

## 論 文 要 旨

**Smurf2 Induces Ubiquitin-dependent Degradation of Smurf1 to Prevent Migration of Breast Cancer Cells**

Smurf2 は Smurf1 タンパクをユビキチン依存性に  
分解することで乳癌細胞の遊走を抑制している

福 永 絵 里 奈

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

Smad ubiquitin regulatory factor 1 (以下 Smurf1) と Smurf2 は E3 ユビキチンリガーゼであり、transforming growth factor- $\beta$  (以下 TGF- $\beta$ ) や BMP のレセプター、Smadなどを分解して TGF- $\beta$  シグナルを制御している。これまでに Smurf1 は RhoA をユビキチン化、分解することで細胞運動を制御し、癌の進行に関与することが報告されている。しかしながら、癌の進展における Smurf1 と Smurf2 の機能的差異は明らかになっていない。そこで今回我々は、乳癌細胞を用いて癌の進行における両者の機能的差異を解明した。

【材料および方法】

ヒト乳癌細胞 MDA-MB-231 を用いて Smurf1 ノックダウン細胞、Smurf2 ノックダウン細胞、および Smurf1/2 ノックダウン細胞を作成した。Cell migration assay、PCR、細胞増殖実験、マウスへの細胞移植実験などを行い *in vitro*、*in vivo* において Smurf1 および Smurf2 の細胞遊走への関与を比較検討した。また、免疫沈降実験を行い Smurf1 と Smurf2 の相互作用についても検討を行った。

【結 果】

まず MDA-MB-231 細胞で miRNA を用いて Smurf1 ノックダウン細胞、Smurf2 ノックダウン細胞を樹立した。PCR 法で Smurf1 および Smurf2 の発現をみたところ、いずれも約 70% 程度減少していることが確認された。これらの細胞を用いて TGF- $\beta$  の target gene である Smad7、PAI-1 の発現を調べたところ、TGF- $\beta$  刺激下で Smurf1 ノックダウン細胞では Smad7、PAI-1 の発現が増加しており、Smurf1 が TGF- $\beta$  シグナルを抑制していることが改めて確認できた。次に Smurf1、Smurf2 のそれぞれのノックダウン細胞を用いて cell migration assay を行ったところ、Smurf1 ノックダウン細胞では細胞遊走が減少し、一方 Smurf2 ノックダウン細胞では細胞遊走が増加していた。このことより乳癌細胞の遊走、浸潤において Smurf1 と Smurf2 は全く逆の作用を有することが考えられた。尚、同細胞を用いて細胞増殖実験を行ったが、細胞増殖能に関してはいずれも影響を与えていなか

った。さらにマウスを用いて Smurf1 ノックダウン細胞および Smurf2 ノックダウン細胞の移植実験を行ったところ、Smurf2 をノックダウンすることにより MDA-MB-231 細胞の骨転移は亢進し、乳癌細胞の骨転移を Smurf2 が抑制する可能性があることが示唆された。そこで Smurf2 のノックダウンにより Smurf1 の発現や機能に影響があるか調べるためにタンパクレベルで検討したところ、Smurf2 ノックダウン細胞では Smurf1 タンパクが増加していることがわかった。このことにより Smurf2 が Smurf1 タンパクを分解するのではないかと考え Smurf1 と Smurf2 の相互作用について調べたところ、Smurf1 と Smurf2 は endogenous に結合することが明らかになった。さらに Smurf2 は Smurf1 タンパクのユビキチン化及び分解を誘導し、Smurf2 はそのリガーゼ活性依存的に Smurf1 の分解を誘導することがわかった。

#### 【結論及び考察】

今回我々は同じファミリー分子である Smurf1 と Smurf2 が乳癌細胞の cell migration において全く逆の役割を果たすことを初めて明らかにした。そのメカニズムとしてタンパクレベルにおいて Smurf2 が Smurf1 と結合しさらに Smurf1 のユビキチン化、分解を誘導するということがわかった。E3 ユビキチンリガーゼのシグナル制御や生物学的機能はとても複雑であるが、癌に対するその作用を理解することで癌治療における biomarker や薬の開発に役立つ可能性があるかと思われる。

(The Journal of Biological Chemistry, Vol. 283, No. 51 2008 年 掲載)

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第102号		学位申請者	福永 絵里奈
審査委員	主査	夏越 祥次	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	丸山 征郎	副査	秋山 伸一
	副査	橋口 照人	副査	古川 龍彦

### Smurf2 Induces Ubiquitin-dependent Degradation of Smurf1 to Prevent Migration of Breast Cancer Cells

(Smurf2 は Smurf1 タンパクをユビキチン依存性に分解することで乳癌細胞の遊走を抑制している)

