

201118028A

厚生労働省科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

脳腫瘍における 幹細胞性維持機構の遮断と その臨床応用

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

宮園 浩平

平成24(2012)年5月

目 次

I. 総括研究報告		
脳腫瘍における幹細胞性維持機構の遮断とその臨床応用-----		1
宮園 浩平		
II. 分担研究報告		
1. 脳腫瘍における幹細胞性維持機構の遮断とその臨床応用-研究の総括----		4
宮園 浩平		
2. 脳腫瘍幹細胞のゲノム解析 -----		7
鯉沼 代造		
3. 脳腫瘍幹細胞維持機構の遮断の in vivo効果 -----		10
藤堂 具紀		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----		13
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----		14

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書
「脳腫瘍における幹細胞性維持機構の遮断とその臨床応用」

研究代表者： 宮園 浩平 東京大学大学院・医学系研究科・教授

研究要旨：我々はこれまで TGF- β が脳腫瘍幹細胞に作用して転写因子 Sox4、その下流の Sox2 を介して脳腫瘍幹細胞の未分化性を維持していることを明らかにした。本研究では脳腫瘍幹細胞において、TGF- β -Sox4-Sox2 経路がどのような標的遺伝子を活性化するか、それらの遺伝子は脳腫瘍幹細胞の未分化性維持にどのように関わっているか、さらにこれらの遺伝子群はヒト脳腫瘍においてどのように発現しているかを中心に研究を進めた。

平成 22 年度に引き続き、我々は転写因子 Oct4 に注目し、ヒト脳腫瘍患者から得た脳腫瘍幹細胞で Oct4 の発現を低下させたところ、分化の促進が見られた。また脳腫瘍幹細胞を Oct4 siRNA で処理すると、コントロールに比べて抗がん剤投与により有意に細胞数の減少が見られ、抗がん剤に対する感受性が亢進したと考えられた。脳腫瘍幹細胞は培養中に継代を重ねると未分化性を次第に失うことから、我々は Oct4/Sox2 enhancer の活性化を指標に培養脳腫瘍幹細胞の未分化性を検出する系を立ち上げることを試みた。これらの脳腫瘍幹細胞をマウス頭蓋内に移植したところ、マウスを屠殺することなく、腫瘍の形成・増大を検出することができた。また、未分化性を維持していると考えられる脳腫瘍細胞は血管周辺に局在する傾向があることを免疫組織染色で確認した。我々はさらに TGF- β ファミリーの脳腫瘍幹細胞に対する作用の研究を進め、BMP-4 は脳腫瘍幹細胞に作用し、分化促進作用を持つことを確認した。一方、TGF- β 阻害剤と BMP-4 を併用しても協調作用は明らかではなく、BMP-4 と TGF- β は異なる下流シグナル経路や転写因子を介して脳腫瘍幹細胞の分化を制御していると考えられた。

研究分担者氏名

鯉沼 代造

（東京大学大学院・医学系研究科・講師）

藤堂 具紀

（東京大学医学部附属病院・特任教授）

A. 研究目的

脳腫瘍の中でも最も悪性度の高い膠芽腫では、TGF- β ががんの進行に密接な役割を果たしていることが近年示唆されている。実際に、TGF- β 2 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドや TGF- β 受容体の阻害剤の臨床試験が国外では開始されており、TGF- β シグナルの抑制が膠芽腫の治療に有効であることが報告されている。

我々はこれまで TGF- β が脳腫瘍幹細胞に作用して脳腫瘍幹細胞の未分化性を維持していることを明らかにした(Ikushima et al. 2009)。また TGF- β 受容体阻害剤が脳腫瘍幹細胞の分化を促進することを見出した。さらに、脳腫瘍幹細胞において TGF- β が Smad シグナル経路を活性化すると、転写因子 Sox4、その下流の Sox2 を介して未分化性を維持していることを明らかにした。しかし、脳腫瘍幹細胞に対する TGF- β 阻害剤の効果は症例によって差があることから、TGF- β が脳腫瘍幹細胞において Sox4-Sox2 経路を介してどのような下流シグナル分子を活性化

するかを明らかにすることは個々の脳腫瘍症例に最適な治療法を決定する上で極めて重要と考えられる。

本研究では、① Smad が Sox4-Sox2 経路を介して他の転写因子とともにどのような標的遺伝子を活性化するか、②それらの遺伝子は脳腫瘍幹細胞の未分化性維持にどのように関わっているかを in vitro, in vivo の両面から明らかにする、③さらにこれらの遺伝子群の脳腫瘍における発現、とくに血管組織などのニッチェとの関わりを含めて免疫組織染色などで確認することを中心に研究を進めている。平成 23 年度は平成 22 年度に引き続き Sox ファミリーの転写因子と会合する転写因子 Oct4 について研究を進めた。また脳腫瘍幹細胞を標識してマウス頭蓋内に移植し、組織学的に検討を行った。さらに、TGF- β ファミリーの因子ですでに脳腫瘍幹細胞の分化を促進することが知られている BMP-4 について、他の因子と比較しながら、TGF- β の作用との関連を検討した。

B. 研究方法

ヒト脳腫瘍幹細胞は東京大学医学部倫理委員会の承認を得て採取したものをを用いた。培養は無血清で EGF と bFGF の存在下で行った。

幹細胞マーカーの発現、sphere 形成能の測定、

RNAiによる遺伝子ノックダウン、イムノブロットイング、定量的 RT-PCR、ルシフェラーゼアッセイ、ヌードマウス頭蓋骨内への同所移植はすでに報告した手法 (Ikushima et al. 2009)により行った。クロマチン免疫沈降法はすでに報告されている方法を用いて行った (Ikushima et al. 2009; Koinuma et al. 2009)。Lentiviral vector による細胞の発現は既報の通り行った (Nagano et al. 2010)。

(倫理面への配慮)

1) この研究で行なう予定の遺伝子組み換え実験は平成 20 年 10 月 21 日の東京大学医学部組織 DNA 実験安全委員会において承認を受けており、適切な拡散防止措置がとられている。

2) 動物を用いた実験は、動物実験の講習を修了し、十分な知識と経験を有するものだけに従事させ、東京大学医学部の定める規則に従って行った。

3) 本研究で用いる臨床検体は東京大学医学部倫理委員会の承認を得て、被験者に対するインフォームド・コンセントを書面で行っている。

4) ヒトの遺伝子解析を行う研究は本研究計画には予定されていない。ヒト ES 細胞を用いた研究は本研究計画には予定されていない。

C. 研究結果

1) 転写因子 Oct4 と Sox4-Sox2 経路の協調作用

我々は膠芽腫幹細胞において TGF- β シグナルの下流で作用する因子として転写因子 Sox4 と Sox2 の重要性をこれまで明らかにして来た。我々は平成 22 年度に引き続き Sox4 に会合して TGF- β シグナルを制御する因子として転写因子 Oct4 に注目して研究を行った。Sox4, Sox2 が TGF- β シグナルによってその発現が上昇するのに対して、Oct4 の発現は TGF- β シグナルによって変動しない。しかし、Oct4 は Sox4 と結合して Sox2 のエンハンサー領域に結合して Sox2 の発現を制御し、膠芽腫幹細胞の未分化性の維持に重要な役割を果たしていることを見出した。実際に、Oct4 の発現が低下すると膠芽腫幹細胞の未分化性は喪失し、動物実験モデルで脳腫瘍形成能が低下すること、抗がん剤 temozolomide (TMZ) への感受性が上昇することを明らかにした。また極めて興味深いことに Sox2 の発現調節は膠芽腫幹細胞では Sox4-Oct4 複合体が重要な役割を果たしているのに対し、正常脳幹細胞では Sox2-Oct4 が重要であることから、腫瘍と正常組織での Sox2 の発現機構が異なっている可能性が示唆された。これらの成果を平成 23 年度に Journal of Biological Chemistry 誌に原著論文として発表した。

我々は Oct4 の抗体で腫瘍組織の染色を行ったが適切な抗体がなく、組織染色で Oct4 陽性の脳

腫瘍細胞を in vivo で確認することはできず、他の TGF- β -Sox4-Sox2 経路の標的遺伝子の検索が必要と考えられた。

2) 脳腫瘍幹細胞を用いた in vivo イメージングシステムの確立

本研究では TGF- β -Sox4-Sox2 経路の新規標的遺伝子の探索のために ChIP-sequencing を行う予定で研究を進めた。しかし ChIP-sequencing を行うためには比較的大量の脳腫瘍幹細胞を準備することが必要であるが、脳腫瘍幹細胞は培養中に spontaneous に分化してしまうことが実験を行う過程で明らかとなった。我々は EOS lentiviral vector を用いて Oct4/Sox2 enhancer の活性化を指標に培養脳腫瘍幹細胞の未分化性を検出する系を立ち上げることを試みた。その結果、TGS-01 細胞において Oct4/Sox2 を発現する細胞を検出することが可能となり、さらに検討を進めている。さらに網羅的な標的遺伝子同定のため、幹細胞という限られた量のサンプルからの RNA sequencing の方法を確立し、研究を進めている。その結果 1 ng の total RNA からある程度の定量性を維持した遺伝子発現解析が可能であることを確認した。

