

# 論文要旨

## Notch signaling is necessary for epithelial growth arrest by TGF- $\beta$

( TGF- $\beta$  による表皮系細胞の増殖抑制作用には、  
Notch シグナルが必要である )

仁井見 英樹

### 【序論および目的】

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) は、細胞増殖を阻害する増殖抑制因子として知られている。特に表皮系細胞の増殖抑制においては、Smad2, 3 を介した p21 の発現とその維持が重要であるが、p21 発現の維持に関するメカニズムについては良く分かっていない。我々はこのメカニズムに Notch シグナルが関与しているのではないかと考えた。Notch は殆どの組織の発生に関与しているが、ヒトでは染色体転座による Notch シグナルの強発現で白血病を起こすことが知られている。しかし表皮系細胞においては、逆に p21 を介して細胞増殖を抑制することが近年報告された。Notch と TGF- $\beta$  との crosstalk に関する研究も幾つか報告されている為、我々は表皮系細胞の増殖抑制メカニズムにおける Notch と TGF- $\beta$  との crosstalk を調べる目的で研究を開始した。

### 【材料および方法】

細胞; HaCaT (ヒト表皮細胞), MCF-10A (ヒト乳房表皮細胞), HEK-293 (ヒト腎芽細胞), NMuMG (マウス乳房表皮細胞), NMe (NMuMG 由来の clone), Mv1Lu (ミンク肺表皮細胞), HMEC (ヒト乳房表皮細胞), MCF-10A clone 1, and 2 (p21 欠損 clone: ヒト乳房表皮)

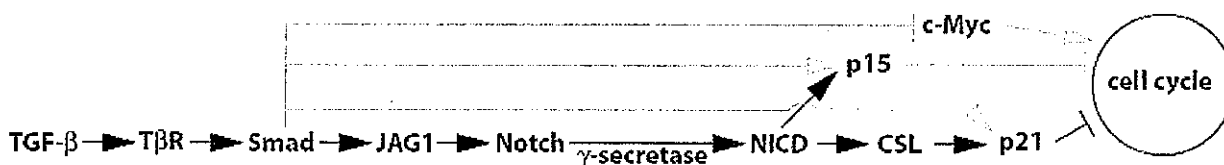
試薬; LY580276 (TGF- $\beta$  type I 受容体キナーゼ阻害薬), LY364947 (TGF- $\beta$  type I / II 受容体キナーゼ阻害薬),  $\gamma$ -secretase 阻害薬 (Calbiochem)

実験系; アデノウイルスによる一過性蛋白発現 (Adeno-GFP, NICD), siRNA (Luc, Jag1, CSL), Western Blotting (含 IP-Western), Thymidine incorporation assay ( $^3$ H-Thymidine 使用), cell counting, FACS assays (細胞周期解析), cDNA microarray 解析 (Stanford type array, t-test p-value<0.05), Semi-quantitative RT-PCR, quantitative real-time PCR (ABI-PRISM7700, triplicate で施行)

【結果】 以下、各々の実験で得られた結果を箇条書きで示す。

- ① Notch と TGF- $\beta$  は、協調的に表皮系細胞の増殖を抑制する。
- ② TGF- $\beta$  による多くの遺伝子発現調節には、Notch シグナルが必要である。
- ③ TGF- $\beta$  1 は Notch リガンドを誘発し、Notch 受容体それぞれの発現を調節する。
- ④ TGF- $\beta$  は細胞周期やアポトーシスに関わる遺伝子を標的として調節するが、その中の幾つかの遺伝子は Notch シグナル依存的に調節される。
- ⑤ TGF- $\beta$  による Jagged1 (Notch ligand) の誘発は、p21 の遺伝子発現と表皮系細胞の増殖抑制に関与する。
- ⑥ TGF- $\beta$  による p21 の遺伝子発現と表皮系細胞の増殖抑制には、CSL を介したシグナルが重要である。
- ⑦ TGF- $\beta$  受容体を介し、Smad のリン酸化に引き継ぐ TGF- $\beta$  シグナルは、 $\gamma$ -secretase 活性に一部依存しているようだ。
- ⑧ TGF- $\beta$  / Notch による表皮系細胞の増殖抑制メカニズムには、p21 が重要な役割を担っている。

