

## TGF- $\beta$ による小細胞肺癌細胞の細胞死制御の分子メカニズムを解明

### 1. 発表者：

宮園 浩平（東京大学大学院医学系研究科 分子病理学分野 教授）  
江幡 正悟（東京大学大学院医学系研究科 分子病理学分野 特任講師）  
村井 文彦（東京大学大学院医学系研究科 分子病理学分野 博士課程4年生（研究当時））  
鯉沼 代造（東京大学大学院医学系研究科 分子病理学分野 准教授）  
深山 正久（東京大学大学院医学系研究科 人体病理学・病理診断学分野 教授）  
牛久 綾（東京大学医学部附属病院 病理部 特任講師（病院）並びに助教）

### 2. 発表のポイント：

- ◆小細胞肺癌細胞では、エピジェネティック（注1）なメカニズムにより TGF- $\beta$ （注2）に対する感受性が喪失し、TGF- $\beta$ が腫瘍の進展を抑制するメカニズムが破綻していることが明らかになりました。
- ◆小細胞肺癌細胞に特異的な TGF- $\beta$ の標的遺伝子の同定を通じ、がん細胞の生存に重要な分子メカニズムを解明しました。
- ◆小細胞肺癌の新規治療法の開発へのブレークスルーになると期待されます。

### 3. 発表概要：

肺癌は致死率の高いがんのひとつですが、全肺癌の約15%を占める小細胞肺癌は、特に悪性度の高い神経内分泌腫瘍で、5年生存率が約5%にすぎません。本疾患の多くの症例に対しては、化学療法や放射線照射などが行われますが、小細胞肺癌細胞はこれらに対する抵抗性を獲得することが多く、治療を行う上での大きな問題になっています。

このような現状において、東京大学大学院医学系研究科 分子病理学分野 江幡正悟特任講師、宮園浩平教授らの研究グループは、小細胞肺癌細胞における TGF- $\beta$ シグナル伝達に着目した研究を行いました。この結果、TGF- $\beta$ は小細胞肺癌細胞に細胞死（アポトーシス）を誘導することで、潜在的に腫瘍抑制性に働くサイトカイン（注3）として機能していることがわかりました。ところが、多くの小細胞肺癌細胞では、エピジェネティックなメカニズムにより TGF- $\beta$ に対する感受性が喪失しており、TGF- $\beta$ が腫瘍抑制的に機能するメカニズムが破綻していることが判明しました。

今回の研究で、小細胞肺癌細胞の生存に重要な新たな分子メカニズムが解明されました。この成果に基づいた新たな治療法が創出されることが期待されます。

### 4. 発表内容：

TGF- $\beta$ は細胞の増殖や分化の調節に関わるサイトカインであり、がんをはじめ多くのヒトの疾患に関係しています。TGF- $\beta$ は様々ながんの進行に関与していますが、ある場合は腫瘍抑制的に、またはある場合は腫瘍促進的に作用することが明らかにされてきました。小細胞肺癌に限定してみると、がん細胞で TGF- $\beta$ のシグナル伝達に不可欠な II 型受容体 (T $\beta$ RII)（注4）の発現が低下していることが 1990 年代に報告されているまでにとどまっており、TGF- $\beta$ の小

細胞肺癌における詳細な機能は長年にわたって解明されてきませんでした。そこで本研究では、小細胞肺癌細胞における  $T\beta RII$  の発現低下の分子メカニズムの解明、小細胞肺癌細胞に特異的に制御される  $TGF-\beta$  の標的遺伝子の同定を通じて、小細胞肺癌の進行における  $TGF-\beta$  の機能を明らかにしました。