また EOS-Luc 発現脳腫瘍幹細胞を用いて、in vivo で脳腫瘍幹細胞を免疫不全マウスの頭蓋内に同所移植したさいにマウスを屠殺することなく、腫瘍の形成・増大を検出する実験系の確立を進めている。興味深いことに、EOS-Luc 発現脳腫瘍幹細胞を同所移植し、得られた腫瘍組織を観察したところ、未分化性を維持していると考えられる脳腫瘍細胞は血管の周辺 (perivascular niche) に局在する傾向があることを免疫組織染色で確認した。一方で、最近国外の他のグループ (Ricci-Vitiani et al. 2010; Wang et al. 2010) から報告されている脳腫瘍幹細胞が血管前駆細胞へ分化するという所見を積極的に支持する結果は、この実験系では確認できなかった。

3) BMP-4 の脳腫瘍幹細胞に対する作用

これまで我々は TGF- β の脳腫瘍幹細胞を中心に研究を進めて来たが、TGF- β ファミリーの他の因子の作用についても検討を行った。その結果、既報 (Piccirillo et al. 2006) のとおり、BMP-4 は EOS-Luc 発現脳腫瘍幹細胞に作用し、CD133 や Olig2 の発現を低下させ、分化促進作用を持つことが明らかとなった。一方、TGF- β 阻害剤と BMP-4 を併用しても協調作用は明らかではなく、BMP-4 と TGF- β は異なる下流シグナル経路や転写因子を介して脳腫瘍幹細胞の分化を制御していると考えられた。

D&E. 考察及び結論

本研究は、近い将来、我が国で開始されることが期待される TGF- β 阻害剤の膠芽腫に対する効果との関連性を明らかにするための基礎的知見を得ることを目的としており、極めて必要性の高い研究である。また TGF- β シグナルの下流で Sox4-Sox2 経路が重要であることは我々が世界に先駆けて明らかにしたものであり、さらに本研究課題の成果として我々は Oct4 の重要性をも明らかにしたことから独創性の高い研究である。

平成 23 年度は脳腫瘍幹細胞を用いた in vivo イメージングシステムの確立、網羅的な遺伝子発現解析や TGF- β シグナルと BMP シグナルとの関係について研究を進めた。本研究の成果が明らかとなれば将来、TGF- β 阻害剤を臨床応用するさいに治療が有効な症例を予測する上で重要となることが期待される。

とくに本年度開始した EOS-Luc 発現脳腫瘍幹細胞を用いた in vivo イメージングシステムは今後の研究の発展のために極めて意義深いと思われる。がん幹細胞は培養中に spontaneous に分化してしまうことから、がん幹細胞の未分化性を維持した状態で研究を行うことが重要である。本システムの導入により、脳腫瘍幹細胞を適切な条件下で培養し実験を行うことが可能となると思われる。また in vivo イメージングを導入することで、これまで屠殺しないと腫瘍の進展を明らかにできなかったのが、マウスが生きてままで腫瘍の増大を追跡することが可能となった。さらに腫瘍組織の解析においては Luciferase 抗体を用いて未分化な脳腫瘍細胞の局在を明らかにすることが可能と思われ、今後は脳腫瘍細胞の分化と腫瘍組織内における局在との関連についても研究を進めることができると期待される。平成 24 年度に向けて TGF- β シグナルや BMP-4 シグナルの標的遺伝子を網羅的に解析しその機能を明らかにする予定であるが、EOS-Luc 発現脳腫瘍幹細胞はその分子レベルでの役割を解明する上でも重要なツールとなると期待される。

膠芽腫は極めて予後の悪いがんの一つで、1 年以内に 50% の患者が死亡し、5 年生存率は約 3% である。膠芽腫に対しては手術以外にも抗がん剤や γ ナイフなどの放射線療法が行われているが、治療効果の劇的な改善は望めないのが現状である。TGF- β 2 のアンチセンスオリゴヌクレオチドはドイツなど国外で第 3 相試験が開始されているが、その臨床効果が期待されている。一方で本研究により TGF- β を標的とした治療と脳腫瘍幹細胞との関連が明らかになり、TGF- β 阻害剤が有効な症例を予測することができれば、厚生労働行政の面でも極めて重要であると期待される。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizutani A, Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Morikawa M, Suzuki HI, Imamura T, Miyazono K, Aburatani H. (2011) Cell type-specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 proteins and hepatocyte nuclear factor 4alpha in HepG2 cells. **J Biol Chem.** 286 (34): 29848-29860.
- 2) Watanabe A, Ogiwara H, Ehata S, Mukasa A, Ishikawa S, Maeda D, Ueki K, Ino Y, Todo T, Yamada Y, Fukayama M, Saito N, Miyazono K, Aburatani H. (2011) Homozygously deleted gene DACH1 regulates tumor-initiating activity of glioma cells. **Proc Natl Acad Sci USA.** 108 (30): 12384-12389.
- 3) Morikawa M, Koinuma D, Tsutsumi S, Vasilaki E, Kanki Y, Heldin CH, Aburatani H, Miyazono K. (2011) ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif. **Nucleic Acids Res.** 39 (20): 8712-8727.
- 4) Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Saito N, Miyazawa K, Miyazono K. (2011) Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. **J Biol Chem.** 286 (48): 41434-41441.
- 5) Ikushima H, and Miyazono K. (2012) TGF- β signal transduction spreading to a wider field: A broad variety of mechanisms for context-dependent effects of TGF- β . **Cell Tissue Res.** 347 (1): 37-49.
- 6) Miyazono K, Ehata S, Koinuma D (2012) Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer. **Ups J Med Sci.** 117 (2): 143-152.
- 7) Morikawa M, Koinuma D, Miyazono K, and Heldin, C-H. (2012) Genome-wide mechanisms of Smad binding. **Oncogene** in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

「脳腫瘍における幹細胞性維持機構の遮断とその臨床応用— 研究の総括」

研究代表者： 宮園 浩平 東京大学大学院・医学系研究科・教授

研究要旨:我々はこれまで TGF- β が脳腫瘍幹細胞に作用して転写因子 Sox4、その下流の Sox2 を介して脳腫瘍幹細胞の未分化性を維持していることを明らかにした。本研究では脳腫瘍幹細胞において、TGF- β -Sox4-Sox2 経路がどのような標的遺伝子を活性化するか、それらの遺伝子は脳腫瘍幹細胞の未分化性維持にどのように関わっているか、さらにこれらの遺伝子群はヒト脳腫瘍においてどのように発現しているかを中心に研究を進めた。

我々は平成 22 年度に引き続き転写因子 Oct4 に注目し、ヒト脳腫瘍患者から得た脳腫瘍幹細胞を Oct4 に対する siRNA で処理したところ、sphere 形成能が著しく抑制されることを確認した。さらに我々は分子メカニズムの解明を行い、正常の神経幹細胞と脳腫瘍幹細胞の相違を明らかにした。我々はさらに TGF- β ファミリーの脳腫瘍幹細胞に対する作用の研究を進め、種々の BMP やその阻害剤を中心にその作用を検討した。その結果、BMP-4 は脳腫瘍幹細胞に作用し、分化促進作用を持つことが明らかとなった。一方、TGF- β 阻害剤と BMP-4 を併用しても協調作用は明らかではなく、BMP-4 と TGF- β は異なる下流シグナル経路や転写因子を介して脳腫瘍幹細胞の分化を制御していると考えられた。

A. 研究目的

脳腫瘍の中でも最も悪性度の高い膠芽腫では、TGF- β ががんの進行に密接な役割を果たしていることが近年示唆されている。実際に、TGF- β 2 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの TGF- β 阻害剤の臨床試験が国外では開始されており、TGF- β シグナルの抑制が膠芽腫の治療に有効であることが報告されている。

我々はこれまで TGF- β が脳腫瘍幹細胞に作用して脳腫瘍幹細胞の未分化性を維持していることを明らかにした(Ikushima et al. 2009)。また TGF- β 受容体阻害剤が脳腫瘍幹細胞の神経細胞様細胞や星細胞への分化を促進することを見出した。さらに、脳腫瘍幹細胞において TGF- β が Smad シグナル経路を活性化すると、転写因子 Sox4、その下流の Sox2 を介して未分化性を維持していることを明らかにした。しかし、脳腫瘍幹細胞に対する TGF- β 阻害剤の効果は症例によって差があることから、TGF- β が脳腫瘍幹細胞において Sox4-Sox2 経路を介してどのような下流シグナル分子を活性化するかを明らかにすることは個々の脳腫瘍症例に最適な治療法を決定する上で極めて重要と考えられる。

本研究では脳腫瘍幹細胞において、TGF- β -Sox4-Sox2 経路がどのような標的遺伝子を活性化するか、それらの遺伝子は脳腫瘍幹細胞の未分化性維持にどのように関わっているか、さらにこれらの遺伝子群はヒト脳腫瘍においてどのように発現しているかを中心に研究を進めている。平成 23 年度は平成 22 年度に引き続き Sox ファミリーの転写因子と会合する転写因子

