

論文の内容の要旨

論文題目 TGF- β による EMT 誘導の分子機構の解析

氏名 堀口 華奈

EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition, 上皮-間葉転換)とは、上皮細胞が間葉系細胞様に形態的及び機能的に変化する現象のことであり、個体発生における原腸陥入や創傷治癒、線維症、癌の浸潤や転移などの過程で観察される。EMT を獲得した細胞では、E-cadherin などの上皮系マーカーから間葉系マーカーへの変換が行われ、細胞極性が喪失する。また、アクチンストレスファイバーの再構築やマトリックス分解酵素の分泌が促進され、運動能や浸潤能が亢進する。EMT を誘導する代表的なサイトカインとして TGF- β (transforming growth factor- β) が知られる。TGF- β のノックアウトマウスでは口蓋裂や心臓房室クッションの形成不全など EMT 誘導が必須な発生過程での異常が認められる。また、癌細胞自身や炎症性細胞により分泌される TGF- β は癌細胞の EMT を誘導し、浸潤や転移を促進することが示されている。

当研究室の先行研究により、TGF- β により EMT を誘導した細胞では FGF-2 (fibroblastic growth factor-2) に対する応答性が上昇することが示された。FGF-2 は創傷部位や多くの癌組織で発現が上昇することが報告されている増殖因子である。FGF-2 を TGF- β と共に添加して共刺激を行うと、TGF- β 単独刺激時と比較してより顕著な線維芽細胞様の細胞骨格の変化と細胞運動能や浸潤能の亢進がもたらされる。FGF 受容体 (FGFR) は 1~4 の 4 種類が同定されており、FGFR1~3 は組織特異的な選択的スプライシングによりリガンド特異性の異なる IIIb 型 (FGFRIIIb) と IIIc 型 (FGFRIIIc) の 2 つのアイソフォームを産生する。FGFRIIIb は上皮系の細胞で発現が高く、FGFRIIIc は間葉系の細胞で主に発現する。FGF-2 は FGFRIIIc に対するリガンドである。原腸陥入時の間充織細胞では FGFR1 の発現が高く、中胚葉形成や原腸陥入での細胞運動などの発生初期の形態形成に重要な役割を果たすことが知られている。FGFR1 をノックアウトしたマウスでは EMT の誘導が必須である原腸陥入の過程に障害が起こり、原腸胚形成期に胎生致死となる。興味深いことに、FGFR1IIIc の特異的ノックアウトマウスは FGFR1 ノックアウトマウスと同一

の表現型を示すが、FGFR1IIIb の特異的ノックアウトマウスでは表現型の異常は認められない。発生や癌悪性化で認められる EMT の誘導は、様々なシグナルが時空間的にクロストークすることで生じるとされており、TGF- β による細胞の外的刺激に対する応答性の変化は細胞の EMT 獲得に重要な役割を果たしていることが考えられる。そこで本研究では、TGF- β と FGF シグナルの関連性を調べるため、TGF- β による FGFR の発現制御機構について解析を行った。

まず、マウス乳腺上皮細胞である NMuMG 細胞や EpRas 細胞において TGF- β 誘導性 EMT に伴う FGFR の発現変化を解析したところ、無刺激の細胞では FGFR1IIIb の発現が高いのに対し、TGF- β 刺激により EMT を誘導した細胞では FGFR1IIIb の発現は抑制され、FGFR1IIIc の発現が上昇した。そこで FGFR の選択的スプライシングを制御する因子の発現を解析したところ、TGF- β は RNA 結合タンパク質である ESRP (epithelial splicing regulatory protein) の発現を抑制することが明らかとなった。ESRP は FGFR のエクソン IIIb と IIIc 間のイントロン上の cis エlement に結合し、エクソン IIIb を含むスプライシングを促進し、エクソン IIIc を含むスプライシングを抑制する。ESRP をノックダウンした細胞では TGF- β 刺激と同様に FGFR1IIIb の発現が抑制され、FGFR1IIIc の発現が亢進した。一方、ESRP を過剰発現させた細胞に TGF- β 刺激すると FGFR1IIIb の発現が維持され、FGFR1IIIc の発現は検出されなかった。これらの結果から、TGF- β は ESRP の発現抑制を介して FGFR の選択的スプライシングを IIIb 型から IIIc 型へと変化させることが明らかとなった。

