

Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ は初期の癌細胞に対して細胞増殖抑制作用を示し、腫瘍抑制因子として機能するが、進行期の癌細胞に対しては運動能・浸潤能を促進させるなど、腫瘍促進因子として機能する。このような TGF- $\beta$ の二面性が何に起因するかについてはこれまで未解明であり、本研究では乳癌と膵癌に着目し、それぞれの癌細胞における TGF- $\beta$ の機能解析を試みた。

#### 乳癌のアポトーシス回避における TGF- $\beta$ の役割

1. TGF- $\beta$  I 型受容体キナーゼ阻害剤である SB431542 により、TGF- $\beta$ シグナルの伝達因子である Smad2 のリン酸化の減弱、および TGF- $\beta$ の代表的な標的遺伝子である Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1; *Serpine1*)の発現低下を認めたことからマウス乳癌細胞では内在性の TGF- $\beta$ シグナルが存在することが示唆された。無血清条件下で内在性 TGF- $\beta$ シグナルを阻害すると、アポトーシスが誘導されることが分かり、内在性の TGF- $\beta$ シグナルが乳癌細胞の生存を促進する可能性が示唆された。
2. Microarray 解析により、TGF- $\beta$ シグナルによって発現が制御されるアポトーシス制御因子の探索を行ったところ、TGF- $\beta$ シグナル阻害により発現誘導される遺伝子群の中に BCL2-like 11 (Bcl2l11; *Bim*)が含まれていた。siRNA を用いて *Bim* 発現をノックダウンすると、SB431542 によって誘導されるアポトーシスがキャンセルされたことから、TGF- $\beta$ シグナル阻害によるアポトーシスには *Bim* の発現誘導が中心的な役割を担っていることが分かった。
3. さらに TGF- $\beta$ による *Bim* の転写制御機構の解析を行った。Cycloheximide を用いた実験により、TGF- $\beta$ による *Bim* の発現制御には転写因子の介在があると想定された。そこで再び Microarray データを解析し、TGF- $\beta$ によって *Bim* より早期に発現制御を受ける遺伝子の探索を行ったところ、17 種の遺伝子が同定でき、その中に DNA 結合能を有するタンパクとして Forkhead box C1 (*Foxc1*)が含まれていた。siRNA により *Foxc1* 発現をノックダウンすると、*Bim* の発現も抑制され、SB431542 により誘導されるアポトーシスも抑制することが分かった。

以上より、マウス乳癌細胞は TGF- $\beta$ を自己分泌することにより、アポトーシスを回避しており、これには *Bim* の発現抑制が重要であることが示唆された。さらに、*Bim* の発

現制御を担う転写因子として *Foxc1* を同定し、*Foxc1* がアポトーシスも制御するという新たな機能を明らかにした。このシグナルは SB431542 により効果的に阻害されることから、今後の乳癌治療における新たな分子標的の解明に重要な貢献をされると考えられる。

### 膵癌幹細胞の維持における TGF- $\beta$ の役割

1. shRNA により TGF- $\beta$  シグナルの主な伝達因子である Smad4 を恒常的にノックダウンした Panc-1 細胞 (Panc-1-shSMAD4 細胞) を樹立した。この細胞をヌードマウスの皮下に移植すると、コントロール細胞と比較して大きな腫瘍を形成したことから、Smad4 が膵癌の悪性化に寄与している可能性が示唆された。膵癌細胞中には癌幹細胞であると想定される Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)<sup>hi</sup> 細胞が一定の割合で存在しているが、この細胞群が Smad4 ノックダウンにより増加することから、Smad4 が膵癌幹細胞を負に制御する可能性が示唆された。さらに膵癌組織症例を用いた免疫組織化学染色から、Smad4 発現と ALDH1 発現の逆相関が確認できた。
2. Flow cytometry の sorting により膵癌細胞から ALDH1<sup>lo</sup> 細胞と ALDH1<sup>hi</sup> 細胞を分取し、それぞれの癌幹細胞活性を検討したところ、ALDH1<sup>hi</sup> 細胞は高い自己複製能、多分化能、腫瘍形成能を示したことから、ALDH1 が膵癌幹細胞を濃縮するマーカーとして有用であることが分かった。さらに、アイソフォームのひとつである ALDH1A1 を shRNA で恒常的にノックダウンすると、軟寒天中でのコロニー形成能が減弱することが分かり、ALDH1 が膵癌細胞の造腫瘍活性を直接的に制御していることがわかった。
3. さらに膵癌細胞において TGF- $\beta$  による ALDH1 の発現および活性の制御機構の解明を行った。Chromatin immunoprecipitation (ChIP)-qPCR および luciferase assay を行ったところ、TGF- $\beta$  刺激により、Smad4 が *ALDH1A1* ゲノムの上流および下流領域に結合し、転写活性を担っていることが分かった。

以上より、Smad4 を介したシグナル伝達により、TGF- $\beta$  が ALDH1<sup>hi</sup> 膵癌幹細胞を制御し得る可能性、また ALDH1 が膵癌細胞の造腫瘍活性を担っている可能性が示唆された。膵癌症例においては *SMAD4* の変異や欠失が高率に発見されるが、この遺伝子異常によって膵癌幹細胞の制御機構が破綻される、という新たな知見をもたらしたと考えられる。

### 総括

TGF- $\beta$  は、乳癌においては腫瘍促進的に作用し、一方で膵癌においては腫瘍抑制的に作用することが示され、癌の進展において TGF- $\beta$  が相反する作用を有していることが再現された。この二面性は癌の悪性度や発生母地の違いによって説明し得ることが考えられ

た。本研究では異なる種類の癌に対する TGF- $\beta$  の作用を多角的に検討しており、学位の授与に値するものと考えられる。