

令和2年度博士学位論文

乳癌細胞における TGF- β 誘導性細胞死の抑制機構の解析

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

分子薬物治療学講座 分子心血管薬理学研究室

17JD0104 平田 健介

2021年2月

【1. 序論・目的】

Transforming growth factor- β (TGF- β)は増殖、分化、細胞死等細胞によって異なる制御を行うサイトカインである。TGF- β はセリン・スレオニンキナーゼである 2 対のレセプター(type I 受容体及び type II 受容体)に結合し、TGF- β と結合した type II 受容体が type I 受容体をリン酸化して活性化させる。活性化された type I 受容体は主に転写因子 Smad3 をリン酸化することでシグナル伝達を行う。リン酸化された Smad3 は Smad4 と複合体を形成し、核内に移行して様々な標的遺伝子の発現を制御する[1-4]。TGF- β は様々な種類の細胞において、増殖を抑制してアポトーシスを引き起こすことが知られている。そのため、TGF 受容体や Smad 遺伝子の機能欠損は腫瘍形成に関与すると考えられており[5]、がん細胞の TGF- β 依存性増殖抑制作用への抵抗性は腫瘍の増殖に重要であることが示唆されている。

乳腺は乳頭と起点として乳腺脂肪体で細かく分岐した乳管で構成される乳管系である。発情期が始まると、主管から側管が分岐することで乳腺組織が発達する。妊娠期においてさらなる分岐がおこり、乳汁を分泌する乳腺小葉が乳管の末端で発達する。この構造は出産後から授乳期まで維持され、離乳後に退縮過程を経て乳腺は速やかに元の状態に戻ることが知られている[6]。

TGF- β シグナルは乳腺の退縮において重要であることが知られている。マウス乳腺上皮細胞において、離乳がトリガーとなって TGF- β 3 の発現が増加し、TGF- β 誘導性アポトーシスが引き起こされることで乳腺の退縮が進行する[6]。そのため、Type I 受容体の恒常活性化体をマウスの乳腺上皮に導入すると、妊娠後期においてもアポトーシスが引き起こされる[7, 8]。これらの研究は正常乳腺細胞において TGF- β シグナルが細胞死を引き起こすことを示している。しかし一方で乳がん細胞では TGF- β 誘導性細胞死に対して抵抗性を示すことが知られている[9]。この細胞死抵抗性ががんの悪性化に寄与しており、TGF- β 誘導性細胞死の抵抗性の分子機構を明らかにすることで乳がん治療発展に繋がると考え、解析を行うことにした。

Forkhead box protein A1(FOXA1)は Forkhead box 転写因子ファミリーの一員である。FOXA1 は乳腺を含む様々な組織の発達に関わる遺伝子の発現を制御していることが知られている[10, 11]。FOXA1 はヘテロクロマチンを開くパイオニアファクターとして機能し、エストロゲン受容体(ER)の標的遺伝子の発現を促進する[12]。これらの機能を介して、FOXA1 は ER 陽性の乳がん細胞において正常乳腺細胞同様に生存や増殖に寄与していることが報告されている[13-15]。FOXA1 が ER 陽性の乳がん細胞において生存に重要であることを考慮すると、FOXA1 は乳がん細胞に細胞死抵抗性に寄与しているのではないかと考えられた。そのため、本研究においては FOXA1 と TGF- β シグナルの関係性について着目し、解析を行うことにした。

【2. 材料・方法】

2.1 プラスミド

Complementary DNA (cDNA) encoding human FOXA1をpIRESpuro3 - CAG vectorに組み込んだものを用いた[16]。Human Smad3 cDNAはpCMV_S - Flag vector (RIKEN BRC, RDB07019)に組み込んだ。cDNAs encoding Smad4 (a Strep tag was added to the N - terminus) 及びimportin7 (a myc tag was added to the N - terminus)はMCF7細胞から抽出したRNAに逆転写を行って得たcDNAからPCRを用いて精製し、pIRESpuro3 - CAG vectorに組み込んだ。FOXA1 mutants (Δ N, Δ C, Δ FH, and FH) 及びSmad3 mutants (MH1+L and MH2)もPCRを用いて精製し、pIRESpuro3 - CAG vectorに組み込んだ。

PCRに用いたプライマーは以下の通りである。

FOXA1 (WT), 5' - AAAGGATCCTTAGGAACTGTGAAGATGGAAGG - 3' (sense) and 5' - AAAGAATTCCTAGGAAGTGTTTAGGACGGGTC - 3' (antisense); FOXA1(Δ N), 5' - AAAGGATCCGCGCCGTCCAACCTGGGCCGCA - 3' (sense) and 5' - AAAGAATTCC TAGGAAGTGTTTAGGACGGGTC - 3' (antisense); FOXA1(Δ C), 5' - AAAGGATCCTTAGGAACTGTGAAGATGGAAGG - 3' (sense) and 5' - TTTGAATTCTCAAGAGGGGTCC TTGCGGCTCTC - 3' (antisense); FOXA1(Δ FH), 5' - ATGAGCCCCATGGCGTACGGCG CCTCTAACCCCA - 3' (sense) and 5' - TGGGGTTAGAGGCGCCGTACGCCATGGGGCT CAT - 3' (antisense); FOXA1(FH), 5' - AAAGGATCCGCGCCGTCCAACCTGGGCCGCA - 3' (sense) and 5' - TTTGAATTCTCAAGAGGGGTCTTGGCGGCTCTC - 3' (antisense); Smad3(WT), 5' - AAAGCGGCCGCTATGTCGTCCATCCTGCCTTT - 3' (sense) and 5' - AAATCTAGACTAAGACACACTGGAACAGCG - 3' (antisense); Smad3(MH1+L), 5' - AAAGCGGCCGCTATGTCGTCCATCCTGCCTTT - 3' (sense) and 5' - AAATCTAGACTA GTTATTATGTGCTGGGGACATCGG - 3' (antisense); Smad3(MH2), 5' - AAAGCGGCC GCTTTGGACCTGCAGCCAGTTAC - 3' (sense) and 5' - AAATCTAGACTAAGACACAC TGGAACAGCG - 3' (antisense); Smad4, 5' - ATCGTAGCGGCCGCATGGACAATATGT CTATTACGAATACACCAACAAG - 3' (sense) and 5' - ATCGTAGCGGCCGCATGTCGT CCATCTTGCCATTACGCCG - 3' (antisense); Importin7, 5' - AAAGGATCCGACCCCA ACACCATTATCGAG - 3' (sense) and 5' - AAAGCGGCCGCTCAATTCATCCCTGGTGC TGG - 3' (antisense).

2.2 抗体

以下の抗体を用いた。

FOXA1 (sc - 6553) and myc (sc - 789 - G) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); Smad3 (#9523), phospho - Smad3 (#9520), Smad4 (#38454), poly - ADP - ribose polymerase

(PARP) (#9542), and cleaved caspase - 7 (#8438) from Cell Signaling Technology (Beverly, MA); α - tubulin (MCA78G) from Serotec (Oxford, UK); Strep from GenScript (Piscataway, NJ); Flag from Sigma - Aldrich (St Louis, MO); importin7 (A302 - 726A) from Bethyl Laboratories (Montgomery, TX); and actin (C4) from Merck Millipore (Guyancourt, France). Horseradish peroxidase (HRP) - F(ab')₂ secondary antibodies were purchased from GE Healthcare (Waukesha, WI), and HRP - linked light chain specific secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA).