Oct4 について研究を進めた。また、TGF- β ファミリーの因子ですでに脳腫瘍幹細胞の分化を促進することが知られている BMP-4 について、他の因子と比較しながら、TGF- β の作用との関連を含めて検討した。

B. 研究方法

ヒト脳腫瘍幹細胞は東京大学医学部倫理委員会の承認を得て採取したものをを用いた。培養は無血清で EGF と bFGF の存在下で行った。

幹細胞マーカーの発現、sphere 形成能の測定、RNAi による遺伝子ノックダウン、イムノブロットティング、定量的 RT-PCR、ルシフェラーゼアッセイはすでに報告した手法 (Ikushima et al. 2009)により行った。クロマチン免疫沈降法はすでに報告されている方法を用いて行った (Ikushima et al. 2009; Koinuma et al. 2009)。

(倫理面への配慮)

1) この研究で行なう予定の遺伝子組み換え実験は平成 20 年 10 月 21 日の東京大学医学部組換え DNA 実験安全委員会において承認を受けており、適切な拡散防止措置がとられている。

2) 動物を用いた実験は、動物実験の講習を修了し、十分な知識と経験を有するものだけに従事させ、東京大学医学部の定める規則に従って行った。

3) 本研究で用いる臨床検体は東京大学医学部倫理委員会の承認を得て、被験者に対するインフォームド・コンセントを書面で行っている。

4) ヒトの遺伝子解析を行う研究は本研究計

画には予定されていない。ヒト ES 細胞を用いた研究は本研究計画には予定されていない。

C. 研究結果

1) 転写因子 Oct4 と Sox4-Sox2 経路の協調作用

我々は膠芽腫幹細胞において TGF- β シグナルの下流で作用する因子として転写因子 Sox4 と Sox2 の重要性をこれまで明らかにして来た。我々は平成 22 年度に引き続き Sox4 に会合して TGF- β シグナルを制御する因子として転写因子 Oct4 に注目して研究を行った。Sox4, Sox2 が TGF- β シグナルによってその発現が上昇するのに対して、Oct4 の発現は TGF- β シグナルによって変動しない。しかし、Oct4 は Sox4 と結合して Sox2 のエンハンサー領域に結合して Sox2 の発現を制御し、膠芽腫幹細胞の未分化性の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。実際に、Oct4 の発現が低下すると膠芽腫幹細胞の未分化性は喪失し、動物実験モデルで脳腫瘍形成能が低下すること、抗がん剤 temozolomide (TMZ) への感受性が上昇することを明らかにした。また Sox2 の発現調節は膠芽腫幹細胞では Sox4-Oct4 複合体が重要な役割を果たしているのに対し、正常脳幹細胞では Sox2-Oct4 が重要であることから、腫瘍と正常組織での Sox2 の発現機構が異なっている可能性が示唆された。これらの成果を平成 23 年度に Journal of Biological Chemistry 誌に原著論文として発表した。

我々は Oct4 の抗体で腫瘍組織の染色を行ったが適切な抗体がなく、Oct4 の組織染色で脳腫瘍幹細胞を in vivo で確認することはできず、他の TGF- β -Sox4-Sox2 経路の標的遺伝子の検索が今後必要と考えられた。

2) BMP-4 の脳腫瘍幹細胞に対する作用

これまで我々は TGF- β の脳腫瘍幹細胞を中心に研究を進めて来たが、TGF- β ファミリーの他の因子の作用についても検討を行った。その結果、既報 (Piccirillo et al. 2006) のとおり、BMP-4 は EOS-Luc 発現脳腫瘍幹細胞に作用し、CD133 や Olig2 の発現を低下させ、分化促進作用を持つことが明らかとなった。BMP ファミリーの因子は BMP-2/4, BMP-6/7, BMP-9/10 が 4 つの BMP の I 型受容体のうちそれぞれ ALK-3, ALK-2, ALK-1 に高い親和性で結合することから、細胞によって BMP のアイソフォームに対する反応性が異なることが予想された。BMP の標的因子である Id1 の発現で確認したところ、脳腫瘍幹細胞 TGS-01 では BMP-4 は効率よく Id1 の発現を誘導するのに対し、BMP-6 や BMP-7 の Id1 誘導作用は顕著ではなかった。また BMP-9 は BMP-6 や BMP-7 よりは強力であったが、BMP-4 には劣ることが明らかとなった。CD133 や Olig2

の発現抑制も BMP-4 で効率よく観察された。このことから脳腫瘍幹細胞は BMP の I 型受容体 ALK-3 を介して分化誘導を促進している可能性が考えられた。

一方、TGF- β 阻害剤と BMP-4 を併用しても協調作用は明らかではなく、BMP-4 と TGF- β は異なる下流シグナル経路や転写因子を介して脳腫瘍幹細胞の分化を制御していると考えられた。

D&E. 考察及び結論

本研究は、近い将来、我が国で開始されることが期待される TGF- β 阻害剤の膠芽腫に対する効果との関連性を明らかにするための基礎的知見を得ることを目的としており、極めて必要性の高い研究であると考えられる。また TGF- β シグナルの下流で Sox4-Sox2 経路が重要であることは我々が世界に先駆けて明らかにしたものであり、さらに我々は Oct4 の重要性をも独自に明らかにしたことから、独創性の高い研究である。本研究の成果がさらに明らかとなれば将来、TGF- β 阻害剤を臨床応用するさいに治療が有効な症例を予測する上で重要となることが期待される。

すでに脳腫瘍に対しては TGF- β 2 のアンチセンスオリゴヌクレオチドや TGF- β 受容体阻害剤の臨床試験が海外で始まっているが、我々は TGF- β 受容体や Sox4, Oct4 も新たなターゲットとなりうることを明らかにした。

とくに本年度、分担研究者である鯉沼、藤堂らが開始した EOS-Luc 発現脳腫瘍幹細胞を用いた in vivo イメージングシステムは今後の研究の発展のために極めて意義深いと思われる。平成 24 年度に向けて TGF- β シグナルや BMP-4 シグナルの標的遺伝子を網羅的に解析しその機能を明らかにする予定であるが、EOS-Luc 発現脳腫瘍幹細胞はその分子レベルでの役割を解明する上でも重要なツールとなると期待される。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikushima H, and Miyazono K. (2011) Biology of transforming growth factor- β signaling. **Curr. Pharmacol. Biotechnol.** 12 (12): 2099-2107.
- 2) Kaneda A, Fujita T, Anai M, Yamamoto S, Nagae G, Morikawa M, Tsuji S, Oshima M, Miyazono K., Aburatani H. (2011) Activation of Bmp2-Smad1 signal and its regulation by coordinated alteration of H3K27 trimethylation in Ras-induced senescence. **PLoS Genet.** 7 (11): e1002359.

- 3) Watanabe A, Ogiwara H, Ehata S, Mukasa A, Ishikawa S, Maeda D, Ueki K, Ino Y, Todo T, Yamada Y, Fukayama M, Saito N, Miyazono K, Aburatani H. (2011) Homozygously deleted gene DACH1 regulates tumor-initiating activity of glioma cells. **Proc Natl Acad Sci USA**. 108 (30): 12384-12389.
- 4) Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Saito N, Miyazawa K, Miyazono K. (2011) Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. **J Biol Chem**. 286 (48): 41434-41441.
- 5) Ikushima H, and Miyazono K. (2012) TGF- β signal transduction spreading to a wider field: A broad variety of mechanisms for context-dependent effects of TGF- β . **Cell Tissue Res**. 347 (1): 37-49.
- 6) Miyazono K, Ehata S, Koinuma D (2012) Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer. **Ups J Med Sci**. 117 (2): 143-152.

H. 知的財産権の出願・登録状況
無し

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書
「脳腫瘍幹細胞のゲノム解析」

分担研究者： 鯉沼 代造 東京大学大学院・医学系研究科・講師

研究要旨：我々はこれまで TGF- β が脳腫瘍幹細胞に作用して転写因子 Sox4、その下流の Sox2 を介して脳腫瘍幹細胞の未分化性を維持していることを明らかにした。本研究では脳腫瘍幹細胞において、TGF- β -Sox4-Sox2 経路がどのような標的遺伝子を活性化するか、それらの遺伝子は脳腫瘍幹細胞の未分化性維持にどのように関わっているか、さらにこれらの遺伝子群はヒト脳腫瘍においてどのように発現しているかを中心に研究を進めた。

脳腫瘍幹細胞は培養中に継代を重ねると未分化性を次第に失うことから、我々は Oct4/Sox2 enhancer の活性化を指標に培養脳腫瘍幹細胞の未分化性を検出する系を立ち上げることを試みた。その結果、Oct4/Sox2 を発現する脳腫瘍幹細胞を検出することが可能となり、検討を進めている。さらに網羅的な標的遺伝子同定のため、幹細胞という限られた量のサンプルからの RNA sequencing の方法を確立し、研究を進めている。

A. 研究目的

脳腫瘍の中でも最も悪性度の高い膠芽腫では、TGF- β ががんの進行に密接な役割を果たしていることが近年示唆されている。実際に、TGF- β 2 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドや TGF- β 受容体の阻害剤の臨床試験が国外では開始されており、TGF- β シグナルの抑制が膠芽腫の治療に有効であることが報告されている。