#### 結果模式図



#### 【結論及び考察】

我々は、TGF- $\beta$  による表皮系細胞の増殖抑制メカニズムの一部に、少なくとも Notch シグナルが必要であることを初めて示した。すなわち、TGF- $\beta$  は早期の gene response では直接 p21 を up-regulate するが、同時に Notch ligand の Jagged1 をも up-regulate する。その結果、Jagged1 に induce された Notch シグナルが CSL を介して p21 の遺伝子発現を維持し続けるという、Notch と TGF- $\beta$  が crosstalk する新規メカニズムを解明した。本メカニズムの解明により、Notch と TGF- $\beta$  それぞれのシグナル異常がヒトの癌を引き起こす可能性が示唆され、未来の癌研究における新たな研究領域が開かれることが期待される。

(The Journal of Cell Biology IN PRESS 2007)

# 論文審査の要旨

報告番号	医論第 1443 号	氏名	仁井見 英樹
審査委員	主査	小澤 政之	
	副査	秋山 伸一	宮田 篤郎

## Notch signaling is necessary for epithelial growth arrest by TGF- $\beta$

(TGF- $\beta$  の細胞増殖抑制作用には Notch シグナルが必要である)

Transforming growth factor- $\beta$  (以下 TGF- $\beta$ ) は、細胞増殖を阻害する増殖抑制因子として知られており、特にヒトの癌の 90% に関わる表皮系細胞で Smad2, 3 を介した増殖抑制とその維持のメカニズム解明が、癌研究において重要課題となる。しかし、TGF- $\beta$  刺激後早期の増殖抑制メカニズムについては詳細に解明されていても、増殖抑制の維持に関するメカニズムについては未だ未解明である。

そこで学位申請者らは、このメカニズムに Notch シグナルが関与しているのではないかと考えた。Notch は殆どの組織の発生に関与しており、神経分化や Epithelial-Mesenchymal Transition に関する研究等、Notch と TGF- $\beta$  との crosstalk について幾つか報告されている為、表皮系細胞の増殖抑制メカニズムにおける Notch と TGF- $\beta$  との crosstalk を調べる目的で研究を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) Notch と TGF- $\beta$  は、協調的に表皮系細胞の増殖を抑制する。
- 2) TGF- $\beta$  による多くの遺伝子発現調節には、Notch シグナルが必要である。
- 3) TGF- $\beta$  1 は Notch リガンドを誘発し、Notch 受容体それぞれの発現を調節する。
- 4) TGF- $\beta$  は細胞周期やアポトーシスに関わる遺伝子を標的として調節するが、その中の幾つかの遺伝子は Notch シグナル依存的に調節される。
- 5) TGF- $\beta$  による Jagged1 (Notch ligand) の誘発は、p21 の遺伝子発現と表皮系細胞の増殖抑制に関与する。
- 6) TGF- $\beta$  による p21 の遺伝子発現と表皮系細胞の増殖抑制には、CSL (CBF1/Suppressor of Hairless/Lag1) を介したシグナルが重要である。
- 7) TGF- $\beta$  受容体を介し、Smad のリン酸化に引き継ぐ TGF- $\beta$  シグナルは、 $\gamma$ -secretase 活性に一部依存している。
- 8) TGF- $\beta$  / Notch による表皮系細胞の増殖抑制メカニズムには、p21 が重要な役割を担っている。

学位申請者らは、TGF- $\beta$  による表皮系細胞の増殖抑制メカニズムの維持に、少なくとも Notch シグナルが必要であることを初めて明らかにした。すなわち、TGF- $\beta$  は早期の gene response では Smad を介して直接 p21 を up-regulate するが、同時に Notch ligand の Jagged1 をも up-regulate する。その結果、Jagged1 に induce された Notch シグナルが CSL (CBF1 /Suppressor of Hairless/Lag1) を介して p21 の遺伝子発現を維持し続けるという、Notch と TGF- $\beta$  が crosstalk する新規メカニズムを解明した。本メカニズムの解明により、Notch と TGF- $\beta$  それぞれのシグナル異常がヒトの癌を引き起こす可能性が示唆され、未来の癌研究における新たな研究領域が開かれることが期待される。