まず、分子生物学的手法を用いて、 $TGF-\beta$  に対する小細胞肺癌細胞の応答性を評価しました。多くの小細胞肺癌細胞では  $TGF-\beta$  刺激を行ってもシグナルが伝達されませんでした。そこで網羅的な遺伝子発現解析によって、受容体や  $TGF-\beta$  のシグナルを伝える分子として知られる Smad タンパクなど、 $TGF-\beta$  シグナル伝達に必要な伝達因子の発現をしらべたところ、正常肺上皮細胞と比較して、小細胞肺癌細胞では  $TGF-\beta$  II 型受容体  $T\beta RII$  をコードする *TGFBR2* 遺伝子の発現が低下していることが明らかになり、このことが小細胞肺癌の進行と何らかの関係があるのでないかと疑われました。

そこで、小細胞肺癌細胞に  $T\beta RII$  を人工的に強制発現させ、 $TGF-\beta$  に対する応答性を回復させた細胞を樹立し、そのがん細胞の性質の観察を行いました。この結果、本来は小細胞肺癌細胞では  $TGF-\beta$  により細胞増殖が制御されませんが、 $T\beta RII$  を強制発現させることで、がん細胞は  $TGF-\beta$  に応答して細胞死（アポトーシス）が誘導されるようになるなど、培養細胞での細胞増殖が抑制されることがわかりました。さらに実験病理学的な検討から、 $T\beta RII$  強制発現によって小細胞肺癌細胞のマウスでの腫瘍形成能が抑制されることがわかりました。これらの実験から、 $TGF-\beta$  はアポトーシスの誘導を介して細胞増殖を抑制することで、小細胞肺癌では腫瘍抑制的に作用していることが示唆されました。

また、先の網羅的遺伝子解析から、小細胞肺癌細胞や組織では、*EZH2* (注5) の発現が亢進していることがわかりました。この *EZH2* はヒストンの化学修飾 (注6) に関与し、遺伝子の転写を不活化させるヒストンメチル基転移酵素のひとつです。小細胞肺癌細胞で *EZH2* の発現を低下、もしくは機能を阻害すると、*TGFBR2* の発現が回復し、 $TGF-\beta$  に対する応答性が観察されるようになり、腫瘍形成が抑制されました。小細胞肺癌細胞では、発現亢進している *EZH2* が、*TGFBR2* を含む領域でクロマチンを閉じた状態にし、 $T\beta RII$  の発現を低下させることで、 $TGF-\beta$  による腫瘍抑制作用から逸脱していると考えられました。

さらに本研究グループは、 $TGF-\beta$  によって誘導される小細胞肺癌細胞に特異的な標的遺伝子の同定を試みました。 $TGF-\beta$  のシグナル分子 Smad2 と Smad3 に対する抗体によるクロマチン免疫沈降シーケンシング (注7) 等により生化学的に解析したところ、*ASCL1* が重要な標的であると予想されました。*ASCL1* の翻訳産物は神経分化に重要な転写因子であり、神経内分泌細胞の特性を持つがん細胞に発現が認められています。正常細胞では、 $TGF-\beta$  の Smad 依存的な経路を介して *ASCL1* の発現が抑制されはずですが、小細胞肺癌細胞では前述の異常から  $TGF-\beta$  に対する感受性が喪失しており、 $TGF-\beta$  刺激を行っても *ASCL1* の発現が抑制を受けることがありません。小細胞肺癌細胞で発現亢進している *ASCL1* の発現をノックダウンすると、がん細胞にアポトーシスが誘導され、さらに腫瘍形成能が抑制されたことから、*ASCL1* の発現抑制が小細胞肺癌の腫瘍形成の抑制に必要であると考えられました。

最後にヒトの臨床検体を用いて、免疫組織化学染色によって一連の分子の発現を検証しました。正常肺組織と比較して、小細胞肺癌組織では、*EZH2* の発現亢進、 $T\beta RII$  の発現低下、