我々はこれまで TGF- β が脳腫瘍幹細胞に作用して脳腫瘍幹細胞の未分化性を維持していることを明らかにした(Ikushima et al. 2009)。また TGF- β 受容体阻害剤が脳腫瘍幹細胞の分化を促進することを見出した。さらに、脳腫瘍幹細胞において TGF- β が Smad シグナル経路を活性化すると、転写因子 Sox4、その下流の Sox2 を介して未分化性を維持していることを明らかにした。しかし、脳腫瘍幹細胞に対する TGF- β 阻害剤の効果は症例によって差があることから、TGF- β が脳腫瘍幹細胞において Sox4-Sox2 経路を介してどのような下流シグナル分子を活性化するかを明らかにすることは個々の脳腫瘍症例に最適な治療法を決定する上で極めて重要と考えられる。

本研究では脳腫瘍幹細胞において、TGF- β -Sox4-Sox2 経路がどのような標的遺伝子を活性化するか、それらの遺伝子は脳腫瘍幹細胞の未分化性維持にどのように関わっているか、さらにこれらの遺伝子群はヒト脳腫瘍においてどのように発現しているかを中心に研究を進めている。脳腫瘍幹細胞は培養中に継代を重ねると未分化性を次第に失うことから、平成 23 年度は Oct4/Sox2 enhancer の活性化を指標に培養脳腫瘍幹細胞の未分化性を検出する系を立ち上げることを試みた。さらに幹細胞

という限られた量のサンプルからの網羅的解析を行うための検討・準備を行った。

B. 研究方法

ヒト脳腫瘍幹細胞は東京大学医学部倫理委員会の承認を得て採取したものを用いた。培養は無血清で EGF と bFGF の存在下で行った。クロマチン免疫沈降法はすでに報告されている方法を用いて行った (Ikushima et al. 2009; Koinuma et al. 2009)。EOS lentivirus vector (Hotta et al., 2009) の脳腫瘍幹細胞での発現は Ellis 博士 (Developmental and Stem Cell Biology Program, Toronto, Canada) より供与を受け、既報の通り行った (Nagano et al., 2010)。

(倫理面への配慮)

1) この研究で行なう予定の遺伝子組み換え実験は平成 20 年 10 月 21 日の東京大学医学部組織 DNA 実験安全委員会において承認を受けており、適切な拡散防止措置がとられている。

2) 動物を用いた実験は、動物実験の講習を修了し、十分な知識と経験を有するものだけに従事させ、東京大学医学部の定める規則に従って行った。

3) 本研究で用いる臨床検体は東京大学医学部倫理委員会の承認を得て、被験者に対するインフォームド・コンセントを書面で行っている。

4) ヒトの遺伝子解析を行う研究は本研究計画には予定されていない。ヒト ES 細胞を用いた研究は本研究計画には予定されていない。

C. 研究結果

1) 未分化脳腫瘍幹細胞の標識

本研究では TGF- β -Sox4-Sox2 経路の新規標的遺伝子の探索のために ChIP-sequencing を行う予

定で研究を進めた。しかし ChIP-sequencing を行うためには比較的大量の脳腫瘍幹細胞を準備することが必要であるが、脳腫瘍幹細胞は培養中に spontaneous に分化してしまうことが実験を行う過程で明らかとなった。我々は EOS lentiviral vector を用いて Oct4/Sox2 enhancer の活性化を指標に培養脳腫瘍幹細胞の未分化性を検出する系を立ち上げた。その結果、TGS-01 細胞において Oct4/Sox2 を発現する細胞を検出することが可能となり、Puromycin での選択を行うなど、さらに検討を進めている。また網羅的な標的遺伝子同定のため、幹細胞という限られた量のサンプルからの RNA sequencing の方法を確立し、研究を進めている。その結果 1 ng の total RNA からある程度の定量性を維持した遺伝子発現解析が可能であることを確認した。

2) がん細胞特異的な Smad2/Smad3 結合部位の網羅的同定解析

分担研究者のこれまでの解析では、TGF- β のシグナル伝達研究領域において初めて ChIP-chip 法を用いて検討を行った。その結果直接の Smad2/Smad3 の標的遺伝子を同定するとともに、対象とする細胞でいかなる制御因子が TGF- β シグナル下流の転写調節にかかわっているのかを同定する手法を確立している。

本研究ではがん細胞株を用いて同様の手法を用い、その結果正常上皮細胞と比較して 8 割に及ぶ結合部位が、がん細胞特異的に存在することが明らかとなった。このことはこれまで知られていた細胞特異的な TGF- β の作用発現が、選択的な Smad2/Smad3 の結合によりもたらされていることを示唆するものである。またがん細胞特異的な結合部位に特徴的な DNA 配列を解析することで、その選択的結合のメカニズムの一部を説明できる転写因子が同定された。

興味深いことに同様の細胞種特異的な結合部位の相違は、脳腫瘍幹細胞に対する抑制的役割が知られる BMP シグナル下流の転写因子である Smad1/Smad5 についても観察された。これらの成果を平成 23 年度に Journal of Biological Chemistry 誌、Nucleic Acids Research 誌に原著論文として発表した。

D&E. 考察及び結論

本研究は、近い将来、我が国で開始されることが期待される TGF- β 阻害剤の膠芽腫に対する効果との関連性を明らかにするための基礎的知見を得ることを目的としており、極めて必要性の高い研究であると考え。現在進めている DNA マイクロアレイによる発現解析については、新たな網羅的遺伝子発現解析手法として RNA-sequencing が急速に普及しつつあることから、この手法を本研究に適用するための検討も

始めている。

本年度開始した EOS-Luc 発現脳腫瘍幹細胞を用いた Sox2/Oct4 発現細胞の検出は今後の研究の発展のために極めて意義深いと思われる。がん幹細胞は培養中に spontaneous に分化してしまうことから、がん幹細胞の未分化性を維持した状態で研究を行うことが重要である。本システムの導入により、脳腫瘍幹細胞を適切な条件下で培養し実験を行うことが可能となると思われる。平成 24 年度に向けて TGF- β シグナルや BMP-4 シグナルの標的遺伝子を網羅的に解析しその機能を明らかにする予定であるが、EOS-Luc 発現脳腫瘍幹細胞はその分子レベルでの役割を解明する上でも重要なツールとなると期待される。今後はより少量の RNA から定量的なデータを取得することができるよう条件を検討する計画である。これにより幹細胞としての形質を極力維持した状態での信頼性の高いデータ取得が可能となることが期待される。

TGF- β シグナルの下流で Sox4-Sox2 経路が重要であることは我々が世界に先駆けて明らかにしたものであり、さらに我々は Oct4 の重要性をも独自に明らかにしたことから、独創性の高い研究である。またがん細胞を用いた我々の ChIP-chip の知見からは膠芽腫における Smad2/Smad3 の結合部位が他の細胞と大きく異なる可能性が考えられる。今年度の検討結果により同様のことが BMP 下流の Smad1/Smad5 についても示唆され、Sox4/Oct4 結合部位の ChIP-sequencing との関係でも意義深いものと考えられた。今後は目的の遺伝子発現情報取得とともに、TGF- β あるいは BMP-Smad シグナルの下流で Sox4-Oct4 による転写制御との関係を明らかにしていく予定である。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizutani A, Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Morikawa M, Suzuki HI, Imamura T, Miyazono K, Aburatani H. (2011) Cell type-specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 proteins and hepatocyte nuclear factor 4alpha in HepG2 cells. **J Biol Chem.** 286 (34): 29848-29860.
- 2) Morikawa M, Koinuma D, Tsutsumi S, Vasilaki E, Kanki Y, Heldin CH, Aburatani H, Miyazono K. (2011) ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif. **Nucleic Acids Res.** 39 (20): 8712-8727.
- 3) Koinuma D, Shinozaki M, Nagano Y, Ikushima H, Horiguchi K, Goto K, Chano T, Saitoh M,

- Imamura T, Miyazono K, and Miyazawa K. (2011) RB1CC1 protein positively regulates transforming growth factor-beta signaling through the modulation of Arkadia E3 ubiquitin ligase activity. **J Biol Chem.** 286 (37), 32502-32512.
- 4) Horiguchi K, Sakamoto K, Koinuma D, Semba K, Inoue A, Inoue S, Fujii H, Yamaguchi A, Miyazawa K, Miyazono K, and Saitoh M. (2012) TGF- β drives epithelial-mesenchymal transition through δ EF1-mediated downregulation of ESRP. **Oncogene** in press.
- 5) Kawata M, Koinuma D, Ogami T, Umezawa K, Iwata C, Watabe T, and Miyazono K. (2012) TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells. **J Biochem.** 151 (2), 205-216.
- 6) Miyazono K, Ehata S, Koinuma D (2012) Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer. **Ups J Med Sci.** 117 (2): 143-152.
- 7) Morikawa M, Koinuma D, Miyazono K, and Heldin, C-H. (2012) Genome-wide mechanisms of Smad binding. **Oncogene** in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況
無し

