—Review for award—

上皮間葉転換を司る TGF- β シグナルの過剰活性化機構の解明

幸 龍三郎

Aberrant Activation Mechanism of TGF- β Signaling in Epithelial-mesenchymal Transition

Ryuzaburo Yuki

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto Pharmaceutical University;
1 Misasagi-Shichono-cho, Yamashina-ku, Kyoto 607-8412, Japan.

(Received June 25, 2021)

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is an important program in epithelial cancer cells to acquire the motility and invasion, which promotes cancer metastasis to remote organs. EMT is induced by various secreted factors, such as transforming growth factor- β (TGF- β) and epidermal growth factor (EGF). TGF- β ligand activates Smad-dependent and -independent pathways by binding to TGF- β receptors. In Smad-dependent pathway, the activated TGF- β receptor phosphorylates Smad2/3 and accelerates its association with Smad4, leading to their nuclear translocation. Smad2/3–4 complex promotes the expression of EMT-inducing transcription factors, such as Snail and Slug. In Smad-independent pathway, mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT pathways are activated and required for TGF- β -induced EMT. Smad-independent pathway is similar to downstream of receptor tyrosine kinases, and therefore EGFR signaling is known to induce EMT synergize with TGF- β signaling. We explored a new mechanism of EGFR-mediated activation of TGF- β signaling and found that c-Abl kinase activates TGF- β signaling. Based on our proteomic analysis, we identified several TGF- β signaling molecules as nuclear c-Abl substrates, including transcriptional intermediary factor 1- γ (TIF1 γ /TRIM33/Ectoderm), a suppressor of TGF- β signaling. c-Abl-mediated phosphorylation of TIF1 γ inhibits its binding to Smad3, thereby increasing Smad3's transcriptional activity and promoting EMT. TIF1 γ phosphorylation is also involved in the EGFR-caused aberrant activation of TGF- β signaling, suggesting that EGFR/c-Abl pathway activates TGF- β signaling through phosphorylation of nuclear substrates and promotes EMT. Our findings provide new insights into the activation machinery of TGF- β signaling, and further studies are required to clarify the clinical significance of the EGFR/c-Abl pathway in cancer metastasis.

Key words—transforming growth factor- β ; cancer; epithelial-mesenchymal transition; Abl kinase; nuclear tyrosine phosphorylation

1. はじめに

がんは、生涯で2人に1人は罹患する国民病である。その発症には遺伝的要因だけでなく、喫煙や食の欧米化など環境要因が関わっている。がんの多くを占める上皮細胞由来のがんは、原発巣での増殖の後、浸潤・転移することで様々な臓器機能を破綻させる。がんで亡くなる原因の多くは遠隔転移によることから、がん細胞の浸潤・転移機構の解明と新規抗がん剤の開発が望まれている。

上皮がん細胞が基底膜を乗り越え間質組織内に浸

潤するためには、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) のプロセスが係わることが知られている。¹⁾ 上皮細胞は E-cadherin や claudin などの細胞間接着分子を通して上皮性を維持している。様々な刺激に応じた、Snail や Slug, ZEB1/2 などの EMT 誘導転写因子の発現は、E-cadherin 等の発現を低下させ、N-cadherin や smooth muscle α -actin の発現を誘導する。それによって、細胞間接着が弱まるとともに細胞の極性が低下し、アクチン骨格の再編成などによって運動性が促進する。そして、細胞は matrix metalloproteinase (MMP) などの分泌を介して基底膜や細胞外マトリックスを分解し、間質組織内へと浸潤する。EMT の過程で、がん細胞はアノキス抵抗性を増強し、間質組織から血管内への移行後の生存

京都薬科大学生化学分野 (〒607-8412 京都市山科区御陵四丁野町 1)

e-mail: yuki2019@mb.kyoto-phu.ac.jp

本総説は、2020 年度日本薬学会関西支部奨励賞 (生物系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

