

博士論文

ChIP-Sequencing を用いた TGF- β シグナルの解析

大上智弘

目次

要旨 p.4

第1章 表皮角化細胞における TGF- β 標的遺伝子の探索

序論 p.6

1. 上皮細胞の機能の多様性と疾患
2. TGF- β シグナル伝達機構
3. 表皮角化細胞分化と TGF- β

実験材料と方法 p.14

実験結果 p.22

1. 表皮角化細胞における TGF- β 標的遺伝子の探索
2. C2orf54 の機能解析

考察 p.47

第 2 章 NMuMG 細胞における Smad2/3 の結合領域の解析

序論	p.52
1. EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition、上皮-間葉転換)	
2. TGF- β シグナルによる EMT の誘導	
実験材料と方法	p.56
実験結果	p.60
1. NMuMG 細胞における Smad2/3 の結合領域の解析	
2. RNA-sequencing を用いた TGF- β による遺伝子発現変動の解析	
3. Smad2/3 結合領域におけるモチーフの解析	
考察	p.71
結論	p.75
引用文献	p.76
謝辞	p.85

要旨

本研究では ChIP-sequencing を用いて TGF- β シグナルの下流因子である Smad の転写因子結合部位の網羅的な同定・解析により①表皮角化細胞と②乳腺上皮細胞の上皮間葉転換(EMT)における Smad2/3 のゲノム上の結合領域についての検討を行った。

その結果、表皮角化細胞で新たに同定した C2orf54 は、Involucrin の発現制御をしていることが示唆された。

また、今まで EMT において TGF- β シグナルによる Snail (Snai1), Slug (Snai2)の発現誘導が知られていたが、これらの遺伝子には Smad2/3 の直接の結合は見られず、TGF- β シグナルの下流で Smad ファミリー分子がこれらの EMT 関連因子を直接発現制御しているわけではないことが示唆された。また、Smad2/3 の結合領域のモチーフ解析では転写因子 TEAD が発現変動を制御していることが示唆された。

第 1 章

表皮角化細胞における TGF- β 標的遺伝子の探索

序論

1. 表皮細胞のバリアー機能と疾患

上皮細胞には体表を覆う表皮細胞や管腔臓器の粘膜側を構成する粘膜上皮細胞、内分泌腺を構成する腺細胞や外分泌腺を構成する腺房細胞などが含まれる。なかでも表皮細胞は最大の臓器と言われる皮膚を構成し、生体を外的環境から守り、生体内部組織の恒常性を保ち、形態を維持するという重要なバリアー機能を有している。表皮角化細胞は表皮幹細胞を含む基底層から、有棘層、顆粒層、角質細胞層へと成熟、分化し、最終的に脱落していく。その際、有棘層から顆粒層で分泌されるインボルクリン、ロリクリンがトランスグルタミナーゼの働きにより架橋し、周辺体 (cornified envelope) を構成する。トランスグルタミナーゼはカルシウムイオンにより制御されており^[1]、細胞死に伴うカルシウムイオンの上昇により活性化する。この表皮細胞のバリアー機能が障害されるとアトピー性皮膚炎などを引き起こす。アトピー性皮膚炎の患者数は我が国でも 40 万人弱いるといわれ^[2]、幼児から成人まで多くの患者が苦しんでいる。また、表皮細胞は分化、脱落を繰り返すがこの分化の過程が異常をきたすと尋常性乾癬を引き起こす。乾癬は WHO の報告では全人口の 2-3% に生じているとされる^[3]一般的な疾患であり、表皮細胞の過増殖や角化異常がみられる。このように皮膚のバリアー機能の障害、分化異常により起きる疾患の治療法を探る意味でも表皮角化細胞の分化メカニズムの解明は極めて重要である。そしてこれまでの

報告から、TGF- β ファミリーに属するサイトカインの表皮細胞分化における役割が指摘されている。

2. TGF- β シグナル伝達機構

TGF- β は骨形成因子 (bone morphogenetic protein, BMP)などとともに TGF- β ファミリーと呼ばれる30種類以上のサイトカインの代表的な因子であり、12.5 kDaのポリペプチドがジスルフィド結合した 25 kDa の二量体分子である。哺乳類では TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3 の3種類のアイソフォームが存在し、これらは同じ受容体を用いてシグナルを伝達する^{[4][5][6]}。その機能は細胞分化、増殖抑制やアポトーシスの制御、細胞外マトリックスの産生など多彩である。TGF- β は一般的に上皮系の細胞に対しては細胞増殖抑制的に働くため、がん抑制遺伝子として知られているが、後述の上皮-間葉転換の誘導作用などによりがんの進展を促進する因子としても振舞う。また間葉系細胞に対しては増殖促進的に働き、線維化への関与が考えられている。TGF- β ファミリーのサイトカインは細胞表面にある I 型と II 型のセリンスレオニンキナーゼ型受容体に結合するとそれぞれ 2 量体であった受容体が会合し 4 量体を形成する(図 1)。そして II 型受容体の恒常活性型キナーゼにより I 型受容体のセリンスレオニンキナーゼ領域の GS ドメインがリン酸化を受け細胞内へシグナルを伝達する。細胞内では主として Smad と呼ばれるタンパク質群が TGF- β シグナルを細胞膜から核内へと伝達している^[4]。

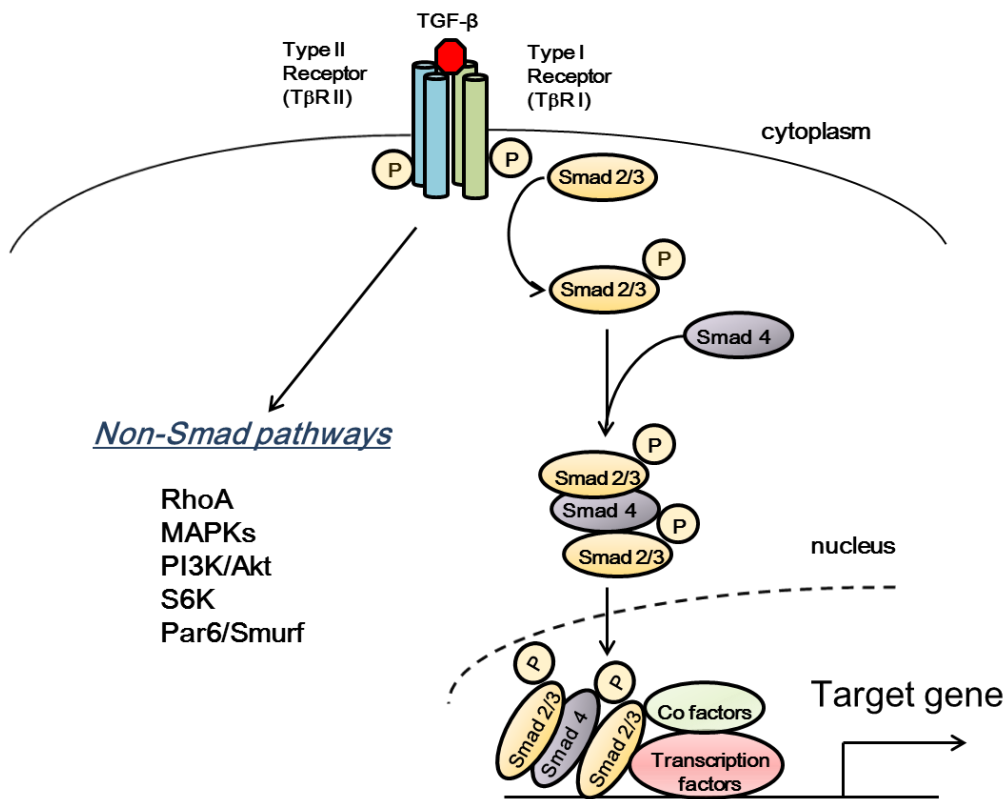


図1 TGF-βシグナルの細胞内伝達機構

TGF-β が受容体に結合すると、それぞれ 2 量体を形成していた I 型受容体と II 型受容体が会合し、四量体となる。そして II 型受容体の恒常活性型キナーゼにより I 型受容体のセリン・スレオニンキナーゼドメインがリン酸化される。そして、Smad がリン酸化され Smad2/3 と Smad4 が 3 量体を形成して核内へ移行し各種遺伝子の転写調節を行う。

哺乳類では8種類の Smad がしられており、機能から3種類に分類されている。

特異型 R-Smad (receptor-regulated Smad)は TGF- β 、activin、nodal の受容体により活性化される Smad2、Smad3 と BMP の受容体で活性化される Smad1, Smad5, Smad8 があり、これらは I 型受容体に直接結合して C 末端にある SSXS モチーフのセリン残基がリン酸化を受け活性化される。ほかに、共有型 Co-Smad (common-mediator Smad)である Smad4、抑制型 I-Smad (inhibitory Smad)である Smad6, Smad7 がある。リン酸化を受けた R-Smad はその N 末端側の構造ドメインである Mad homology 1 (MH1) ドメインと、C 末端側の MH2 ドメインが乖離し、細胞質内に存在する Smad4 と 3 量体を形成して核内へと移行し、種々の転写因子や転写共役因子と結合して標的遺伝子の転写を制御する^{[6],[7]}。Smad 複合体と結合する転写共役因子として p300 や CBP が知られており、これらは転写コアクチベーターとして転写を活性化させる。反対に、c-Ski や SnoN は転写コリプレッサーとして働き、TGF- β シグナルを抑制する^[7]。抑制型 I-Smad である Smad6、Smad7 は I 型受容体に競合的に結合するなど複数の機構でシグナル伝達を阻害する。Smad6 は BMP シグナルのみを、Smad7 は TGF- β シグナルと BMP シグナルの両方を抑制する。これら I-Smad は TGF- β や BMP により発現が誘導されネガティブフィードバックとして働いている^{[8]-[10]}。TGF- β シグナルの異常が腫瘍を引き起こすことも知られている。膵臓がんや若年性大腸がんにおいて Smad4 に遺伝子変異や欠失が存在することが報告されている^{[11]-[13]}。また、II 型

TGF- β 受容体の異常により遺伝性非ポリポーシス性大腸がん (hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC) を引き起こすことも知られている^{[14],[15]}。

このような Smad 依存的なシグナル伝達経路 (Smad pathway)のほかに TGF- β シグナルには Smad 非依存的な伝達経路 (non-Smad pathway) もあり、重要な役割を果たしている。 non-Smad pathway では RhoA、MAPK、PI3K/Akt、S6K などが活性化、不活性化される^[16]。

3. 表皮角化細胞分化と TGF- β

表皮角化細胞の分化においても TGF- β ファミリーシグナルが重要な役割を果たしていることが知られている。トランスジェニックマウスを用いた Sellheyer らの実験では、TGF- β 1 を表皮の有棘層で多く発現しているケラチン 1 のプロモーター制御下に発現させたマウスでは出生後 24 時間で胸壁の機能不全で死に至る^[17]。著者らは薄い表皮と密な角質層、そして表皮の付属器である毛包の減少を報告している。さらに、表皮の基底層で発現しているケラチン 5 のプロモーターで TGF- β 1 を発現させたマウスでは皮膚の分化の早期に TGF- β にさらされることで低形成となり、毛包も閉鎖してしまう^[18]。また、dominant negative の II 型 TGF- β 受容体を発現させたマウスについて、顆粒層で発現するロリクリンのプロモーターで発現させた個体では表皮の低形成が見られるが、より基底層で発現するケラチン 5 のプロモーターで発現させた個体では明らかな表現型の差は出なかった^{[19][20]}。このことは表皮の層構造のなかで TGF- β が作用する時期、

段階に違いがあることを示唆している。また、I-Smad である Smad7 は表皮でも発現している^[21]が、この Smad7 をケラチン 5 のプロモーターで過剰発現させると表皮の過形成と、皮脂腺の増殖を認めた^[22]。このように表皮の増殖、分化に重要な役割を果たす TGF- β であるがマウスを用いた実験では TGF- β ファミリーのシグナル伝達分子である Smad1、Smad2、Smad4、Smad5、Smad6 を欠損したマウスでは妊娠初期から中期にかけて胎生致死となってしまう、解析に困難を伴う。しかし、Smad3 欠損マウスでは胎生致死にはならず、明らかな表皮の表現型は認めないものの、TGF- β 1 欠損マウスと同様に創傷治癒の促進が認められる^{[23]-[25]}。このように TGF- β は表皮角化細胞の分化、形成に非常に重要な役割を果たしているがその具体的メカニズムについては未だ不明の点も多い。

4. ChIP-sequencing を用いた網羅的転写因子結合部位解析と細胞種特異的な

TGF- β シグナルの制御機構

近年になりクロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation: ChIP)を用いた方法により転写因子や転写共役因子のゲノム上の結合部位を網羅的に解析する方法が確立された。高密度ゲノムタイリングアレイを用いた ChIP-Chip 法に引き続き、次世代シーケンサーを用いた ChIP-sequencing (ChIP-seq) が普及している^[26](図 2)。TGF- β シグナルの伝達因子である Smad2/3 や Smad4、Smad1/5 に対する抗体を用いてこれらの結合領域の解析が報告されている^{[27]-[30]}。その結果、

肝がん細胞株と皮膚角化上皮細胞株との比較により Smad の結合部位が細胞種により異なっていることが明らかとなってきた^{[31],[32]}。また、Smad3 の結合部位の比較から Oct4、MyoD などの分化のマスター遺伝子とされる遺伝子がクロマチン上で共存しそれらの因子が Smad3 の結合部位を決め細胞種特異的な TGF- β シグナルを制御しているという報告もある^[33]。したがって Smad によって制御される標的遺伝子の多くが組織・細胞種によって大きく異なることになる。これは TGF- β シグナルの機能とそのメカニズムを理解するために、それぞれの細胞毎に生理的・病的に真に重要な因子を見出すことの必要性を示唆するものと考えられる。

本章では以上の背景から、表皮角化細胞において TGF- β シグナルが果たす役割を解析することを目的とし、Smad ファミリーの ChIP-sequencing と RNA-sequencing を用いて網羅的な解析を行い、明らかにすることを目的とした。

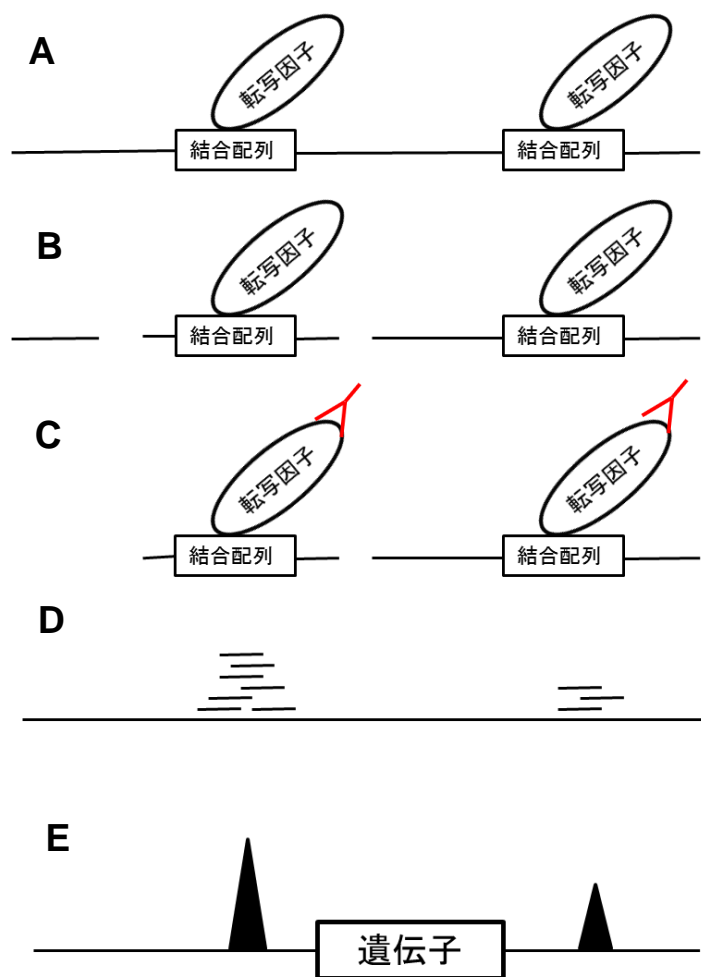


図2 ChIP-sequencing の概略

- A) ゲノム上に転写因子が結合した状態で細胞をホルマリン固定する
- B) 超音波によりゲノムを断片化する
- C) 調べたい転写因子に対する抗体(赤で図示)で免疫沈降を行い、結合部位近傍のゲノムを濃縮する
- D) 得られたサンプルを次世代シーケンサーでシーケンスを行い、ゲノム上にマッピングする
- E) 解析により転写因子の結合部位の近傍にある遺伝子を抽出する

実験材料と方法

細胞培養

ヒト胎児腎上皮細胞由来株 HEK293T 細胞、ヒト表皮角化細胞 HaCaT 細胞は、10% fetal bovine serum (FBS)、50 UI/ml penicillin、50 ug/ml streptomycin を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (high glucose) (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) を用い、37°C, 5%の条件で培養を行った。ヒトケラチノサイト初代培養細胞 HPEK 細胞は未分化性維持培地 CnT-57 と分化培地 CnT-02 (Cellntec, Bern, Switzerland)に 50 UI/ml penicillin、50 ug/ml streptomycin を添加して 37°C, 5%の条件で培養を行った。

プラスミド構築

ヒト C2orf54 は HaCaT 細胞の cDNA からクローニングし、FLAG タグを N 端に付加した pcDNA3 に挿入した。

試薬

本研究で用いた Human recombinant TGF- β 3 は R&D (Minneapolis, MN, USA)より購入したものを使用した。

市販抗体

本研究で用いた抗体は以下の通りである。

rabbit ポリクローナル抗 Involucrin 抗体 (Abcam)

mouse モノクローナル抗 FLAG (M2)抗体 (Sigma-Aldrich)

mouse モノクローナル抗 myc(9E10)抗体 (BD)

mouse モノクローナル抗 α -tubulin 抗体 (Sigma-Aldrich)

mouse モノクローナル Smad2/3 抗体 (BD)

rabbit ポリクローナル抗 Smad3 抗体 (Abcam)

rabbit モノクローナル抗リン酸化 Smad2 抗体 (Cell Signaling Technology)

抗 C2orf54 抗体

ヒト C2orf54 v1 の N 端領域(1-160 aa)の GST タグ融合たんぱく質を発現する pGEX6P-1 ベクターを作成し大腸菌に発現させた後 PBS-T buffer で懸濁・超音波破碎機で溶解し遠心後の上清を GS4B ビーズで精製した。Turbo 3C protease (ナカライテスク) で GST タグ融合部位を切断後得られた精製タンパクを SDS-PAGE にて泳動し、CBB 染色で検出された目的サイズのバンドを切り出した。Operon 社に依頼して同社のウサギ皮下ゲル片免疫プロトコルにより免疫した。ELISA による定量で 2 回目の免疫後血清をピークとして抗体価の低下傾向が認められたため 3 回目免疫後に全採血した。得られた血清は Protein A 精製を行った。

RNA 干渉法

HaCaT 細胞への small interfering RNA (siRNA) の導入には、Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) を使い、推奨されているプロトコルに沿って行った。ネガティブコントロールには、Stealth RNAi Negative Control (12935-112, Life Technologies) を用いた。使用した siRNA は以下のとおりである。

human C2orf54

#1 5'-UCCUGCUGGACAAGUUCCAGGUCUU-3'

human C2orf54

#2 5'-ACGGCCUGACCUUUGGGCCACCUGAA-3'