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書
「脳腫瘍幹細胞維持機構の遮断の in vivo 効果」

分担研究者： 藤堂 具紀 東京大学・医学部附属病院・特任教授

研究要旨：我々はこれまで TGF- β が脳腫瘍幹細胞に作用して転写因子 Sox4、その下流の Sox2 を介して脳腫瘍幹細胞の未分化性を維持していることを明らかにした。本研究では脳腫瘍幹細胞において、TGF- β -Sox4-Sox2 経路がどのような標的遺伝子を活性化するか、それらの遺伝子は脳腫瘍幹細胞の未分化性維持にどのように関わっているか、さらにこれらの遺伝子群はヒト脳腫瘍においてどのように発現しているかを中心に研究を進めた。

我々は Oct4/Sox2 enhancer の活性化を指標に培養脳腫瘍幹細胞の未分化性を検出する系を立ち上げることを試みた。これらの脳腫瘍幹細胞をマウス頭蓋内に移植したところ、マウスを屠殺することなく、腫瘍の形成・増大を検出することができた。興味深いことに、未分化性を維持していると考えられる脳腫瘍細胞は血管周辺に局在する傾向があることを免疫組織染色で確認した。

A. 研究目的

脳腫瘍の中でも最も悪性度の高い膠芽腫では、TGF- β ががんの進行に密接な役割を果たしていることが近年示唆されている。実際に、TGF- β 2 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドや TGF- β 受容体の阻害剤の臨床試験が国外では開始されており、TGF- β シグナルの抑制が膠芽腫の治療に有効であることが報告されている。

我々はこれまで TGF- β が脳腫瘍幹細胞に作用して脳腫瘍幹細胞の未分化性を維持していることを明らかにした (Ikushima et al. 2009)。また TGF- β 受容体阻害剤が脳腫瘍幹細胞の分化を促進することを見出した。さらに、脳腫瘍幹細胞において TGF- β が Smad シグナル経路を活性化すると、転写因子 Sox4、その下流の Sox2 を介して未分化性を維持していることを明らかにした。しかし、脳腫瘍幹細胞に対する TGF- β 阻害剤の効果は症例によって差があることから、TGF- β が脳腫瘍幹細胞において Sox4-Sox2 経路を介してどのような下流シグナル分子を活性化するかを明らかにすることは個々の脳腫瘍症例に最適な治療法を決定する上で極めて重要と考えられる。

本研究では脳腫瘍幹細胞において、TGF- β -Sox4-Sox2 経路がどのような標的遺伝子を活性化するか、それらの遺伝子は脳腫瘍幹細胞の未分化性維持にどのように関わっているか、さらにこれらの遺伝子群はヒト脳腫瘍においてどのように発現しているかを中心に研究を進めている。平成 23 年度は Oct4/Sox2 enhancer の活性化を指標に培養脳腫瘍幹細胞の未分化性を検出する系を立ち上げることを試みた。さらに標識した脳腫瘍幹細胞をマウス頭蓋内に移植し、組織学的に検討を行った。

B. 研究方法

ヒト脳腫瘍幹細胞は東京大学医学部倫理委員会の承認を得て採取したものをを用いた。培養は無血清で EGF と bFGF の存在下で行った。

ヌードマウス頭蓋骨内への同所移植はすでに報告した手法 (Ikushima et al. 2009) により行った。EOS lentivirus vector (Hotta et al., 2009) の脳腫瘍幹細胞での発現は Ellis 博士 (Developmental and Stem Cell Biology Program, Toronto, Canada) より供与を受け、既報の通り行った (Nagano et al., 2010)。

(倫理面への配慮)

1) 動物を用いた実験は、動物実験の講習を修了し、十分な知識と経験を有するものだけに従事させ、東京大学医学部の定める規則に従って行った。

2) 臨床検体は、東京大学医学部倫理委員会の承認を得、患者のインフォームド・コンセントを得て用いられている。

3) ヒトの遺伝子解析を行う研究は本研究計画には予定されていない。ヒト ES 細胞を用いた研究は本研究計画には予定されていない。

C. 研究結果

1) 転写因子 Oct4 と Sox4-Sox2 経路の協調作用

我々は膠芽腫幹細胞において TGF- β シグナルの下流で作用する因子として転写因子 Sox4 と Sox2 の重要性をこれまで明らかにして来た。我々は平成 22 年度に引き続き Sox4 に会合して TGF- β シグナルを制御する因子として転写因子 Oct4 に注目して研究を行った。Sox4, Sox2 が TGF- β シグナルによってその発現が上昇するのに対して、Oct4 の発現は TGF- β シグナルによっ

て変動しない。しかし、Oct4 は Sox4 と結合して Sox2 のエンハンサー領域に結合して Sox2 の発現を制御し、膠芽腫幹細胞の未分化性の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。実際に、Oct4 の発現が低下すると膠芽腫幹細胞の未分化性は喪失し、動物実験モデルで脳腫瘍形成能が低下すること、抗がん剤 temozolomide (TMZ)への感受性が上昇することを明らかにした。また極めて興味深いことに Sox2 の発現調節は膠芽腫幹細胞では Sox4-Oct4 複合体が重要な役割を果たしているのに対し、正常脳幹細胞では Sox2-Oct4 が重要であることから、腫瘍と正常組織での Sox2 の発現機構が異なっている可能性が示唆された。これらの成果を平成 23 年度に Journal of Biological Chemistry 誌に原著論文として発表した。

2) 脳腫瘍幹細胞を用いた in vivo イメージングシステムの確立

脳腫瘍幹細胞は培養中に spontaneous に分化してしまうことが実験を行う過程で明らかとなった。我々は EOS lentiviral vector を用いて Oct4/Sox2 enhancer の活性化を指標に培養脳腫瘍幹細胞の未分化性を検出する系を立ち上げることを試みた。その結果、TGS-01 細胞において Oct4/Sox2 を発現する細胞を検出することが可能となり、さらに検討を進めている。

また EOS-Luc 発現脳腫瘍幹細胞を用いて、in vivo で脳腫瘍幹細胞を免疫不全マウスの頭蓋内に同所移植したさいにマウスを屠殺することなく、腫瘍の形成・増大を検出する実験系の確立を進めている。興味深いことに、EOS-Luc 発現脳腫瘍幹細胞を同所移植し、得られた腫瘍組織を観察したところ、未分化性を維持していると考えられる脳腫瘍細胞は血管の周辺 (perivascular niche) に局在する傾向があることを免疫組織染色で確認した。一方で、最近国外の他のグループ (Ricci-Vitiani et al. 2010; Wang et al. 2010) から報告されている脳腫瘍幹細胞が血管前駆細胞へ分化するという所見を積極的に支持する結果は、この実験系では確認できなかった。

D&E. 考察及び結論

本研究は、近い将来、我が国で開始されることが期待される TGF- β 阻害剤の膠芽腫に対する効果との関連性を明らかにするための基礎的知見を得ることを目的としており、極めて必要性の高い研究である。また TGF- β シグナルの下流で Sox4-Sox2 経路が重要であることは我々が世界に先駆けて明らかにしたものであり、さらに本研究課題の成果として我々は Oct4 の重要性をも明らかにしたことから独創性の高い研究である。

本年度開始した EOS-Luc 発現脳腫瘍幹細胞を

用いた in vivo イメージングシステムは今後の研究の発展のために極めて意義深いと思われる。がん幹細胞は培養中に spontaneous に分化してしまうことから、がん幹細胞の未分化性を維持した状態で研究を行うことが重要である。本システムの導入により、脳腫瘍幹細胞を適切な条件下で培養し実験を行うことが可能となると思われる。また in vivo イメージングを導入することで、これまで屠殺しないと腫瘍の進展を明らかにできなかったのが、マウスが生きたままで腫瘍の増大を追跡することが可能となった。さらに腫瘍組織の解析においては Luciferase 抗体を用いて未分化な脳腫瘍細胞の局在を明らかにすることが可能になると思われ、今後は脳腫瘍細胞の分化と腫瘍組織内における局在との関連についても研究を進めることができると期待される。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe A, Ogiwara H, Ehata S, Mukasa A, Ishikawa S, Maeda D, Ueki K, Ino Y, Todo T, Yamada Y, Fukayama M, Saito N, Miyazono K, Aburatani H. (2011) Homozygously deleted gene DACH1 regulates tumor-initiating activity of glioma cells. **Proc Natl Acad Sci USA**. 108 (30): 12384-12389.
- 2) Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Saito N, Miyazawa K, Miyazono K. (2011) Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. **J Biol Chem**. 286 (48): 41434-41441.
- 3) Muraguchi T, Tanaka S, Tamase A, Nakada M, Nakamura H, Hoshii T, Ooshio T, Tadokoro Y, Naka K, Ino Y, Todo T, Kuratsu J, Saya H, (2011) NKX2.2 suppresses self-renewal of glioma-initiating cells by induction of oligodendroglial differentiation **Cancer Res**. 71(3): 1135-1145
- 4) Ogura M, Todo T, Tanaka M, Nannya Y, Ichikawa M, Nakamura F, Kurokawa M. (2011) Temozolomide may induce therapy-related acute lymphoblastic leukemia. **Br J Haematol**. 154 (4): 663-665
- 5) Koga T, Maruyama K, Tanaka M, Ino Y, Saito N, Nakagawa K, Shibahara J, Todo T. (2011) Extended field stereotactic radiosurgery for recurrent glioblastoma. **Cancer**. DOI: 10.1002/cncr.27372 (published online 16 DEC 2011)
- 6) Fukuhara H, Homma Y, Todo T. (2010) Oncolytic virus therapy for prostate cancer **Int. J. Urol**. 17(1):20-30