2.3 細胞・遺伝子導入

MCF7、MDA - MB - 231 及び COS - 1 は Dulbecco modified Eagle medium (DMEM; Nissui, Tokyo, Japan) に 5% fetal bovine serum (FBS)を含む培地で培養した。35 mm (及び 60 mm) culture dish に細胞を seed し、遺伝子導入には 1 μ g (3 μ g) の plasmid DNA を Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ)を用いてトランスフェクションした。FOXA1 の安定発現株の樹立には MDA - MB - 231 に pIRESpuro3/FOXA1 をトランスフェクションし、puromycin (1 μ g/mL)を用いて 2 週間の selection を行い、生存した細胞のバルクを FOXA1 恒常発現株として用いた。Human recombinant TGF- β 1 は Peptotech (Rocky Hill, NJ)の物を用いた。

Small interfering RNAs (siRNAs) は FOXA1 (sense, 5' - GAACAGGCACUGCAAUAC UGCCUU - 3'; antisense, 5' - AAGGCGAGUAUUGCAGUGCCUGUUC - 3'), SMAD3 (sense: 5' - AGGUCUGCGUGAAUCCCUATT - 3' and antisense: 5' - UAGGGAUUCACG CAGACCUCG - 3'), and SMAD4 (sense: 5' - GCCCUAUUGUUACUGUUGATT - 3' and antisense: 5' - UCAACAGUAACAAUAGGGCAG - 3')を Thermo Fisher Scientific から購入した。siRNA for luciferase (sense: 5' - GCGCUGCUGGUGCCAACCCTT - 3' and antisense: 5' - GGGUUGGCACCAGCAGCGCTT - 3') は Hokkaido System Sciences (Hokkaido, Japan) から購入した。siRNA は Lipofectamine 2000 を用いて細胞にトランスフェクションした。

2.4 トリパンブルー染色

トリパンブルー染色を用いて死細胞を可視化し、以下の式を用いて死細胞の割合を計測した。cell death (%) = (dead cell number/total cell number) \times 100

2.5 ウェスタンブロッティングおよび免疫沈降

ウェスタンブロッティングは enhanced chemiluminescence kit (Merck Millipore) を用いて行った[16]。蛍光強度は Quantity One software (Bio - Rad, Richmond, CA) を用いて測定を行った。細胞は TNE buffer (10mM Tris - HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 1% Triton X - 100, 10mM Na₃VO₄, 1mM NaF, 4 μ g/mL aprotinin, 1.6 μ g/mL pepstatin A, 4 μ g/mL leupeptin,

2mM EDTA, and 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride)を用いて可溶化した後、21130gで15分間遠心分離を行い、上清に事前に抗体を付加したprotein G beadsを加えて免疫沈降を行った[17]。

2.6 定量的リアルタイムPCR

定量的リアルタイムPCR(qPCR)は細胞のRNAをRNAiso plus reagent (Takara, Shiga, Japan)を用いて回収し、0.5µgのRNAをReverTra Ace qPCR RT Kit (Toyobo, Tokyo, Japan)を用いて逆転写して得たcDNAを用いて行った[16]。

qPCRで用いたプライマーは以下の通りである。

Glyceraldehyde 3 - phosphate dehydrogenase, 5' - ACCACAGTCCATGCCATCAC - 3' (sense) and 5' - TCCACCACCCTGTTGCTGTA - 3' (antisense); SERPINE1, 5' - AATCAGACGGCAGCACTGTCT - 3' (sense) and 5' - GGCAGTTCAGGATGTCGTAGT - 3' (antisense); BMF, 5' - GAGGTACAGATTGCCCGAAA - 3' (sense) and 5' - CCCCCTTCCTGTTCTTCTTCT - 3' (antisense); BCL2L10, 5' - GGATGGCTTTTGTCACTTCTTCAGG - 3' (sense) and 5' - ATAATCGTGTCCAGAGATAAATGAAGGC - 3' (antisense); BOK, 5' - CCTCGCGGGTCTGAATGGAAGG - 3' (sense) and 5' - CGAGCGGTCAAAGGCGTCCAT - 3' (antisense); TGFB1, 5' - TACAGCACGGTATGCAAGCC - 3' (sense) and 5' - GCAACCGATCTAGCTCACAGAG - 3' (antisense); TGFB2, 5' - CCCC GGAGGTGATTTCCATC - 3' (sense) and 5' - GGGCGGCATGTCTATTTTGTAAA - 3' (antisense); and TGFB3, 5' - GGAAAACACCGAGTCGGAATAC - 3' (sense) and 5' - GCGGAAAACCTTGGAGGTAAT - 3' (antisense).

95°C で1分間変性させたのち、PCRをThunderbird SYBR Green Polymerase Kit (Toyobo) 及びthe Eco Real - Time PCR System (Illumina, San Diego, CA)を用いて40 cycles (15 seconds at 95°C and 45 seconds at 60°C)行った。

2.7 免疫蛍光染色

Confocal and Nomarski differential interference contrast (DIC)画像はFluoview FV500confocal laser scanning microscope (Olympus, Tokyo, Japan)を用いて取得した[18]。細胞は4% paraformaldehydeを用いて室温20分間で固定を行い、phosphate - buffered saline (PBS) containing 0.2% Triton X - 100 and 3% bovine serum albuminを用いて室温でpermeabilizedした。その後、細胞と抗体を1時間反応させ、PBS containing 0.1% saponinでwashを行った。続いてAlexa Fluor 488 - または 647 - conjugated secondary antibodiesを用いて1時間染色を行い、ProLong antifade reagent (Thermo Fisher Scientific)をmountしてサンプルとした。核はpropidium iodide or 4',6 - diamidino - 2 - phenylindole (DAPI;

Sigma - Aldrich)を用いて染色を行った。

2.8 RNA sequencing

RNA sequencingは、TGF- β 刺激・非刺激(1 ng/mL, 6 hours)のMCF7細胞にsiLuc、siFOXA1、siFOXA1及びsiSmad3 (48 hours)をトランスフェクションした細胞のRNAをRNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA)を用いて精製したものを用いた。cDNAはSMART - Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing (Takara)を用いて製作した[19]。Ds - cDNAはthe S220 Focused - ultrasonicator (Covaris, Woburn, MA)を用いてフラグメント化した。cDNA librariesはNEBNext Ultra DNA Library Prep Kit (New England Biolabs, Beverly, MA)を用いて製作した。シークエンスはHiSeq. 1500 (Illumina)を用いて行った。TopHat (version 2.0.13; default parameters)を用いてreference genome (UCSC/hg19) with annotation data from iGenomes (Illumina)上にマッピングを行った。遺伝子発現解析にはCuffdiff (Cufflinks version 2.2.1; default parameters)を用いた。我々は得られたFPKM値に1加算してGSEA解析を行った[20]。

2.9 データの寄託

RNA sequencingで得られたデータはDNA Data Bank of Japan (accession no. PRJDB6489)へ寄託した。

2.10 統計解析

有意差検定はMicrosoft Excel for Mac (Microsoft, Redmond, WA)のStudent t testを用いて行った。mean \pm SDを示している。

【結果】

3.1 FOXA1はMCF7細胞において細胞死を抑制する

乳がん細胞のTGF- β シグナルにおけるFOXA1の役割を調べる為、ER陽性の乳がん細胞株MCF7細胞のFOXA1をsiRNAを用いてノックダウンを行い、TGF- β 刺激を行った(Figure 1A and 1B) [14]。その結果、コントロール細胞ではTGF- β 刺激の影響は見られなかったが、FOXA1ノックダウン細胞においてはTGF- β 刺激依存的な細胞死を引き起こすことが分かった。

TGF- β 刺激を行ったFOXA1ノックダウン細胞において、アポトーシスのマーカーであるカスパーゼ7やPARPの断片化を引き起こしていることが分かった。さらに、FOXA1ノックダウン細胞におけるTGF- β 刺激誘導性の細胞死は、カスパーゼの阻害剤であるzVAD-fmkを処理することで抑制された(Figure 1C and 1D)。これらの事からFOXA1はMCF7細胞において細胞死を抑制していることが示唆された。