を可能とする。その後、血流量の多い肺や肝臓などの組織に移行し、間葉上皮転換 (mesenchymal-epithelial transition; MET) を誘導することで転移巣を形成する。

EMT は, transforming growth factor- β (TGF- β) を始めとする様々な液性因子の刺激によって誘導される。²⁾ 代表的な EMT 誘導因子である TGF- β は、線維芽細胞の足場非依存的な増殖、すなわち形質転換を誘導する分子として同定されたサイトカインである。哺乳類では TGF- β のアイソフォームが 3 種類存在する。TGF- β の構造に類似したサイトカインはアクチビンや骨形成因子 (bone morphogenetic protein; BMP) など 30 種類にも上り、TGF- β スーパーファミリーと呼ばれる。本稿では、筆者の研究で明らかになった epidermal growth factor receptor (EGFR)/Abl 経路による TGF- β シグナル過剰活性化機構を中心に、TGF- β シグナルと他のシグナル伝達とのクロストークについて概説する。

2. TGF- β シグナル

TGF- β は粗面小胞体で生合成された後、ゴルジ体でフューリンにより切断される。切断された TGF- β のアミノ末端側とカルボキシ末端側はそれぞれホモダイマーを形成し、アミノ末端側は latency-associated peptide (LAP) と呼ばれ、カルボキシ末端側は活性型 TGF- β となる。活性型 TGF- β はそのまま分泌されるのではなく、LAP と latent TGF- β binding protein と相互作用し潜在型 TGF- β 大複合体を形成することで細胞外に分泌され、細胞外マトリックスに保持される。³⁾ 最終的に、潜在型 TGF- β 大複合体から活性型 TGF- β が放出されるためには、MMP やプラスミンなどのプロテアーゼが必要である。放出された TGF- β は、TGF- β II 型受容体キナーゼ (TBR2) に結合することで、TGF- β I 型受容体キナーゼ (TBRI) と TBR2 の複合体形成を促進し TBRI のリン酸化を誘導する。リン酸化により活性化した TBRI は Smad2/3 をリン酸化し、Smad4 との相互作用を促進することで核内への移行を誘導する。Smad2/3-Smad4 複合体は、activator protein 1 (AP-1) 転写因子などの転写因子や、転写共役因子と相互作用しながら標的遺伝子の発現を調節する。この Smad を中心とした TGF- β シグナル経路のことを、Smad 依存的な経路と呼ばれる (Fig. 1)。

TGF- β シグナルは、組織恒常性の維持に重要であることが知られており、初期胚発生においては EMT による原腸陥入に必要である。また、創傷治癒における線維芽細胞の増殖・活性化に必要なことや、⁴⁾ ヘルパー T 細胞の分化制御を介して炎症誘導と収束に必要であると報告されている。⁵⁾ 正常上皮細胞では c-Myc の発現抑制や p21 など細胞周期停止因子の発現誘導を介して増殖を抑制することから、がん抑制シグナルとしても機能している。⁶⁾ 一方がん細胞は、このがん抑制シグナルを回避することで生存しており、EMT 誘導転写因子の発現によって浸潤能・転移能を獲得している。例えば、乳がんや膠芽腫の悪性化過程では、Smad2/3-Smad4 複合体と結合し、増殖制御に係わる転写因子の機能が低下することによって増殖抑制機構は破綻する一方で、EMT 誘導に係わる転写調節機構は保持されているため EMT が誘導される。

3. Smad 非依存的な TGF- β シグナルとシグナルクロストーク

TGF- β 受容体の活性化は、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路や phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT 経路などの活性化を誘導することが知られており、Smad 依存的な経路と相互作用しながら EMT を誘導する (Fig. 1)。活性化した TBRI は速やかにラフト上に移行し、ShcA をリン酸化することで Grb2 と Sos をリクルートし、Ras/Raf 経路を活性化する。⁷⁾ その下流で活性化した extracellular signal-regulated kinase (ERK) は、AP-1 転写因子をリン酸化し活性化することで、Smad の転写活性化を誘導し EMT を促進する。さらに、MAPK/ERK kinase 1 (MEK1) の活性化は Smad3 の発現を促進することで Smad シグナリングを活性化する。また、TBRI は tumor necrosis factor-receptor-associated factor 6 (TRAF6) と結合し、TGF- β -activated kinase 1 (TAK1) を活性化することで c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38