SDS-PAGE とウエスタンブロッティング

培養細胞の上清を除去して PBS (-)で洗浄した後、1% NP-40 lysis buffer (1% Nonidet P-40、20 mM Tris-HCl [pH7.5]、150 mM NaCl、1 mM PMSF、1% aprotinin、1% phosphatase inhibitor cocktail (ナカライテスク)) により細胞を溶解してタンパク質を回収した。回収したタンパク質は BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) で定量し、SDS sample buffer (170 mM Tris-HCl [pH8.8]、44% glycerol、8.7% SDS、22 mM 1,4-dithiothreitol、0.05% Bromophenol Blue) を加え、98°Cで2分間煮沸して調製した。タンパク質量をそろえたサンプルを SDS-PAGE で分離後、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% skim milk (森永) もしくは 5% BSA (Sigma-Aldrich)、50 mM Tris-HCl [pH7.4]、150 mM NaCl、0.1% Tween-20) にて 30 分間室温でインキュベーションした後、一次抗体を加えて室温で 1 時間あるいは 4°Cで一晩インキュベーションした。その後 HRP-標識された二次抗体にて室温で 1 時間のインキュベーションを行った。タンパク質の検出には、Enhanced chemiluminescence detection system (GE) を使用し LAS4000 system (GE)を用いて画像を取得した。

細胞免疫染色

細胞免疫染色には 8-well Culture Slides (Nunc) を使用した。培養上清を除去して PBS(-)で洗浄後、5 分間のアセトン-メタノール固定を室温にて行った。目的の各一次抗体を Blocking One (ナカライテスク) で希釈し、室温にて 1 時間インキュベーションした。その後 Alexa Fluor 488 蛍光標識された二次抗体 (Life technologies) とともに 45 分間のインキュベーションを行い、最後に TOTO3 (Life technologies) で核を染色した。観察にはオリンパス社製の蛍光顕微鏡を用いた。

RNA 精製と逆転写反応

RNA の抽出は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用して、プロトコルに従って行った。1-5 ug の total RNA と Oligo (dT)20 プライマーを用いて、Prime Script II 1st Strand cDNA synthesis kit (Takara Bio, 滋賀, 日本) により cDNA を合成した。

クロマチン免疫沈降法 (ChIP)

細胞を 15 cm または 10 cm dish に播種した。細胞は TGF- β 3 で 1 ng/ml の濃度で 1.5 時間刺激した。固定は、終濃度が 1% になるようホルムアルデヒドを添加し、室温で 10 分間震蕩した。その後、終濃度が 0.125 M となるようグリシン水溶液を添加し、室温で 5 分間震蕩した。氷冷した PBS にて細胞を 2 回洗浄した後、氷冷した PBS を 1 ml 添加し、スクレイパーで掻き集め、4°C で遠心し上清を除いた。細胞ペレットは 1 ml の SDS lysis buffer (1% SDS、50 mM Tris-HCl (pH 8.1), 10 mM EDTA, プロテアーゼインヒビター (P8340, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 用時添加) を添加し再懸濁した。この細胞懸濁液を Bioruptor UCW-201 (コスモ・バイオ, 東京, 日

本) を用いて断片化を行った。断片化の条件は出力' H' で 30 秒を 3 回、インターバルは 30 秒とした。得られたサンプルは 17,800 x g で 8°C 10 分間遠心し、得られた上清の一部をインプット用サンプルとして取り分け、残りを ChIP dilution buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% TritonX-100, Complete EDTA-free protease inhibitors (Roche Diagnostics)) で 10 倍希釈し、予め 10 ug の抗体と 0.5% BSA を含有する PBS で 4°Cにてインキュベートした Dynabeads (Life technologies)を加え、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer-treated 15-ml polypropylene tube (アシスト, 東京, 日本)に入れ、4°Cで一晩震蕩した。ビーズは、遠心沈降して回収した後、wash buffer (50 mM HEPES-KOH (pH7.0), 0.5 M LiCl (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA, 0.7 % sodium deoxycholate, 1% NP-40)にて 3 回洗浄し、Magnetic Particle Concentrator (Life technologies) にて、回収した。SDS-lysis buffer を 200 ul/tube 添加し、65°Cで懸濁後 16 時間、静置した。上清を PCR purification kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いて精製し、RNase-free 水で溶出した。得られた ChIP サンプルは定量的リアルタイム PCR 法により、解析を行った。

用いたプライマーは以下のとおりである。

ChIP

human	Fwd プライマー	Rev プライマー
C2orf54 1	cagcttcaggggctgtgggc	gccccagagtgccctcctga
C2orf54 2	ggggtgagtcagtccccagca	taaccaaaccagccccgc
C2orf54 3	catcgacccttggccctgcc	cccctgtggggccatctcca
C2orf54 4	tgggaaaggcggggtggga	cagggtgtgccctgttget
C2orf54 5	gggccagcgtctcctcctca	cagccccggggagctatgga

HBB	aacgtgatcgcccttctc	gaagcagaactctgcacttc
SOBP	tcccttcctgaaggagcatgca	gggcaagacctgagggccca
p21	actgtccctaggaatcc	gaaaaggagagtgagtttg

ChIP-sequencing

HaCaT 細胞、HPEK 細胞、NMuMG 細胞での Smad2/3、Smad3 の結合部位の同定は ChIP-sequencing 法により行った。15 cm または 10 cm dish に播種した細胞に TGF- β 3 1 ng/ml で 1.5 時間刺激後上記 ChIP 法によりサンプルを取得した。得られたサンプルは Qubit (Life technologies) で DNA 量を測定し、およそ 5 ng を東京大学先端技術研究センターゲノムサイエンス分野 (油谷浩幸教授) に依頼してメーカーのプロトコルに従いライブラリーを作成の上、Genome Analyzer Iix (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いてシーケンスを行った。得られた 36 塩基のシーケンスタグのゲノム hg19 へのマッピングは Illumina 社のプロトコルに従い ELAND アルゴリズムを用い、1 塩基のミスマッチまで許容して行った。上記データ処理により得られたマッピングデータからの Smad2/3 および Smad3 結合部位の同定は MACS (Model-based Analysis for ChIP-Seq) の two sample analysis 法を用いて、パラメータはデフォルト値で行った。有意な結合部位の同定は、 $p\text{-value} < 1 \times 10^{-5}$ で行った。Smad 結合領域における de novo motif prediction は CisGenome (version 2.0) の Gibbs motif sampler プログラムを使用した^[34]。算出されたモチーフの matrix file を用いた既知のモチーフ探索には TOMTOM を用いた^[35]。対照ゲノム領域塩基配列の取得や同定モチーフの頻度解析は CisGenome を用いた。

RNA 精製と逆転写反応

RNAの抽出はRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用して、プロトコルに従って行った。

1-5 ug の total RNA と Oligo (dT)20 プライマーを用いて、Prime Script II 1st Strand cDNA synthesis kit (Takarabio, 滋賀, 日本) により cDNA を合成した。

定量的 PCR (qPCR)

定量的リアルタイム PCR は FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Diagnostics) を用い、データの検出は、7500 Fast Real-Time PCR System または Step One Plus (Applied Biosystems, Life technologies)を用いて行った。

RT-qPCR に用いたプライマーは以下の通りである。

	Fw(5')プライマー	Rv(3')プライマー
C2orf54	gatacttcactgcctcctcg	cgcgttcagcgaacctgg
GAPDH	gaaggtgaaggtcggagtc	gaagatggtgatgggatttc
Keratin 1	gatgccctctgtttcattag	catagctctttctccgga
Keratin 5	agcagtgttctctggata	tgctgctggaagtagtagctt
Keratin 10	gctgctactccatagcttc	gttcagtgggtgctctttta
Keratin 14	aggcagcggcctgctgagat	aagtcacccgcccagacg
TAp63	ccgcatgcaggactcgaacc	actggtggacgaggagccgt
dNp63	actggtggacgaggagccgt	ggagccagaagaaggacagcgc
Involucrin	cacaaagggagaagtattgc	Ctcttccttgtatgagacg
p21	gcgactgtgatgcgctaag	ccagtgggtctcggtgaca

RNA-sequencing

HPEK 細胞を 1.5 mM CaCl₂ 添加分化培地で 7 日間培養後に TGF- β 1 ng/ml で 24 時間刺激し RNA を Tripure (Roche) で回収・精製した。未分化 HPEK 細胞、HaCaT 細胞についても同様に刺激し RNA を回収した。得られた RNA を on column DNase I 処理 (Qiagen) した後、10 ug を用いて Dynabeads Oligo(dT)25 (Life technologies) で poly-A 選択した。得られた mRNA からのライブラリー作成は Illumina 社のプロトコルに従い、シーケンスは東京大学先端技術研究センターゲノムサイエンス分野（油谷浩幸教授）に依頼して Genome Analyzer IIx を用いてメーカーのプロトコルに従い行った。

結果

表皮角化細胞における TGF- β による分化誘導遺伝子の探索

表皮角化細胞における TGF- β シグナルの調節機構を解析するためにまずその下流の転写因子 Smad2/3 のゲノム上の結合領域を ChIP-sequencing によって同定し検討した。このために初代培養細胞 HPEK (Human progenitor epidermal keratinocyte) と HaCaT 細胞株の 2 種類を用いた。HPEK 細胞は培地を無血清で低カルシウム濃度の未分化性維持培地で継代することで未分化性を維持でき、またカルシウム濃度の高い分化培地に切り替えることにより皮膚角化細胞の分化が始まり、そのまま培養を続けると分化が継続していくという性質を持つ。さらに分化培地で気相液相の境界で培養を続けることにより基底層から有棘層、顆粒層、角化層という生体での 3 次元構造を再現することができる。HPEK 細胞について本検討では、分化前後に重要な TGF- β の影響を調べるため、5日間分化培地で分化させた状態のものと、未分化性維持培地で培養した未分化の状態のものを用いた。また、HaCaT 細胞は不死化した正常表皮角化細胞株であり表皮角化細胞の実験では一般的に用いられ、特に正常上皮細胞における TGF- β シグナル伝達経路解析のモデル細胞として確立している。

これら2種類の細胞を TGF- β 刺激し1.5時間後にホルマリン固定の上回収した。ソニケーションにより DNA を断片化した後 HaCaT 細胞は Smad2/3 抗体、HPEK 細胞は Smad3 抗体を用いて ChIP を行い、Illumina 社の GA II x シーケンサーを用いてデータ取得を行った。なお、細胞により抗体が異なるのは、主に実験の時期の差異によるものである。当初所属研究室で ChIP が行えることが確認されている抗 Smad2/3 抗体を用いて HaCaT 細胞の ChIP を行い、その後より効率的に ChIP が行える抗

Smad3 抗体が同定されたため、その抗体を用いて HPEK 細胞の ChIP を行った。これらのプロトコルはこれまで当研究室での検討に用いてきたものに準じている^{[27][31]}。また有意な Smad 結合部位の同定: peak call は確立している方法を用いて input genome のシーケンスデータとの比較によって行った^[34]。

その結果、分化 HPEK 細胞の ChIP サンプルでは Smad 3 結合部位は $p < 10^{-5}$ で 67,515 箇所同定された。未分化 HPEK 細胞については qPCR によるサンプル評価段階では十分なポジティブコントロールでの結合が認められたが、シーケンス結果の解析では有意な結合部位は同定できなかった。一方 HaCaT 細胞の ChIP サンプルでは Smad2/3 結合部位は $p < 10^{-5}$ で 37,452 箇所同定された。HPEK 細胞と HaCaT 細胞両方で共通な結合領域は 21,167 箇所であった (図 3A)。

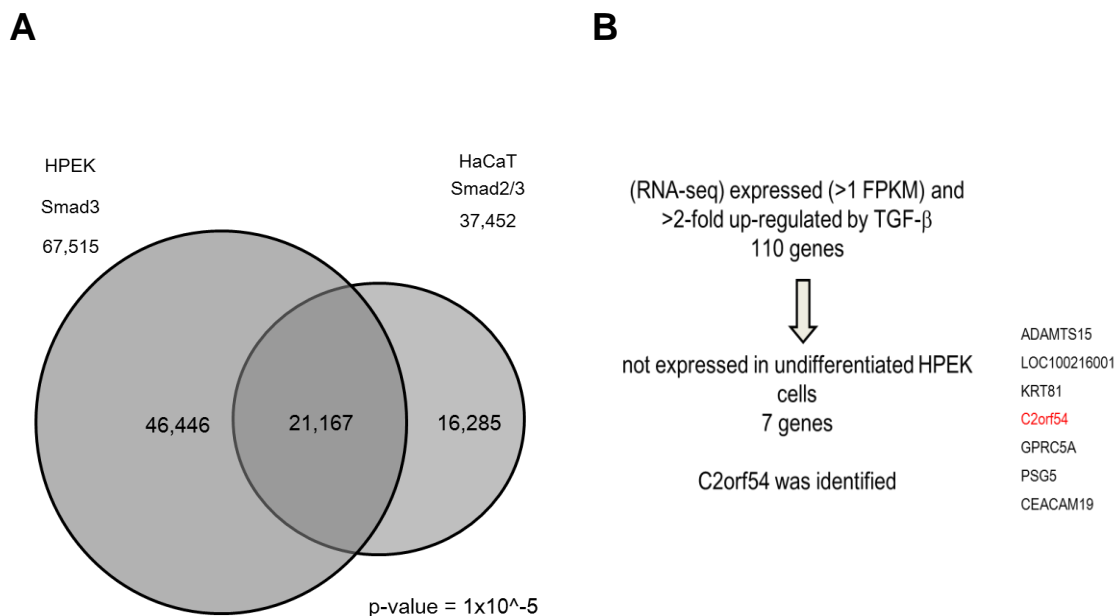


図3 HPEK細胞とHaCaT細胞におけるSmad3、Smad2/3の結合領域の比較

- A)** TGF- β 刺激後 1.5 時間で細胞をホルマリン固定し、HPEK 細胞は分化させた状態のものを用いて Smad3 抗体、HaCaT 細胞は Smad2/3 抗体でクロマチン IP (ChIP) を行い、次世代シーケンサーを用いて結合領域を同定した。その結果、HPEK 細胞は 67,515 か所の結合領域を認め、HaCaT 細胞は 37,452 か所の結合を認めた。2 種類の細胞で共通の結合領域として 21,167 か所が同定された。
- B)** ChIP-sequencing と RNA-sequencing を用いた新規標的遺伝子の同定
HPEK 細胞と HaCaT 細胞の Smad2/3 の共通の結合領域のうち、HPEK の RNA-sequencing の結果 TGF- β 刺激により mRNA の発現が 2 倍以上になる 110 遺伝子を抽出した。さらに、未分化の状態の HPEK 細胞では発現していない遺伝子を除外すると 7 種の遺伝子が同定された。

続いて、両細胞における TGF- β による網羅的な遺伝子発現変化について RNA-sequencing によるデータ取得を行った。各遺伝子の発現定量は方法に記載した標準的な方法を用い、それぞれの転写産物コード領域におけるリード数を各サンプルのマップされたリード総数およびそれぞれの転写産物の長さで補正した値：FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments)で比較した。所属研究室で報告済みの発現マイクロアレイデータとの比較からある程度の発現があると考えられる、FPKM 値 1 以上である遺伝子について、更に TGF- β 刺激後24時間で両細胞で遺伝子発現が2倍以上に上昇するものを絞り込んだところ110個の遺伝子がリストアップされた。そして、この遺伝子群の中から分化した表皮角化細胞において役割を果たしている遺伝子を絞り込むために未分化状態の HPEK 細胞では発現していない (FPKM < 1) 遺伝子を除外したところ、7 個の遺伝子がリストアップされた。つまり、未分化状態の HPEK 細胞では発現しておらず、分化した HPEK 細胞、HaCaT 細胞で Smad の直接の制御下にあり、TGF- β で 2 倍以上に発現上昇する遺伝子が絞りこまれた(図 3B)。

C2orf54 の機能解析

これら 7 種類の遺伝子として ADAMTS15、LOC100216001、C2orf54、KRT81、GPRC5A、PSG5、CEACAM19 が同定されたが、本研究では中でも既報がない C2orf54 という遺伝子に着目し、その機能を解析した。C2orf54 (chromosome 2 open reading frame 54, Gene ID: 79919) は 2 番染色体長腕に存在する全長 10803 bp の遺伝子であり、447 アミノ酸をコードしている (図 4 A)。