3.2 FOXA1はSmad依存的なTGF- β シグナルを抑制する

TGF- β はSmad依存的経路またはJNK(c - Jun N - terminal kinase)等の活性化を介したSmad非依存的な経路を介して細胞死を引き起こすことが知られている[7]。しかし、FOXA1ノックダウンMCF7細胞におけるTGF- β 刺激依存的な細胞死はJNKの阻害剤であるSP600125の処理による影響を受けなかった(Figure 2A)。このことから、Smad非依存的な経路は今回の細胞死に関与していないことが分かった。

一方で、FOXA1ノックダウンMCF7細胞におけるTGF- β 刺激依存的な細胞死はSmad3のノックダウンを行うことで顕著に抑制されることを見出した(Figure 2B and 2C)。また、Smad4のノックダウンも同様にFOXA1ノックダウンMCF7細胞のTGF- β 刺激依存的な細胞死を抑制した(Figure 2D and 2E)。

さらに、Smad3/4複合体の標的遺伝子であるSERPINE1のmRNA量をリアルタイムPCRを用いて解析したところ[21]、FOXA1ノックダウン細胞においてTGF- β 刺激依存的にSERPINE1の顕著な増加が見られ、さらにFOXA1ノックダウン細胞におけるSERPINE1の増加はSmad3またはSmad4のノックダウンを行うことでSERPINE1の発現量は抑制された(Figure 2F - H)。これらのことから、FOXA1はTGF- β 刺激依存的なSmadの活性化を抑制することで、乳がん細胞におけるSmad依存的なTGF- β 刺激依存的な細胞死を抑制していることが明らかとなった。

3.3 FOXA1はTGF- β 刺激依存的なSmad3の核移行を抑制する

FOXA1によるSmad依存的なTGFシグナル抑制について詳細な分子機構を明らかにするため、Smad複合体において重要なSmad3の活性化において、FOXA1のノックダウン

がどのような影響を及ぼすか解析を行った。

まず、TGF- β 刺激依存的なSmad3のリン酸化について解析を行ったが、コントロール細胞とFOXA1ノックダウン細胞間においてSmad3のリン酸化に違いは見られなかった(Figure 3A)。

次に、TGF- β 刺激依存的なSmad3の核移行について調べる為、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析を行った。その結果、FOXA1ノックダウン細胞においてTGF- β 刺激依存的なSmad3の核移行が顕著に増加していることが分かった(Figure 3B and 3C)。さらに、FOXA1陰性の乳がん細胞株MDA-MB-231細胞にFOXA1のトランスフェクションを行い、FOXA1の恒常発現株の作製を行った(Figure 3D) [14]ところ、FOXA1を恒常発現したMDA-MB231細胞においてTGF- β 刺激依存的なSmad3の核移行及びSmad複合体の標的遺伝子であるSERPINE1の発現量が抑制されることを見出した(Figure 3E - G)。これらのことから、FOXA1はSmad3のリン酸化に影響することなく、TGF- β 刺激依存的なSmad3の核移行を抑制することを見出した。

3.4 FOXA1はforkhead boxドメインを介してSmad3のMad homology2ドメインに結合し、Smad3とimportin7との結合を抑制する

FOXA1がSmad3の核移行を抑制することから(Figure 3)、FOXA1がSmad3に結合していると考えて解析を行った。COS-1細胞にFOXA1とSmad3を共発現させ、免疫沈降を用いて結合の解析を行ったところ、FOXA1とSmad3が結合する事が分かった(Figure 4A)。さらに、MCF7細胞を用いて内在性のFOXA1とSmad3との結合を解析したところ、興味深いことにTGF- β 刺激非依存的にFOXA1とSmad3が結合していることが分かった(Figure 4B)。これらのことから、FOXA1とSmad3はTGF- β 非刺激下において結合していることが示唆された。

次に、FOXA1がどのドメインを介してSmad3と結合しているか明らかにするため、FOXA1のデリューションミュータントの作製を行い、COS-1細胞に共発現させて免疫沈降法を用いて結合の解析を行った。その結果、forkhead box domainのみの変異体、C末端を欠損した変異体、N末端を欠損した変異体はSmad3と結合していたが、forkhead box domainを欠損した変異体はSmad3との結合が見られなかった(Figure 4C and 4D)。さらにSmad3のデリューションミュータントの作製を行い、FOXA1との結合を解析したところ、Smad3はC末端にあるMad homology 2 (MH2)を介してFOXA1と結合していることが分かった(Figure 4E and 4F)。これらのことから、FOXA1はFHドメインを介してSmad3のMH2ドメインに結合していることが分かった。

Smad3はSmad4と複合体形成を行い、輸送タンパクimportin7と結合する事で核内に移行することが知られている[22]。そこで、FOXA1がSmad3とSmad4及びimportin7の結合に与える影響について解析を行った。その結果、FOXA1の発現はSmad3とSmad4の結合には影響を与えなかったが、Smad3とimportin7の結合を抑制することが分かった

(Figure 4G and 4H)。これらのことから、FOXA1はSmad3とimportin7の結合を抑制することにより、Smad3の核移行を抑制していることが明らかとなった。

3.5 FOXA1はSmad3依存的な細胞死関連遺伝子を抑制する

遺伝子プロファイルの解析を行うため、FOXA1、FOXA1とSmad3、コントロールのsiRNAをMCF7にトランスフェクションし、TGF- β 刺激、非刺激下における遺伝子発現プロファイルをRNAシーケンスを用いて取得した。TGF- β 刺激によって発現が1.4倍以上に増加し、かつFOXA1ノックダウン細胞において特異的に発現の増加が見られた180の遺伝子に着目して解析を行うことにした(Figure 5A, top)。公開されている遺伝子プロファイル解析ツールでdatabase for annotation, visualization, and integrated discovery (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov>)を用い、この180の遺伝子についてgene ontology (GO)解析を行った所、“Positive regulation of apoptotic process”が優位に亢進していることが分かった(Figure 5A, bottom)。“Positive regulation of apoptotic process”の中から特に細胞死に関連していることが知られている細胞死誘導性Bcl-2ファミリー(BMF, BCL2L10, BOK)及び細胞死誘導遺伝子GADD45Gの4つの遺伝子について、リアルタイムPCRを用いてより詳細な解析を行った。その結果、TGF- β 刺激依存的なBMF, BOK, GADD45Gの発現はFOXA1のノックダウンによって顕著に増加し、Smad3をノックダウンすることによって抑制されることが分かった(Figure 5B)。

さらに、RNAシーケンス解析で得られたFPKM値を用いてGSEA解析を行った。その結果、アポトーシスに関連する遺伝子セットである“Hallmark_Apoptosis”のenrichment score (ES)はFOXA1をノックダウンしたMCF7細胞において増加しており、またこのESの増加はSmad3を同時にノックダウンすることで抑制されることが分かった(Figure 5C)。これらのことから、Smad3下流の細胞死関連遺伝子であるBMF、BOK、GADD45G等の遺伝子がFOXA1ノックダウン細胞におけるTGF- β 刺激依存的な細胞死を引き起こしていることが示唆された(Figure 5D)。

3.6 FOXA1は乳がん治療薬タモキシフェンの細胞傷害性を低下させる

エストロゲンレセプター(ER)のアンタゴニストであるタモキシフェンは、乳がん細胞にTGF- β の自己分泌を誘導し、アポトーシスを引き起こすことが知られている[23, 24]。そのためFOXA1がタモキシフェンの細胞傷害性に影響を与える可能性があると考え、ER陽性の乳がん細胞株MCF7のFOXA1をノックダウンし、タモキシフェン誘導性の細胞死について解析を行った。その結果、FOXA1ノックダウン細胞において、タモキシフェン誘導性の細胞死が優位に増加することが分かった(Figure 6A)。FOXA1のノックダウンはTGF- β リガンドの自己分泌には影響を与えなかったことから(Figure 6A and B)、FOXA1のノックダウンはタモキシフェンのTGF- β 自己分泌による細胞死を増強することが示唆された。

