

論文の内容の要旨

論文題目 肺腺癌細胞における TGF- β シグナルの制御機構の解析

氏名 磯谷 一暢

Transforming growth factor- β (TGF- β)は発生・分化から各種線維化疾患・癌細胞の浸潤・転移などにおいて多彩な作用を発揮するサイトカインである。その制御機構は多段階にわたり、これまでの解析から、多くの細胞に共通のもののほか、組織・細胞種特異的になされていることも明らかになっている。一方 Thyroid transcription factor-1 (TTF1)は甲状腺や肺の発生と恒常性維持に重要な役割が知られる転写因子である。TTF1 はまた肺癌との関係が知られており、その発現のない肺腺癌は予後不良として知られる。また TTF1 の発現消失と癌の進行も実験的に報告されてきた。この TTF1 は TGF- β によって、それ自身の発現抑制や TGF- β シグナルの下流因子 Smad3 による標的遺伝子の転写調節領域への結合阻害など、抑制的な制御を受けることが明らかとなっている。一方所属研究室では近年、TTF1 が肺癌細胞の Mesenchymal-to-epithelial transition (MET)を起こす機能を有すること、それが TGF- β による肺癌細胞の EMT を抑制することを報告している。このように TGF- β と TTF1 は相互機能抑制を行っていることが示唆されるが、そのメカニズムについては十分に明らかにされていない。そこで本研究では肺癌細胞における TGF- β シグナルの制御因子としての TTF1 の作用メカニズムを明らかにすることを目的として解析を行った。

TGF- β の主たる細胞内シグナル伝達経路である Smad 経路は細胞膜状の受容体によるリン酸化から Smad ファミリー間の複合体形成と核内移行、そして標的遺伝子プロモーター上での転写活性のそれぞれの段階で、

様々な機能制御因子によって脱リン酸化・ユビキチン化と分解などを通して調節を受けている。本検討ではまず、TTF1 の発現のない A549 細胞での TTF1 の過剰発現の検討により、TTF1 は核内にあって、Smad3 のリン酸化と核内移行には影響を与えずに Smad3/4 複合体形成を阻害することが明らかとなった。一分子レベルでの結合を検出できる in situ PLA 法を活用して、TTF1 によるこの Smad3/4 複合体乖離作用が、細胞質ではなく、核内のみで行われていること、さらに乖離した Smad3 はそのまま核内にとどまる傾向にあることが明らかとなった。この状態において TTF1 は核内に局在して、免疫沈降法では検出できないような比較的弱い結合で Smad3 と共に局在し、且つそれは TGF- β 非依存的であった。

TTF1 による Smad3 の核内での機能調節機構が考えられたことから、次に Smad3 の標的遺伝子プロモーターへの結合への TTF1 の影響をクロマチン免疫沈降法(ChIP)によって検討した。Smad3 の ChIP に適した抗体を同定し、その Smad2,3,4 ファミリー内での特異性を検定した上で、代表的な TGF- β 応答性の遺伝子である PAI-1 と Smad7 のプロモーター領域における既知の Smad3 結合部位における検討を行った。その結果 Smad3 の PAI-1 プロモーターへの結合が TTF1 の過剰発現によって抑制されたことから、TTF1 が Smad3 の標的遺伝子座への TGF- β による結合増強を阻害していることが示唆された。TGF- β による PAI-1 遺伝子発現誘導への TTF1 の抑制効果は所属研究室で明らかにされており、本研究でも PAI-1 のプロモーターを用いたルシフェラーゼ活性が TTF1 の過剰発現で抑制された。興味深いことに、Smad binding element のみからなるレポーターでは、この TTF1 による転写抑制効果は認められなかったことから、TTF1 の作用には、標的遺伝子の転写調節領域上の他のシスエレメントが重要であることが示唆された。

TGF- β の標的遺伝子の転写調節領域には多様なシスエレメントが存在することが考えられる。そこで Smad3 のゲノム上の結合部位を ChIP-sequencing (ChIP-seq) 法により網羅的に同定するとともに、その結合に対する TTF1 の役割を解析することとした。内在性の TTF1 を発現する肺腺癌細胞 H441 を用い、TTF1 を siRNA によりノックダウンし Smad3 の ChIP-seq を行って control siRNA におけるデータと比較を行った。さらに TTF1 についても合わせてその結合部位の網羅的同定を行い Smad3 の結合部位との比較検討を行った。用いた TTF1 抗体は既知の標的遺伝子サーファクタント蛋白 B (SpB) のプロモーターでの ChIP で良好な結果を得られた。Smad3 および TTF1 の有意な結合部位を算出した結果、TTF1 の ChIP-seq では FDR 0.1 % で 31,083 箇所同定された。一方 Smad3 結合部位は TGF- β 刺激後 1.5 時間では control siRNA サンプルでは FDR 0.1 % で 8,941 箇所同定されたのに対して、TTF1 の siRNA では同じ同定条件で 14,145 箇所と増加した。この傾向は TGF- β 刺激後 24 時間でも同様で control siRNA の 4,530 箇所に対して、TTF1 siRNA の 11,906 箇所であった。