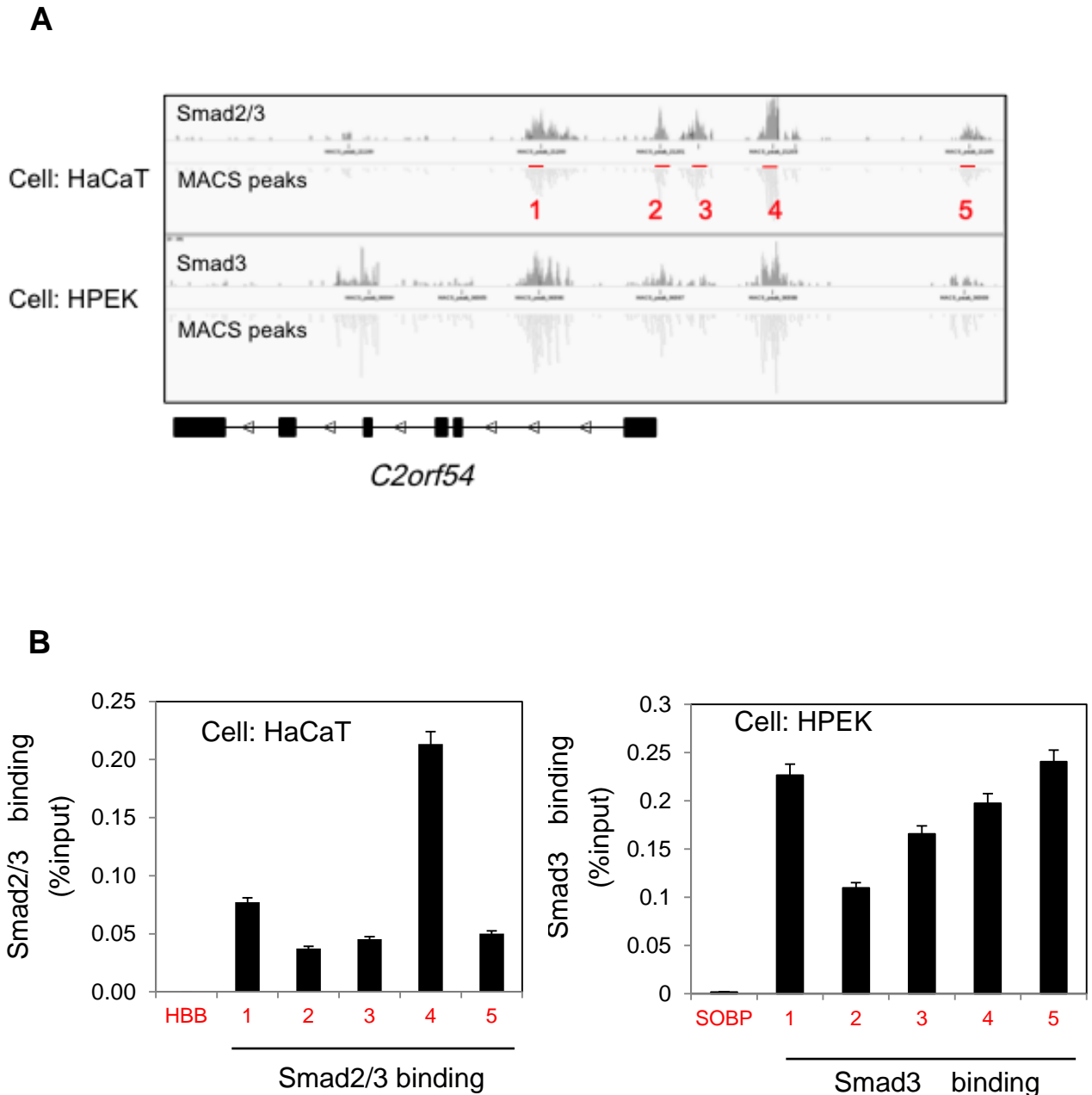


図4 C2orf54 遺伝子座における Smad2/3 結合領域の確認

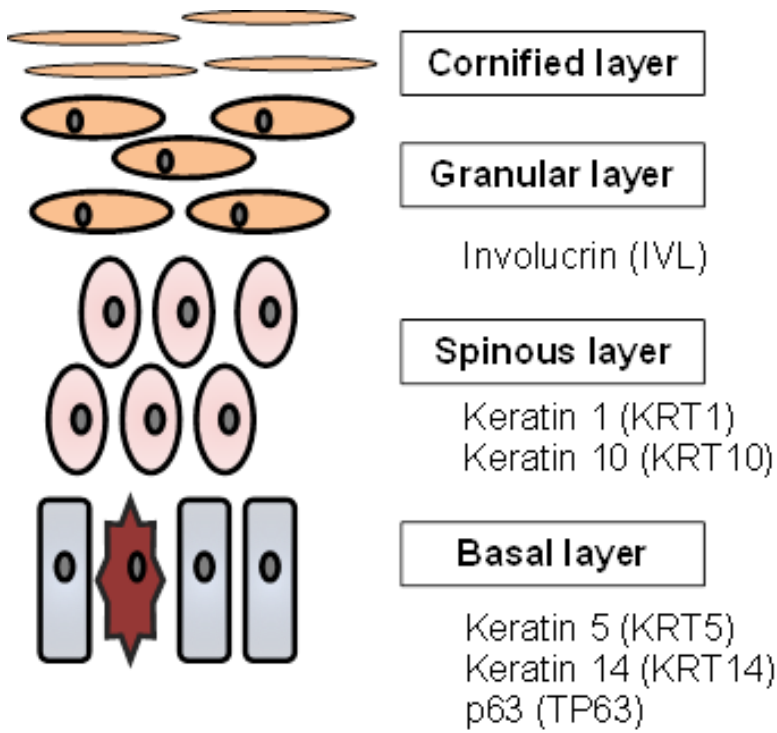
HPEK 細胞、HaCaT 細胞において C2orf54 遺伝子座に実際に Smad2/3 が結合するかを ChIP-qPCR により検討した。

- A)** C2orf54 転写開始点近傍の Smad2/3 結合領域 5 か所それぞれの領域にプライマーを設計した(赤線部)。C2orf54 は 2q37.3 に存在する 447 アミノ酸をコードする遺伝子。
- B)** ネガティブコントロールとして TGF- β で誘導がかからないことが明らかなる HBB と SOBP を用いた。HaCaT 細胞、HPEK 細胞ともにネガティブコントロール領域と比べ明らかな増幅を認め、C2orf54 遺伝子座に Smad2/3 が結合していることが明らかとなった。

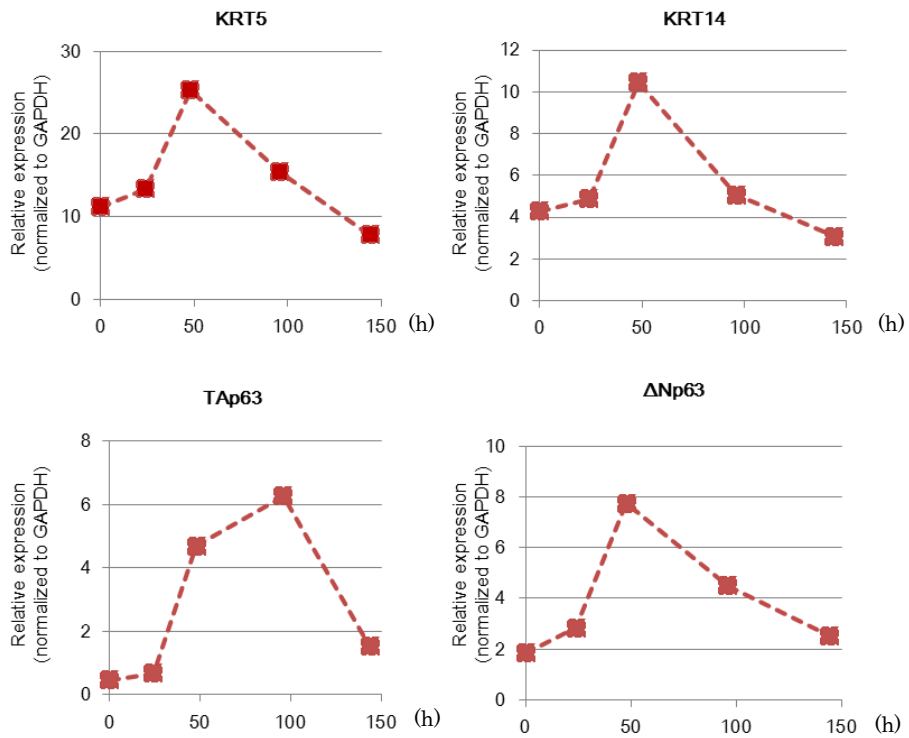
まず、ChIP-sequencing データの validation を行った。HPEK 細胞、HaCaT 細胞ともに C2orf54 の転写開始点の上流からイントロン内にわたり複数の Smad2/3 結合領域を認めた(図 4A)。そこで、HaCaT 細胞における転写開始点近傍の結合部位 5 箇所についてプライマーを設計し、実際に結合が認められるか qChIP-PCR を用いて検討した。HaCaT 細胞では hemoglobin beta (HBB)、HPEK 細胞では sine oculis binding protein homolog (SOBP) をネガティブコントロールとして用い、input のサンプルと比較した。その結果 HPEK 細胞、HaCaT 細胞ともにネガティブコントロール領域と比べ有意な結合があることが確認された(図 4B)。

続いて、C2orf54 が表皮角化細胞においてどのような役割を果たしているのかを検討するため、HPEK 細胞を分化させてその時系列にそって RNA を回収し発現変動を確認した。皮膚は基底層から有棘層、顆粒層、角化層へと分化していき最終的に脱落する。この各層でどのような遺伝子が発現しているか知られている。最下層の基底層では、ケラチン 5, 14 や p63 などが発現していることが知られている。続く有棘層ではケラチン 1, 10 が発現し、顆粒層ではインボルクリン、ロリクリンの発現が知られている。

2次元培養条件下に HPEK 細胞を分化培地に切り替えておよそ 48 時間でケラチン 5, 14 と p63 が発現のピークを認め、その後減少していくことから HPEK 細胞は同条件で分化開始から 48 時間程度で基底層から有棘層の特徴を有する細胞へとその主体がシフトしていくことが示唆された(図 5)。次に、有棘層ではケラチン 1, 10 の発現が知られているが HPEK 細胞では分化開始後 96 時間でケラチン 1 の発現上昇を認め、ケラチン 10 も 96 時間で発現のピークを認めたため 96 時間前後を境に有棘層から顆粒層へとさらに分化していくことが示唆された。そして顆粒層での発現が知



Basal layer



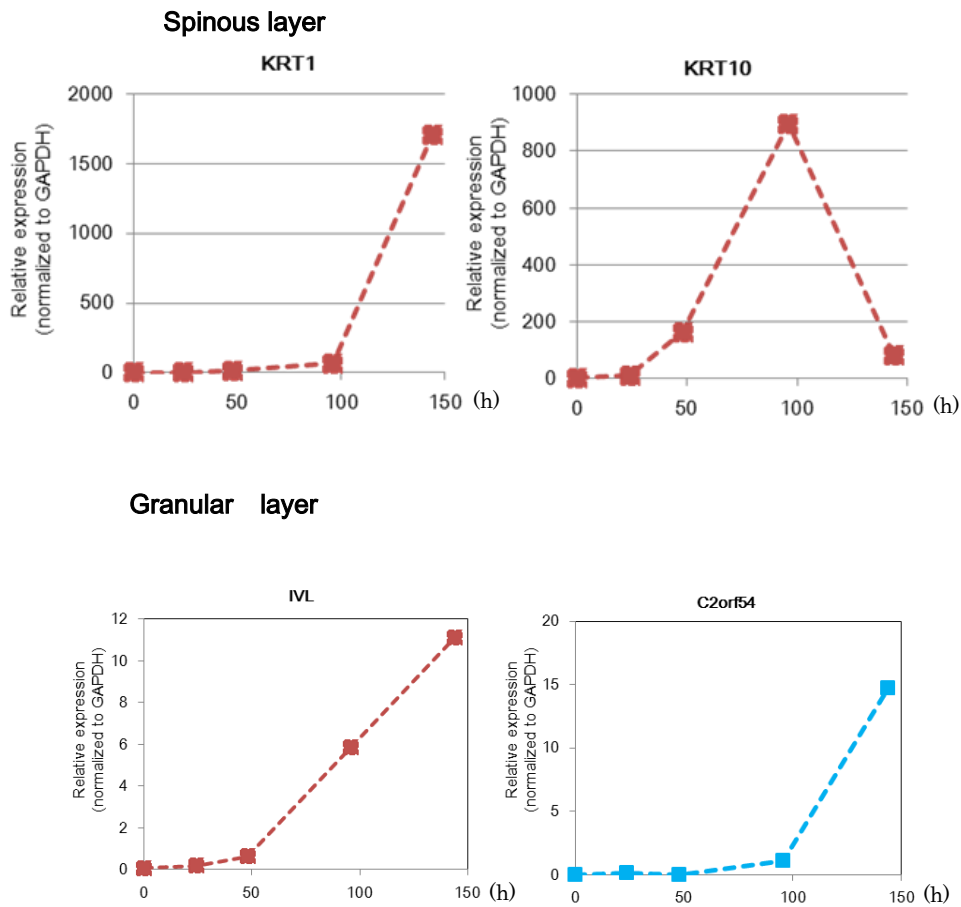


図5 各種表皮細胞マーカーと C2orf54 の発現変動

表皮細胞は基底層から分化していく過程で異なる遺伝子マーカーが発現する。代表的なものとして基底層で発現するケラチン 5、ケラチン 14、p63 があり、有棘層ではケラチン 1、ケラチン 10 があり、顆粒層ではインボルクリンが知られている。HPEK 細胞を用いて分化開始からのこれらの遺伝子の発現の経時変化を検討した。基底層のケラチン 5、ケラチン 14、p63 は分化開始後発現上昇を認め 48 時間でピークを認めた。p63 は p63 (TAp63) と、 Δ Np63 の 2 種類の転写バリエーションが知られているが TAp63 は 96 時間、 Δ Np63 は 48 時間で発現上昇のピークを認めその後低下に転じた。さらに、顆粒層で発現するインボルクリンでは分化開始後 48 時間経過後より発現上昇を認めるが、今回新たに同定した C2orf54 は 96 時間を経過してから発現上昇を認め、分化の後期で発現してくることが示唆された。

られているインボルクリン、ロリクリンについては 48 時間経過後より上昇を始め、96 時間、144 時間と発現が上昇し続けていくことが観察された(図 5)。そこで今回同定した C2orf54 の発現を mRNA レベルで確認したところ未分化状態では発現が認められず、96 時間経過後に著明に上昇していく傾向が確認された。このことから C2orf54 は皮膚の分化の後期、顆粒層付近で発現していることが考えられた。この C2orf54 の TGF- β による発現誘導を分化した状態にある HaCaT 細胞で確認したところ TGF- β 1 ng/ml の刺激後 1.5 時間で mRNA の発現上昇を認め、その後 4 時間、8 時間と時間の経過とともに減少し 24 時間後には元の発現レベル付近まで低下することが確認された (図 6 A)。

続いて C2orf54 の N 末端側を抗原として新たに作成した抗 C2orf54 抗体を用いてタンパクレベルでの発現とその変動を確認した。まず免疫後血清を用いてヒト C2orf54 およびマウスの ortholog である 2310007B03Rik のクローニングを行い、293T 細胞に強制発現させて抗体の検定を行ったところ、双方の検出が可能であった(Data not shown)。続いて抗体の段階希釈を行い過剰発現ヒト C2orf54 の検出を行ったところ 30,000 倍まで検出が可能であった(Data not shown)。次に、HaCaT 細胞において内在性タンパクの検出を行ったところ、TGF- β 刺激前から検出されるタンパクが刺激後およそ 4 時間で増加し 8 時間、24 時間で減少することがわかった (図 6 B)。

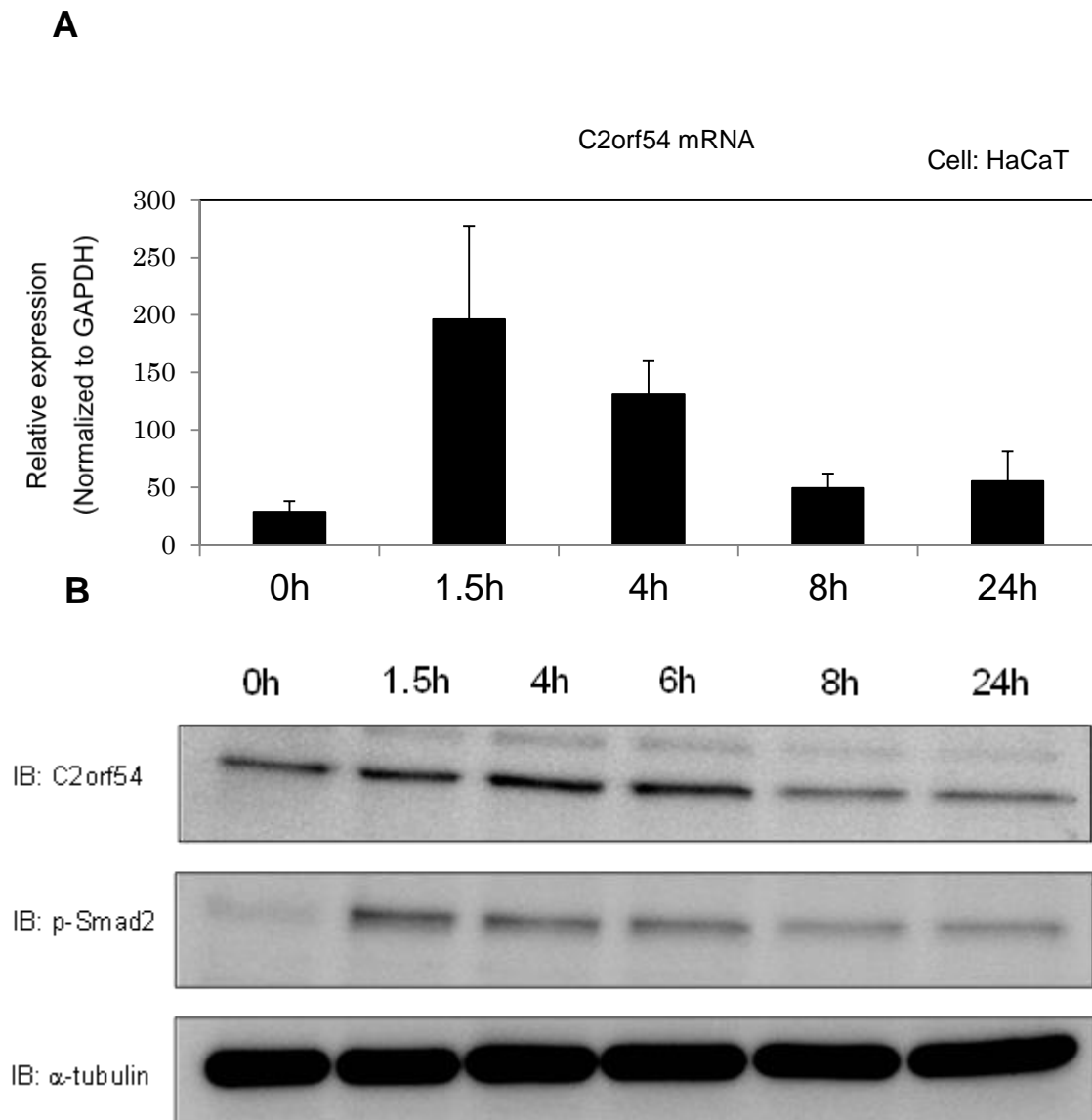


図6 TGF- β による C2orf54 の発現変動

- A)** HaCaT 細胞における TGF- β による C2orf54 発現の経時変化を real-time PCR を用いて確認した。TGF- β 1 ng/ml で刺激したのち 1.5 時間、4 時間、8 時間、24 時間で細胞を回収した。TGF- β 刺激後 1.5 時間で mRNA レベルは上昇しその後 4 時間、8 時間と時間の経過とともに減少した。
- B)** タンパクレベルでの C2orf54 の発現誘導を確認した。C2orf54 は分化した細胞である HaCaT では刺激前から発現しているが TGF- β によりタンパクレベルの上昇を認め、4 時間でタンパクレベルは最大となった。また、対照として TGF- β で誘導されるリン酸化 Smad2 の抗体で blotting も行い、こちらは刺激後 1.5 時間で発現が最大となりその後は減少していった。

以上のことから、C2orf54 は HPEK 細胞の結果より未分化状態で発現せず、分化の後期で発現上昇し、また分化した角化細胞である HaCaT 細胞の結果より TGF- β 刺激により早期に mRNA、タンパクレベル双方で一過性に発現が増強することが明らかになった。

続いて C2orf54 の細胞内局在について免疫蛍光染色による同定を試みた。FLAG タグのついた C2orf54 プラスミドを作成し強制発現して確認したところ細胞にびまん性に存在していることが示唆された(図 7)。