ASCL1 の発現亢進が見られることが確認され、最終的に以下のメカニズムの存在を想定しています (図 1)。正常肺上皮細胞では T $\beta$ RII の発現が認められるために、TGF- $\beta$  が Smad 依存的な経路を介して ASCL1 の発現を低下させ、アポトーシスを誘導することで異常な細胞増殖を抑制しています。ところが小細胞肺癌細胞では、EZH2 発現が亢進し、エピジェネティックな作用により T $\beta$ RII の発現を抑制されています。このため、TGF- $\beta$  シグナル伝達機構は破綻し、本来抑制を受けるべき ASCL1 の発現が維持されることでアポトーシスから回避しており、小細胞肺癌細胞の病的な増殖がひきおこされる、ということです。

同じ肺癌でありながら、非小細胞肺癌と比べ、小細胞肺癌の病態に関する基礎研究は必ずしも多いとは言えず、分子標的治療などの新たな治療法の確立の妨げになってきました。今回の研究から小細胞肺癌に特異的な TGF- $\beta$  の作用や、その分子メカニズムが明らかになりましたが、本研究成果が同疾患の予後判定のマーカー確立や、新規分子標的治療の研究開発へのブレークスルーなることが期待されます。

## 5. 発表雑誌：

雑誌名：「Cell Discovery (セル・ディスカバリー)」 (2015年9月22日オンライン版)

論文タイトル：EZH2 promotes progression of small cell lung cancer by suppressing the TGF- $\beta$ -Smad-ASCL1 pathway

著者：Fumihiko Murai, Daizo Koinuma, Aya Shinozaki-Ushiku, Masashi Fukayama, Kohei Miyazono\*, and Shogo Ehata\*

DOI 番号：doi:10.1038/celldisc.2015.26

## 6. 問い合わせ先：

東京大学大学院医学系研究科 分子病理学分野 特任講師

江幡 正悟 (えはた しょうご)

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Tel: 03-5841-3356

Fax: 03-5841-3354

E-mail: ehata-jun@umin.ac.jp

## 7. 用語解説：

### (注1) エピジェネティックス

細胞における遺伝子の発現は、ゲノム DNA とヒストンなどのタンパク質から構成されるクロマチンの化学的・構造的な修飾によって制御されており、これをエピジェネティックなメカニズムという。エピジェネティックな制御は発生の過程で確立し、その後も細胞の記憶として作用するが、慢性炎症やウイルス感染などによって、エピジェネティックスの異常が誘発される。エピジェネティックスの異常は遺伝子の突然変異や染色体欠損と並び、がん抑制遺伝子の不活性化の主要な分子機構であり、発がんの原因となりうる。

### (注2) TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  は 12.5kDa のポリペプチドが 2 分子結合した約 25kDa の分子である。TGF- $\beta$  はさまざまな機能が報告されているが、なかでも細胞増殖の抑制と細胞外マトリックスの産生は TGF- $\beta$

の古典的な二大作用とされ、様々な臓器における多種多様な生物学的プロセスに関わっていると考えられている。

### (注3) サイトカイン

サイトカインは細胞同士、あるいは周辺細胞とのコミュニケーションをつかさどる生化学物質（タンパク質）の総称である。さまざまな細胞で産生されるが、それに対する受容体を持つ細胞にのみ作用し、細胞の増殖、細胞死、機能発現、分化、炎症反応などを制御する。

### (注4) TGF- $\beta$ II 型受容体

TGF- $\beta$ は細胞表面上の I 型受容体および II 型受容体の二種類の受容体に結合することで、細胞内にシグナルを伝達する。I 型受容体と II 型受容体はともに類似した構造を持つ細胞膜受容体であり、セリン・スレオニンキナーゼ活性を持つ。TGF- $\beta$ が II 型受容体に結合すると、T $\beta$ RII が I 型受容体をリン酸化し、活性化する。活性化した I 型受容体は Smad2 や Smad3 をリン酸化することで、Smad 経路が活性化される。