次に、TGF- β による ESRP の発現変動を調べたところ ESRP の発現は TGF- β 刺激後徐々に減少し、この経時変化は E-cadherin のそれと一致していた。NMuMG 細胞において TGF- β による E-cadherin の発現低下は δ EF1 ファミリータンパク質に属する δ EF1 と SIP1 により制御されることが報告されている。また、ESRP のプロモーター上には δ EF1 ファミリータンパク質が結合する E-box 配列が存在したことから、TGF- β の下流で ESRP の転写を制御する因子として δ EF1 と SIP1 に着目した。 δ EF1 と SIP1 を過剰発現すると ESRP のプロモーター活性の低下や転写抑制が認められた。さらに、siRNA を用いてこれらの転写因子をノックダウンすると TGF- β による ESRP の転写抑制やそれに伴う FGFR の選択的スプライシングの変化が抑制された。これらの結果から、

TGF- β は δ EF1 ファミリーの発現誘導を介して ESRP の発現を抑制することが明らかとなった。

ヒト乳癌細胞パネルを用いて δ EF1、SIP1、ESRP の発現を比較したところ、 δ EF1 や SIP1 の発現が低い細胞では ESRP の発現が高く、 δ EF1 や SIP1 の発現が高い細胞では ESRP の発現が低いことが明らかとなった。また、これらの乳癌細胞株の分子病型分類と δ EF1、SIP1、ESRP の発現を比較すると、 δ EF1 と SIP1 の発現が低く ESRP の発現が高い乳癌細胞株は予後が比較的良好とされる Luminal type に主に分類され、 δ EF1 と SIP1 の発現が高く ESRP の発現が低い乳癌細胞株は予後不良な Basal type に分類された。このことから、 δ EF1 ファミリータンパク質の発現上昇や ESRP の発現低下は乳癌の悪性化や予後不良と関連することが示唆された。さらに、ESRP の発現が低い乳癌細胞株である MDA-MB-231 細胞と BT549 細胞で δ EF1 と SIP1 をノックダウンすると、ESRP の発現上昇が認められた。このことから、ヒト乳癌細胞株においても δ EF1 と SIP1 が ESRP の発現を抑制することが明らかとなった。

MDA-MB-231 細胞に ESRP を過剰発現させると、FGFR3c の発現が FGFR3b へと変化した。また、細胞形態が紡錘形から敷石状へと変化した。E-cadherin のタンパク量が上昇した。しかしその一方で、間葉系マーカーである N-cadherin や fibronectin の発現やアクチンストレスファイバーの形成には影響を与えず、ESRP は特定の EMT マーカーのみに特異的に作用していることが明らかとなった。同様に、ESRP を過剰発現させた NMuMG 細胞では TGF- β による敷石状から紡錘形への細胞形態の変化と E-cadherin の発現減少が抑制されたが、間葉系マーカーの発現やストレスファイバーの形成には影響が無かった。興味深いことに、E-cadherin mRNA 量を測定したところ、ESRP を過剰発現した細胞における TGF- β による E-cadherin の転写抑制はコントロールの細胞と同程度に認められた。このことから、ESRP は E-cadherin の転写量に影響を与えることなく、E-cadherin のタンパク量を増加させることが考えられる。これまで δ EF1 ファミリータンパク質は転写抑制を介して E-cadherin の発現を減少させることが知られていたが、直接の転写調節以外の過程に影響を与えることでも E-cadherin の発現量を減少させることが示唆された。本研究の中で、TGF- β は FGFR 以外にも CD44 や Mena、p120-catenin などの遺伝子の選択的スプライシングを上皮型から間葉系型へと変化させることが明らかとなった。これらの遺伝子のスプライシング

の変化は EMT や細胞運動能の調節に関わることが報告されており、こうした過程にも ESRP の発現抑制が関与している可能性がある。ESRP の過剰発現による E-cadherin の発現上昇には、こうした様々な遺伝子の選択的スプライシングの変化による遺伝子の機能変化が関与している可能性が考えられる。

最後に、乳癌患者の遺伝子発現公開データを用いた解析から、肺転移を有する症例では肺転移を持たない症例と比較して ESRP の発現が低い傾向が認められ、ESRP の発現が低い患者群では高い患者群と比較して無肺転移生存率が低い傾向が認められた。このことから、ESRP の発現低下が乳癌患者の予後不良マーカーとなりうることが示唆された。

以上のことから、 δ EF1 ファミリータンパク質は ESRP の発現を抑制することで FGFR をはじめとする遺伝子の選択的スプライシングを変化させ、細胞の EMT 形質の獲得に関与することが示唆された。 δ EF1 ファミリータンパク質を高発現する癌細胞は低分化型で浸潤性の高い表現型を有し、また ESRP の発現低下は乳癌患者の予後不良マーカーとなりうることが示唆された。このことから、遺伝子の選択的スプライシングの変化が癌の悪性化に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。そのため、EMT に伴い選択的スプライシングが変化する遺伝子の同定やその制御機構の解明は、EMT を標的とした診断や治療法の確立につながる重要な知見になると考えている。