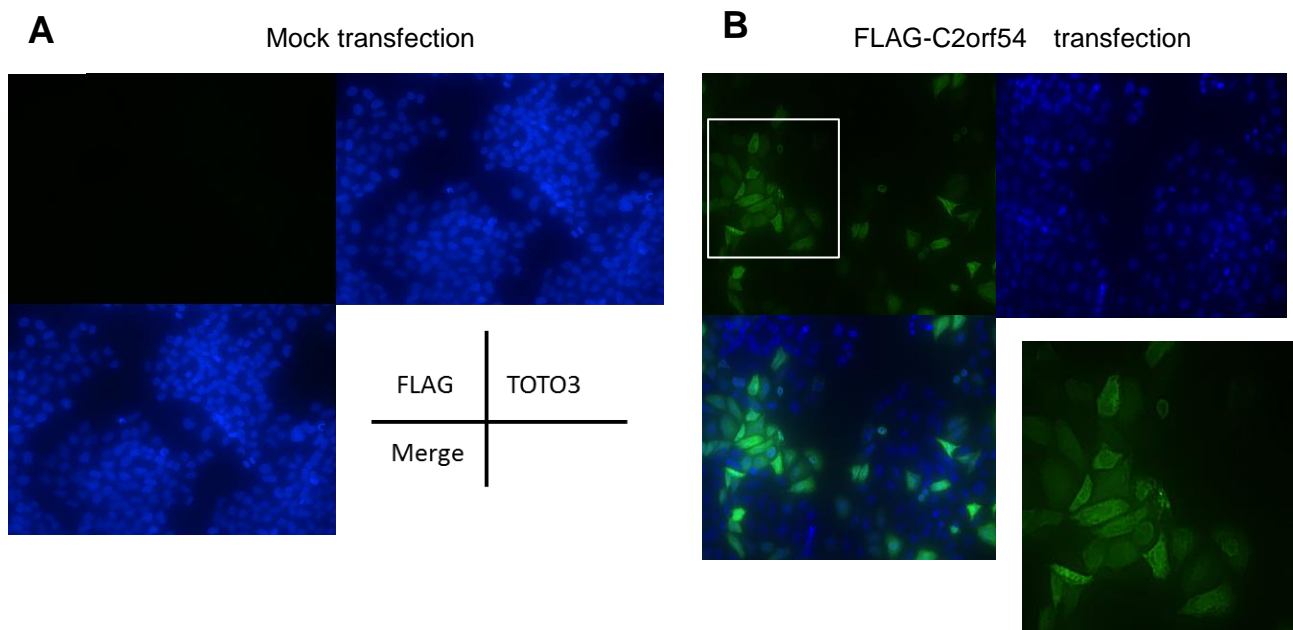


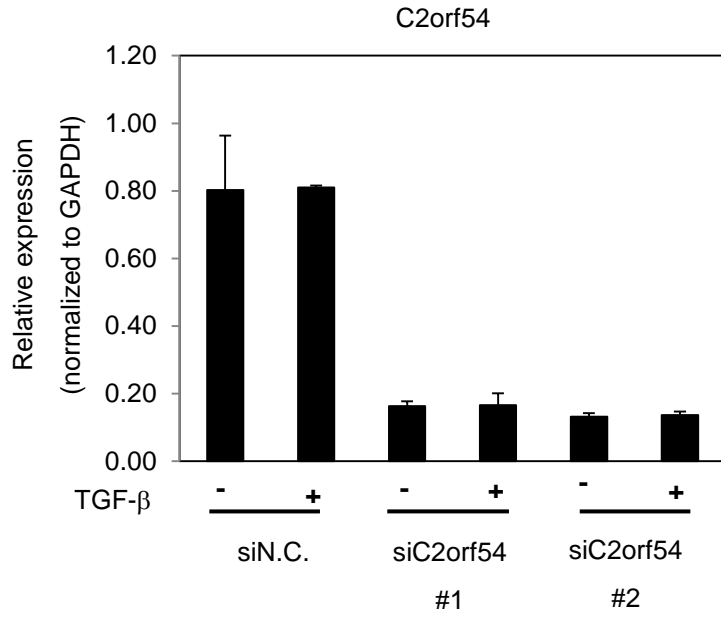
図7 C2orf54の細胞内局在

FLAG タグを N 末端側に付加した C2orf54 を HeLa 細胞にトランスフェクションし、その局在を確認した。

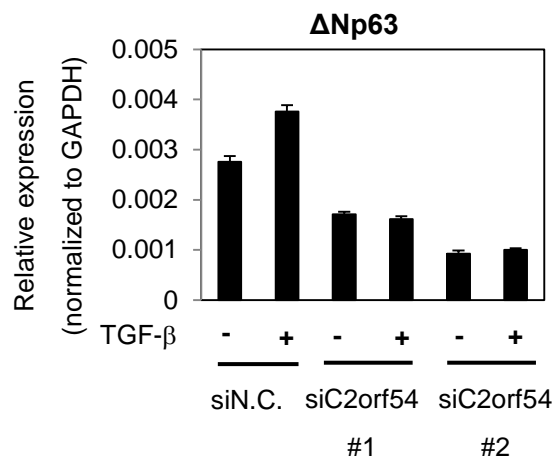
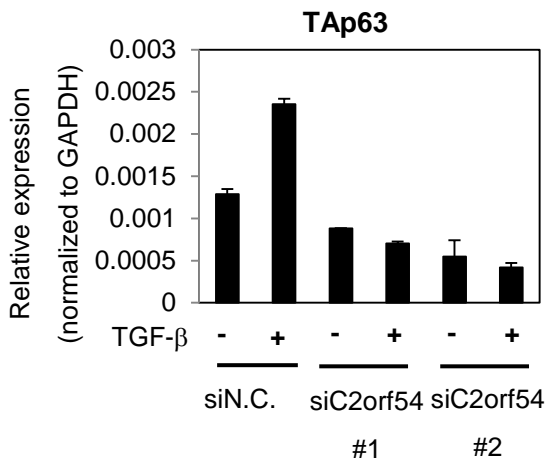
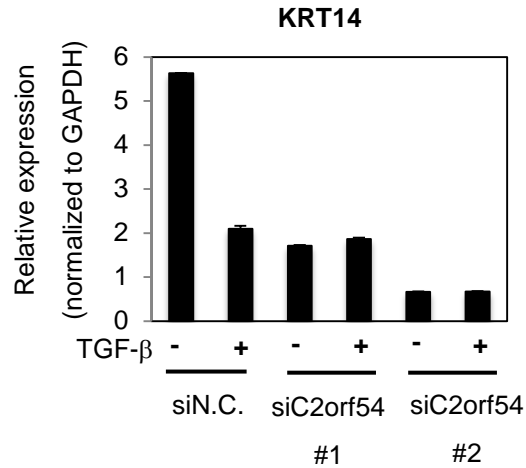
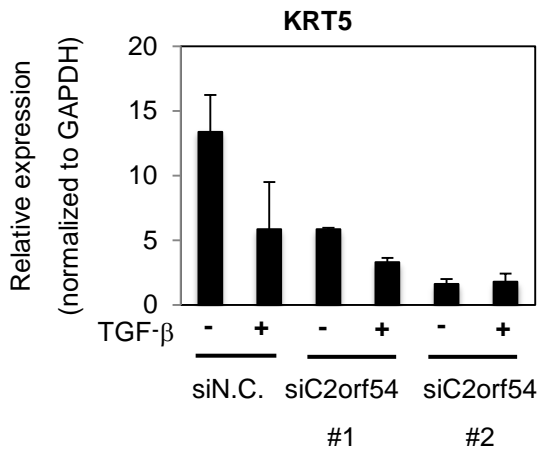
A) Mock トランスフェクションしたもの。核は TOTO3 で染色を行った。

B) FLAG-C2orf54 をトランスフェクションした。FLAG タグを付加した C2orf54 は細胞質を中心に核酸にも染色され、びまん性に存在していることが示唆された。右下は抗 FLAG 抗体での染色(白枠)の拡大写真

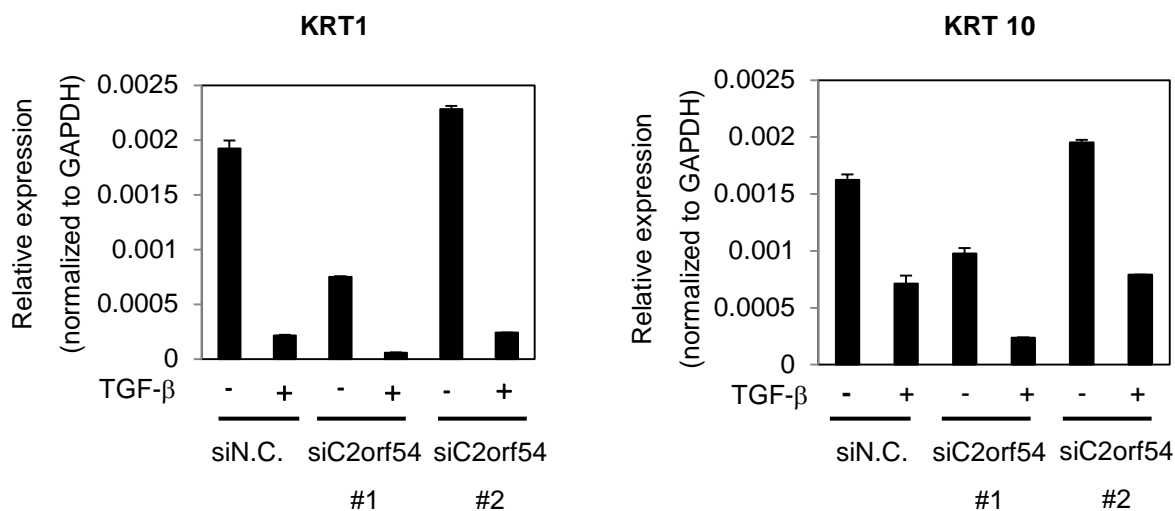
続いて C2orf54 がどのような役割を果たしているのかを確認するため、siRNA を用いて C2orf54 をノックダウンして表皮角化細胞の分化関連遺伝子の発現への影響を検討した。HaCaT 細胞に siRNA をトランスフェクションし、TGF- β 刺激後 24 時間で RNA を回収し逆転写の後 real time PCR で確認したところ、用いた 2 種類の siRNA により十分 C2orf54 の発現がノックダウンされていることが確認された (図 8)。



Basal layer



Spinous layer



Granular layer

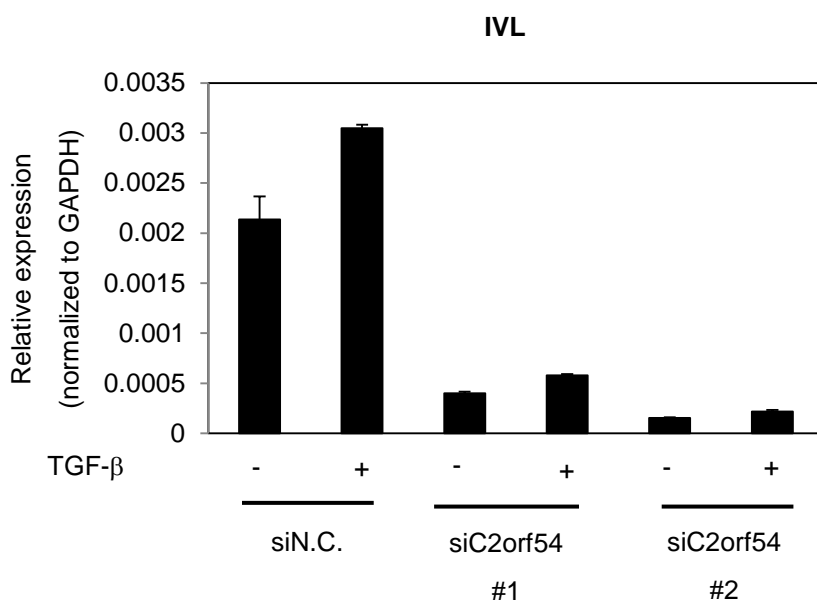


図8 C2orf54 ノックダウン時の各種表皮マーカーの変動

siRNA を用いて C2orf54 をノックダウンした際の各種マーカーの変動を確認した。基底層で発現しているケラチン 5、ケラチン 14、p63 は C2orf54 をノックダウンすることで発現の減少傾向が見られた。有棘層で発現しているケラチン 1、ケラチン 10 は変動を認めなかった。顆粒層で発現しているインボルクリンが著明な減少を認めた。siN.C. : control siRNA。エラーバーは標準偏差を示す。

基底層で発現しているとされるケラチン 5, 14 と p63 は C2orf54 をノックダウンすることによりやや発現が抑えられる傾向にあった。また、有棘層で発現しているとされるケラチン 1, 10 は C2orf54 をノックダウンしても明らかな変動を認めなかった。そして顆粒層で発現しているインボルクリンを確認したところ著明な発現の減少を認めた。そこでタンパクレベルでもインボルクリンの発現が減少するかを確認した(図 9)。

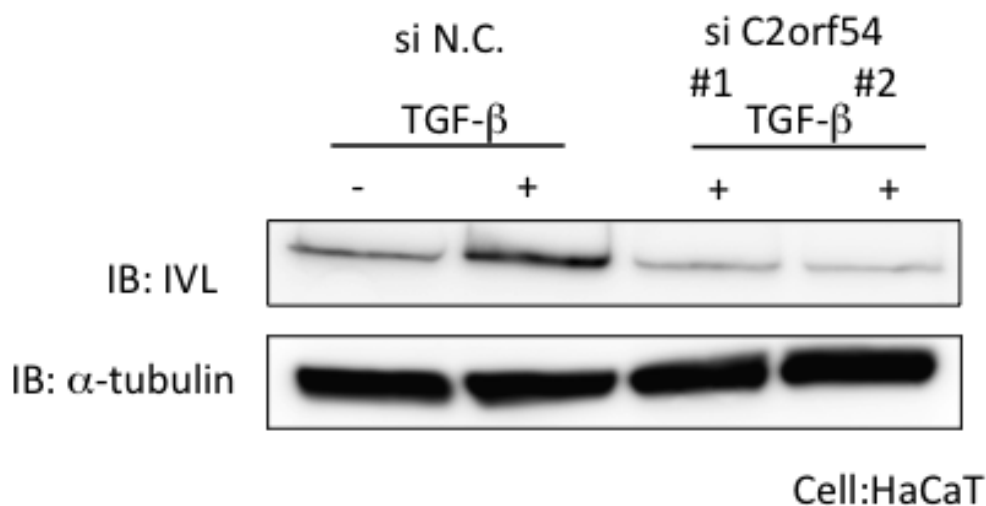


図 9 C2orf54 のインボルクリンタンパク発現への影響

C2orf54 をノックダウンした際のインボルクリン発現への影響をウエスタンブロットティングで確認した。コントロール siRNA (siN.C.)では TGF-β刺激によりインボルクリンのタンパク増加を認め、C2orf54 をノックダウンしたものでは TGF-βで刺激してもインボルクリンの増加を認めなかった。

ネガティブコントロールの siRNA では TGF- β 刺激後 24 時間でインボルクリンのタンパクの発現誘導が明瞭に確認できるのに対して、C2orf54 をノックダウンした細胞ではインボルクリンの発現誘導は認められず、mRNA と一致する結果であった。

ここで C2orf54 は機能未知のタンパクでありその働きについての報告はないが、数多くのタンパクの NTase (Nucleotidyltransferase) 活性についてタンパクの 2 次構造など評価した報告において前述の C2orf54 のマウス ortholog である 2310007B03Rik が NTase 活性の示唆されるタンパクのリストに含まれている^[36]。この NTase の機能としてはたとえば RNA の編集、DNA の修復やクロマチンリモデリングなどが知られており、先の文献によれば N 末端側のアミノ酸配列のうち、 β シート構造の中の酸性-中性-酸性の配列が重要であることが示唆されている。そこで同様の部位が C2orf54 に存在するか検討するためタンパク質 2 次構造予測を PSIPRED を用いて行ったところ 80 番目から 82 番目のアミノ酸配列が β シートの中にアスパラギン酸 (D: 酸性)-メチオニン (M: 中性)-グルタミン酸 (E: 酸性) という配列を認めこの領域が NTase 活性を持つことが推測された (図 10)。

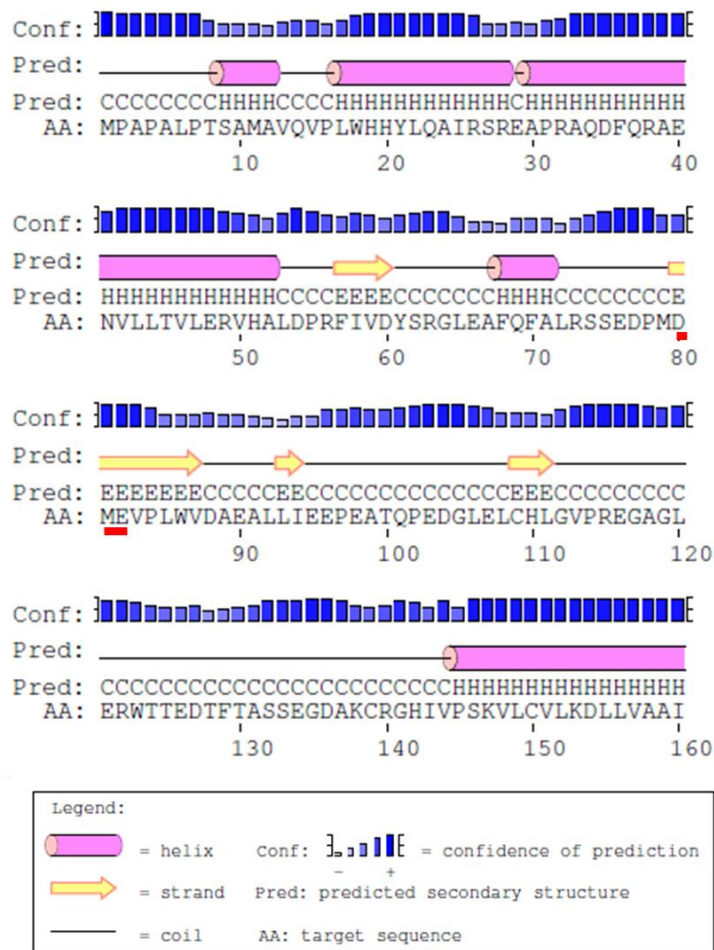


図 10 C2orf54 の NTase 活性予測部位のタンパク質 2 次構造

C2orf54 のタンパク質 2 次構造予測を PSIPRED を用いて行った。赤下線は活性中心になることが予測される β シート構造内のアミノ酸残基。

また、C2orf54 が Smad シグナルにより誘導されることが明らかとなったが、C2orf54 自身が Smad シグナルへ影響を与えているかを検討するため、Smad2/3 の直接の標的であることが知られている PAI1 (plasminogen activator inhibitor type 1) と p21 (CDKN1A: cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)の発現を検討した(図 11)。

その結果、HaCaT 細胞では TGF- β シグナルにより PAI1、p21 の著明な発現上昇がみられた。また、C2orf54 をノックダウンすることにより PAI1 の発現がコントロールと比較して半分程度にまで低下しており、p21 も発現が 3 割ほど低下していたことより TGF- β で誘導される C2orf54 が逆に Smad シグナルへ影響を与えている可能性が示唆された。