- 7) Ino Y, Todo T. (2010) Clinical development of a third-generation oncolytic HSV-1 (G47 Δ) for malignant glioma **Gene Therapy and Regulation** 5: 101-111

H. 知的財産権の出願・登録状況
無し

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mizutani A, <u>Koinuma D</u> , Tsutsumi S, Kamimura N, Morikawa M, Suzuki HI, Imamura T, <u>Miyazono K</u> and Aburatani H.	Cell type-specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 proteins and hepatocyte nuclear factor 4alpha in HepG2 cells	J. Biol. Chem.	286 (34)	29848- 29860	2011
Watanabe A, Ogiwara H, Ehata S, Mukasa A, Ishikawa S, Maeda D, Ueki K, Ino Y, <u>Todo T</u> , Yamada Y, Fukayama M, Saito N, <u>Miyazono K</u> , and Aburatani H.	Homozygously deleted gene DACH1 regulates tumor-initiating activity of glioma cells	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	108 (30)	12384- 12389	2011
Morikawa M, <u>Koinuma D</u> , Tsutsumi S, Vasilaki E, Kanki Y, Heldin CH, Aburatani H, and <u>Miyazono K</u> .	ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif	Nucleic Acids Res.	39 (20)	8712- 8727	2011
Ikushima H, <u>Todo T</u> , Ino Y, Takahashi M, Saito N, Miyazawa K, and <u>Miyazono K</u> .	Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein	J. Biol. Chem.	286 (48)	41434- 41441	2011
Ikushima H, and <u>Miyazono K</u> .	TGF- β signal transduction spreading to a wider field: A broad variety of mechanisms for context-dependent effects of TGF- β	Cell Tissue Res.	347 (1)	37-49	2012
<u>Miyazono K</u> , Ehata S and <u>Koinuma D</u> .	Tumor-promoting functions of transforming growth factor-beta in progression of cancer	Ups. J. Med. Sci.	117	143-152	2011

Cell Type-specific Target Selection by Combinatorial Binding of Smad2/3 Proteins and Hepatocyte Nuclear Factor 4 α in HepG2 Cells^{*[S]†}

Received for publication, December 30, 2010, and in revised form, May 19, 2011. Published, JBC Papers in Press, June 6, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.217745

Anna Mizutani^{*1}, Daizo Koinuma[‡], Shuichi Tsutsumi[§], Naoko Kamimura[§], Masato Morikawa[‡], Hiroshi I. Suzuki[‡], Takeshi Imamura^{¶12}, Kohei Miyazono^{‡3}, and Hiroyuki Aburatani[§]

From the [‡]Department of Molecular Pathology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, the [§]Genome Science Division, Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo, Meguro-ku, Tokyo 153-8904, and the [¶]Division of Biochemistry, Cancer Institute of the Japanese Foundation for Cancer Research, Koto-ku, Tokyo 135-8550, Japan

Specific regulation of target genes by transforming growth factor- β (TGF- β) in a given cellular context is determined in part by transcription factors and cofactors that interact with the Smad complex. In this study, we determined Smad2 and Smad3 (Smad2/3) binding regions in the promoters of known genes in HepG2 hepatoblastoma cells, and we compared them with those in HaCaT epidermal keratinocytes to elucidate the mechanisms of cell type- and context-dependent regulation of transcription induced by TGF- β . Our results show that 81% of the Smad2/3 binding regions in HepG2 cells were not shared with those found in HaCaT cells. Hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) is expressed in HepG2 cells but not in HaCaT cells, and the HNF4 α -binding motif was identified as an enriched motif in the HepG2-specific Smad2/3 binding regions. Chromatin immunoprecipitation sequencing analysis of HNF4 α binding regions under TGF- β stimulation revealed that 32.5% of the Smad2/3 binding regions overlapped HNF4 α bindings. *MIXL1* was identified as a new combinatorial target of HNF4 α and Smad2/3, and both the HNF4 α protein and its binding motif were required for the induction of *MIXL1* by TGF- β in HepG2 cells. These findings generalize the importance of binding of HNF4 α on Smad2/3 binding genomic regions for HepG2-specific regulation of transcription by TGF- β and suggest that certain transcription factors expressed in a cell type-specific manner play important roles in the transcription regulated by the TGF- β -Smad signaling pathway.

Transforming growth factor- β (TGF- β) has multiple roles in growth arrest, apoptosis, differentiation, epithelial-to-mesenchymal transition, and extracellular matrix deposition in various types of cells and is related to embryonic development and various human diseases (1). In cancer cells, TGF- β is known to possess conflicting tumor-suppressive and pro-metastatic functions; TGF- β inhibits cancer progression by cell cycle arrest and apoptosis, although it also helps cancer cells to evade anti-tumor immune response and metastasize to distant organs by epithelial-to-mesenchymal transition. Understanding the precise regulatory mechanisms downstream of this signaling pathway is required for the control of diseases.

Smad family proteins are the principal and specific molecules that transduce signals from the ligand-bound active receptor complexes on the cell surface membrane to the nucleus (2–4). Smad2 and Smad3 form hetero-oligomers with Smad4 after phosphorylation of the C terminus of Smad2 or Smad3 by the receptor complex, and the Smad complex serves as a transcription factor on the genome. The Smad complex was reported to bind to the sequences containing “GTCT” (Smad-binding element) by *in vitro* screening of the binding sequences and structural analysis of the Smad complex bound to the DNA (5, 6). However, this very simple motif is present everywhere in the genome. It has also been suggested that the binding affinity of the Smad complex to Smad-binding elements is not high. Interaction with other transcription factors and cofactors has been shown to be important to provide functional specificity of TGF- β signaling, and these transcription factors and cofactors facilitate binding of the Smad complex to the favorable positions in the genome. Expressions of these transcription factors and cofactors are often regulated in a cell- or tissue-specific manner, and a subset of these molecules indeed has been shown to be important for the context-dependent Smad binding to the genome and transcriptional regulation of target genes. Target genes of TGF- β that are regulated by the same cofactors are designated as a synexpression group (7), as reported in the regulation of several genes such as *CDKN1A/p21* and *GADD45A* by FOXO family proteins (8).

High throughput analyses of transcription factor binding regions using either an oligonucleotide tiling microarray or massively parallel sequencing are now widely used to understand the roles of transcription factors (9, 10). We have identi-

* This work was supported by KAKENHI Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas, Integrative Research on Cancer Microenvironment Network, 22112002 (to K.M.) Grants-in-Aid for Scientific Research (S) 20221009 (to H.A.) and for Young Scientists (B) 10014456 (to D.K.) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan, a grant from the Genome Network Project from Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (to H.A.), and the Global Center of Excellence Program (Integrative Life Science Based on the Study of Biosignaling Mechanisms) from the Japan Society for the Promotion of Science.

† This article was selected as a Paper of the Week.

‡ Author's Choice—Final version full access.

[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1 and S2 and Tables S1–S6.

¹ Supported by an Ishidzu Shun Memorial Scholarship.

² Present address: Dept. of Molecular Medicine for Pathogenesis, Ehime University Graduate School of Medicine, Toon, Ehime 791-0295, Japan.

³ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 81-3-5841-3356; Fax: 81-3-5841-3354; E-mail: miyazono@m.u-tokyo.ac.jp.

fied Smad2/3 binding regions and Smad4 binding regions using a promoter tiling array in the HaCaT normal human epidermal keratinocyte cell line (11, 12). We found Smad2/3 binding regions at the previously analyzed regions as well as many unrecognized binding regions. Activator protein-1 (AP-1), v-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog, and transcription factor AP-2-binding motifs were identified as enriched motifs in the Smad2/3 binding regions in HaCaT cells (11). However, it remains to be determined whether the identified Smad2/3 binding regions are shared with those in other cells and tissues.

Hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α)⁴ is a member of the hepatocyte nuclear factor family, which includes well conserved nuclear receptors among mammals. HNF4 α is expressed in the liver, kidney, small intestine, and pancreas and is essential for the organogenesis of the liver (13, 14). HNF4 α is also required for the differentiation of hepatocytes and is engaged in hepatocyte-specific gene regulation related to the synthesis of apolipoproteins, acute phase reactive proteins, and other secreted proteins. HNF4 α is located in the nucleus, forms a homodimer, and functions as a transcription factor by binding to DR1 elements in the genome (15).