### (注5) EZH2

クロマチン構造を変化させ、遺伝子の発現を抑制する分子をコードする遺伝子の一群はポリコム遺伝子群とよばれるが、このひとつに Enhancer of zeste homolog (EZH2) がある。EZH2 はヒストンメチル基転移酵素活性をもっており、ヒストンの 9 番目と 27 番目のリジン残基のメチル化修飾をおこし、さまざまな遺伝子の転写を抑制することで、細胞の分化などに関与する。一部の悪性腫瘍では EZH2 発現と悪性度が相関する。

### (注6) ヒストンの化学修飾

エピジェネティクスの異常には大きく、DNA メチル化とヒストンの化学修飾の二つがあり、どちらも遺伝子の転写制御に関与している。ヒストンの化学修飾では、ヒストン尾部がメチル化やアセチル化、リン酸化などの修飾を受ける。がん細胞では、ヒストン修飾の異常が多く存在し、その結果、がん抑制遺伝子の不活性化を引き起こす。

### (注7) クロマチン免疫沈降シーケンシング

クロマチン免疫沈降と大規模並列 DNA シーケンスを併用することで、DNA に結合する転写因子などのタンパク質の結合部位を同定する解析技術をクロマチン免疫沈降 (ChIP) シーケンシングと呼び、次世代シーケンサーの登場で可能となった手法である。実際には、DNA に結合しているタンパク質を架橋した後、DNA の断片化を行い、目的とするタンパク質を特異的に認識する抗体で DNA とタンパク質の複合体を回収する。次いで次世代シーケンサーによって回収された DNA 断片の配列情報を、解析する。

8. 添付資料：

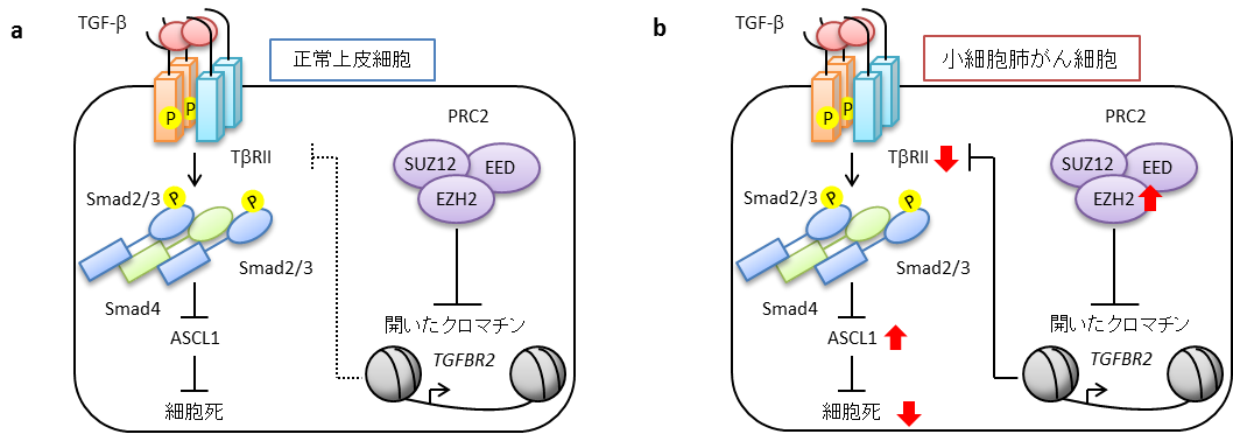


図1 小細胞肺癌における TGF-βによる腫瘍抑制メカニズムの破綻

(a) 正常上皮細胞では、TGF-βは直接的に Smad 経路を介して、ASCL1 の発現を抑制させアポトーシスを誘導する。

(b) 小細胞肺癌細胞では、EZH2 が高発現し TβRII の発現が抑制される。これにより TGF-βシグナルが遮断され、ASCL1 の発現量が高く維持されるため、小細胞肺癌細胞では細胞死（アポトーシス）が阻害され小細胞肺癌の進展に寄与している。