TGF- $\beta$ シグナルは上皮系細胞の発癌初期には増殖抑制にはたらく一方で、進行癌の浸潤・転移を促進する二面性を有する。ユビキチン・リガーゼである Smad ubiquitin regulatory factor1(Smurf1)とそのファミリー分子 Smurf2 は特異型 Smad とI型レセプターの分解誘導により TGF- $\beta$ シグナルを抑制するが、Smurf1 については別に RhoA を標的として細胞遊走を促進することが報告されている。TGF- $\beta$ シグナルの重要な制御因子であるにも関わらず、Smurf1/2 の発癌や浸潤、遠隔転移における役割は殆ど明らかになっていない。今回申請者は、乳癌細胞株の *in vitro* 運動と *in vivo* 骨転移における Smurf1/2 の役割と、両者の機能的差異について検討した。その結果、本研究では以下の知見が明らかにされた。

- ① ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 において、Smurf1 の knock down (KD) は TGF- $\beta$ シグナルを増強するが、Smurf2 の KD では増強も減弱もしなかった。
- ② Smurf1、Smurf2 のいずれの KD も MDA-MB-231 細胞の増殖に影響を与えなかった。
- ③ Smurf1 を KD すると細胞遊走が期待通り抑制されたが、Smurf2 の KD は予想に反して細胞遊走を促進した。この Smurf2 の KD 効果は Smurf1 を併せて KD するとキャンセルされた事から、内因性 Smurf2 の細胞遊走抑制作用は内因性 Smurf1 蛋白の作用を介すると示唆された。
- ④ Smurf1 が Smurf2 の基質である可能性を検証するため、まず免疫沈降実験にて Smurf2 と Smurf1 の複合体形成を見出した。さらにリガーゼ活性欠失変異体 Smurf2 を用いて co-transfection 実験を行うと、Smurf2 がユビキチン・リガーゼ依存的に Smurf1 をユビキチン化し、分解に導く事がわかった。
- ⑤ Smurf1 を KD した MDA-MB-231 細胞をヌードマウスに心注すると、骨転移巣数に変化は無かったが、Smurf2 を KD した細胞の心注実験では骨転移巣数が有意に増加した。

以上の結果により Smurf2 は、その役割の少なくとも一部分では、Smurf1 を分解誘導する事で MDA-MB-231 細胞の遊走を抑制すると結論された。一方で、Smurf1 の KD が *in vivo* 骨転移巣形成には影響を与えない反面、Smurf2 の KD はそれを抑制する現象は”Smurf1 分解”単独では説明出来ず、ここには細胞遊走以外に転移先でのそれぞれの TGF- $\beta$ シグナル制御能の違い(上記①)が反映されていると考察された。

本研究で申請者は、Smurf1 と Smurf2 の乳癌細胞の遊走と骨転移における役割の相違と、その分子メカニズムの一端を明らかにした。今後他の細胞株や臨床サンプルを用いたさらに詳細な分子レベルの解析を進める事により Smurf1/2 は有望な抗癌治療分子標的として現実的な視野に入って来るものと期待される。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。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第102号		学位申請者	福永 絵里奈
審査委員	主査	夏越 祥次	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	丸山 征郎	副査	秋山 伸一
	副査	橋口 照人	副査	古川 龍彦

主査および副査の5名は、平成22年2月19日、学位申請者 福永絵里奈 君に面接し、学位申請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。

質問1) Smurf2を分解するシステムは分かっているか。Smurf2がSmurf1/2にユビキチン化されない理由はどのように考えられるか。

(回答) Smurf2を分解するシステムについての報告はない。Smurf1だけがユビキチン化されてSmurf2がユビキチン化されないのは、両者の構造上の違い等からユビキチン・リガーゼが異なると予想するが、データは無い。

質問2) Smurf1/2はいずれもTGF-βシグナルを抑制するがSmurf1/2が増えると癌化を抑制すると考えてよいのか。

(回答) 正常細胞からの“癌化”をみる実験は行っていないが、癌化した細胞の挙動におけるSmurf1/2の役割については、まずTGF-βが癌細胞の増殖抑制因子という観点からSmurf1/2は細胞増殖促進に働きそうだが、これらのノックダウンは全く増殖に影響しなかった。次にTGF-βシグナルが促進する癌の浸潤・転移等の“悪性度”に関しては、本研究からSmurf1は細胞運動を亢進する事が再確認された。局所浸潤に関しては促進的と予想されるが、遠隔転移については重要な役割はないと推察される。一方、Smurf2は細胞運動と骨転移巣数の両者を抑制させたので、TGF-βと拮抗する役割が示唆される。

