

論文の内容の要旨

小細胞肺癌における TGF- β シグナルの機能解析

村井 文彦

【背景・目的】

小細胞肺癌は肺癌全体の約 15%を占め、肺癌の中でも予後不良のがんである。一方で、transforming growth factor- β (TGF- β)は細胞の増殖や分化の調節に関わる cytokine であり、がんでは腫瘍抑制的もしくは腫瘍促進的に作用することが知られている。小細胞肺癌の多くの細胞では TGF- β シグナルの伝達に不可欠な TGF- β type II receptor (T β RII)の発現が低下していることが知られているが、TGF- β の機能は全く解明されていない。本研究では、小細胞肺癌における TGF- β の機能の解明、T β RII の発現低下メカニズムの解明、TGF- β の新規標的遺伝子の同定を目的に研究を行った。

【結果】

分子生物学的手法を用いて、小細胞肺癌細胞における TGF- β シグナル伝達の開始により惹き起こされる Smad2 のリン酸化と、TGF- β の標的遺伝子である SMAD7 の発現誘導について評価した。H146 細胞では例外的に Smad2 のリン酸化と SMAD7 の発現誘導が見られたが、H82 細胞、H209 細胞、H345 細胞では Smad2 のリン酸化と SMAD7 の発現誘導は見られなかった。また、TGF- β シグナル因子の発現を解析したところ、H146 細胞では T β RII を code している TGFBR2 の発現が見られたのに対して、H82 細胞、H209 細胞、H345 細胞では低下していた。また、網羅的遺伝子発現解析のデータベースからも、多くの小細胞肺癌細胞や小細胞肺癌組織で TGFBR2 の発現低下が判明した。

次に、TGF- β シグナルの機能を解析することを目的に T β RII の強制発現を行った。T β RII の発現が低下している小細胞肺癌細胞に T β RII を強制発現させた場合に (H82-T β RII 細胞と H345-T β RII 細胞)、TGF- β による apoptosis が誘導され、*in vitro* での細胞増殖が抑制された。また、H82-T β RII 細胞と H345-T β RII 細胞を BALB/c nu/nu マウスに皮下移植を行うと、*in vivo* での腫瘍形成能が抑制された。一方で、H146 細胞に dominant negative 活性を持つ T β RII 変異体を強制発現することで (H146-dnT β RII 細胞)、TGF- β シグナルを遮断すると、TGF- β による *in vitro* での細胞増殖抑制や *in vivo* での腫瘍形成能の抑制がともに減弱された。これらの実験から、TGF- β は apoptosis を介した細胞増殖抑制により、腫瘍抑制的に機能していることが示された。

様々ながん細胞で、*TGFBR2* において変異が導入、もしくは転写が抑制されることで、*TβRII* の機能喪失が起こることが知られている。小細胞肺癌細胞では *TGFBR2* の発現が低下しているが、そのメカニズムについては十分に理解されていない。これまでの小細胞肺癌に関する報告では、*TGFBR2* における変異については、否定的な所見が見られる。このことから、小細胞肺癌における *TGFBR2* の発現低下には、別のメカニズムによる転写抑制があると考え、その同定を行った。網羅的遺伝子発現解析のデータベースの再解析を行ったところ、正常肺上皮細胞や正常肺組織と比べて、分子 X の発現が、小細胞肺癌において上昇していることを認めた。そこで、H345 細胞において X を shRNA で knockdown したところ (H345-shX 細胞)、*TGFBR2* の発現が上昇し TGF-β による Smad2 のリン酸化ならびに *SMAD7* の発現誘導が見られた。以上から、*TβRII* の発現低下には X を介したメカニズムにより惹き起こされていることが示唆された。次に、H345-shX 細胞に TGF-β 刺激を行うと、apoptosis が誘導された。更に、H345-shX 細胞を BALB/c nu/nu マウスに皮下移植を行うと、腫瘍形成能が抑制された。これより、X は *TβRII* の発現を低下させることで、TGF-β による腫瘍抑制作用を減弱していると示唆された。

続いて、TGF-β によって誘導される小細胞肺癌細胞の生存に関わる新規標的遺伝子の同定を行った。H345-*TβRII* 細胞を TGF-β で刺激し抗 Smad2/3 抗体を用いたクロマチン免疫沈降シーケンシングで網羅的に探索した。その中から、遺伝子 Y が TGF-β によって発現制御を受けることを見出した。初めに、遺伝子 Y が TGF-β によって発現制御を受ける生化学的なメカニズムを探索した。H345-*TβRII* 細胞や H146 細胞を用いて TGF-β による Y mRNA の発現変動を見たところ、TGF-β の直接的な標的遺伝子である *SMAD7* の発現変動パターンと類似していた。更に、H345-*TβRII* 細胞に *de novo* タンパク質合成を阻害する cycloheximide (CHX) を用いて、Y が TGF-β の直接的な標的遺伝子か調べた。TGF-β による Y の発現制御に対して CHX は影響を及ぼさなかった。このことから、Y は TGF-β の直接的な標的遺伝子であると示唆された。TGF-β シグナルには Smad 依存的な経路と Smad 非依存的な経路がある。TGF-β による Y の発現制御について、どちらの経路が重要か調べるために H345-*TβRII* 細胞における Smad4 の knockdown を shRNA (shSmad4) を用いて行った。TGF-β による Y の発現誘導は shSmad4 で抑制された。これより、Y は TGF-β によって Smad 依存的な経路で直接的に発現制御を受けることが示唆された。次に、Y の機能を明らかにするために、H345 細胞において shRNA により Y の knockdown を行った。Y の knockdown により、apoptosis の誘導による細胞増殖抑制が見られた。また、H345-*TβRII* 細胞に Y を強制発現したところ、TGF-β による apoptosis が回避された。これより、Y は TGF-β による apoptosis の回避に重要であると考えられた。そして、Y を siRNA により knockdown した細胞を BALB/c nu/nu マウスに皮下移植すると、腫瘍形成能が抑制されたことから、Y の発現抑制が小細胞肺癌の腫瘍形成の抑制に必要であると示唆された。

最後に、ヒト臨床検体を用いた免疫組織化学染色を行った。X の発現は小細胞肺癌細胞で高発現し、他の組織型の肺癌細胞にも発現していたが、小細胞肺癌細胞ほど

高発現ではなかった。正常肺上皮細胞では X はほとんど発現していなかった。また、小細胞肺癌を含めたすべての組織型の肺癌で、TβRII の発現が X の発現と逆相関していたが、Y は小細胞肺癌細胞と大細胞神経内分泌がん細胞の核内に発現が認められた。

【結論】

想定される小細胞肺癌の TGF-β による腫瘍抑制作用には、以下のメカニズムを考えている。正常肺上皮細胞では TβRII の発現が認められるために、TGF-β が Smad 依存的な経路を介して直接的に Y の発現を低下させ、apoptosis を誘導することで異常な細胞増殖を抑制している。しかし、小細胞肺癌細胞においては X が高発現し、TβRII の発現を抑制させている。このため、TGF-β シグナルは破綻し Y の発現が維持され apoptosis が抑制されるために、小細胞肺癌の細胞増殖と腫瘍の進展が惹き起こされると考えられた。本研究から、これらの分子メカニズムを標的とした小細胞肺癌の治療が開発される可能性があると考えられた。