4. 総括

マウスの正常乳腺上皮細胞においてTGF- β シグナルは細胞死を誘導し、乳腺の退縮を促している。また、マウス乳腺の退縮期においてTGF- β 3の発現が増加していることが報告されている[6, 25]。一方、FOXA1は乳腺の発達期において発現し、乳腺の退縮期に発現が低下していることから[25]、FOXA1の発現レベルが低下にすることにより乳腺細胞のTGF- β 誘導性細胞死の感受性が亢進しているのではないかと考えられる。その為、FOXA1の発現は正常乳腺上皮細胞において乳腺の発達退縮サイクルに依存した厳密な制御を受けており、これによってTGF- β 誘導性細胞死を制御しているのではないかと考えられる。一方でFOXA1はエストロゲンレセプター陽性の乳がん細胞において高発現しており、これらの細胞はFOXA1の恒常発現性を獲得しているのではないかと考えられる。最近の乳がんに関する報告において、FOXA1のプロモーター領域にポイントミューテーションが入ることにより転写因子E2Fの認識配列となり、発現が増加しているという事が分かっている[26]。このことから、乳がん細胞においてFOXA1の発現を維持するための分子機構を解明するために、より詳細な遺伝子発現解析を行う必要がある。

今回、内在性のFOXA1がSmad3に結合する事を見出した。また、このFOXA1とSmad3の結合はTGF- β 刺激による影響を受けないことから、TGF- β 刺激を受ける前からFOXA1はSmad3と結合していると考えられる。Smad3はTGF- β 刺激を受ける前は細胞質に局在していることから、FOXA1は細胞質においてSmad3と結合し、Smad3の核移行を抑制しているのではないかと考えた。主に細胞質のタンパクを抽出する試薬である1% Triton X - 100を用いて細胞を可溶化した際にもFOXA1とSmad3の結合が見られたことから(Figure 4B) [17]、FOXA1とSmad3が細胞質において結合しているという仮説を支持している。FOXA1の大部分が転写因子として核内に局在していることから[10, 11]、FOXA1の一部が細胞質に局在しており、Smad3の核移行を制御していると考えられる。

Smad3はTGF- β 刺激を受けたTGF- β I レセプターによってC末端にあるSSXSモチーフをリン酸化され、Smad4と複合体を形成する[1-4]。その後、Smad3/4複合体はimportin7によって核へ輸送される[22]。今回の解析から、FOXA1はSmad3とimportin7の結合を阻害することでSmad3/4複合体形成に影響を与えることなくSmad3の核移行を抑制していることを明らかにした。Importin7はSmad3のMH2ドメインに結合する事が知られており[22]、FOXA1はSmad3のMH2ドメインに結合する事でimportin7の結合サイトをマスクし、Smad3とimportin7の結合を阻害していることが示唆された(Figure 4)。この仮説は今後FOXA1/Smad3複合体の構造解析を行うことで明らかにする予定である。

FOXA1陰性の乳がん細胞株MDA-MB-231細胞にFOXA1を発現させることでもTGF- β

刺激によるSmad3の活性化を抑制することを見出した(Figure 3)。MDA-MB-231細胞はエストロゲンレセプター(ER)及びFOXA1陰性であるため、FOXA1はERの発現とは無関係にSmad3の活性化を抑制していることが分かった[14]。FOXA1はER陽性の乳がん細胞において高発現しており[11]、MDA-MB-231細胞はTGF- β 誘導性細胞死に対して抵抗性を持っている[9]。このことから、FOXA1は主にER陽性の乳がん細胞においてSmad3の活性化を抑制することでTGF- β 誘導性細胞死を抑制しているのではないかと考えた。

さらに、FOXA1をノックダウンすることで抗がん剤であるタモキシフェンの細胞傷害性が亢進することを見出した(Figure 6)。タモキシフェンはERの阻害薬であり、ER陽性の乳がん細胞に用いられている。タモキシフェンの細胞傷害性はERの抑制だけではなく、TGF- β 1の自己分泌にも依存していることが知られている[23, 24]。FOXA1はER陽性の乳がん細胞において高発現しているため、FOXA1はタモキシフェンのTGF- β 自己分泌による細胞傷害性を抑制していることが示唆された。そのため、FOXA1を抑制することで乳がんにおけるタモキシフェンの治療効果を増強させると考えられる。

最後に、今回の研究からFOXA1はSmad3の活性化を抑制することTGF- β 誘導性細胞死を抑制していることが明らかとなった。また、FOXA1はSmad3と結合することでimportin7との結合を阻害していることを見出した。これまでのFOXA1の研究では、核内における転写因子FOXA1の機能に着目したものが大半だったが、今回の我々はFOXA1が細胞質においてシグナル伝達因子と結合し、シグナル制御因子として機能していることを明らかにした。

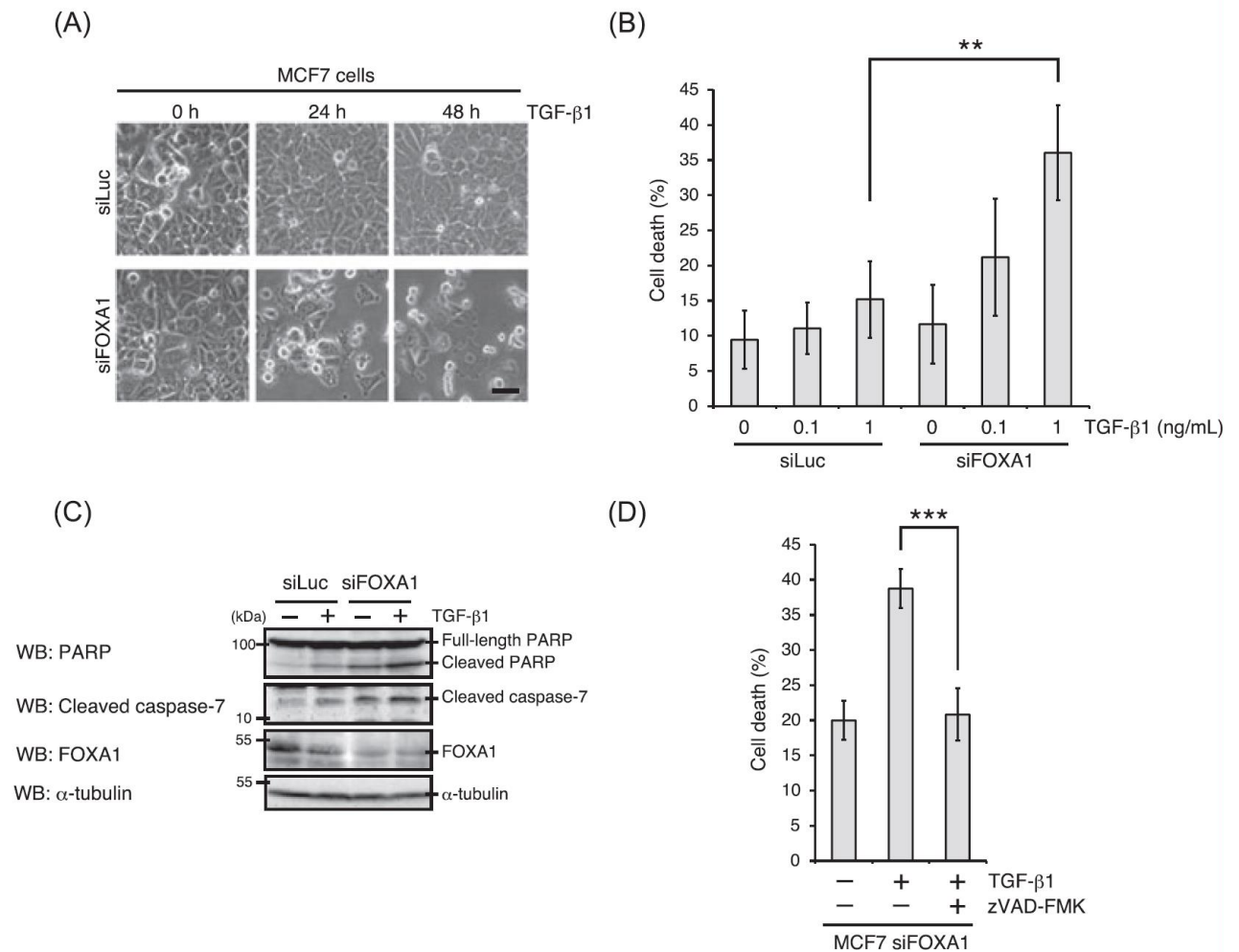


Figure1. MCF7 細胞において FOXA1 は TGF-β誘導性細胞死を抑制する

A, MCF7 細胞に luciferase(siRNA)、FOXA1(siFOXA1)の siRNA をトランスフェクションし、TGF-β1(1 ng/ml)を 24 時間処理を行った後、光学顕微鏡を用いて観察を行った。Scale bar = 40 μm。