幸 龍三郎

京都薬科大学学生化学分野・助教、博士 (薬学)。2012 年千葉大学薬学部卒業 (6 年制課程 1 期生)、2016 年千葉大学大学院薬学研究院博士課程修了、同大学医学研究院博士研究員、日本学術振興会特別研究員 (PD) を経て 2019 年より現職。

Fig. 1. TGF- β -induced Smad-dependent and -independent Pathway

MAPK を活性化することも報告されている。p38 MAPK の阻害や TRAF6 のノックダウンは TGF- β 誘導性の EMT を抑制し、アクチン骨格のリモデリングを阻害する。⁸⁾ PI3K/AKT 経路は、TGF- β 受容体の下流で RhoA⁹⁾ や integrin-linked kinase (ILK)¹⁰⁾ を介して活性化される。活性化した AKT は、Smad3 の転写活性化を誘導することでコラーゲン I 産生を促進することや、脱ユビキチン化酵素 USP4 をリン酸化することで TBRI の安定化をもたらす。TGF- β シグナルを促進し EMT を誘導する。¹¹⁾ さらに AKT は、Wnt シグナル抑制因子 glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) による Smad3 の 66 番目のスレオニンリン酸化を抑制することで、ポリユビキチン化修飾を低下させ Smad3 の安定化をもたらす。¹²⁾

このような Smad 非依存的な経路は、TGF- β だけでなく様々な液性因子を介したシグナル伝達によっても活性化されることから、TGF- β シグナルは多様なシグナル伝達によって調節される。特に、EGFR などの receptor tyrosine kinase (RTK) を介したシグナリングは、MAPK や PI3K/AKT 経路を介して TGF- β シグナルの過剰な活性化をもたらす。

EGF 刺激により活性化した ERK1 は、Smad2 の 8 番目のスレオニン残基をリン酸化し、安定化や Smad4 との複合体形成の促進によって転写活性化を誘導する。¹³⁾ AP-1/Smad 複合体の形成促進によっても、TGF- β シグナルを促進する。興味深いことに、TGF- β 刺激による、Smad 及び p38 MAPK 依存的なヒアルロン酸の産生促進と、その受容体である CD44 の発現誘導は、CD44 と EGFR の複合体形成を促進し、EGFR シグナルを活性化する。したがって EGF 存在下においては、TGF- β シグナルと EGFR シグナルの正のフィードバック機構によって EMT を強く誘導する。¹⁴⁾ 同様に、TGF- β 刺激による fibroblast growth factor receptor (FGFR) と integrin α V β 3 の発現誘導は、両者の会合を促進し FGF1 感受性を促進することで、FGFR/ERK 経路を介した EMT を促進する。TGF- β シグナルの活性化による platelet-derived growth factor (PDGF) と PDGFR の発現誘導は、MAPK 経路の活性化を軸に EMT をもたらす。このように、TGF- β シグナルは他のシグナル伝達と相互作用することによって過剰に活性化し、がん悪性化をもたらすと考えられる。

4. c-Abl キナーゼによる TGF- β シグナルの活性化

筆者は、EGFR シグナルによる TGF- β シグナル活性化機構の解析を試み、EGFR 下流で関与する分子の探索を行った。その結果、子宮頸部上皮がん細胞 HeLa S3 において、EGFR 下流の c-Abl チロシンキナーゼの阻害が、TGF- β 刺激による EMT 誘導因子の発現を抑制することを見出した。TGF- β 1 に加えて EGF の共刺激は、EMT 誘導因子の発現を強く誘導するが、c-Abl の阻害はそれを抑制した。したがって、EGFR 下流で c-Abl は TGF- β シグナルを活性化する可能性が示唆された。c-Abl は細胞質と核内をシャトリングしながら機能するリン酸化酵素である。c-Abl は上皮がん細胞の浸潤や転移を促進することが報告されている¹⁵⁾が、その機構は十分には明らかになっていない。