本研究は、表皮系細胞の増殖抑制メカニズムにおける TGF- $\beta$  と Notch シグナルとの関連を検討したものであり、その結果 TGF- $\beta$  の増殖抑制の維持に Notch シグナルを介した p21 の遺伝子発現が重要であることを解明した点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1443 号	氏名	仁井見 英樹
審査委員	主査	小澤 政之	
	副査	秋山 伸一	宮田 篤郎
<p>主査および副査の3名は、平成19年3月26日、学位請求者 仁井見 英樹君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 本研究の実験系で、Jagged1 は膜結合型で発現しているか？                  (回答) 膜結合型で発現しています。</p> <p>質問2) HaCaT では、Jagged1 は自分の細胞に発現して Notch に結合するのか？                  (回答) 発生過程においては最終的に ligand を発現している細胞と、receptor を発現している細胞に分かれますが (binary cell-fate decision)、HaCaT におきましては恐らく、同じ細胞に ligand と receptor が共に発現して、互いに近隣の細胞に filopodia を伸ばして Notch シグナルを導入しているのではないかと考えます。例えば、ヒトの表皮の basal layer には、Notch1, Notch2 と、Jagged1, Delta-like1 が発現していると報告されています。</p> <p>質問3) 本研究の Notch シグナルでは、Notch1~4 のどれが主に働いているのか？                  (回答) 実験の結果では Notch1~4 の遺伝子発現は複雑な動きをしており、また、Notch1~4 の働きの違いについては未だ解明されていないのが現状ですので、どの Notch が主に働いているかを判断することは難しいと思います。そういった現状で私達が特に Notch1 に注目した理由は、Notch1 の皮膚での conditional knock out mouse の結果、皮膚に hyperplasia や basal-cell like tumor が生じたという報告から、少なくとも Notch1 には表皮細胞において増殖抑制作用があると考えたからです。</p> <p>質問4) Smad のリン酸化が <math>\gamma</math>-secretase 活性依存的であるというデータについては、実験的に解明が進んでいるのか？                  (回答) この点に関しては今迄に報告が無く、私達が初めて示したデータだと思っておりますが、このメカニズムの解明は全く別のプロジェクトだと思っておりますので、未だ手を付けておりません (解明は進んでいません)。しかし、<math>\gamma</math>-secretase inhibitor は Notch シグナルの inhibitor として広く使われていますので、警告の意味も含めて掲載いたしました。</p> <p>質問5) HaCaT では、p15 よりも p21 の方が主に増殖抑制作用に関わると考えていいのか？                  (回答) 本研究の p21 adenovirus を用いたりカバリ-実験や、p21 をノックアウトした MCF-10A clone の実験結果などにより、p21 は HaCaT での TGF-<math>\beta</math> による細胞増殖抑制作用において主要な役割を演じていると考えます。</p> <p>質問6) Thymidine 取り込み実験では細胞によって反応が違うようだが、血清除去で cell-cycle を止めているか？                  (回答) TGF-<math>\beta</math> 刺激 12 時間前に 0%FBS で starving していますが、12 時間ですので完全に cell-cycle を止めてからスタートしている訳ではありません。但し、反応の違いは Cell Line による反応差であると考えます。</p> <p>質問7) Thymidine 取り込みは、TGF-<math>\beta</math> 刺激何時間後をみているのか？                  (回答) TGF-<math>\beta</math> 刺激 56 時間後に 4 時間 (56~60 時間)、Thymidine を入れています。</p> <p>質問8) adenovirus で infection する場合、どういったタイミングで infection させるのか？                  (回答) adenovirus を infection してから GFP 蛋白が発現するまで少なくとも 8 時間~10 時間かかります。従って、adenovirus を infection して 10 時間後に TGF-<math>\beta</math> で刺激を開始しています。尚、adenovirus-NICD を infection した場合、Notch シグナルの target gene である Hes1 遺伝子が infection 10 時間後に発現することを確認しています。</p> <p>質問9) FACS Analysis はどのような Time course で解析しているのか？24 時間後をみているのか？                  (回答) 24 時間の starving 後、TGF-<math>\beta</math> 刺激し、40 時間後に解析を行いました。</p>			

質問 10) FACS Analysis は G1, S, G2 等の phase によって反応が違うということはないか? 時間をずらして施行するような工夫は行わなかったか?

(回答) FACS Analysis では時間をずらして施行するような工夫は行いませんでした。TGF- $\beta$  は p15, p21 等の G1/S, S-Cdk Inhibitor を up-regulate し、c-Myc, Cdk4 を down-regulate して G1-arrest を起こし、Notch シグナルはケラチノサイトで p21 を up-regulate して G1-arrest を起こすとされています。その他の Cell Cycle 関連遺伝子が TGF- $\beta$  や Notch で強く制御されるという報告が無いことと、Fig.1E, F の FACS の結果を考慮しますと、主に G1 phase で arrest するのではないかと考えますが、G1 check point を越えると G2 phase で止まる可能性も否定できません。

質問 11) 各種サイクリン遺伝子の発現は追っていないのか?