B, MCF7 細胞に siLuc、siFOXA1 をトランスフェクションし、TGF-β1 の処理を行った。48 時間後、トリパンプルー染色を用いて死細胞の計測を行った。結果は mean±SD(n = 3)で示している。

C, MCF7 細胞に siLuc、siFOXA1 をトランスフェクションし、TGF-β1(1 ng/ml)の処理を行った。48 時間後、細胞を可溶化し、ウェスタンブロットを用いて解析を行った。

D, MCF7 細胞に siFOXA1 をトランスフェクションし、TGF-β1(1 ng/ml)の処理を行った。48 時間後、トリパンプルー染色を用いて死細胞の計測を行った。

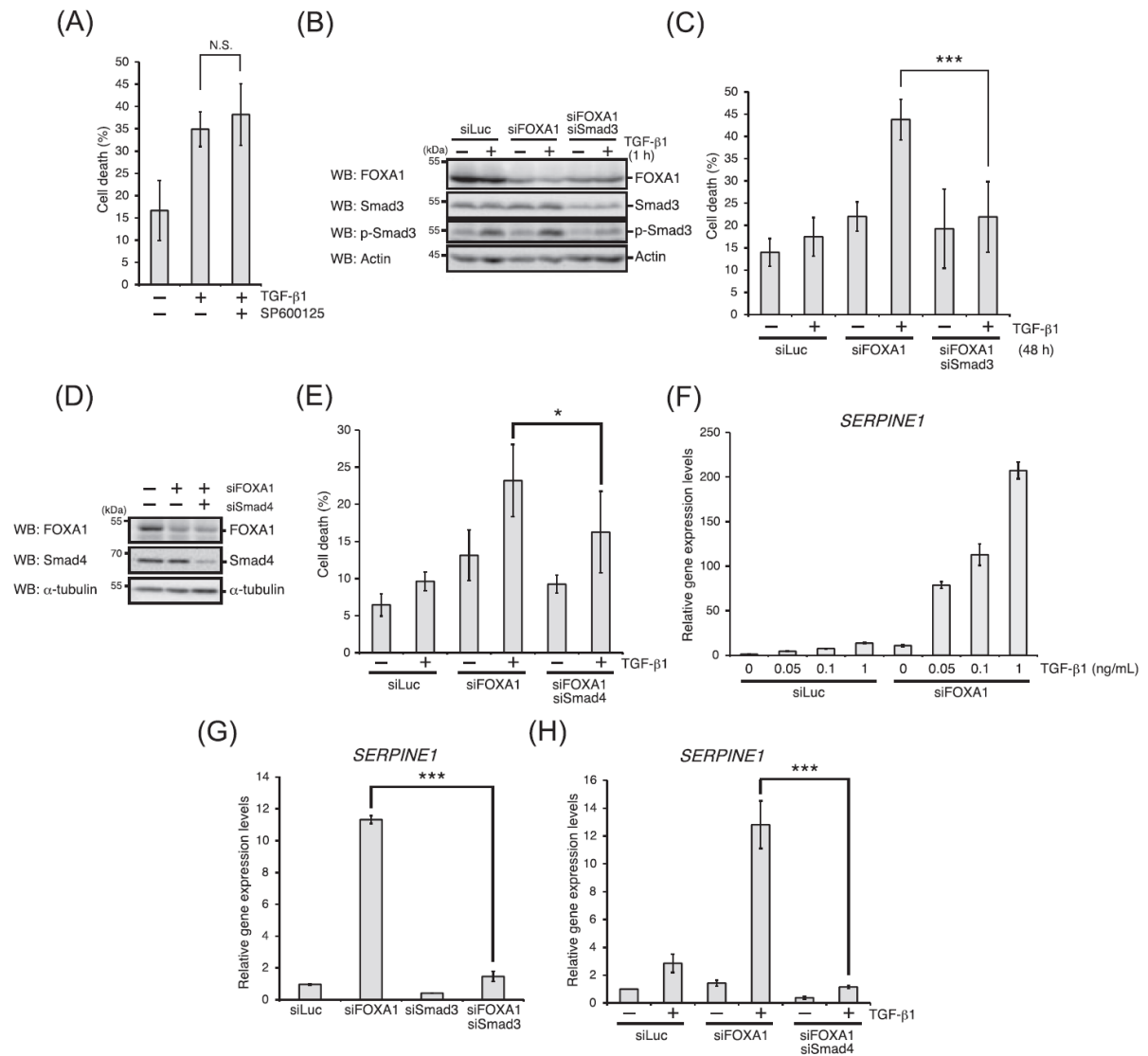


Figure 2. FOXA1 は Smad 依存的な TGF-β誘導性細胞死を抑制する

A, MCF7 細胞に siFOXA1 をトランスフェクションして TGF-β1(1 ng/ml)の処理を行った。

48 時間後、トリパンブルー染色を用いて死細胞の計測を行った。

B, C, MCF7 細胞に siLuc、siFOXA1 及び Smad3 の siRNA(siSmad3)をトランスフェクションし、TGF-β1(1 ng/ml)の処理を行った。その後、ウェスタンブロット若しくはトリパンブルー染色を用いて解析を行った。

D, B と同様の実験を siSmad4 を用いて TGF-β非処理下において行った。

E, C と同様の実験を siSmad4 を用いて行った。

F, MCF7 細胞に siLuc、siFOXA1 をトランスフェクションし、TGF-β処理を行った。6 時間後、細胞の RNA を抽出し、cDNA とした後に qPCR を用いて SERPINE1 の mRNA 量の解析を行った。コントロールとして GAPDH の mRNA 量を用いている。コントロール細胞の SERPINE1 の発現を 1 としている。

G, MCF7 細胞に siLuc、siFOXA1 をトランスフェクションし、TGF- β 処理を行った。6 時間後、F と同様に SERPINE1 の mRNA を測定した。H, G と同様の実験を siSmad4 を用いて行った。