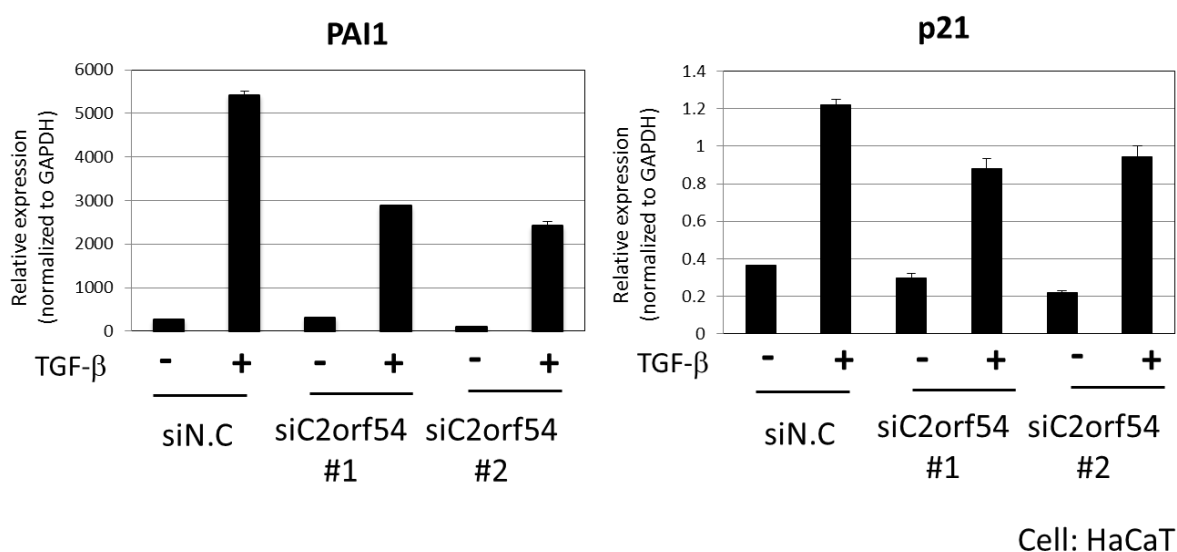


図 11 C2orf54 の PAI 1 , p21 への影響

Smad2/3 の直接の標的遺伝子である PAI1 についても RT-PCR で発現を検討した。その結果、TGF- β 刺激により PAI1、p21 の著明な上昇がみられた。また、C2orf54 をノックダウンすることにより PAI1 の発現が半分程度に低下し、p21 も 3 割程度低下した。

また、C2orf54を抑えることで、TGF- β シグナルの直接の標的である PAI1、p21 の発現が減少することが確認されたが実際に C2orf54を抑えることでPAI1 やp21 への Smad2/3 の結合が減弱するかを検討するため、HaCaT 細胞に C2orf54 の siRNA をトランスフェクションした後、TGF- β 刺激を行ったサンプルで ChIP-qPCR を行った。ChIP を行っていない input サンプルとの相対比較を用いてこれらの遺伝子領域における Smad2/3 の結合の程度を確認したところ、PAI1、p21 共に Smad2/3 の減弱は見られず、逆に増強していることが確認された。

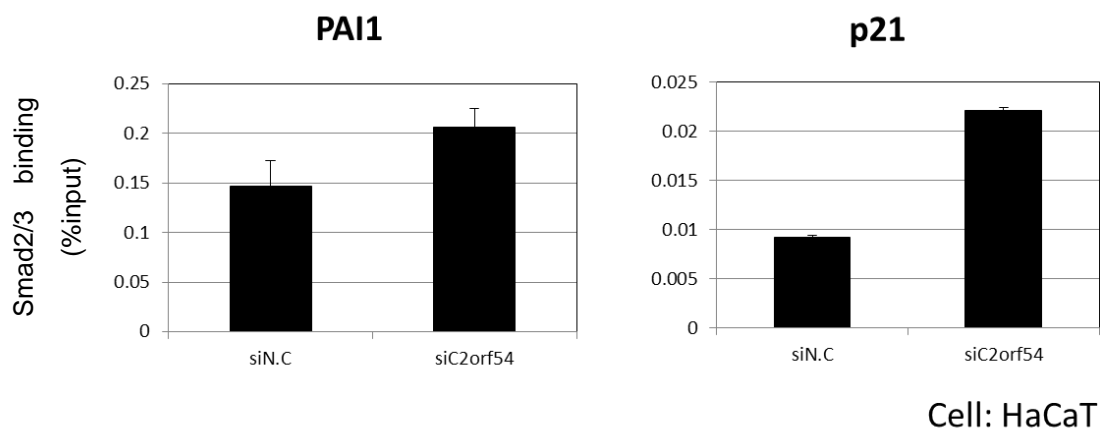


図 12 C2orf54 ノックダウン時における Smad2/3 ChIP-qPCR

C2orf54 に対する siRNA をトランスフェクションした後、抗 Smad2/3 抗体を用いて ChIP-qPCR を行った。

その結果、TGF- β の直接の標的であることが知られている PAI1、p21 に対する Smad2/3 の結合は、コントロール siRNA と比較して減弱しておらず、逆に増強している結果となった。

以上の結果から TGF- β で誘導される C2orf54 が、feed forward に Smad 経路に作用していることが示唆された。そこで ChIP-qPCR の結果から C2orf54 が Smad の cofactor を制御している可能性を考え、c-Ski に注目した。Ski は Smad3/4 と結合してその DNA 結合能を増強し、転写を抑制していることが知られている^[37](図 13)。

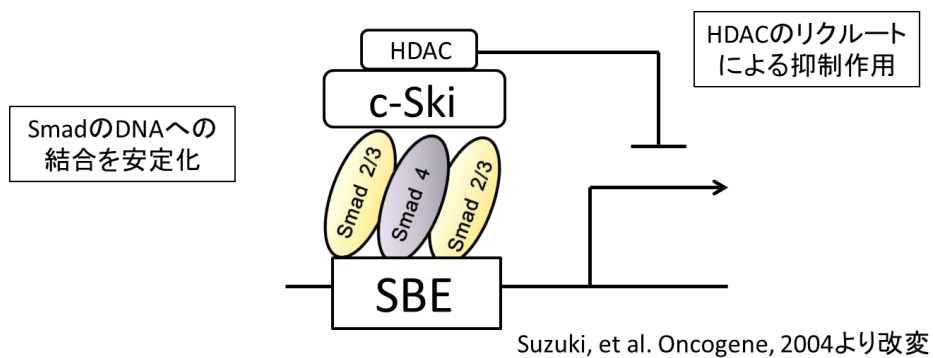


図 13 Smad シグナルに対する c-Ski の役割

c-Ski は Smad 複合体が DNA に結合した際、その結合を安定化させる作用と、HDAC をリクルートすることによる転写抑制作用が報告されている。

そこで、C2orf54 と Smad2, 3, 4 の直接の影響を確認するため、6myc タグをつけた Smad2, 3, 4 と、FLAG タグをつけた C2orf54 を用いて直接の結合がみられるかを確認した(図 13)。6myc タグをつけた Smad2、Smad3、Smad4 と FLAG タグをつけた C2orf54 を強制発現させ、myc タグに対する抗体を用いて免疫沈降を行い、ウエスタンブロットを行った後 FLAG タグに対する抗体で検出した。その結果、Smad2 や Smad4 との結合はみられなかったが、Smad3 との結合が認められた。このことから TGF- β シグナルにより誘導された C2orf54 は Smad3 と結合することにより Smad シグナルを制御している可能性が示された。

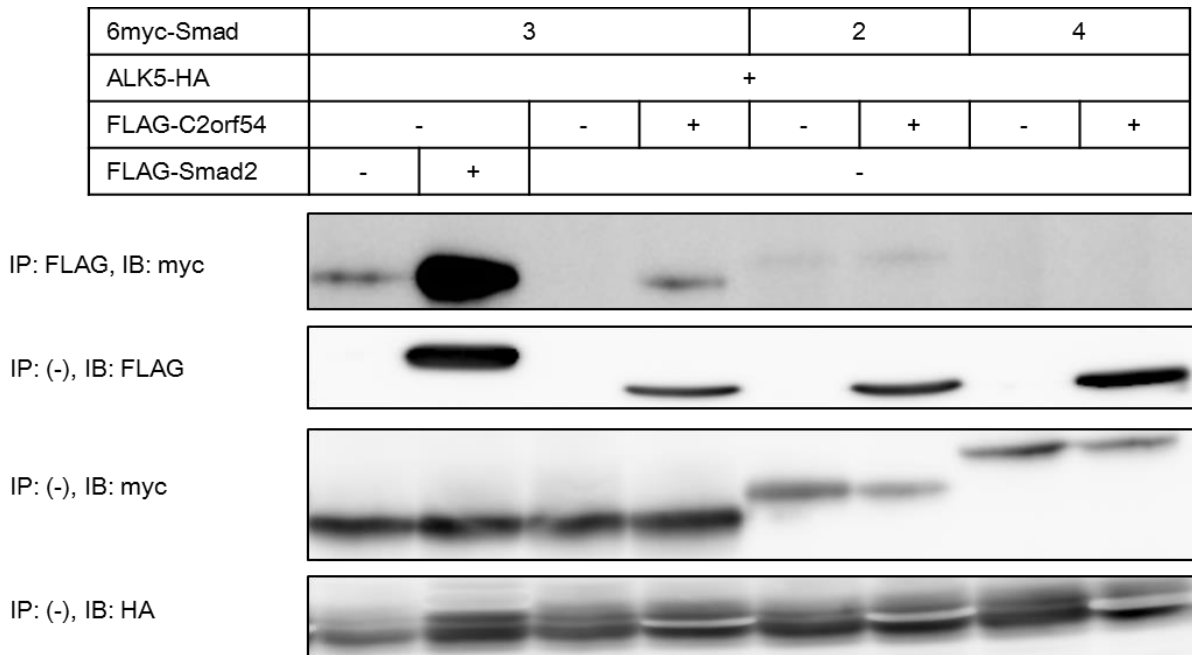


図 13 C2orf54 と Smad2、Smad3、Smad4 の結合の確認

6myc タグをつけた Smad2、Smad3、Smad4 と FLAG タグをつけた C2orf54 を強制発現させ、FLAG の抗体で IP を行い、ウエスタンブロットを行い myc タグの抗体で検出した。ポジティブコントロールとして FLAG タグのついた Smad2 を用いて Smad3 との結合がみられることも確認した。その結果、C2orf54 と Smad2 や Smad4 との結合はみられなかったが、Smad3 の結合が確認された。

続いて Smad3 と c-ski との結合に与える C2orf54 の作用を評価した。その結果、c-Ski と Smad3 は結合するが、そこに C2orf54 が存在すると用量依存的に c-Ski の発現及び c-Ski と Smad3 の結合が減弱し、C2orf54 と Smad3 の結合が増強する結果となった。つまり TGF- β シグナルの抑制因子である c-Ski が C2orf54 発現により分解促進されていることを示唆する結果となった (図 14)。

以上のことより、TGF- β で誘導される C2orf54 は、TGF- β シグナルの抑制因子である c-Ski を抑えることで Smad による標的遺伝子の発現の増強を引き起こすことが示唆された。

FLAG- Smad3	+	+	+	+
6myc-c-Ski	+	+	+	+
6myc-C2orf54	-	+	++	+++

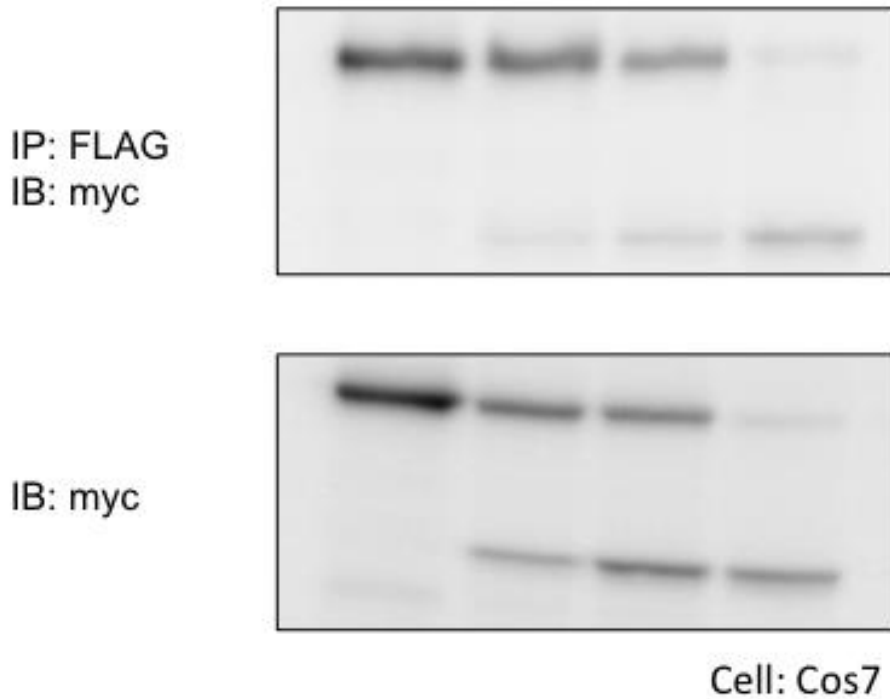


図 14 C2orf54 が c-Ski と Smad3 の結合へ与える影響

C2orf54 が c-Ski と Smad3 の結合に与えるをウエスタンブロットを用いて確認した。c-Ski と Smad3 は結合するが、そこに C2orf54 が存在すると用量依存的に c-Ski と Smad3 の結合が減弱し、反対に C2orf54 と Smad3 の結合が増加していくことが認められた。

考察

1. TGF- β による C2orf54 発現誘導と表皮細胞でのインボルクリン発現への関与

TGF- β シグナルの下流で Smad 複合体は主たるシグナル伝達因子として、細胞膜から核内での転写調節に至る重要な役割を担っている。TGF- β が表皮角化細胞の分化や腫瘍化に重要であり^{[21][38]}、その下流因子である Smad2 は表皮のホメオスターシスの維持にも大切であることなどが示されてきているが^[39]、その Smad の作用メカニズムまでは詳細には分かっていない。本検討では、培地を変えることで分化した状態と未分化の状態をコントロールできる HPEK 細胞を用いることにより、同じ遺伝学的背景において未分化の状態では Smad3 によって発現誘導されていないが分化することで誘導される遺伝子を、より少ないバイアスで同定することが可能になった。この解析においては ChIP-sequencing によって Smad3 の直接の発現制御下にあることを担保し、且つ RNA-sequencing によってプローブの性質の相違のため発現マイクロアレイでは困難であった、遺伝子間の発現定量比較を可能にし、実際に mRNA が発現あるいは誘導される遺伝子を抽出することができた。また TGF- β シグナル解析のモデル細胞であり分化した表皮角化細胞でもある HaCaT 細胞との Smad 共通結合領域解析および RNA-sequencing 解析と組み合わせたことで C2orf54 をはじめとして同定した新規標的遺伝子群が広く分化した表皮細胞一般において TGF- β の下流因子として役割を果たしていることが期待される。

これらの遺伝子の働きに関して現在のところ報告はない。公開されている Cancer Genome Anatomy Project の SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)デー

タベースでは、皮膚での発現が最も高く、次いで網膜、肺などで発現が高い。本研究ではこのうち C2orf54 によるインボルクリンの発現誘導作用を見出したが、このインボルクリンは皮膚の分化の過程の後期で生成され、トランスグルタミナーゼの働きにより架橋することで cornified envelope を形成し皮膚のバリア機能に重要な役割を果たしていることが知られている^{[40][41][42]}。TGF- β は用量依存的にインボルクリンの発現を誘導するという報告がある^[43]。バリア機能の障害によりおこるとされているアトピー性皮膚炎では代償的にケラチンやインボルクリンの発現が正常の皮膚組織と比べて著明に上昇しているとの報告もある^{[44][45]}が、逆に減少するという報告もある^[46]。また、この cornified envelope が未成熟な状態となり、皮膚のターンオーバーが正常よりもはるかに亢進することが尋常性乾癬の病態であるが、この尋常性乾癬でも TGF- β が重要な役割を担っている^{[47][48]}。乾癬患者では表皮および血清中に TGF- β が検出され^[49]、TGF- β 1 の血清レベルは密接に疾患の重症度と相関しているという報告もある^[50]。インボルクリンは表皮角化細胞の分化の指標として用いられるが、乾癬の病変部では基底層に近いところからもインボルクリン陽性の細胞が見られ、不全角化の状態を呈しているという報告もある^[51]。

インボルクリンの発現制御機構として、カルシウムなどが刺激となり PKC、RAS を介して MAPK 経路を経て AP1 (activator protein 1) や Sp1、C/EBP (enhancer binding protein) が制御領域に結合することで調節しているとの報告がある^[52]。しかし、前述のとおり皮膚のバリア機能の重要性とそこに関与する多数の因子を考慮すると、必ずしも全てが明らかになっているとはいえない。所属研究室をはじめとしていくつかの研究室でこれまで TGF- β がインボルクリンの

発現誘導を行うことが示されてきたが^[53]、本研究結果はその発現が直接 Smad2/3 の制御下にあると同時に、その発現誘導に C2orf54 が必須であることを示すものである。C2orf54 が他のインボルクリン制御因子の作用にもかかわっているか否かの検討は今後の興味深い検討課題である。また本研究では合わせて分化表皮細胞で産生されるインボルクリン以外の Filaggrin などのバリア機能関連遺伝子についても合わせて評価を行ったが、必ずしも TGF- β -Smad2/3 の直接の制御下ではなく、C2orf54 による調節も受けていないことが明らかになった。このインボルクリン選択性の意義についても今後の検討が必要と考えられる。以上、今回同定した C2orf54 は TGF- β の下流因子としてインボルクリンの発現を feed-forward に制御していることが考えられるが、その機能メカニズムとしてタンパク構造から予測される NTase (Nucleotidyltransferase) 活性の重要性、C 末端側にありタンパク-タンパク相互作用に役割を果たすと考えられるプロリンリッチな SH3 結合ドメインについては今後も変異体などを用いた更なる解析が必要と考えられる。

表皮細胞において TGF- β が果たす役割は大きく、特に分化促進作用をコントロールすることで各種皮膚疾患への治療法の応用が期待されるが、同時に TGF- β は皮膚のみならず全身で種々の作用を果たしている。そこで今回同定した TGF- β の下流因子である C2orf54 の活性や結合タンパクとの相互作用をコントロールすることでインボルクリンをはじめとする皮膚のバリア機能を選択的に正常化することができれば他臓器への TGF- β の影響を最小限にした有用な治療法開発へとつながることが期待される。

また、TGF- β により誘導される C2orf54 が Smad3 と直接結合することも明らかとなり、C2orf54 をノックダウンすることで Smad2/3 の直接の標的遺伝子とし

て知られる PAI1、p21 の発現も抑制されることから今回同定した C2orf54 は TGF- β シグナルの下流で Smad3 と協調して Smad シグナルそのものにも影響を与えていることが示唆された。この C2orf54 の feed-forward な働きについては今後さらなる解析が必要であるが、表皮角化細胞の分化の過程における TGF- β シグナルの重要性を鑑みると大変興味深く、C2orf54 の発現量が各種皮膚疾患の予後に関連している可能性も考えられる。

第 2 章

NMuMG 細胞における Smad2/3 の結合領域の解析

序論

1. EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition、上皮-間葉転換)

上皮細胞は極性を有して秩序だった配列を構成することで組織を構築しているが、生理的・病的にその構成が消失する重要なプロセスが存在する。この現象を Elizabeth Hay らは EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition、上皮-間葉転換) と呼び、新たな概念として提唱した^[54]。個体発生における原腸陥入や器官形成、創傷治癒の過程に見られるこの現象では一部の上皮細胞が極性を失い、間葉系細胞様の形態および機能を獲得する。以来、EMT は発生学の分野で主に研究が進められてきたが、がん細胞においても局所浸潤や転移する際同様の現象が生じていることが知られるようになった^[55]。がん細胞が浸潤、転移する際それまで上皮細胞様の性質を持っていたものが極性を失い、細胞間接着分子の発現が失われて細胞同士の結びつきが疎になる。そして細胞外マトリックスを分解するプロテアーゼ Matrix metalloproteinase (MMP) のような分子を分泌しながら基底膜を超えて周辺組織へ浸潤していく。このように発生や創傷治癒、がんの浸潤転移において重要な役割を果たしている EMT の制御機構、制御因子を解明することは重要である。