このピーク数の変化を踏まえて、TTF1 siRNA の Smad3 の結合部位と control siRNA での結合部位との重複を TGF- β 刺激後 1.5 時間と 24 時間のそれぞれについて計算した結果、1.5 時間では control siRNA 条件、すなわち TTF1 が発現している状態での Smad3 結合部位 8,941 か所のうち 80.5 %は TTF1 ノックダウンによっても引き続き有意な結合が認められた。一方 TTF1 siRNA によって新たに出現した Smad3 結合部位は、6,944 か所にのぼった。次に TTF1 結合部位と TGF- β 刺激後 1.5 時間の Smad3 結合部位の重複について同様の解析を行った。Control siRNA 群では Smad3 結合部位 8,941 か所のうち 7,839 か所が TTF1 結合部位と重複した。それに対して、TTF1 siRNA 群では Smad3 結合部位は前述のように 14,145 か所に増加するものの、重複部位は 1,009 か所の増加にとどまり、一方で TTF1 と結合部位の重複しない、5,297 か所の新たな結合部位が認められた。以上のことから TTF1 siRNA によって新たに他のゲノム領域に Smad3 結合部位が出現することが示唆された。このことはそれぞれのピークにおける Smad3 結合程度の変化を ChIP-seq でマップされたリード数で定量的に比較した結果でも同様であった。そして発現マイクロアレイによる解析から、こうした Smad3 の結合強度の変化が標的遺伝子発現と関係することが示唆された。以上のことから、TTF1 の Smad3 への作用は、これまで提唱されていた、クロマチン上の結合部位をめぐる競合ではなく、Smad 複合体の乖離を介した機序を含む、その他の要因によるものであると考えられた。

本研究では初めて TTF1 結合部位を ChIP-seq によって網羅的に同定したことから、CisGenome によるモチーフ解析によってこれら TTF1 結合部位に濃縮するモチーフを算出した。同定した TTF1 モチーフはランダムなコントロールゲノム配列データセットと比較して、ChIP-seq での TTF1 結合部位に 4.3 倍濃縮して存在し、その TTF1 結合部位における頻度は 34.2 %であった。また TGF- β 刺激により、TTF1 の結合は一様に抑制を受ける傾向が認められ、Smad3 の結合が部位選択的に TTF1 によって制御を受けることは対照的な結果であった。

ChIP-seq による解析から、PAI-1 領域には複数の Smad3 結合ピークが認められた。その多くは TTF1 の結合ピークと重複せず、TTF1 発現下ではピークが大きく減弱した。一方で転写開始点から 10k bps 下流の PAI-1 遺伝子のコーディング領域に、TTF1 の結合ピークがあり、かつ TTF1 の存在下でも Smad3 の結合ピークが大きく変わらない領域が存在した。TTF1 が Smad3 の DNA 結合部位の分布に影響を与えるとともに、Smad3/4 複合体を核内で乖離することが観察されたことから、この部位において、Smad4 の DNA への結合を確かめるために、ChIP を行った。その結果、TTF1 発現下においても、Smad3 は転写開始点の下流 10kbps の領域に結合しているが、そこでは Smad4 と複合体を形成せず、単独で結合していることが考えられた。また Smad4 は TTF1 存在下には、検討を行った PAI-1 の転写調節領域には結合しないことが示唆された。

Smad3 が TTF1 と同時にクロマチン上に存在することが ChIP-seq によって示されたことから、最後に TTF1 の DNA 結合が Smad 複合体の乖離に必要かどうかを検討するため、TTF1 のホメオドメインのうち DNA への結合に重要であるとされるアルギニン残基を変異させた TTF1 遺伝子を作成した。この TTF1 の R214C 変異体は Smad3/4 結合を阻害しないことが分かった。この R214C は A549 細胞における SpB 遺伝子の転写活性を向上させることができなかったことから、Smad3/4 複合体の乖離に TTF1 の DNA 結合能が重要である可能性が示唆された。

以上のことから、肺癌細胞において TTF1 が標的遺伝子上で Smad3/4 複合体の乖離を促すとともに Smad3/4 の結合部位に影響を与え、TGF- β による転写調節に影響を与えているという、シグナルの制御機構が示唆された。