興味深いことに、核内移行シグナル (nuclear localization signal; NLS) を付加した c-Abl (NLS-c-Abl) は、野生型に比べて強く TGF- β シグナルを促進したことから、c-Abl による核内チロシンリン酸化シグナルが TGF- β シグナルの制御に係わることが示唆された。そこで、NLS-c-Abl を用いたリン酸化プロテオミクス解析により、c-Abl の核内基質分子の探索を行ったところ、TGF- β シグナルに係わる分子が多く検出された。そこで、c-Abl は核内分子のリン酸化を介して TGF- β シグナルを促進すると仮説を立て検証することにした。

核内の c-Abl 基質候補分子の中でも、特に TGF- β シグナルとの関連が報告されていた TGF- β シグナル抑制因子 transcriptional intermediary factor 1- γ (TIF1 γ /TRIM33/Ectodermin) に着目して研究を進めた。TIF1 γ は、E3 ユビキチンリガーゼ活性に必要な RING domain, Smad2/3 と結合する middle domain, ヒストン H3/H4 と結合する PHD finger-bromodomain を持つ 123 kDa の核内分子である。TIF1 γ は、TGF- β による造血前駆細胞から赤血球分化に係わること¹⁶⁾や、アフリカツメガエルの初期胚発生において、TGF- β /nodal シグナルによる中胚葉誘導を抑制することで外胚葉領域を維持すること¹⁷⁾が明らかとなり、TGF β シグナルを抑制する因子であることが分かった。肝細胞がんや膵管腺がん、非小細胞肺癌、腎臓がん、膠芽腫、慢性骨髄単球性白血病などで TIF1 γ の発現低下がみられて

おり、それによって TGF- β シグナルの過剰活性化が誘導されがん進展に寄与することが報告されている。¹⁸⁾

まず筆者は、TIF1 γ が c-Abl によりリン酸化されるかどうか解析したところ、c-Abl はキナーゼ活性依存的に TIF1 γ の 524 番目、610 番目、1048 番目のチロシン残基をリン酸化することが分かった。TIF1 γ は Smad2/3 に結合することで Smad2/3-Smad4 の複合体形成を阻害する。¹⁹⁾ そこで、TIF1 γ のリン酸化と Smad2/3 との結合の関係を調べるために、c-Abl のノックダウンや阻害を行ったところ、TGF- β 1 存在下で TIF1 γ と Smad3 の結合は増強した。さらに、c-Abl によってリン酸化されるチロシン残基 3 ヲ所をフェニルアラニン残基に置換した非チロシンリン酸化変異体と、グルタミン酸残基に置換した疑似チロシンリン酸化変異体を作製し解析を行った。野生型に比べて、非リン酸化変異体は Smad3 との結合が増強した一方で、疑似リン酸化変異体は結合が低下することが分かった。このことから、c-Abl による TIF1 γ のチロシンリン酸化は Smad3 との結合を低下させることが示唆された。

次に、TIF1 γ のリン酸化が TGF- β シグナル標的遺伝子の転写に係わるのかを解析した。Smad3 の転写活性を評価するために、Smad3 が結合する DNA 配列 CAGA box を組み込んだレポータープラスミドを作製した。その結果、野生型や非リン酸化変異体は Smad3 の転写活性を抑制した一方で、疑似リン酸化変異体は Smad3 の転写活性を抑制しなかった。さらに、野生型に比べて非リン酸化変異体は、TGF- β 1 刺激による Slug や c-Jun の発現を抑制するとともに EMT を抑制した。また、TGF- β 1 と EGF 共刺激下においても、TIF1 γ の非リン酸化変異体は Slug 発現を強く抑制した。以上の結果から、c-Abl は TIF1 γ をリン酸化することで、Smad3 との結合を低下させ、TIF1 γ による TGF- β シグナルの抑制を解除することが明らかになった。そして、EGFR シグナルの活性化は、c-Abl による TIF1 γ の機能抑制を介して、TGF- β シグナルを過剰に活性化すると考えられる (Fig. 2).²⁰⁾