EMT はまず上皮細胞で認められる強固な細胞間接着の減弱をきたすことから始まる (図 15)。中でもアドヘレンスジャンクションを構成している E-cadherin が重要な役割を担っている。E-cadherin は細胞膜貫通型タンパクであ

り、細胞外ドメインを介したホモフィリックな結合により細胞同士を接着させている。この E-cadherin の接着が喪失し、アクチンが細胞間接着の構成配列からアクチンストレスファイバーへと再構成され、線維芽細胞様へと形質転換する。このアクチンストレスファイバーの再構築には RhoA-ROCK シグナルが関与していることが知られている^[56]。そのほか、Fibronectin、N-cadherin、Vimentin などの間葉系マーカーの発現上昇や細胞運動能にかかわる MMPs などの発現誘導が EMT の指標として用いられている^{[57],[58]}。

2. TGF- β シグナルによる EMT の誘導

EMT を誘導する因子の研究も広く行われているが中でも TGF- β は代表的な EMT 誘導因子として知られている^[59]。TGF- β による EMT の誘導は *in vitro* で正常細胞株、がん細胞株において認められている^{[60]-[62]}。また、*in vivo* でも TGF- β 1 や TGF- β 2 のノックアウトマウスでみられる心房クッションの形成不全や、TGF- β 3 のノックアウトマウスで認められる口蓋裂は EMT 不全が原因であると考えられており、器官形成期に誘導される EMT への TGF- β の関与が示唆される^{[63],[64]}。そして TGF- β によって EMT を誘導する転写因子には zinc-finger 型転写因子である Snail、Slug、two-handed zinc-finger 型転写因子である δ EF1、SIP1、basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子である Twist や E2A (E12/E47) などが知られている^[65]。

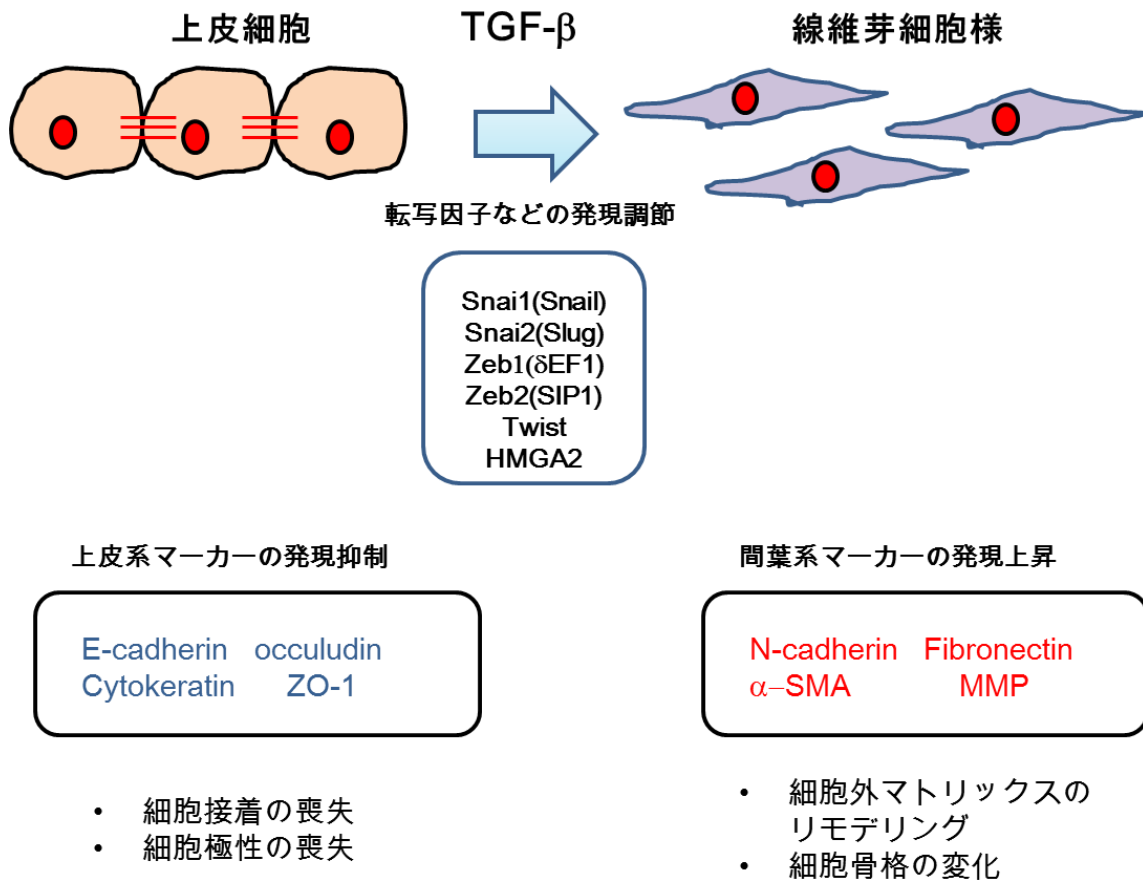


図 15 EMT 評価の指標と TGF- β による EMT 誘導時の制御因子

これらの転写因子を過剰発現させることにより E-cadherin の発現が抑制され間葉系マーカーの発現上昇を認める。また、がん細胞の中でも悪性度の高い低分化型のものや、転移したがん細胞ではこれらの転写因子の発現が高いことが報告されており、がんの悪性度と EMT を誘導する転写因子の発現には強い相関がある^[65]。これらの転写因子は E-cadherin のプロモーター上の E-box と呼ばれるコンセンサス配列に結合し E-cadherin の発現を直接抑制することが知られているが^[66]、どのように TGF- β シグナルの制御をうけるのか、また、E-cadherin 以外の EMT に伴う変化に TGF- β シグナルがどのように関与しているのかは未だ十分に明らかにはなっていない。

本研究では以上の背景から、乳腺上皮細胞の EMT のプロセスにおいて TGF- β シグナルがどのように役割を果たしているか、それぞれ Smad ファミリーの ChIP-sequencing と RNA-sequencing を用いて網羅的な解析を行い、明らかにすることを目的とした。

実験材料と方法

細胞培養

マウス乳腺上皮細胞 NMuMG 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS)、50 UI/ml penicillin、50 ug/ml streptomycin、10 ug/ml insulin (細胞化学研究所)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (high glucose) (Life technologies)を用い、37°C、5%の条件で培養を行った。

試薬

本研究で用いた Human recombinant TGF- β 3 は R&D (Minneapolis, MN, USA)より購入したものを使用した。

市販抗体

mouse モノクローナル Smad2/3 抗体 (BD)

クロマチン免疫沈降法 (ChIP)

細胞を 15 cm または 10 cm dish に播種した。細胞は TGF- β 3 で 1 ng/ml の濃度で 1.5 時間刺激した。固定は、終濃度が 1%になるようホルムアルデヒドを添加し、室温で 10 分間震蕩した。その後、終濃度が 0.125 M となるようグリシン水溶液を添加し、室温で 5 分間震蕩した。氷冷した PBS にて細胞を 2 回洗浄した後、氷冷した PBS を 1 ml 添加し、スクレイパーで掻き集め、4°Cで遠心し上清を除いた。細胞ペ

レットは 1 ml の SDS lysis buffer (1% SDS、50 mM Tris-HCl (pH 8.1), 10 mM EDTA, プロテアーゼインヒビター (P8340, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 用時添加) を添加し再懸濁した。この細胞懸濁液を Bioruptor UCW-201 (コスモ・バイオ, 東京, 日本) を用いて断片化を行った。断片化の条件は出力 'H' で 30 秒を 3 回、インターバルは 30 秒とした。得られたサンプルは 17,800 x g で 8°C 10 分間遠心し、得られた上清の一部をインプット用サンプルとして取り分け、残りを ChIP dilution buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% TritonX-100, Complete EDTA-free protease inhibitors (Roche Diagnostics)) で 10 倍希釈し、予め 10 ug の抗体と 0.5% BSA を含有する PBS で 4°C にてインキュベートした Dynabeads (Life technologies) を加え、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer-treated 15-ml polypropylene tube (アシスト, 東京, 日本) に入れ、4°C で一晩震蕩した。ビーズは、遠心沈降して回収した後、wash buffer (50 mM HEPES-KOH (pH7.0), 0.5 M LiCl (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA, 0.7 % sodium deoxycholate, 1% NP-40) にて 3 回洗浄し、Magnetic Particle Concentrator (Life technologies) にて、回収した。SDS-lysis buffer を 200 ul/tube 添加し、65°C で懸濁後 16 時間、静置した。上清を PCR purification kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いて精製し、RNase-free 水で溶出した。得られた ChIP サンプルは定量的リアルタイム PCR 法により、解析を行った。

用いたプライマーは以下のとおりである。

ChIP

	Fwd プライマー	Rev プライマー
mouse		
Smad7	tagaaacccgatctgttgttgcg	cctctgctcggctggtccactgc
HBB	caacctgcccagggcctcac	aggctgctgtctctggcctgt

ChIP-sequencing

NMuMG 細胞での Smad2/3 の結合部位の同定は ChIP-sequencing 法により行った。15 cm または 10 cm dish に播種した細胞に TGF- β 3 1 ng/ml で 1.5 時間刺激後上記 ChIP 法によりサンプルを取得した。得られたサンプルは Qubit (Life technologies) で DNA 量を測定し、およそ 5 ng を東京大学先端技術研究センターゲノムサイエンス分野 (油谷浩幸教授) に依頼してメーカーのプロトコルに従いライブラリーを作成の上、Genome Analyzer Iix (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いてシーケンスを行った。得られた 36 塩基のシーケンスタグのゲノムへのマッピングは Illumina 社のプロトコルに従い ELAND アルゴリズムを用い、1 塩基のミスマッチまで許容して行った。上記データ処理により得られたマッピングデータからの Smad2/3 および Smad3 結合部位の同定は CisGenome (version 2.0) の two sample analysis 法を用いて、パラメータはデフォルト値で行った。有意な結合部位の同定は、FDR < 5%で行った。Smad 結合領域における de novo motif prediction は CisGenome (version 2.0) の Gibbs motif sampler プログラムを使用した^[34]。算出されたモチーフの matrix file を用いた既知のモチーフ探索には TOMTOM を用いた^[35]。対照ゲノム領域塩基配列の取得や

同定モチーフの頻度解析は CisGenome を用いた。

RNA-sequencing

NMuMG 細胞の RNA-sequencing のデータは所属研究室で得た TGF- β 刺激後 24 時間のデータ (Arase et al, 未発表) を用いた。

遺伝子発現変化の散布図の作成には統計解析ソフト R および hexbin plotting function を用いた。Gene ontology 解析は DAVID の functional annotation clustering 機能を用いた^[67]。

結果

NMuMG 細胞における Smad2/3 の結合領域の解析

TGF- β シグナルはリン酸化した Smad2/3 と Smad4 が複合体を形成し、核内に移行することで各種遺伝子の転写を調節している。TGF- β は EMT において重要な役割を果たしていると考えられるが、前述のように EMT において重要とされる各種遺伝子の発現にどの程度 Smad2/3 が直接関与しているか、EMT を制御する主要な転写調節因子群の働きにかかわっているかは十分に明らかになっていない。そこで本研究では TGF- β による EMT 解析のモデル細胞であるマウス正常乳腺上皮細胞 NMuMG 細胞を用いて TGF- β 刺激後 1.5 時間と 24 時間において細胞をホルマリン固定・回収し、HPEK や HaCaT と同様にソニケーションにより DNA を断片化した後 Smad2/3 抗体で ChIP を行い、次世代シーケンサーでデータ取得した。

まず、ChIP-sequencing データの validation を行った。調製したサンプルについて Smad2/3 の結合を ChIP-qPCR で確認した。Smad2/3 の直接のターゲットであり、転写活性領域に Smad2/3 が結合することが知られている Smad7 をポジティブコントロールとし、Smad2/3 が転写活性領域に結合しない HBB をネガティブコントロールとして、非結合領域である HBB に対する Smad2/3 の結合と Smad2/3 の結合が知られている Smad7 領域を相対比較し、得られたサンプルで実際に TGF- β 刺激により Smad の結合が増強するかを確認したところ TGF- β 刺激後 1.5 時間のサンプルで 82 倍と著名に上昇しており、得られたサンプルでは十分な Smad 結合 DNA 断片の濃縮が得られたと考えられた (図 13)。

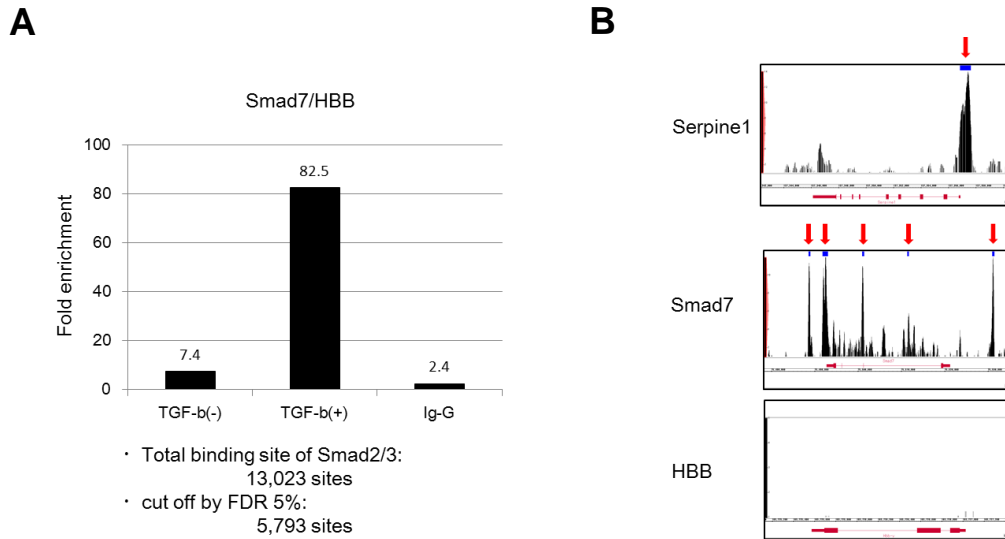


図 13 NMuMG 細胞における Smad2/3 結合領域

TGF-β刺激後 1.5 時間で細胞を固定し、Smad2/3 抗体でクロマチン IP を行い、次世代シーケンサを用いてシーケンシングを行った。

- A)** ChIP サンプルの評価のため Smad2/3 が結合することが知られている Smad7 の領域をポジティブコントロール領域とし、ネガティブコントロール領域として HBB 領域にプライマーを設計し qPCR で確認したところ TGF-β刺激なしの状態では 7.4 倍の濃縮度であったものが、TGF-β刺激により 82.5 倍と著明な上昇を認め Smad2/3 がゲノム上に確かに結合していることが示された。ChIP-sequencing の結果 Smad2/3 がゲノム上に結合している領域は 13,023 箇所認め、FDR 5% で有意な結合を計算したところ 5,793 箇所認めた。
- B)** コントロール領域への Smad2/3 の結合を示す。Serpine1、Smad7 では赤矢印で示す有意な結合領域を認め、ネガティブコントロール領域の HBB では結合を認めなかった。

また、刺激後 24 時間で回収したサンプルでは Smad7 遺伝子座ではエンリッチは認めなかった。これは、Smad の結合は TGF- β 刺激後早期に DNA に結合し、24 時間までにその結合は解除されることを示す結果となった。これらのサンプルを用いて ChIP-seq を行った結果、1.5 時間においてこの Smad2/3 の結合領域は全体で 13,023 箇所みられ、FDR 5% で計算したところ 5,793 箇所となった。24 時間のサンプルについては有意な結合部位は得られなかった。代表的な Smad2/3 の直接の制御遺伝子の結合波形を示す (図 13)。Serpine1, Smad7 は Smad2/3 の直接の結合領域として知られているがいずれも統計学的に有意な結合を認めた (図 13 赤矢印)。また、HBB をネガティブコントロール領域として確認したが結合は認められなかった。そこで、EMT に重要な役割を与えている因子として報告がある Snai1, Snai2, Zeb1, Zeb2, Twist,そして EMT の指標として上皮系・間葉系細胞での発現遺伝子である E-cadherin, N-cadherin, Fibronectin, α -SMA にも Smad が直接影響を及ぼすのかを見るため、これらの遺伝子上に Smad2/3 の結合領域があるかを調べた(図 14)。

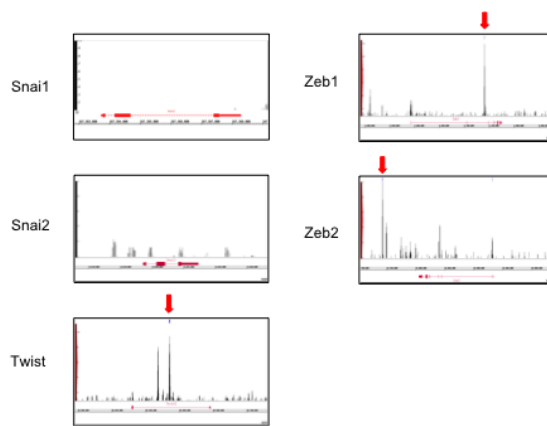
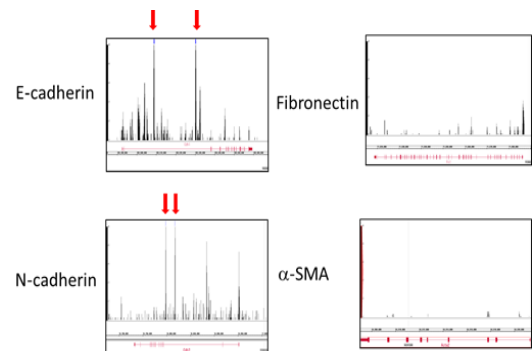
A**B**

図 14 各種 EMT 関連遺伝子座での Smad2/3 の結合

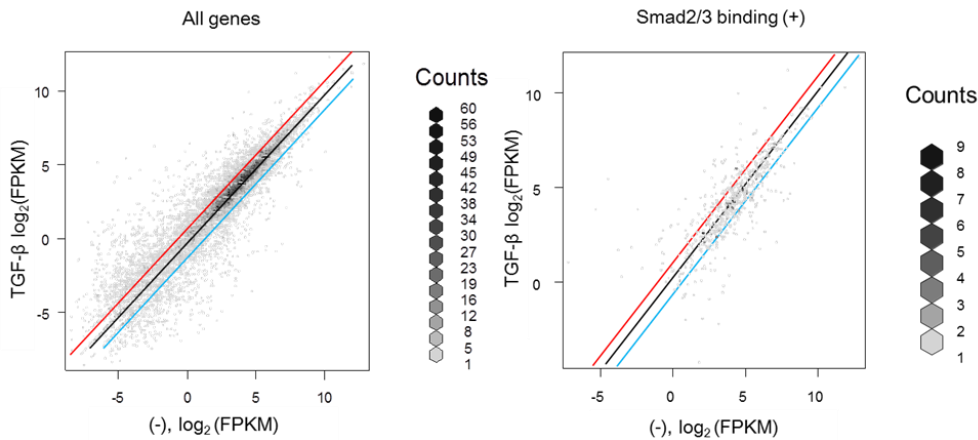
- A)** EMT の関連因子への Smad2/3 の結合を検討した。EMT には Snai1、Snai2、Zeb1、Zeb2、Twist などの因子が重要な役割を果たしているが中でも Snai1 が重要であるとされている。しかし、今回の網羅的な解析では Snai1、Snai2 には Smad2/3 の有意な結合は認めず、TGF- β の制御を受けていないことが示唆された。
- B)** EMT が起きる際、E-cadherin の低下と N-cadherin の上昇が見られるが今回の解析では E-cadherin、N-cadherin ともに Smad2/3 の結合を認め、TGF- β の制御を受けていることが明らかとなった。一方、Fibronectin、 α -SMA は Smad2/3 の結合を認めず、TGF- β の直接の制御を受けていないことが明らかとなった。