質問3) 悪性腫瘍でのSmurf1/2の発現亢進はみられるのか。

(回答) 乳癌細胞以外にも大腸癌や肝臓癌など他臓器の悪性腫瘍においてSmurf1/2の発現はみられるが、乳癌細胞で高い発現が認められている。

質問4) MDA-MB-231以外の乳癌細胞で実験を行ったか。

(回答) MCF7を用いてSmurf1/2をノックダウンしたが、migrationへの効果はみられず、またTGF-βシグナルへの影響もみられなかった。MCF-7における内因性Smurf1/2の役割は大きくないと考えられる。

質問5) 今回の結果は他の臓器の癌細胞にも普遍化できるものか。

(回答) 今回は実験していないので普遍化できるのかは分からない。しかし、他の臓器の癌細胞にもSmurf1/2の発現は認められ、TGF-βシグナルも動いているので十分にその可能性はあり、検討が必要と思われる。

質問6) 本ヌードマウス骨転移モデルの結果は、癌細胞転移過程のどのステップでのcell migrationをみている事になるのか。

(回答) 本モデルは左心室動脈系に癌細胞を直接注入しているので、血管からのextravasationと転移先での浸潤の両者、またはいずれかにおける細胞運動をみていると考えられる。

## 最終試験の結果の要旨

質問7) TGF- $\beta$ 、RhoA 等複数のシグナルに対して Smurf が作用する際、その作用点を決定づける因子または機構が存在するのか。低酸素との関係などはあるのか。

(回答) Smurf のリガーゼとしての機能からその基質蛋白との複合体形成が必要とすると、少なくとも作用機構の一つは基質蛋白の細胞内局在、すなわちシグナル伝達や細胞骨格変化に伴う蛋白移動は重要と予想されるが知見は無い。また、酸素条件との関係については今回は検討しなかったが、Smurf の関与の検討も今後重要であると思われる。

質問8) なぜ心注実験を行ったのか。他の部位からの移植は行わなかったのか。

(回答) 心注以外に尾静脈や脛骨への髄注などの方法もあるが、それぞれ一長一短があり、その中で心注は骨転移の再現性に優れているので採用した。

質問9) MDA-MB-231 細胞は TGF- $\beta$ シグナルに対し正常に応答する細胞であるのか。細胞増殖は抑えられるのか。

(回答) MDA-MB-231 細胞は TGF- $\beta$ で刺激することにより細胞増殖が抑制されることが分かっている。R-Smad のリン酸化も正常に起こり、Smad7 や PAI-1 等の direct target gene も誘導されるので、TGF- $\beta$ シグナルに対し正常に応答する細胞と考えている。

質問10) 骨転移を評価する際、病理組織像との相関性はみられたか。また、骨転移数の計測はどのように行ったか。

(回答) 本研究グループにおいて、骨転移巣 tumor burden の軟線 X 線像と病理切片像のある程度の相関を確認しているが、今回の研究材料では行っていない。また骨転移数は、軟線 X 線像で明らかな骨破壊を生じている骨透亮像から計測した。

質問11) Smurf が癌転移の migration に関与する際の Smad4 の役割についてはどう考えるか。

(回答) 今回の実験では Smad4 について評価していない。Smad4 は TGF- $\beta$ シグナル伝達における必須の co-Smad であり良い抗体もあるので、今後検討したい。

質問12) MDA-MB-231 細胞はエストロゲンを発現しているか。またエストロゲンのシグナルとの関係はどう考えるか。

(回答) MDA-MB-231 細胞はエストロゲンを発現している。エストロゲンは TGF- $\beta$ シグナルとのクロス・トークも知られており、癌化に重要なホルモンであるが、Smurf との関係は明らかではない。エストロゲン・レセプターとの複合体形成の検討や、charcoal stripped medium 等を用いた評価も興味のあるところだが、今回の目的の範囲ではなく、今後の検討課題としたい。

質問13) TGF- $\beta$ シグナルと Epithelial-Mesenchymal Transition(EMT)で分かっていることは何か。また Smurf と EMT との関連はあるのか。

(回答) TGF- $\beta$ は SNAIL や Cadherin などの細胞接着分子などの誘導を介して EMT を促進することがわかっているが、Smurf と EMT との関連は、最近 Smurf2 が migration や EMT を促進するという報告がある以外に少ない。本研究では上皮系/間葉系マーカーを観察していないので、今後の課題である。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・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。