Several groups have identified a functional relationship between HNF4 α and TGF- β signaling. TGF- β down-regulates the expression of variant 1 of HNF4 α , one of the transcriptional variants of HNF4 α , which has an AF1 transcriptional activation domain in their N terminus (16). On the contrary, the expression of the transcriptional activation domain lacking variant 8 is repressed by TGF- β in normal murine mammary gland (NMuMG) epithelial cells (17). TGF- β has also been reported to regulate the HNF4 α expression by proteasome-dependent degradation (16). The effect of HNF4 α on TGF- β -induced transcription has also been analyzed for the *APOC3* promoter, where HNF4 α interacts with Smad3 and Smad4 to induce the *APOC3* expression (18, 19). The HNF4 α -binding motif in the *APOC3* promoter has been shown to be important for TGF- β -induced transcriptional activity, and a mutant of Smad3 that lacks the DNA binding property to Smad-binding elements still interacts with HNF4 α to synergistically transactivate the *APOC3* promoter (19). Because HNF4 α binds to the MH1 DNA binding domain of Smad3 through both its N and C termini (19), Smads may indirectly bind to the *APOC3* promoter through HNF4 α . However, it is still unclear whether the reported interaction with Smads and mechanisms of transcriptional regulation are generally important for the function of both HNF4 α and Smads in hepatocytes.

Here, we identified Smad2/3 binding regions in the HepG2 hepatoblastoma cell line and compared them with the binding regions in HaCaT cells and hepatocellular carcinoma Hep3B cells to elucidate the mechanisms of context-dependent regulation of TGF- β -induced transcription. We found HNF4 α as an important factor for HepG2-specific Smad2/3 binding regions and analyzed its regulatory mechanism using a new target gene of HNF4 α , *MIXL1*, under TGF- β stimulation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—Human hepatoblastoma HepG2 cells and hepatocellular carcinoma Hep3B cells were obtained from the American Type Culture Collection and were cultured in minimum essential medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Thermo Scientific, Rockford, IL), 0.1 mM nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 100 units/ml penicillin G, and 100 μ g/ml streptomycin. HaCaT cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; catalog no. 11965; Invitrogen) supplemented with 10% FBS, 100 units/ml penicillin G, and 100 μ g/ml streptomycin. Cells were grown in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C.

Antibodies and Chemicals—We used the following commercially available antibodies: mouse anti-Smad2/3 (BD Biosciences), anti- α -tubulin (DM1A) (Sigma), rabbit anti-phospho-Smad2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), anti-phospho-Smad3 (Cell Signaling Technology), and anti-HNF4 α (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). TGF- β 3 was from R & D Systems (Minneapolis, MN).

RNA Interference and Oligonucleotides—Stealth small interfering RNA (siRNA) targeting HNF4 α (5'-AAAGCGGCCACGC-GAGUCAUACUGG-3') was purchased from Invitrogen. As a negative control, we used a predesigned siRNA (12935–200, sequence not available). siRNAs were introduced into HepG2 cells using the Lipofectamine RNAi MAX reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions (reverse transfection method), using 3 nM siRNA per 1 \times 10⁵ cells/ml per well of 12-well plates.

Immunoblotting—SDS-gel electrophoresis and immunoblotting were performed as described, using a LAS-4000 lumino-image analyzer (Fujifilm, Tokyo, Japan) (20). RIPA buffer (1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA) was used for cell lysis.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP), ChIP-chip, and ChIP Sequencing (Seq)—Sample preparation for ChIP-chip analysis was performed as described previously, using anti-Smad2/3 (BD Biosciences) (11, 21, 22). Briefly, ChIP and control input DNA samples were amplified by two cycles of *in vitro* transcription and hybridized on separate Affymetrix human promoter 1.0R oligonucleotide tiling arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA). Enrichment values (ChIP/control input DNA) were calculated using the MAT algorithm, and Smad2/3 binding regions were determined using detection *p* values of 10⁻⁴ (23). For conventional quantitative anti-Smad2/3 ChIP-quantitative PCR (ChIP-qPCR) analyses, cells were cross-linked with 10 mM dimethyl adipimidate (Thermo Scientific) for 30 min at room temperature before formaldehyde fixation. Bioruptor UCW-301 (output: H, 2 cycles of 30 s of sonication with 30-s intervals; Cosmobio, Tokyo, Japan) was used for sonication of ChIP-qPCR samples. Sample preparation for ChIP-seq was performed according to the manufacturer's instructions (Illumina, San Diego). The obtained read tags were mapped on the NCBI/hg18 human genome assembly using ELAND (Illumina). Cis-Genome was used for the calculation of significant HNF4 α

⁴The abbreviations used are: HNF4 α , hepatocyte nuclear factor 4 α ; qPCR, quantitative PCR; ChIP-seq, ChIP sequencing; FDR, false discovery rate; CEAS, cis-regulatory element annotation system.

Smad2/3 and HNF4 α Binding Regions in HepG2 Cells

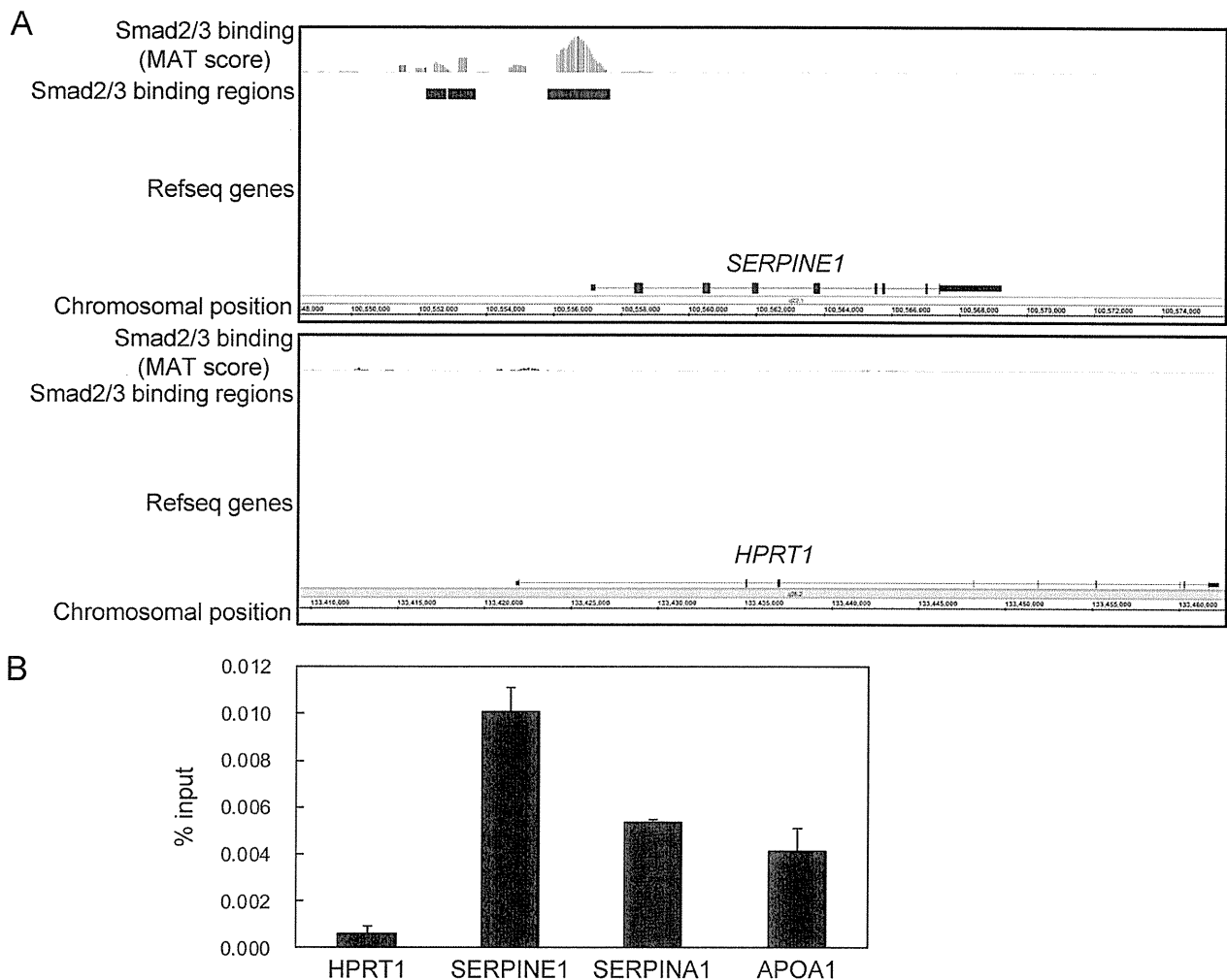


FIGURE 1. Identification of Smad2/3 binding regions in HepG2 cells. *A*, Smad2/3 binding to the *SERPINE1*/*PAI-1* locus in HepG2 cells. MAT scores were plotted at the *SERPINE1* and *HPRT1* loci to obtain a graphical representation of Smad2/3 binding in these regions. Significant Smad2/3 binding regions as determined by detection of p values of 10^{-4} are shown by black bars. *B*, percent input values of Smad2/3 binding compared with input genome as determined by ChIP-qPCR. Cells were treated with 120 pM TGF- β for 1.5 h. Cells were cross-linked sequentially with dimethyl adipimidate and formaldehyde. Error bars represent S.D.

binding regions (one-sample analysis, with default parameters and a false discovery rate (FDR) of less than 0.1%) (24).

