

論文の内容の要旨

論文題目 TGF- β 誘導性上皮-間葉移行の分子機構の解析

指導教員 宮園 浩平教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月進学

医学博士課程

病因・病理学専攻

白木・ ・哉

EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition、上皮-間葉移行) とは上皮細胞が間葉系様細胞に形態的及び機能的に変化する現象であり、個体発生における原腸陥入や器官形成、創傷治癒、癌の浸潤・転移などの過程で観察される。EMT を獲得した細胞では、上皮系から間葉系への発現マーカーの変化やアクチンストレスファイバーの再構築が誘導され、運動能や浸潤能が著しく亢進する。TGF- β は EMT を誘導する代表的なサイトカインである。*in vivo* では、癌浸潤先端での癌細胞に対して TGF- β による EMT の誘導が示唆されており、TGF- β のノックアウトマウスでは口蓋裂や心臓房室組織の形成不全など EMT 誘導が必須な発生過程での異常が認められる。*in vitro* においてもいくつかの正常上皮細胞や癌細胞で TGF- β による EMT 様の変化が誘導されることが知られている。しかし、EMT 獲得の評価系として用いられているマーカー遺伝子の発現変化に関わる TGF- β シグナルの下流因子は未だほぼ明らかにされていない。そこで本研究の前半部では上皮細胞に特異的な発現を示す E-cadherin の TGF- β 誘

導性 EMT での転写制御機構の分子生物学的解析を行った。また、TGF- β 刺激によって EMT を獲得すると FGF の受容体である FGFR の発現量が変動することを見出したことから、本研究の後半部では TGF- β 誘導性 EMT への FGF シグナルの関与についての検討を試みた。

マウス乳腺上皮 NMuMG 細胞では TGF- β 刺激後約 24 時間から顕著な EMT の獲得を形態的に観察することができる。TGF- β 刺激後の EMT の評価マーカー及び EMT との関連が報告されている数種類の転写因子について発現量の経時変化を定量性 RT-PCR 法で解析し、 δ EF1 ファミリーに属する転写因子である SIP1 と δ EF1 が E-cadherin と逆相関して上昇することに着目した。SIP1 と δ EF1 は共に E-cadherin のプロモーター領域へ直接結合することにより転写を強力に抑制し、過剰発現することで内在性の E-cadherin の発現が抑えられた。さらに、siRNA を用いて両転写因子のノックダウンを行うと、TGF- β による E-cadherin の転写抑制やそれに伴う運動能の亢進が抑えられた。しかしその一方で、間葉系マーカーである fibronectin や N-cadherin は SIP1 や δ EF1 による制御を受けず、これら転写因子は特定の EMT マーカーにのみ特異的に作用していることが明らかとなった。

NMuMG 細胞は TGF- β で EMT を獲得すると、EMT のマーカー遺伝子以外に FGFR1IIIc の発現上昇が認められた。そこでこの受容体が認識するリガンドである FGF2 を TGF- β と共に添加して持続的な共刺激を行ったところ、驚くことに TGF- β の単独刺激時と比べてより顕著な線維芽細胞様の細胞骨格変化と細胞運動能や細胞外マトリックスの分解の亢進がもたらされた。一方、NMuMG 細胞を TGF- β の単独刺激下で4日間以上の長期培養を行うと δ EF1 転写因子を介して筋線維芽細胞のマーカーである α SMA が発現が誘導された。この α SMA 陽性細胞は FGF2 との共刺激下では出現しなかった。以上のことから、FGF2 からのシグナルは TGF- β による EMT

の誘導を形態的にも機能的にも促進し、一方で筋線維芽細胞様細胞への分化を抑制していることが示唆された。

本研究で示した TGF- β 誘導性 EMT で見られる各々のマーカー遺伝子の転写制御が別々の転写因子によって行われているという成果は、癌治療や癌診断を最終目標とした分子生物学的観点からの EMT 研究にとって極めて重要な発見であると考えている。また、FGF2 との協調作用という新規のシグナルクロストークからは、今後創傷治癒や線維化などの分子レベルでの理解や組織工学にも繋がることを期待できる。