さらに、c-Abl は別の TGF- β シグナル制御因子 SKI-interacting protein (SKIP) もチロシンリン酸化することが明らかとなった。SKIP はがん原遺伝子産物である Ski と結合することで、その Smad3

Fig. 2. EGFR/c-Abl-mediated Activation of TGF- β Signaling by Phosphorylation of TIF1 γ and SKIP

転写抑制活性を解除することが知られている。c-Ablは、SKIPをリン酸化することでSmad3との結合を増強し、TGF- β シグナルを活性化することが分かった。²¹⁾ 筆者の研究から、上皮がん細胞においてc-Ablは、核内分子のチロシンリン酸化を介してSmad依存的なTGF- β シグナルを促進することが明らかとなった。

5. おわりに

本稿では、がん細胞の悪性化に関してTGF- β シグナルを中心に解説した。また、TGF- β シグナルが他のシグナル伝達によってどのように活性が制御されているのか、筆者の研究を含め紹介した。

がん進展をもたらすTGF- β シグナルを標的として、TGF- β の中和抗体や受容体の拮抗薬が開発され、臨床応用への検討が進められている。²²⁾ しかし、TGF- β シグナルは恒常性維持にも必須なシグナルであることから、TGF- β 阻害薬には心血管系への副作用がみられるなど、課題になっている。TGF- β シグナルが正常細胞ではがん抑制的である一方で、進展したがん細胞ではがん悪性化に寄与する原因としては、細胞のコンテキスト変化によるTGF- β シグナルの変化が係わる。したがって、TGF- β シグナルの中でも、がん進展に係わる分子を標的とする必要がある。筆者の研究では、細胞のがん化に伴って活性化するc-Ablが、核内チロシンリン酸化シグナルを介してTGF- β シグナルを活性化する機

構を明らかにした。EGFRシグナルは多くのがん種で活性化しており、今後EGFR/c-Abl経路によるTGF- β シグナルの過剰活性化が*in vivo*においてがん進展に係わっているのか、詳細な解析と介入方法の検討が求められる。

近年、TGF- β によるがん免疫の抑制機能が明らかとなり、それを標的とした創薬開発が注目を集めている。抗PD-L1抗体にTGF- β 受容体を結合させたbintrafusp alfaは、PD-L1に対する抗体によって腫瘍局所に集積しTGF- β を阻害することが可能であり、抗腫瘍効果の増強かつ副作用減弱につながると期待されている。²³⁾ bintrafusp alfaは既に、国内でも臨床試験が始まっている。また、潜在型のTGF- β 1特異的抗体SRK-181が、抗PD-1抗体に対する抵抗性を改善することも報告されている。²⁴⁾ TGF- β シグナルを標的とした抗がん剤開発の裾野は大きく広がっており、今後も期待したい。

謝辞 本研究は主に、千葉大学大学院薬学研究院分子細胞生物学研究室で行われたものであり、研究の遂行に当たり終始多くのご鞭撻を賜りました山口直人教授、山口憲孝准教授、福本泰典講師を始め、研究室のメンバーにこの場を借りて厚く御礼申し上げます。また、千葉大学から現在も引き続き、懇切なご指導を賜りました京都薬科大学化学分野中山祐治教授にも深謝致します。研究の一部は千葉

