

TGFβ シグナル伝達分子 Smad を介した TRB1 による細胞がん化の分子基盤

名古屋市立大学大学院

薬学研究科 助教 伊藤友香

名古屋市立大学大学院

薬学研究科 教授 林 秀敏

薬学研究科 准教授 井上靖道

1. 背景および目的

Tribbles - related protein 1 (TRB1) はアダプタータンパク質として様々なシグナル伝達を制御する分子であり、マクロファージの分化や脂質代謝、白血病などとの関連が示唆されている^{1) -3)}。また、TRB1 は大腸癌における発現亢進や卵巣癌や前立腺癌、膵臓癌との関連が報告されており、様々ながんとの関連が強く示唆されているが、がんにおける TRB1 の機能については十分には解明されていない^{4) -7)}。

一方、transforming growth factor - β (TGFβ) は細胞増殖や分化、アポトーシスなど多彩な細胞応答に関与するサイトカインであり、特に上皮細胞に対して強い細胞増殖抑制作用を示す。また、消化器系のがんなどにおいて TGFβ のシグナル伝達に関わる因子の変異や欠損が見つかり、これらのがんにおいて TGFβ はがん抑制シグナルとしてがんの発症や進展に関与すると考えられている⁸⁾。そこで本研究では、TRB1 の細胞がん化への作用を理解することを目的とし、TRB1 による TGFβ シグナル抑制の分子メカニズムの詳細を明らかにすることにした。

2. 方法

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 における TGFβ シグナル伝達因子 Smad の転写活性化をレポーターアッセイにより評価した。TGFβ 標的遺伝子である plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) mRNA の発現変化について、全 RNA 抽出後 cDNA を作製し、PCR 法により検討した。Smad 複合体形成は、免疫沈降法を利用して検出した。

3. 結果

TRB1 による TGFβ シグナルへの影響について検討するため、HepG2 細胞に TRB1 遺伝子あるいは TRB1 shRNA を発現するプラスミドを導入し、TGFβ の細胞内シグナル伝達分子 Smad の転写活性の変化を調べた。すると、TRB1 の過剰発現により Smad の活性化が抑制され、また逆に TRB1 の発現抑制では Smad の活性が上昇し、TRB1 は TGFβ シグナルを負に制御すると推察された。次に、TGFβ の標的遺伝子であり細胞の複製老化にかかわる PAI-1 の発現⁹⁾ に対する TRB1 の影響について、TRB1 を安定的に発現させた HepG2 細胞を用いて検討したところ、TRB1 発現安定株において、TGFβ 依存的な PAI-1 遺伝子の発現誘導の低下がみられた。また、PAI-1 プロモーター活性化に対する影響について検討したところ、TRB1 の過剰発現により PAI-1 プロモーターの活性化は抑制され、TRB1 のノックダウンによりその活性は上昇した。

TGFβ による Smad の活性化は、細胞膜表面に存在する受容体を介した Smad のリン酸化とそれに続く Smad 複合体の核移行および DNA 結合によって制御されている。そこで、TGFβ による Smad 複合体形成に対する TRB1 の影響を検討したところ、TRB1 は Smad 複合体の形成には影響しないことが明らかになった。また、Smad 複合体の構成因子の 1 つである Smad3 の転写活性化能に対する影響について、酵母由来転写因子である GAL4 の DNA 結合ドメインと Smad3 を融合させたタンパク質 GAL4-Smad3 と GAL4 の DNA 結合配列を 5 個タンデムにつなげたレポータープラスミドを用いた mammalian one-hybrid システムにより検討した。すると、TRB1 は過剰発現あるいはノックダウンのどちらの条件においても Smad3 の転写活性化能に変化はなかった。

4. 考察

本研究により TRB1 は TGFβ 依存的な Smad の活性化を抑制すること、TGFβ の標的遺伝子のひとつである PAI-1 の発現を抑制することが明らかになった。また、TRB1 による TGFβ シグナルの抑制メカニズムは、Smad 複合体形成や Smad3 の転写活性化能以外を介したものであることが推察された。

以前の研究において、TRB1 の発現誘導に MAPK シグナルの活性化が関与することが示唆されることから¹⁰⁾、がん細胞での異常な MAPK シグナルの活性化が TRB1 の過剰発現を誘導することで TGFβ シグナルの過度の抑制を惹起している可能性が考えられた。また、TRB1 による TGFβ シグナルの制御のメカニズムは、Smad 複合体形成や Smad3 の転写活性化能の阻害ではないことが明らかになった。今後、Smad 複合体の核移行や DNA 結合などに対する TRB1 の影響について検討することで、TRB1 による細胞がん化を制御できる方法の開発につながる分子基盤の知見が得られることが期待される。

5. 参考文献

- 1) Satoh T, Kidoya H, Naito H, Yamamoto M, Takemura N, Nakagawa K, Yoshioka Y, Morii E, Takakura N, Takeuchi O, Akira S. Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages. *Nature* **495**, 524-528 (2013)
- 2) Burkhardt R1, Toh SA, Lagor WR, Birkeland A, Levin M, Li X, Robblee M, Fedorov VD, Yamamoto M, Satoh T, Akira S, Kathiresan S, Breslow JL, Rader DJ. Trib1 is a lipid- and myocardial infarction-associated gene that regulates hepatic lipogenesis and VLDL production in mice. *J Clin Invest.* **120**, 4410-4414 (2010)
- 3) Jin G, Yamazaki Y, Takuwa M, Takahara T, Kaneko K, Kuwata T, Miyata S, Nakamura T. Trib1 and Evi1 cooperate with Hoxa and Meis1 in myeloid leukemogenesis. *Blood.* **109**, 3998-4005 (2007)
- 4) Liang JW, Shi ZZ, Zhang TT, Hao JJ, Wang Z, Wang XM, Yang H, Wang MR, Zhou ZX, Zhang Y. Analysis of genomic aberrations associated with the clinicopathological parameters of rectal cancer by array-based comparative genomic hybridization. *Oncol Rep.* **29**, 1827-1834 (2013)
- 5) Puiiffe ML, Le Page C, Filali-Mouhim A, Zietarska M, Ouellet V, Tonin PN, Chevrette M, Provencher DM, Mes-Masson AM. Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia.* **9**, 820-829 (2007)
- 6) Mashima T, Soma-Nagae T, Migita T, Kinoshita R, Iwamoto A, Yuasa T, Yonese J, Ishikawa Y, Seimiya H. TRIB1 supports prostate tumorigenesis and tumor-propagating cell survival by regulation of endoplasmic reticulum chaperone expression. *Cancer Res.* **74**, 4888-4897 (2014)
- 7) Lu XX, Hu JJ, Fang Y, Wang ZT, Xie JJ, Zhan Q, Deng XX, Chen H, Jin JB, Peng CH, Liu J, Li HW, Shen BY. A case-control study indicates that the TRIB1 gene is associated with pancreatic cancer. *Genet Mol Res.* **13**, 6142-6147 (2014)
- 8) Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103**, 295-309 (2000)
- 9) Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol.* **8**, 877-884 (2006)
- 10) Soubeyrand S1, Naing T, Martinuk A, McPherson R. ERK1/2 regulates hepatocyte Trib1 in response to mitochondrial dysfunction. *Biochim Biophys Acta.* **1833**, 3405-3414 (2013)