その結果、これまで TGF- β によって発現誘導され EMT において重要な役割を果たしているとして報告のある Snai1, Snai2 には Smad2/3 有意な結合は認められなかった。このことから EMT において Snai1, Snai2 は重要な役割を果たしているが、Smad2/3 の直接の標的遺伝子ではなく間に他の要素が関与している可能性が示唆された。また、興味深いことに、Zeb1, Zeb2, Twist における主たる Smad の結合領域はこれまでに示唆されていたプロモーター領域や転写開始点とは異なり、イントロン領域に存在した。E-cadherin についてはこれまで TGF- β による Zeb1, Zeb2 の発現誘導を介した間接的な転写抑制機構が知られていたが、ChIP-seq の結果から Smad の有意な結合が intragenic region に存在し、Smad2/3 もこの遺伝子の発現抑制に直接何らかの役割を果たしていることが示唆された。N-cadherin については TGF- β で誘導される Twist により発現制御を受けていることが報告されているが^[68]、今回 N-cadherin にも Smad2/3 が直接結合しており TGF- β が直接制御していることが示唆された。また Fibronectin や α -SMA の遺伝子座には有意な Smad2/3 の結合領域が存在せず、何らかの因子を介して転写誘導がなされていることが示唆された。

RNA-sequencing を用いた TGF- β による遺伝子発現変動の解析

続いて、所属研究室で行われた NMuMG 細胞での RNA-sequencing のデータを用い(未発表)、これらの Smad2/3 の結合が遺伝子発現にどの程度影響を及ぼすかを検討した (図 15)。

A



B

Up-regulated genes	Down-regulated genes
1. Cell adhesion Enrichment Score: 18.61	1. Cell cycles Enrichment Score: 25.49
2. Signal peptide Enrichment Score: 10.94	2. Chromosome Enrichment Score: 13.69
3. Angiogenesis Enrichment Score: 10.27	3. DNA replication Enrichment Score: 9.34
4. Adhesion Enrichment Score: 9.84	4. Cytoskeleton Enrichment Score: 8.11
5. Cytoskeleton Enrichment Score: 8.86	5. DNA repair Enrichment Score: 5.29

図 15 TGF-β刺激による遺伝子発現変動と遺伝子機能

- A)** TGF-β刺激による遺伝子の発現変動と、Smad2/3 が結合した遺伝子の発現変動を比較した。遺伝子はその長さも発現に影響を与えるため長さで補正した FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments)を用いた。横軸は TGF-β刺激なしの状態、縦軸は TGF-β刺激した時の遺伝子の発現を示す。黒の実線が刺激前後で発現変動を認めない遺伝子、赤の実線が刺激により発現変動2倍の遺伝子、青の実線が TGF-β刺激により発現が1/2になる遺伝子を示す。左図は全遺伝子の変動、右図は Smad2/3 が結合している遺伝子を表す。その結果、Smad2/3 が結合している遺伝子も TGF-β刺激により発現の上昇や低下が増加するわけではないことが明らかとなった。
- B)** 発現増加、発現低下する遺伝子について DAVID を用いて gene ontology 解析を行った。その結果、発現上昇する遺伝子は細胞接着に関する遺伝子が多く、発現低下する遺伝子では細胞周期に関する遺伝子が多いことが明らかとなった。

まず TGF- β 刺激の有無が Smad2/3 の結合にかかわらず遺伝子発現全体に与える影響を定量比較した。シーケンスで得られた遺伝子あたりのリード数は、総マップリード数と遺伝子の長さによって影響を受けるためそれらによって補正した FPKM (Fragments Per Kilo base of exon per Million mapped fragments) 値を用いた。その結果、TGF- β 24 時間の刺激により発現が 2 倍以上上昇あるいは減少する遺伝子のうち、Smad2/3 結合領域が転写開始点近傍に存在する遺伝子群を抽出して、TGF- β による遺伝子の発現変動への影響について検討した (図 15)。その結果 Smad2/3 の結合がある遺伝子においても、必ずしも TGF- β 刺激により顕著な発現変動をきたすとは限らないことが示唆された。

Gene ontology 解析では TGF- β により発現が上昇する遺伝子の中には細胞接着、シグナルペプチド、血管新生などの働きを持つ遺伝子が上位に挙げられた (発現変動が 2 倍以上の遺伝子) (図 15)。一方 TGF- β により発現が減少する遺伝子として細胞接着、DNA 複製などが上位に挙げられた (発現変動が 0.5 倍未満の遺伝子)。この結果はこの細胞の TGF- β に対する主たる細胞応答として知られる EMT 促進作用と細胞増殖抑制作用を強く反映しているものと考えられた^[69]。

Smad2/3 の結合モチーフの解析

ChIP-sequencing 及び RNA-sequencing の結果は Smad2/3 の結合が必ずしも TGF- β による転写調節作用の十分条件ではないことを示唆するものであった。そこで Smad2/3 結合部位における DNA 配列の特徴について解析を行い、遺伝子発現変動をきたすものとそうでないものについて比較を行った。遺伝子の発現変動が 2 倍以上の遺伝子のうち、転写開始点から 10 kbp 以内にある Smad2/3 結合領域は全部で 800

存在した。これらの結合領域に共通のモチーフを **Gibbs motif sampler** を用いて算出したところ、図 16 に示すモチーフ群が見出された。

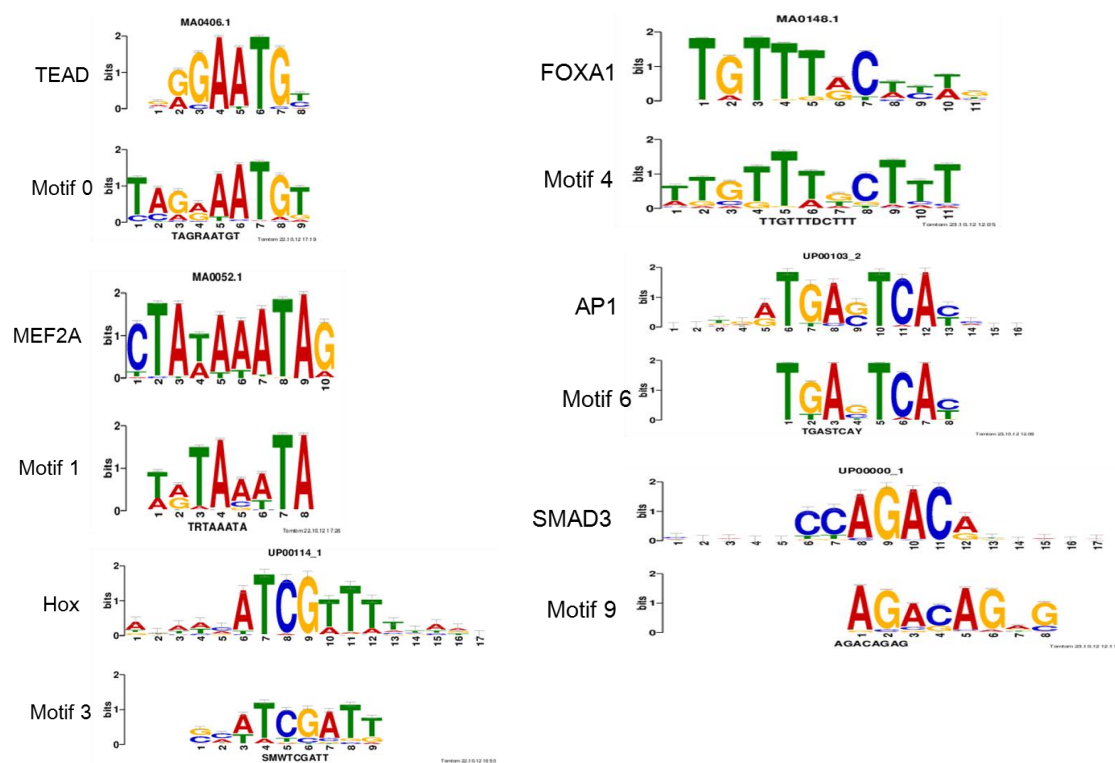


図 16 Smad2/3 結合領域におけるモチーフ解析

Smad2/3 の結合モチーフの解析結果を示す。

Motif 0 は TEAD の結合モチーフと類似し、Motif 1 は MEF2A、Motif 3 は Hox、Motif 4 は FOXA1、Motif 6 は AP1、Motif 9 は Smad3 と類似の結合モチーフであった。

TOMTOM を用いてそれぞれに類似する既知の転写因子結合モチーフを探索したところ、モチーフ 0 は TEAD の結合モチーフと類似しており、モチーフ 1 は MEF2A、モチーフ 3 は Hox、モチーフ 4 は FOXA1、モチーフ 6 は AP1、モチーフ 9 は Smad3 の結合配列と類似していた。それ以外のモチーフは繰り返し配列などからなり、明らかに類似するモチーフは存在しなかった。そこでそれぞれの同定したモチーフの Smad2/3 結合領域における頻度を転写開始点からの相対距離分布をマッチさせランダムに取得した対照ゲノム領域群における頻度と比較すると、モチーフ 1 (MEF2A 類似)を除いて今回新たに同定したモチーフはいずれもより高頻度に Smad2/3 結合領域に存在することがわかった。次に Smad2/3 結合領域を遺伝子発現変動があるものとそうでないものに分けて、同定したモチーフの頻度の違いを検討した。その結果、発現上昇する遺伝子群の Smad2/3 結合部位においてモチーフ 0 (TEAD 類似) の頻度が相対的に高いことが明らかになった(図 17)。

Motif	Frequency	Fold enrichment relative to Smad binding (-) Regions	Fold enrichment relative to Smad binding (+) Regions 1	Fold enrichment relative to Smad binding (+) Regions 2
Motif 0 (TEAD)	11.0%	2.05	1.61	2.18
Motif 1 (MEF2A)	11.3%	1.20	1.09	1.16
Motif 3 (HOX)	8.1%	2.10	1.36	1.11
Motif 4 (FOXA1)	13.1%	1.52	1.20	1.40
Motif 6 (AP1)	38.0%	9.50	1.06	1.30
Motif 9 (SMAD3)	21.9%	2.54	1.20	1.35

Smad binding (+) control 1: gene expressions were unchanged
Smad binding (+) control 2: located within 10kb from the TSS and not up-regulated

図 17 各モチーフの頻度と遺伝子発現変動との関係

図 12 で同定した結合モチーフごとの出現頻度と遺伝子発現変動との関係を解析した。各モチーフともに発現頻度は 10%以上認められ、特に AP1 は 38%もの出現頻度を認めた。また、これらのモチーフの頻度を Smad2/3 結合のないコントロール領域との頻度を比較したところ、Motif 1、Motif 4 は 1.2 倍、1.5 倍と低い値であったが他のモチーフは 2 倍以上の増幅を認めた。

続いて、それらの結合モチーフの中で実際に遺伝子発現の影響を 2 種類のコントロール領域を用いて計算した。コントロール 1 では Smad2/3 の結合を認めるが遺伝子発現変化が 10%以内の領域と比較したところ、Motif 0 のみが増幅を認めた。コントロール 2 では転写開始点 10kb 以内に Smad2/3 結合を認めるものの遺伝子発現上昇がない結合部位と比較したところやはり Motif 0 のみが増幅を認め、Motif 0 が遺伝子の発現変動に影響を与える Smad2/3 の結合領域に濃縮していることが明らかとなった。

考察

NMuMG 細胞における Smad2/3 結合領域の解析

胚発生やがん細胞の浸潤・転移や線維化などに EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) が重要な役割を果たしており、その誘導因子として TGF- β が広く知られている。また、EMT において上皮系から間葉系に転換する際に E-cadherin が減少するが、これは EMT の代表的な指標として考えられており、がんの悪性度とその発現が逆相関することが知られている。この E-cadherin の発現調節をすする転写因子として Snai1 (Snail)、Snai2 (Slug)、Zeb1(δ EF1)、Zeb2(SIP1)、Twist などの転写因子が知られている。Snai1 (Snail)は zinc-finger 型転写因子でショウジョウバエの中胚葉形成に必須の分子として単離された。この Snai1 (Snail)が EMT に関与することはニワトリ胚を用いた Snai2 (Slug)の loss of function の実験から明らかとなった。また、Snai1 (Snail)は過剰発現させることにより強力に E-cadherin の転写抑制を示し、EMT 誘導時に Snai1 (Snail)の発現が亢進し、E-cadherin のプロモーター上に直接結合することなどから Snai1 (Snail)が EMT の主な誘導因子として認識されるに至った^[70]。ヒト角膜上皮細胞においても TGF- β により Snai1、Snai2 の発現上昇と N-Cadherin の上昇および E-Cadherin が低下するという EMT が促進されることが報告されている^[71]。また、Zeb2 は δ EF1/Zfh1 ファミリーを形成する homeodomain/zinc finger 型転写因子で Smad1 に結合する分子として酵母の two-hybrid 法により同定されたため、SIP1 (smad1-interacting protein 1)とも呼ばれる^[72]。この Zeb2 はヒルシュスプリング病

の原因遺伝子の1つであり^[73]、ヒルシュスプルング病と小頭症や精神発達遅滞を併発したモワット-ウィルソン症候群(Mowat-Wilson syndrome)の原因遺伝子としても知られている^[74]。δEF1/Zfh1 がコードする ZEB1 と ZEB2 は、共に E-cadherin のプロモーター上に結合し転写を抑制し TGF-β により発現が上昇する^[75]がその詳細なメカニズムは不明であった。また、Twist は bHLH 型転写因子であり、Myogenin プロモーター上で E12 とヘテロ 2 量体を形成し、遺伝子発現を抑制することが知られている。また、Seathre-Chatzen syndrome の原因遺伝子として知られている^[76]。また、中等度分化型のヒト胃癌細胞株である CDK28 細胞において、Twist を過剰発現させると N-cadherin と Fibronectin の上昇と、E-cadherin の低下を認めるという報告もあり^[77]、Twist が EMT を起こす際重要な役割を果たすことが知られている。そして、Twist を乳がん細胞株において強制発現させると E-Cadherin のプロモーター上に Twist が結合し、E-Cadherin の発現が低下するという報告もある^[78]。これらの因子により EMT が制御されているが、EMT に伴う転写調節に関して TGF-β の下流での Smad の直接の作用を網羅的に検討した報告はこれまでなかった。今回の研究で Smad2/3 に対する抗体を用いた ChIP-sequencing により Snai1 (Snail)、Snai2 (Slug) 遺伝子座に有意な Smad2/3 の直接結合が認められなかったことはこれまでに考えられていた TGF-β による Snail ファミリーの制御機構について再考を迫るもので、その意義は大きい。すなわち、TGF-β は EMT を誘導するが、その主たる誘導因子である Snai1 (Snail)、Snai2 (Slug) の発現は、少なくとも全ての細胞種で下流因子の Smad2/3 によって直接誘導されているわけではない、ということになる。本検討で用いた乳腺上皮細胞ではたとえば Smad 以外の経路 (non-Smad-pathway) を介して Snai1 (Snail)

を発現誘導していることが可能性として考えられ、今後の検討が必要と思われる。

また、それ以外の *Zeb1*、*Zeb2*、*Twist* についても *Smad2/3* の有意な結合は認められるがその部位がこれまで検討・報告されてきた転写開始点やその上流のプロモーター領域とは異なり、イントロンもしくは遺伝子の下流に存在した。したがってこうした部位：エンハンサーと考えられる領域への *Smad* の結合もまた、これまで考えられてきた転写制御機構とは異なる形で標的遺伝子の発現を制御している可能性が高い。

また、*TGF- β* により発現変動する遺伝子のオントロジーを見てみると細胞接着に関する遺伝子の発現が上昇しており、細胞周期に関する遺伝子が抑制されていた。がんの浸潤などで *EMT* が現象として生じるとき、まず辺縁部の細胞の接着能が低下し組織から剥離、浮遊しやすくなる状態を呈するとともにそれに続く細胞が増殖することで追隨する。事実、*Snail* の発現により細胞増殖を抑える報告が *Nieto* らのグループから出ている^[79]。この報告では *MDCK* 細胞に *Snail* の過剰発現株を樹立すると *p21* の発現が上昇し *G0/G1* 期が増加するとともに、*Bcl-xL* 等の *anti-apoptotic* な遺伝子発現を誘導し、血清飢餓による細胞死に抵抗性となる。その結果 *EMT* を獲得した細胞は増殖抑制的に働き且つ細胞死抵抗性になるとしている。一方で *TGF- β* は上皮細胞に対しては強力な細胞増殖抑制因子として働くが間葉系細胞に対しては細胞増殖促進作用を有するため *EMT* により細胞が間葉系の形質にシフトすることで増殖促進的に働くことは考えられる。事実、*EMT* により *E-cadherin* の発現が抑制されると *adherens junction* の裏打ちタンパクである *β -catenin* は細胞内では *E-cadherin* との結合が優位であるため *E-cadherin* の絶対量が減少した時には、*Wnt pathway* や *GSK-3 β* の制御を受けるようになり、

β -catenin は細胞質での機能が優位となり、TCF/LEF と結合して核内での転写を調節し、c-myc や cyclin D の転写を上昇させる結果、細胞増殖を促進するとする報告もある^[80]。これらの解釈は EMT という現象が単一の性質の細胞のみで構成されているのではなく、上皮系と間葉系の細胞の転換点のどの時点を観察するかによっても変わりうるもので妥当と考えられる。

Smad2/3 の結合部位周辺に存在するモチーフ検索の結果見出した TEAD、MEF2A、HOX、FOXA1、AP1、SMAD3 は、いずれも TGF- β シグナル、Smad との関連が個別の遺伝子の発現調節解析などで報告されている^{[81]-[85]}。今回の結果からは遺伝子発現には関係なく、Smad2/3 結合領域に AP1 モチーフと Smad3 結合モチーフが上昇していた。これらは直接 Smad 複合体の結合するモチーフとして知られる。また、興味深いことに TEAD モチーフのみがコントロール領域と比較して遺伝子発現誘導する遺伝子座近傍の Smad 結合領域に濃縮していることが見出された。TEAD (Transcriptional Enhancer Factor Domain) は Hippo 経路の下流で TEA/ATTS DNA 結合領域を持ち多様な遺伝子の転写活性を調節している。今回の解析の結果は、乳腺上皮細胞の EMT において、Smad2/3 の標的遺伝子のサブセットの発現誘導が TEAD 依存的に新たな synexpression group^[86]を形成していることを示すものとして興味深い。