Motif Prediction and Mapping—CisGenome was used for both *de novo* motif prediction and motif mapping of Smad2/3 ChIP-chip and HNF4 α ChIP-seq binding regions. Cis-regulatory element annotation system (CEAS) was also used for identification of known motifs in Smad2/3 and HNF4 α binding regions (25).

Quantitative PCR Analysis—Quantitative real time PCR analysis was performed as described previously (26). Amplification data were quantified using the standard curve method. Detected signals were confirmed to be specific by a dissociation protocol. All samples were run in duplicate or triplicate, and the results were averaged. Sequences of the primers are available in supplemental Tables S1 and S2.

Reverse Transcription-PCR and Expression Microarray Analysis—Total RNAs were extracted as described previously (26). First strand cDNAs were synthesized using the PrimeScript2 reverse transcriptase (TakaraBio, Shiga, Japan). The

experimental procedures for GeneChip (Affymetrix) were performed as described previously (11) using the GeneChip human U133 plus 2.0 oligonucleotide array (Affymetrix). Microarray Suite software 5.0 (Affymetrix) was used with a target intensity of 100. Data from one array were obtained for each sample.

Promoter Reporter Constructs and cDNA Constructs—The human *MIXL1* promoter reporter (*MIXL1*-WT-luc, -583 to -8) and its mutants were constructed by a PCR-based approach and cloned into the pGL4.10 (Promega, Fitchburg, WI) vector with a minimal luciferase promoter sequence (11). Primer sequences used for the construction of *MIXL1*-mut1-luc were 5'-GCAGGGGTGGTAAATAAATTTAGGGT-TATCGGGACAGACGGGAC-3' and 5'-GTCCCGTCTGTC-CGATAACCCTAAATTTATTACCACCCTGC-3'. The primer sequences for the construction of *MIXL1*-mut2-luc were 5'-TCCCCGAGCCCTTAGGGTATTACACCGCCCC-GCCTTC-3' and 5'-GAAGGCGGGGCGGTGTAATACCCTAAGGGCTCGGGGA-3'. *MIXL1*-luc reporters with mutations in Smad-binding elements were also constructed by

Smad2/3 and HNF4 α Binding Regions in HepG2 Cells

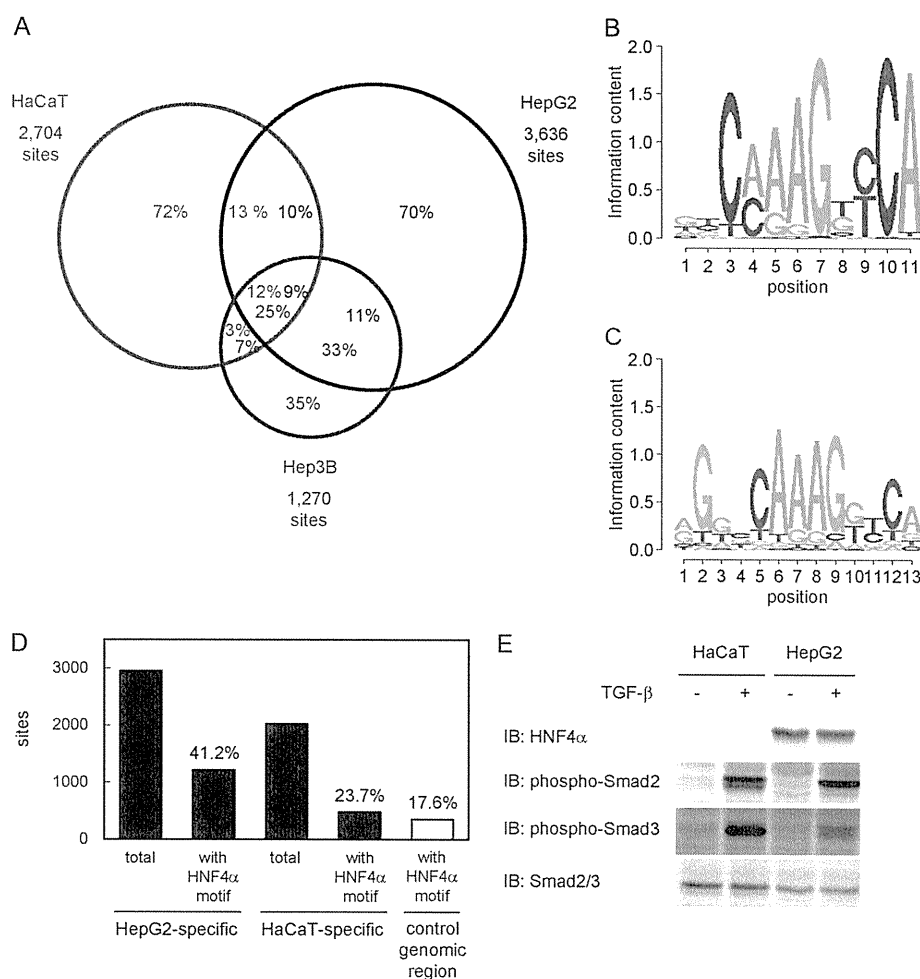


FIGURE 2. Comparison of the Smad2/3 binding regions among different cell lines. *A*, Venn diagrams showing the overlaps of Smad2/3 binding regions in HaCaT, HepG2, and Hep3B cells. Numbers in the circles indicate percentages of the Smad2/3 binding region of each cell line (red, HaCaT; black, HepG2; blue, Hep3B). *B*, identification of a motif conserved in HepG2-specific Smad2/3 binding regions. Partial genomic sequences within 250 bp from the peak positions of HepG2-specific Smad2/3 binding regions ($n = 2,955$) were analyzed using the CisGenome Gibbs motif sampler. Default parameters were used for the calculation, except for the numbers of motifs to be identified ($n = 10$). Matrix datum of the motif calculated by CisGenome was graphically shown using the SegLogo function of the R software. *C*, HNF4 α -binding motif that matched the predicted motif in HepG2-specific Smad2/3 binding regions. The JASPAR CORE data base was used to identify known transcription factor binding motifs similar to the calculated matrix data in *B*. An HNF4 α motif (ID: MA0114.1) was identified as the most similar motif with a comparison score of 21.3, which reached 96.9% of the potential maximal score. *D*, frequencies of the HNF4 α -binding motif in Smad2/3 binding regions. Presence of the HNF4 α -binding motif in each Smad2/3 binding region (within 250 bp from the peak signal position) was determined using CisGenome. Frequencies of the motif in either HepG2- or HaCaT-specific Smad2/3 binding regions were then calculated. As a control, matched genomic regions to HaCaT-specific Smad2/3 binding regions were obtained using CisGenome, and the frequency of the HNF4 α motif was determined. *E*, expression of the HNF4 α protein and phosphorylation of Smad2/3 in HaCaT and HepG2 cells. Cells were treated with TGF- β for 1.5 h, and the expression of each protein was determined by immunoblotting (IB).

PCR (see Fig. 6D for sequences of the mutants). HNF4 α and its C115R mutant were constructed by a PCR-based approach using the first strand cDNA of HepG2 cells as a template. The sequences of all cDNAs constructed were verified by sequencing.

Luciferase Assay—Cells in 24-well plates were transfected with different combinations of promoter reporter constructs and expression plasmids by using Lipofectamine LTX (Invitrogen). The total amount of transfected DNA was adjusted to the same amount using an empty vector. Twenty four hours later, cells were treated with TGF- β for an additional 24–48 h and lysed. Luciferase activities in the lysates were measured using the Dual-Luciferase[®] reporter system (Promega) as described previously. For normalization, cells were co-transfected with pGL4.75-SV40-hRluc. Where indicated, siRNAs were trans-

ected 24 h before reporter transfection. All samples were prepared in triplicate, and results were averaged.

Statistical Analysis—The Tukey-Kramer test of R program was used for multiple comparisons of data. The *t* test was used for two-sample analysis. *p* values of less than 0.05 were considered to indicate significance for each experiment.

RESULTS

Identification of HNF4 α -binding Motif in HepG2-specific Smad2/3 Binding Regions—To determine Smad2/3 binding regions in HepG2 hepatoblastoma cells, we stimulated the cells with TGF- β for 1.5 h and fixed them with formaldehyde to cross-link genome-bound molecules to DNA. ChIP on microarray analysis (ChIP-chip) was performed according to the established protocol using an Affymetrix human promoter

Smad2/3 and HNF4 α Binding Regions in HepG2 Cells

array (22). Obtained image data were analyzed using the MAT algorithm, which provided enrichment values of the ChIP samples for every promoter region, compared with the input genomic sample. There was significant Smad2/3 binding to the

promoter region of the *SERPINE1/PAI-1* gene as observed previously in the ChIP-chip analysis of Smad2/3 bindings in HaCaT cells (Fig. 1A, upper panel) (11). In contrast, there was no significant Smad2/3 binding to the *HPRT1* locus that served