(回答) 各種サイクリンの発現はマイクロアレイで TGF- $\beta$  刺激後 2 時間、6 時間、48 時間後を追っています。その結果、48 時間後に CyclinD1, D2 は上昇しますが、GSI 非存在下では p15, p21 も上昇していますので、G1 arrest が引き続いていないのではないかと考えます。また、GSI 有る無しに関らず、Cyclin B2 が時間経過ごとに減少しています。このことは G2 arrest の可能性を示唆するものであり、ご指摘の点は大変興味深いポイントであると思います。Notch シグナルが無ければ、後期に G2 arrest が生じるかもしれません。

質問 12) Figure.7 において p-Smad が  $\gamma$ -secretase activity dependent であることを示す図に関して、例えば、NICD や Smad の抗体を使って免疫沈降するなどして、NICD と Smad の結合の有無を確認していないのか?

(回答) 実は何回か、NICD, Smad, 双方で免疫沈降し、endo の蛋白で互いの結合をみようとしてみましたが、結合を観察することは出来ませんでした。COS 細胞を使って、TGF- $\beta$  刺激時に NICD と Smad が結合することが既にペーパーに報告されていますが、私達は HaCaT を使用している違いからか、結合は観察されませんでした。

質問 13) NICD と Smad との結合があれば、Figure.7 のデータは説明が付くのではないか? 例えば Triton-X や NP40 以外の detergent を使ってみると、量の少ない endo の蛋白も見えるようになる可能性はないだろうか?

(回答) endo の蛋白をみるために、Luminol を high grade にしたり、gel に apply する蛋白量、wash の回数、CCD カメラの露光時間など工夫していたのですが、御指摘のような detergent に関しては検討しませんでした。従って、「結合は無い」とは言い切れません。

質問 14) GSI の感受性が Cell line によって違うようだが、GSI の濃度を振って感受性を試してみたか?

(回答) GSI の濃度はいろいろと振って試してみました。御指摘のように HaCaT では GSI は TGF- $\beta$  の細胞増殖抑制作用を完全にブロックしていますが、NMuMG では完全にブロックは出来ません。これは Cell line の違いによるものであると考えます。実際、GSI で完全にブロックできる Cell line は調べた限りでは HaCaT のみであり、NMuMG では GSI の濃度を上げてデータに示した以上の効果を得ることは出来ませんでした。

質問 15) データによると、FACS Analysis では TGF- $\beta$  で刺激しても、或いは NICD で刺激しても、G1-arrest は 100% の細胞には起こせないが、これはこの時間内には止め切れないからか、或いは一定の割合の細胞は G1-arrest せずに回ってしまうものなのか?

(回答) 今回、FACS Analysis は TGF- $\beta$  刺激 40 時間後に解析を行いました。この条件での細胞数の時間経過を S1E のデータから観ることが出来ます。データによると細胞数が増加しなくなる時間は TGF- $\beta$  刺激 60 時間後であり、40 時間の時点では増え続けています。従って、100%に近い G1-arrest を得るには、少なくとも 60 時間待つ必要があったと思います。Thymidine 取り込み実験が TGF- $\beta$  刺激後 56~60 時間の間に取り込ませている為、比較対照する目的では FACS Analysis も 60 時間にすべきでした。尚、TGF- $\beta$  の濃度は生理的な濃度に近い値、2ng/ml としていますが、TGF- $\beta$  の濃度を上げるとより早期に 100%近い G1-arrest が得られるのではないかと思います。NICD による G1-arrest に関しましては、adenovirus による感染率が 100%ではないという理由で、100%近い G1-arrest の達成が難しいのではないかと考えます。

質問 16) Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) と Cell Cycle arrest との関係はどのように考えるか? HaCaT では、TGF- $\beta$  による細胞増殖抑制作用に反応し続けるからこそ、EMT が起こらないのではないか?

(回答) 先ず Carcinoma が TGF- $\beta$  の細胞増殖抑制作用に反応しなくなり、それから EMT が生じるという順序を考えると、Cell cycle arrest と EMT には直接の関係が在るのかも知れません。EMT が mammary epithelial cell line では報告されていても、HaCaT の様なケラチノサイトでは報告されていないこと、また mammary epithelial cell での EMT には、Smad3 を介した HEY1 の発現と、Notch シグナルを介した HEY1 の発現が必要であると報告されていることを考え合わせると、御指摘のように HaCaT では TGF- $\beta$  と Notch で cell cycle arrest が生じるが為に、EMT が生じないのかも知れません。とても興味深い御指摘であると思います。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。