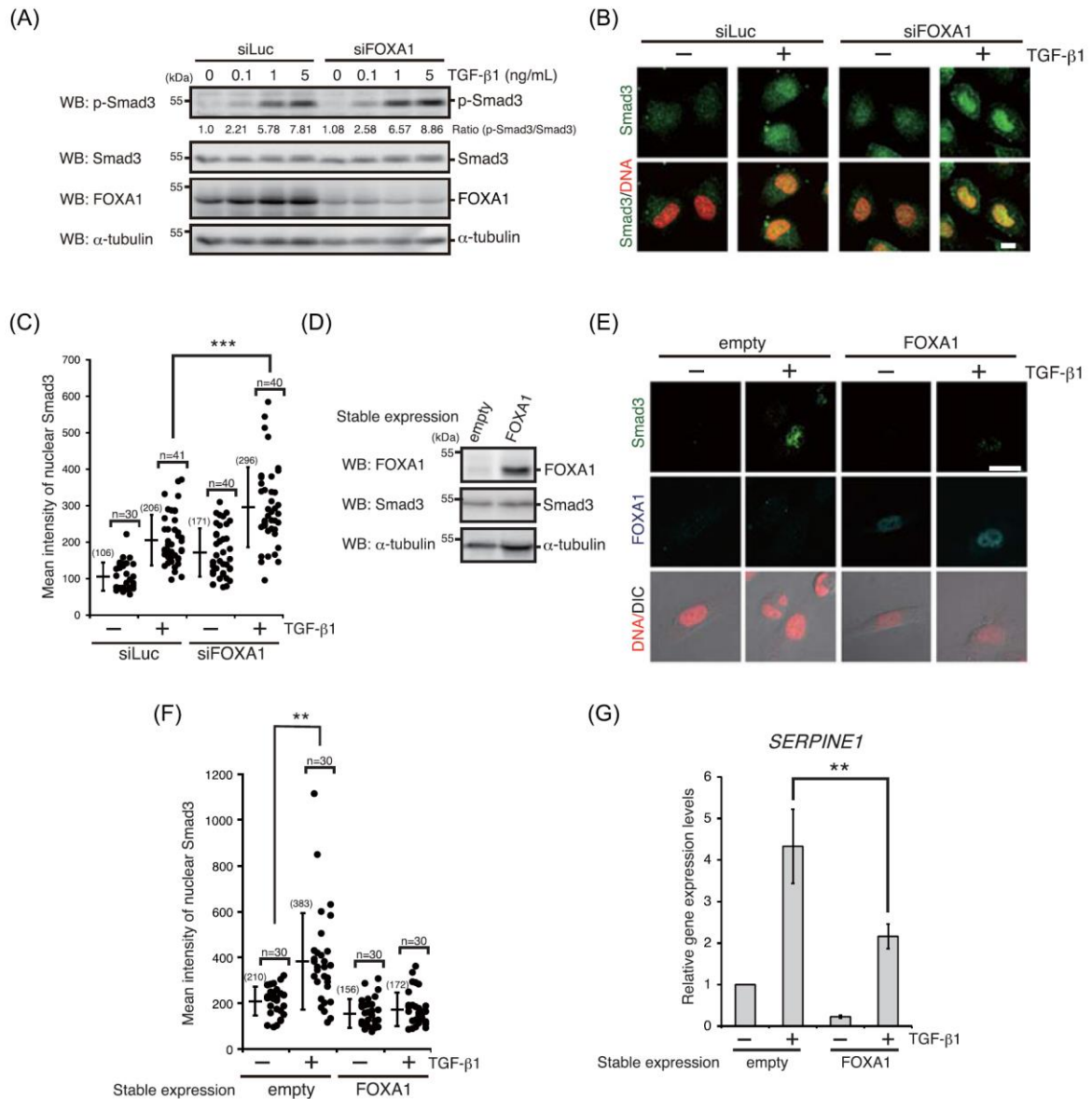


Figure 3. FOXA1 は Smad3 の核移行を抑制する

A, MCF7 細胞に siLuc、siFOXA1 をトランスフェクションし、TGF- β の処理を行った。1 時間後、ウェスタンブロットを用いて解析を行った。

B, MCF7 細胞に siLuc、siFOXA1 をトランスフェクションし、TGF- β の処理を行った。1 時間後に細胞を固定し、Smad3 と核の染色を行い、観察した。Scale bar = 10 μ m。

C, B で観察した細胞の Smad3 核内蛍光を定量した。N は計測した細胞数を現す。

D, FOXA1 を恒常発現させた MDA-MB-231 細胞をウェスタンブロットを用いて解析を行った。

E, FOXA1 を恒常発現させた MDA-MB-231 細胞に TGF- β 処理を行った。1 時間後、細胞を固定し、抗体を用いて染色を行った。Scale bar = 20 μ m。

F, C と同様の解析を E に対して行った。

G, コントロールベクター及び FOXA1 を恒常発現させた MDA-MB-231 細胞に TGF- β 刺激を行った。1 時間後に細胞を回収し、qPCR を用いて SERPINE1 の mRNA 量を解析した。

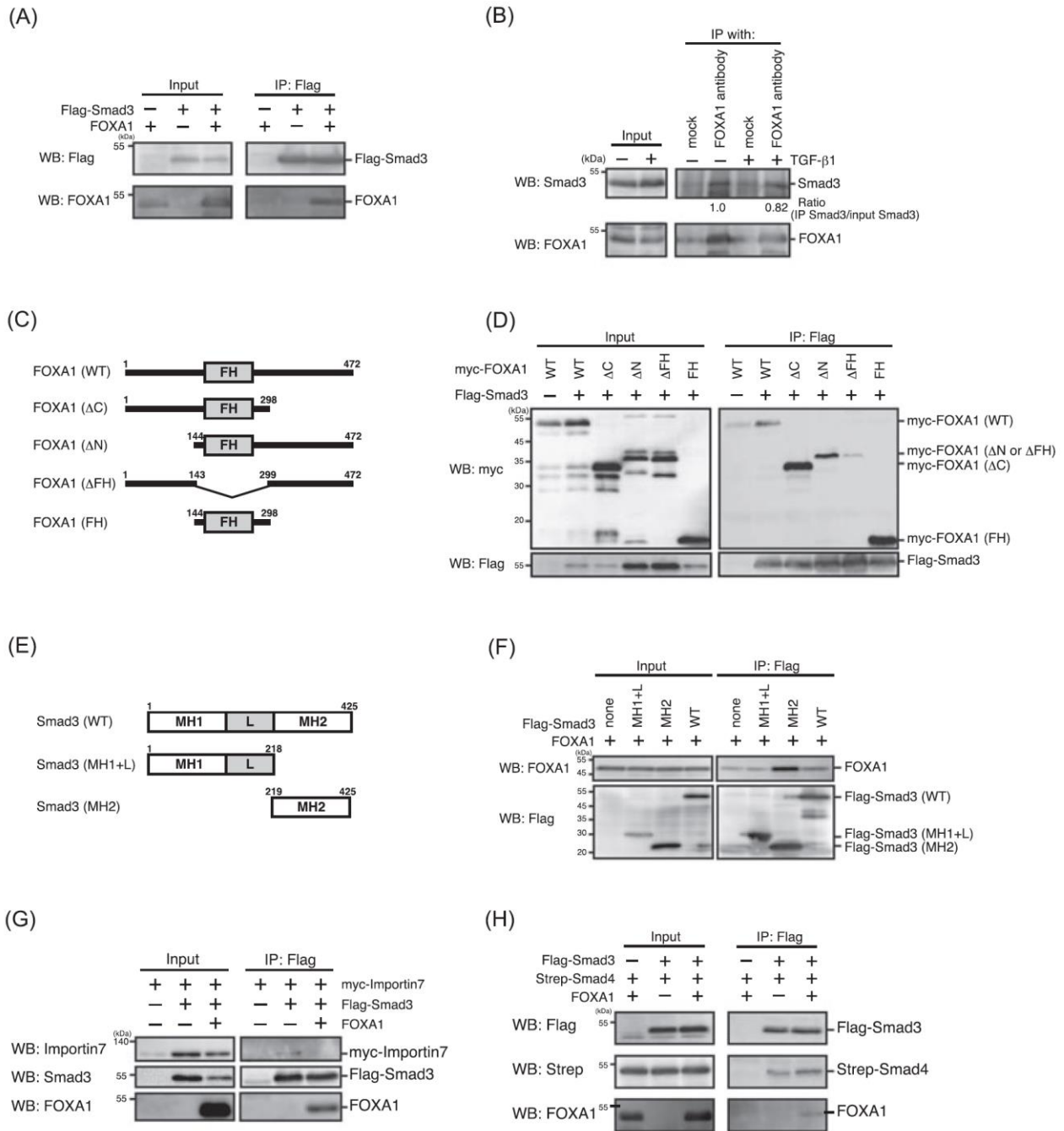


Figure 4. FOXA1 は Smad3 と importin7 の結合を阻害する

A, COS-1 細胞に FOXA1 と Flag-Smad3 を共発現させ、24 時間後に回収した。抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降により Smad3 を精製し、ウェスタンブロットを用いて解析を行った。