結論

- 分化と未分化の状態をコントロールできる HPEK 細胞と、株化された表皮角化細胞の HaCaT 細胞を用いて TGF- β シグナルの役割を解析するため ChIP-sequencing と RNA-sequencing を行った。
- 未分化の状態では発現しておらず、分化した状態で発現し、かつ TGF- β で誘導される遺伝子として C2orf54 を同定した。
- C2orf54 の機能については既報はなかったが、表皮の分化の指標であり、cornified envelope の重要な構成要素であるインボルクリンの発現に影響を与えることが明らかとなった。
- C2orf54 は Smad3 と直接結合することにより Smad シグナルへ影響を与えていることが示唆された。
- TGF- β が EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition)へ与える影響を調べるため乳腺上皮細胞を用いて ChIP-sequencing を行った。
- EMT に重要や役割を果たす Snail、Slug などの遺伝子には Smad2/3 の結合は認められず、必ずしも常に直接の制御を受けているわけではないことが明らかとなった。
- Smad の結合モチーフ解析の結果、TEAD 結合モチーフの存在が TGF- β の標的遺伝子のサブセットにおいて遺伝子発現変化に影響を与えていることが示唆された。

引用文献

1. Rice, R. H. & Green, H. Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell* 18, 681–94, 1979
2. 厚生労働省：平成17年患者調査の概況. at <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/05/05.html>
3. WHO | The known health effects of UV. at <http://www.who.int/uv/faq/uvhealthfac/en/index1.html>
4. Heldin, C. H., Miyazono, K. & ten Dijke, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465–71, 1997
5. Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. & Massagué, J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370, 341–7, 1994
6. Shi, Y. & Massagué, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685–700, 2003
7. Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T. & Miyazono, K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* 7, 1191–204, 2002
8. Nakao, A., Afrakhte, M., Morén, A., Nakayama, T., Christian, J. L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N. E., Heldin, C. H. & ten Dijke, P. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 389, 631–5, 1997
9. Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y. Y., Grinnell, B. W., Richardson, M. A., Topper, J. N., Gimbrone, M. A., Wrana, J. L. & Falb, D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* 89, 1165–73, 1997
10. Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M. & Miyazono, K. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 389, 622–6, 1997
11. Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Inactivation of the type II

- TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268, 1336–8, 1995
12. Hahn, S. A., Schutte, M., Hoque, A. T., Moskaluk, C. A., da Costa, L. T., Rozenblum, E., Weinstein, C. L., Fischer, A., Yeo, C. J., Hruban, R. H. & Kern, S. E. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271, 350–3, 1996
 13. Hata, A., Shi, Y. & Massagué, J. TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol. Med. Today* 4, 257–62, 1998
 14. Myeroff, L. L., Parsons, R., Kim, S. J., Hedrick, L., Cho, K. R., Orth, K., Mathis, M., Kinzler, K. W., Lutterbaugh, J. & Park, K. A transforming growth factor beta receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.* 55, 5545–7, 1995
 15. Lu, S. L., Zhang, W. C., Akiyama, Y., Nomizu, T. & Yuasa, Y. Genomic structure of the transforming growth factor beta type II receptor gene and its mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Cancer Res.* 56, 4595–8, 1996
 16. Derynck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577–84, 2003
 17. Sellheyer, K., Bickenbach, J. R., Rothnagel, J. A., Bundman, D., Longley, M. A., Krieg, T., Roche, N. S., Roberts, A. B. & Roop, D. R. Inhibition of skin development by overexpression of transforming growth factor beta 1 in the epidermis of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5237–41, 1993
 18. Liu, X., Alexander, V., Vijayachandra, K., Bhogte, E., Diamond, I. & Glick, A. Conditional epidermal expression of TGFbeta 1 blocks neonatal lethality but causes a reversible hyperplasia and alopecia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9139–44, 2001
 19. Wang, X. J., Greenhalgh, D. A., Bickenbach, J. R., Jiang, A., Bundman, D. S., Krieg, T., Derynck, R. & Roop, D. R. Expression of a dominant-negative type II transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor in the epidermis of transgenic mice blocks TGF-beta-mediated growth inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2386–91, 1997

20. Amendt, C., Schirmacher, P., Weber, H. & Blessing, M. Expression of a dominant negative type II TGF-beta receptor in mouse skin results in an increase in carcinoma incidence and an acceleration of carcinoma development. *Oncogene* 17, 25–34, 1998
21. He, W., Cao, T., Smith, D. A., Myers, T. E. & Wang, X. J. Smads mediate signaling of the TGFbeta superfamily in normal keratinocytes but are lost during skin chemical carcinogenesis. *Oncogene* 20, 471–83, 2001
22. He, W., Li, A. G., Wang, D., Han, S., Zheng, B., Goumans, M.-J., Ten Dijke, P. & Wang, X.-J. Overexpression of Smad7 results in severe pathological alterations in multiple epithelial tissues. *EMBO J.* 21, 2580–90, 2002
23. Zhu, Y., Richardson, J. A., Parada, L. F. & Graff, J. M. Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell* 94, 703–14, 1998
24. Datto, M. B., Frederick, J. P., Pan, L., Borton, A. J., Zhuang, Y. & Wang, X. F. Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2495–504, 1999
25. Yang, X., Letterio, J. J., Lechleider, R. J., Chen, L., Hayman, R., Gu, H., Roberts, A. B. & Deng, C. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta. *EMBO J.* 18, 1280–91, 1999
26. Park, P. J. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat. Rev. Genet.* 10, 669–80, 2009
27. Morikawa, M., Koinuma, D., Tsutsumi, S., Vasilaki, E., Kanki, Y., Heldin, C.-H., Aburatani, H. & Miyazono, K. ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif. *Nucleic Acids Res.* 39, 8712–27, 2011
28. Mizutani, A., Koinuma, D., Tsutsumi, S., Kamimura, N., Morikawa, M., Suzuki, H. I., Imamura, T., Miyazono, K. & Aburatani, H. Cell type-specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 proteins and hepatocyte nuclear factor 4alpha in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 286, 29848–60, 2011
29. Koinuma, D., Tsutsumi, S., Kamimura, N., Imamura, T., Aburatani, H. & Miyazono, K. Promoter-wide analysis of Smad4 binding sites in human epithelial cells. *Cancer Sci.* 100, 2133–42, 2009

30. Koinuma, D., Tsutsumi, S., Kamimura, N., Taniguchi, H., Miyazawa, K., Sunamura, M., Imamura, T., Miyazono, K. & Aburatani, H. Chromatin immunoprecipitation on microarray analysis of Smad2/3 binding sites reveals roles of ETS1 and TFAP2A in transforming growth factor beta signaling. *Mol. Cell. Biol.* 29, 172–86, 2009
31. Mizutani, A., Koinuma, D., Tsutsumi, S., Kamimura, N., Morikawa, M., Suzuki, H. I., Imamura, T., Miyazono, K. & Aburatani, H. Cell type-specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 proteins and hepatocyte nuclear factor 4alpha in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 286, 29848–60, 2011
32. Liu, Z., Lin, X., Cai, Z., Zhang, Z., Han, C., Jia, S., Meng, A. & Wang, Q. Global identification of SMAD2 target genes reveals a role for multiple co-regulatory factors in zebrafish early gastrulas. *J. Biol. Chem.* 286, 28520–32, 2011
33. Mullen, A. C., Orlando, D. A., Newman, J. J., Lovén, J., Kumar, R. M., Bilodeau, S., Reddy, J., Guenther, M. G., DeKoter, R. P. & Young, R. A. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- β signaling. *Cell* 147, 565–76, 2011
34. Ji, H., Jiang, H., Ma, W. & Wong, W. H. Using CisGenome to analyze ChIP-chip and ChIP-seq data. *Curr. Protoc. Bioinformatics* Chapter 2, Unit2.13, 2011
35. Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W. & Noble, W. S. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* 37, W202–8, 2009
36. Kuchta, K., Knizewski, L., Wyrwicz, L. S., Rychlewski, L. & Ginalski, K. Comprehensive classification of nucleotidyltransferase fold proteins: identification of novel families and their representatives in human. *Nucleic Acids Res.* 37, 7701–14, 2009
37. Suzuki, H., Yagi, K., Kondo, M., Kato, M., Miyazono, K. & Miyazawa, K. c-Ski inhibits the TGF-beta signaling pathway through stabilization of inactive Smad complexes on Smad-binding elements. *Oncogene* 23, 5068–76, 2004
38. Buschke, S., Stark, H.-J., Cerezo, A., Prätzel-Wunder, S., Boehnke, K., Kollar, J., Langbein, L., Heldin, C.-H. & Boukamp, P. A decisive function of transforming growth factor- β /Smad signaling in tissue morphogenesis and differentiation of human HaCaT keratinocytes. *Mol. Biol. Cell* 22, 782–94, 2011

39. Ito, Y., Sarkar, P., Mi, Q., Wu, N., Bringas, P., Liu, Y., Reddy, S., Maxson, R., Deng, C. & Chai, Y. Overexpression of Smad2 reveals its concerted action with Smad4 in regulating TGF-beta-mediated epidermal homeostasis. *Dev. Biol.* 236, 181–94, 2001
40. Steinert, P. M. & Marekov, L. N. Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope. *J. Biol. Chem.* 272, 2021–30, 1997
41. Candi, E., Schmidt, R. & Melino, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 328–40, 2005
42. Proksch, E., Brandner, J. M. & Jensen, J.-M. The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* 17, 1063–72, 2008
43. Reiss, M. & Sartorelli, A. C. Regulation of growth and differentiation of human keratinocytes by type beta transforming growth factor and epidermal growth factor. *Cancer Res.* 47, 6705–9, 1987
44. Theerawatanasirikul, S., Sailasuta, A., Thanawongnuwech, R. & Suriyaphol, G. Alterations of keratins, involucrin and filaggrin gene expression in canine atopic dermatitis. *Res. Vet. Sci.* 93, 1287–92, 2012
45. Jarzab, J., Filipowska, B., Zebracka, J., Kowalska, M., Bozek, A., Rachowska, R., Gubala, E., Grzanka, A., Hadas, E. & Jarzab, B. Locus 1q21 Gene expression changes in atopic dermatitis skin lesions: deregulation of small proline-rich region 1A. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 151, 28–37, 2010
46. Jensen, J.-M., Fölster-Holst, R., Baranowsky, A., Schunck, M., Winoto-Morbach, S., Neumann, C., Schütze, S. & Proksch, E. Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 122, 1423–31, 2004
47. Leivo, T., Leivo, I., Kariniemi, A. L., Keski-Oja, J. & Virtanen, I. Down-regulation of transforming growth factor-beta receptors I and II is seen in lesional but not non-lesional psoriatic epidermis. *Br. J. Dermatol.* 138, 57–62, 1998
48. Doi, H., Shibata, M.-A., Kiyokane, K. & Otsuki, Y. Downregulation of TGFbeta isoforms and their receptors contributes to keratinocyte hyperproliferation in psoriasis vulgaris. *J. Dermatol. Sci.* 33, 7–16, 2003

49. Flisiak, I., Chodynicka, B., Porebski, P. & Flisiak, R. Association between psoriasis severity and transforming growth factor beta(1) and beta (2) in plasma and scales from psoriatic lesions. *Cytokine* 19, 121–5, 2002
50. Nockowski, P., Szepietowski, J. C., Ziarkiewicz, M. & Baran, E. Serum concentrations of transforming growth factor beta 1 in patients with psoriasis vulgaris. *Acta Dermatovenerol. Croat.* 12, 2–6, 2004
51. Dover, R. & Watt, F. M. Measurement of the rate of epidermal terminal differentiation: expression of involucrin by S-phase keratinocytes in culture and in psoriatic plaques. *J. Invest. Dermatol.* 89, 349–52, 1987
52. Eckert, R. L., Crish, J. F., Efimova, T., Dashti, S. R., Deucher, A., Bone, F., Adhikary, G., Huang, G., Gopalakrishnan, R. & Balasubramanian, S. Regulation of involucrin gene expression. *J. Invest. Dermatol.* 123, 13–22, 2004
53. Akiyoshi, S., Ishii, M., Nemoto, N., Kawabata, M., Aburatani, H. & Miyazono, K. Targets of transcriptional regulation by transforming growth factor-beta: expression profile analysis using oligonucleotide arrays. *Jpn. J. Cancer Res.* 92, 257–68, 2001
54. Greenburg, G. & Hay, E. D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J. Cell Biol.* 95, 333–9, 1982
55. Thiery, J. P., Almeida, D., Huang, R. Y. J. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–90, 2009
56. Sahai, E. & Marshall, C. J. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat. Cell Biol.* 4, 408–15, 2002
57. Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 131–42, 2006
58. Xu, J., Lamouille, S. & Derynck, R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 19, 156–72, 2009
59. Moustakas, A. & Heldin, C.-H. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci.* 98, 1512–20, 2007

60. Zavadil, J. & Böttinger, E. P. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24, 5764–74, 2005
61. Kondo, M., Cubillo, E., Tobiume, K., Shirakihara, T., Fukuda, N., Suzuki, H., Shimizu, K., Takehara, K., Cano, A., Saitoh, M. & Miyazono, K. A role for Id in the regulation of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cell Death Differ.* 11, 1092–101, 2004
62. Horiguchi, K., Shirakihara, T., Nakano, A., Imamura, T., Miyazono, K. & Saitoh, M. Role of Ras signaling in the induction of snail by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* 284, 245–53, 2009
63. Kaartinen, V., Cui, X. M., Heisterkamp, N., Groffen, J. & Shuler, C. F. Transforming growth factor-beta3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of the basement membrane. *Dev. Dyn.* 209, 255–60, 1997
64. Camenisch, T. D., Molin, D. G. M., Person, A., Runyan, R. B., Gittenberger-de Groot, A. C., McDonald, J. A. & Klewer, S. E. Temporal and distinct TGFbeta ligand requirements during mouse and avian endocardial cushion morphogenesis. *Dev. Biol.* 248, 170–81, 2002
65. Peinado, H., Olmeda, D. & Cano, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* 7, 415–28, 2007
66. Peinado, H., Portillo, F. & Cano, A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 365–75, 2004
67. Huang, D. W., Sherman, B. T., Tan, Q., Kir, J., Liu, D., Bryant, D., Guo, Y., Stephens, R., Baseler, M. W., Lane, H. C. & Lempicki, R. A. DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 35, W169–75, 2007
68. Ng, Y. H., Zhu, H. & Leung, P. C. K. Twist modulates human trophoblastic cell invasion via regulation of N-cadherin. *Endocrinology* 153, 925–36, 2012
69. Ikushima, H., Komuro, A., Isogaya, K., Shinozaki, M., Hellman, U., Miyazawa, K. & Miyazono, K. An Id-like molecule, HHM, is a synexpression group-restricted regulator of TGF-beta signalling. *EMBO J.* 27, 2955–65, 2008

70. Barrallo-Gimeno, A. & Nieto, M. A. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151–61, 2005
71. Aomatsu, K., Arao, T., Sugioka, K., Matsumoto, K., Tamura, D., Kudo, K., Kaneda, H., Tanaka, K., Fujita, Y., Shimomura, Y. & Nishio, K. TGF- β induces sustained upregulation of SNAI1 and SNAI2 through Smad and non-Smad pathways in a human corneal epithelial cell line. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 2437–43, 2011
72. Verschuere, 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. & 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, 20489–98, 1999
73. Wakamatsu, N., Yamada, Y., Yamada, K., Ono, T., Nomura, N., Taniguchi, H., Kitoh, H., Mutoh, N., Yamanaka, T., Mushiake, K., Kato, K., Sonta, S. & Nagaya, M. Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease. *Nat. Genet.* 27, 369–70, 2001
74. Cacheux, V., Dastot-Le Moal, F., Kääriäinen, H., Bondurand, N., Rintala, R., Boissier, B., Wilson, M., Mowat, D. & Goossens, M. Loss-of-function mutations in SIP1 Smad interacting protein 1 result in a syndromic Hirschsprung disease. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1503–10, 2001
75. Shirakihara, T., Saitoh, M. & Miyazono, K. Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by deltaEF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF-beta. *Mol. Biol. Cell* 18, 3533–44, 2007
76. Howard, T. D., Paznekas, W. A., Green, E. D., Chiang, L. C., Ma, N., Ortiz de Luna, R. I., Garcia Delgado, C., Gonzalez-Ramos, M., Kline, A. D. & Jabs, E. W. Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat. Genet.* 15, 36–41, 1997
77. Yang, Z., Zhang, X., Gang, H., Li, X., Li, Z., Wang, T., Han, J., Luo, T., Wen, F. & Wu, X. Up-regulation of gastric cancer cell invasion by Twist is accompanied by N-cadherin and fibronectin expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 925–30, 2007

78. Vesuna, F., van Diest, P., Chen, J. H. & Raman, V. Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 235–41, 2008
79. Vega, S., Morales, A. V, Ocaña, O. H., Valdés, F., Fabregat, I. & Nieto, M. A. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 18, 1131–43, 2004
80. Eger, A., Stockinger, A., Park, J., Langkopf, E., Mikula, M., Gotzmann, J., Mikulits, W., Beug, H. & Foisner, R. beta-Catenin and TGFbeta signalling cooperate to maintain a mesenchymal phenotype after FosER-induced epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene* 23, 2672–2680, 2004
81. Quinn, Z. A., Yang, C. C., Wrana, J. L. & McDermott, J. C. Smad proteins function as co-modulators for MEF2 transcriptional regulatory proteins. *Nucleic Acids Res.* 29, 732–42, 2001
82. Hullinger, T. G., Pan, Q., Viswanathan, H. L. & Somerman, M. J. TGFbeta and BMP-2 activation of the OPN promoter: roles of smad- and hox-binding elements. *Exp. Cell Res.* 262, 69–74, 2001
83. Taube, J. H., Allton, K., Duncan, S. A., Shen, L. & Barton, M. C. Foxa1 functions as a pioneer transcription factor at transposable elements to activate Afp during differentiation of embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 285, 16135–44, 2010
84. Zhang, Y., Feng, X. H. & Derynck, R. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* 394, 909–13, 1998
85. Fujii, M., Toyoda, T., Nakanishi, H., Yatabe, Y., Sato, A., Matsudaira, Y., Ito, H., Murakami, H., Kondo, Y., Kondo, E., Hida, T., Tsujimura, T., Osada, H. & Sekido, Y. TGF- β synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. *J. Exp. Med.* 209, 479–94, 2012
86. Massagué, J., Seoane, J. & Wotton, D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19, 2783–810, 2005

謝辞

本研究を施行するにあたり、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講座の宮園浩平教授に厚く御礼申し上げます。また、研究方針から細かい実験に至るまで、終始御指導賜りました鯉沼代造准教授に深く御礼申し上げます。サンプルのゲノムシーケンスに御尽力頂きました東京大学先端技術研究センターゲノムサイエンス分野の油谷浩幸教授に深く御礼申し上げます。研究方針等で貴重な御助言を与えて頂きました山梨大学医学部医学工学総合研究部生化学講座第二教室の宮澤恵二教授に心より御礼申し上げます。研究を進めるなかで多くの御支援をいただきました分子病理学講座の皆様にも心より感謝申し上げます。

最後に、博士課程進学より現在に至るまで、あらゆる面で支えてくれた家族に心より感謝致します。