大学大学院医学研究院疾患システム医学研究室で行われものであり、眞鍋一郎教授、工藤藤美助教を始め研究室メンバーにも深く御礼申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Bakir B., Chiarella A. M., Pitarresi J. R., Rustgi A. K., *Trends Cell Biol.*, **30**, 764–776 (2020).
- 2) Ungefroren H., *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 977 (2021).
- 3) Derynck R., Budi E. H., *Sci. Signal.*, **12**, eaav5183 (2019).
- 4) Liarte S., Bernabé-García Á., Nicolás F. J., *Cells*, **9**, 306 (2020).
- 5) Hatton R. D., *Immunity*, **34**, 288–290 (2011).
- 6) Padua D., Massagué J., *Cell Res.*, **19**, 89–102 (2009).
- 7) Lee M. K., Pardoux C., Hall M. C., Lee P. S., Warburton D., Qing J., Smith S. M., Derynck R., *EMBO J.*, **26**, 3957–3967 (2007).
- 8) Yamashita M., Fatyol K., Jin C., Wang X., Liu Z., Zhang Y. E., *Mol. Cell*, **31**, 918–924 (2008).
- 9) Bakin A. V., Tomlinson A. K., Bhowmick N. A., Moses H. L., Arteaga C. L., *J. Biol. Chem.*, **275**, 36803–36810 (2000).
- 10) Lee Y. I., Kwon Y. J., Joo C. K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **316**, 997–1001 (2004).
- 11) Zhang L., Zhou F., Drabsch Y., Gao R., Snaar-Jagalska B. E., Mickanin C., Huang H., Sheppard K. A., Porter J. A., Lu C. X., Ten Dijke P., *Nat. Cell Biol.*, **14**, 717–726 (2012).
- 12) Guo X., Ramirez A., Waddell D. S., Li Z., Liu X., Wang X. F., *Genes Dev.*, **22**, 106–120 (2008).
- 13) Funaba M., Zimmerman C. M., Mathews L. S., *J. Biol. Chem.*, **277**, 41361–41368 (2002).
- 14) Porsch H., Bernert B., Mehić M., Theocharis A. D., Heldin C. H., Heldin P., *Oncogene*, **32**, 4355–4365 (2013).
- 15) Ganguly S. S., Plattner R., *Genes Cancer*, **3**, 414–425 (2012).
- 16) Ohta M., Greenberger J. S., Anklesaria P., Bassols A., Massagué J., *Nature*, **329**, 539–541 (1987).
- 17) Dupont S., Zacchigna L., Cordenonsi M., Soligo S., Adorno M., Rugge M., Piccolo S., *Cell*, **121**, 87–99 (2005).
- 18) Yu C., Ding Z., Liang H., Zhang B., Chen X., *Front. Oncol.*, **9**, 979 (2019).
- 19) He W., Dorn D. C., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Moore M. A. S., Massagué J., *Cell*, **125**, 929–941 (2006).
- 20) Yuki R., Tatewaki T., Yamaguchi N., Aoyama K., Honda T., Kubota S., Morii M., Manabe I., Kuga T., Tomonaga T., Yamaguchi N., *Oncogene*, **38**, 637–655 (2019).
- 21) Kuki K., Yamaguchi N., Iwasawa S., Takakura Y., Aoyama K., Yuki R., Nakayama Y., Kuga T., Hashimoto Y., Tomonaga T., Yamaguchi N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **490**, 1045–1051 (2017).
- 22) Ciardiello D., Elez E., Tabernero J., Seoane J., *Ann. Oncol.*, **31**, 1336–1349 (2020).
- 23) Lan Y., Zhang D., Xu C., Hance K. W., Marelli B., Qi J., Yu H., Qin G., Sircar A., Hernández V. M., Jenkins M. H., Fontana R. E., Deshpande A., Locke G., Sabzevari H., Radvanyi L., Lo K. M., *Sci. Transl. Med.*, **10**, eaan5488 (2018).
- 24) Martin C. J., Datta A., Littlefield C., *et al.*, *Sci. Transl. Med.*, **12**, eaay8456 (2020).