B, MCF7 細胞に TGF- β 刺激を行い、1 時間後に細胞を回収し、抗 FOXA1 及びコントロール抗体を用いた免疫沈降を行い、ウェスタンブロットを用いて解析を行った。

C, 実験で用いた FOXA1 欠損変異体の概要を示した。

- D, 各種 FOXA1 変異体を恒常発現させた MDA-MB-231 細胞に Flag-Smad3 をトランスフェクションし、24 時間後に回収した。これらの細胞を免疫沈降及びウェスタンブロットを用いて解析を行った。
- E, Smad3 の欠損変異体の概要を示した。
- F, COS-1 細胞に Flag-Smad3 変異体及び FOXA1 を共発現させ、免疫沈降及びウェスタンブロットを用いて解析を行った。
- G, COS-1 細胞に myc-importin7 及び Flag-Smad3 を共発現させ、さらに FOXA1 有無の条件下で免疫沈降及びウェスタンブロットを用いて解析を行った。
- H, COS-1 細胞に Flag-Smad3、Strep-Smad4、FOXA1 を共発現させ、24 時間後に TGF- β 1 の刺激を 1 時間行い、免疫沈降及びウェスタンブロットを用いて解析を行った。

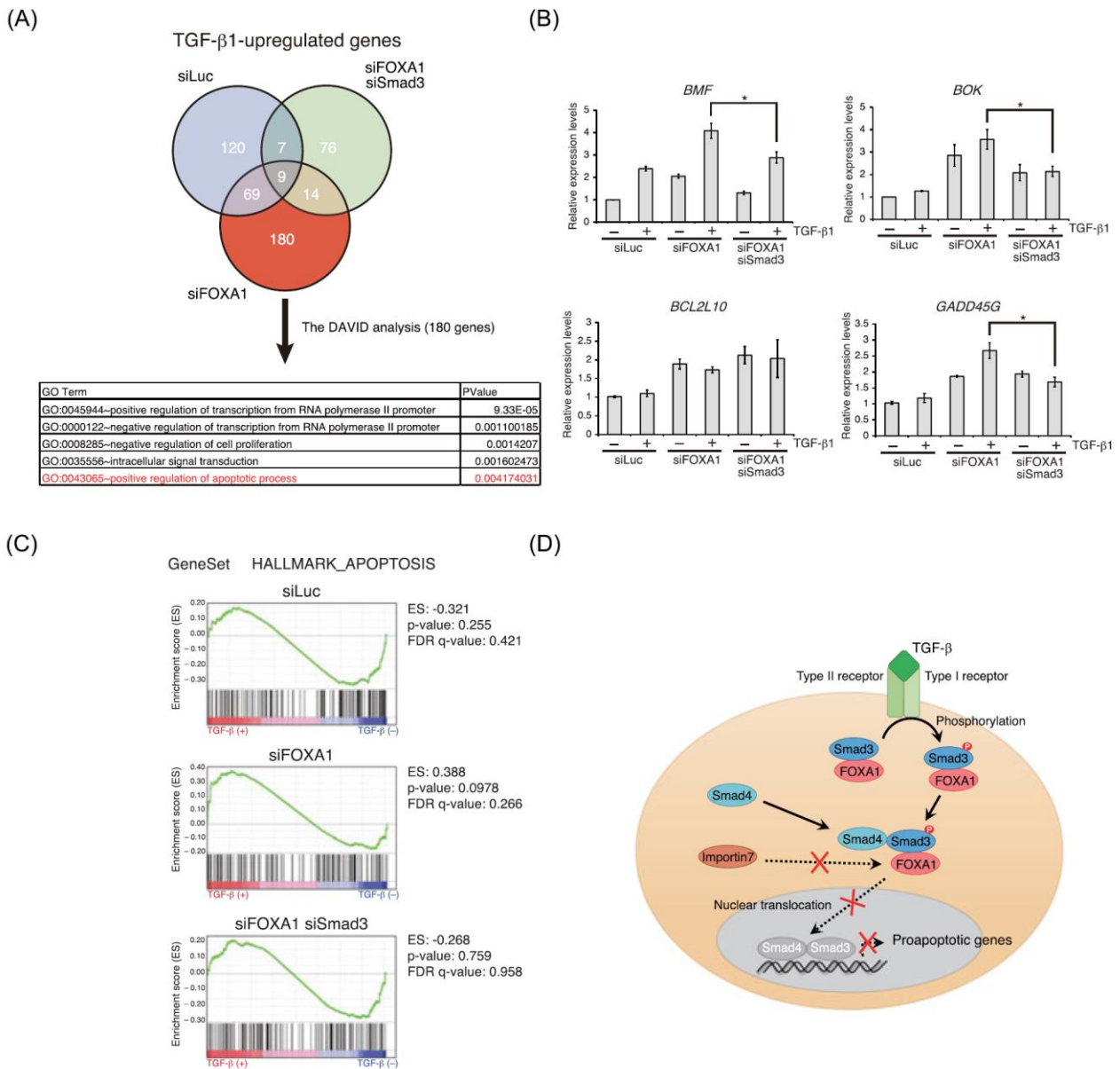


Figure 5. FOXA1 は Smad3 依存的な細胞関連遺伝子の発現を抑制する

A, siLuc、siFOXAX1、siSmad3 をトランスフェクションした MCF7 細胞に対して RNA シーケンス解析を行い、TGF- β 刺激依存的に FPKM 値が 1.4 倍以上になった遺伝子のベン図を示す(upper panel)。特に siFOXAX1 をトランスフェクションした MCF7 細胞において特異的に発現の増加が見られた 180 の遺伝子に対して GO 解析を行い、優位な増加が見られた上位 5 つの terms について示す(bottom panel)。

B, siLuc、siFOXAX1、siSmad3 をトランスフェクションした MCF7 細胞に TGF- β 処理を行った。6 時間後に Fig. 2F と同様に qPCR を用いて遺伝子の mRNA 量を解析した。

C, RNA シークエンス解析で得られた FPKM 値に対し、“Hallmark_Apoptosis”の geneset を用いて GSEA 解析を行った。

D. FOXA1 による TGF- β 刺激誘導性細胞死の阻害機構の概要。FOXA1 は TGF- β 刺激が起こる前から Smad3 と結合しており、この FOXA1 が Smad3 に結合することにより、Smad3 と importin7 の結合を阻害している。この機構により、FOXA1 は TGF- β 刺激誘導性細胞死を抑制している。

