵癌細胞 SUIT-2 において、Smad4 発現を恒常的にノックダウンしたところ、細胞増殖の速度、アポトーシス誘導性に顕著な変化が見られなかったが、*in vivo* における腫瘍形成能が著しく上昇していることが分かった。同時に Smad4 ノックダウン細胞では未分化性マーカーや ALDH1 の発現が上昇していることが分かった。さらに膵癌組織標本を用いた解析からは、16 病変中 11 病変において Smad4 と ALDH1 の発現に逆相関が確認された。これらのことから Smad4 が膵癌中の ALDH1 陽性細胞 (ALDH1^{hi}細胞)の維持を負に制御していると仮定された。

膵癌細胞から数%の割合で存在する ALDH1^{hi}細胞を分取し培養を行ったところ、ALDH1^{hi}細胞自身を自己複製し、また ALDH1^{hi}細胞にも分化しうることがわかった。さらに、ALDH1^{hi}細胞は *in vitro* におけるコロニー形成能や、*in vivo* における腫瘍形成能が高いことが分かった。さらに、ヒト膵癌細胞 Panc-1 に発現している ALDH1 をノックダウンしたところ、腫瘍形成能が減少した。これらの結果から、ALDH1 は膵癌幹細胞マーカーであり、さらに ALDH1 の発現自体が膵癌幹細胞の造腫瘍活性に直接関与することが分かった。

癌幹細胞の維持には、癌幹細胞ニッチからのシグナルが重要であることが知られている。膵癌においては、癌細胞を取り巻く微小環境から TGF- β が産生されていることから、癌幹細胞の維持において、Smad4 依存的にシグナルが伝達される TGF- β や BMP が何ら

かの機能をもつことが予想された。Smad4 を発現する複数の膵癌細胞に TGF- β や BMP による刺激を行ったところ、TGF- β により ALDH1 発現や ALDH1 活性が低下した。一方で、BMP では一定した傾向が明らかではなかったため、膵癌細胞においては TGF- β がより強く ALDH1 の発現および活性を制御することが示唆された。さらに *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ところ、これらの膵癌細胞では *ALDH1A1* ゲノムに対して Smad4 が TGF- β 依存的に直接的に結合することが明らかになった。さらに、luciferase assay により、TGF- β による promoter 活性の変化を検討したところ、*ALDH1A1* ゲノムの下流領域をトランスフェクションした細胞では、TGF- β 刺激による promoter 活性が減少していることが分かった。

以上の結果から、膵癌細胞では TGF- β の下流で Smad4 が *ALDH1A1* ゲノムに直接的に結合することでその発現を制御し、膵癌幹細胞の維持が負に制御されている可能性が示唆された。本研究などにより、膵癌幹細胞の特性がより解明され、未だ根本的な治療の乏しい膵癌に対する新たな治療法の確立がすすむことが望まれる。