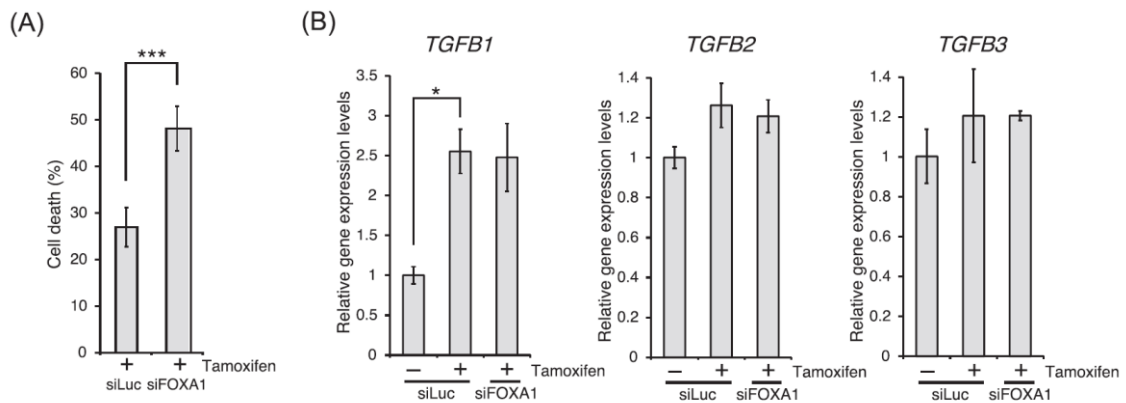


Figure 6. FOXA1 は MCF7 におけるタモキシフェンの細胞傷害性を抑制する

A, siLuc、siFOXA1 をトランスフェクションした MCF7 細胞にタモキシフェン(5 mM)の処理を行った。48 時間後、トリパンプルー染色を用いて死細胞の計測を行った。

B, siLuc、siFOXA1 をトランスフェクションした MCF7 細胞にタモキシフェン(5 mM)の処理を行った。48 時間後、qPCR を用いて TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3 の mRNA 量の解析を行った。標準として GAPDH の発現量を用いた。また、タモキシフェン非刺激の細胞を 1 として相対値を現している。

【主要論文目録】

本学位論文内容は下記の発表論文による。

(主論文) Hirata, K., Takakura, Y., Shibazaki, M., Morii, M., Honda, T., Oshima, M., Aoyama, K., Iwama, A., Nakayama, Y., Takano, T., Yamaguchi, N., and Yamaguchi, N.-t.

Forkhead box protein A1 confers resistance to transforming growth factor- β -induced apoptosis in breast cancer cells through inhibition of Smad3 nuclear translocation.

J. Cell. Biochem., 120: 2259-2270, 2019.

【参考文献】

1. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.*2012;13:616 - 630.
2. Pardali K, Moustakas A. Actions of TGF- β as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1775:21 - 62.
3. Saitoh M, Miyazawa K. Transcriptional and post-transcriptional regulation in TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition. *J Biochem.* 2012;151:563 - 571.
4. Schmierer B, Hill CS. TGF β -SMAD signal transduction : molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:970 - 982.
5. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell.* 2003;113:685 - 700.
6. Nguyen AV, Pollard JW. Transforming growth factor β 3 induces cell death during the first stage of mammary gland involution. *Development.* 2000;127:3107 - 3118.
7. Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:807 - 821.
8. Siegel PM, Shu W, Cardiff RD, Muller WJ, Massagué J. Transforming growth factor β signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:8430 - 8435.
9. Lin S, Yang J, Elkahlon AG, et al. Attenuation of TGF - β signaling suppresses premature senescence in a p21-dependent manner and promotes oncogenic Ras-mediated metastatic transformation in human mammary epithelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 2012;23:1569 - 1581.
10. Augello MA, Hickey TE, Knudsen KE. FOXA1: master of steroid receptor function in cancer. *EMBO J.* 2011;30:3885 - 3894.
11. Bernardo GM, Keri RA. FOXA1: a transcription factor with parallel functions in development and cancer. *Biosci. Rep.*2012;32:113 - 130.
12. Carroll JS, Liu XS, Brodsky AS, et al. Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long - range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell.*2005;122:33 - 43.
13. Yamaguchi N, Ito E, Azuma S, et al. FoxA1 as a lineage - specific oncogene in luminal type

- breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;365:711 - 717.
14. Bernardo GM, Bebek G, Ginther CL, et al. FOXA1 represses the molecular phenotype of basal breast cancer cells. *Oncogene.*2013;32:554 - 563.
 15. Bernardo GM, Lozada KL, Miedler JD, et al. FOXA1 is an essential determinant of ER α expression and mammary ductal morphogenesis. *Development.* 2010;137:2045 - 2054.
 16. Yamaguchi N, Nakayama Y, Yamaguchi N. Down - regulation of Forkhead box protein A1 (FOXA1) leads to cancer stem cell - like properties in tamoxifen - resistant breast cancer cells through induction of interleukin - 6. *J Biol Chem.* 2017;292:8136 - 8148.
 17. Kubota S, Fukumoto Y, Aoyama K, et al. Phosphorylation of KRAB - associated protein 1 (KAP1) at Tyr - 449, Tyr - 458, and Tyr - 517 by nuclear tyrosine kinases inhibits the association of KAP1 and heterochromatin protein 1 α (HP1 α) with heterochromatin. *J Biol Chem.* 2013;288:17871 - 17883.
 18. Aoyama K, Fukumoto Y, Ishibashi K, et al. Nuclear c - Abl mediated tyrosine phosphorylation induces chromatin structural changes through histone modifications that include H4K16 hypoacetylation. *Exp Cell Res.* 2011;317:2874 - 2903.
 19. Tanaka T, Nakajima - Takagi Y, Aoyama K, et al. Internal deletion of BCOR reveals a tumor suppressor function for BCOR in T lymphocyte malignancies. *J Exp Med.* 2017;214:2901 - 2913.
 20. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge - based approach for interpreting genome - wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:15545 - 15550.
 21. Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF β - inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor - type 1 gene. *EMBO J.* 1998;17:3091 - 3100.
 22. Chuderland D, Konson A, Seger R. Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. *Mol Cell.* 2008;31:850 - 861.
 23. Benson J, Baum M. Modulation of transforming growth factor β expression and induction of apoptosis by tamoxifen in ER positive and ER negative breast cancer cells. *Br J Cancer.*1996;74:993 - 994.
 24. Chen H, Tritton TR, Kenny N, Absher M, Chiu JF. Tamoxifen induces TGF - β 1 activity and apoptosis of human MCF - 7 breast cancer cells in vitro. *J Cell Biochem.* 1996;61:9 - 17.
 25. Anderson SM, Rudolph MC, McManaman JL, Neville MC. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis!. *Breast Cancer Res.* 2007;9:204.
 26. Rheinbay E, Parasuraman P, Grimsby J, et al. Recurrent and functional regulatory mutations in breast cancer. *Nature.*2017;547:55 - 60.

本学位論文の審査は、千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学大学院薬学研究院	薬効薬理学研究室	村山	俊彦	教授
副査	千葉大学大学院薬学研究院	免疫微生物学研究室	川島	博人	教授
副査	千葉大学大学院薬学研究院	臨床薬理学研究室	佐藤	洋美	講師

謝辞

本研究を行うに当たり、終始ご指導、ご鞭撻を賜った本研究室の山口直人教授と高野博之教授に深く感謝いたします。また、研究に対する確かなアドバイスを下さいました山口憲孝准教授に心より御礼申し上げます。

研究生活においては、皆様に支えられたおかげで研究を進めていく事ができました。豊富な知識と様々な知見からの確かなアドバイスを下さいました森井真理子氏、本田拓也氏、高倉勇氣氏、実験手技・手法を終始よく指導して下さいました柴崎美里氏に深く感謝いたします。

同期としてお互いに支えあい、刺激を与えてくださった阿蘇拓也氏、榎本杏子氏、佐藤里香氏、中村怜央氏に感謝します。

また、研究室を明るくし、励まして下さった堀直人氏、町田萌香氏、井上椋太氏、尾間萌歌氏、杉野歩美氏、鈴木孝行氏、荒木拓郎氏、大久保愛未氏、川村友博氏、高橋和史氏、寺田菜摘氏、野溝航太氏に感謝します。今後の成長と活躍に期待しています。

研究に様々なアドバイスを下さり、今はそれぞれの道で活躍している青山和正氏、久保田翔氏、長谷川仁美氏、盛永敬郎氏、幸龍三郎氏に感謝をいたします。

最後に研究生活を温かく見守り、支えてくださった両親に深く感謝いたします。

今後の皆様のご活躍、ご健闘をお祈り申し上げます。