

201220012A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

宮園 浩平

平成25（2013）年5月

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

宮園 浩平

平成25（2013）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..... | 5 |
| 宮園 浩平 | |
| 2. 脳腫瘍幹細胞のゲノム解析..... | 8 |
| 鯉沼 代造 | |
| 3. 脳腫瘍幹細胞維持機構の遮断の in vivo 効果..... | 11 |
| 藤堂 具紀 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表..... | 14 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷..... | 15 |

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 ファミリーシグナル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 24 年度は Luciferase 発現脳腫瘍幹細胞をマウス頭蓋内に移植することにより、マウスを屠殺することなく、腫瘍の形成・増大をリアルタイムで検出することを可能にした。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、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。BMP-4 は、BMP-6 や BMP-9 に比べてより強力に脳腫瘍幹細胞に作用し、CD133 や Olig2、Sox2 の発現を低下させた。BMP-4 単独の処理では *in vivo* での腫瘍形成能には大きな影響を与えなかった。このため、BMP-4 の標的遺伝子を探索したところ、BMP-4 の機能を阻害する細胞外タンパク質 Noggin や細胞内タンパク質 Smad6 の発現が BMP-4 投与により上昇することが明らかとなった。このため、Noggin や Smad6 の発現を siRNA でノックダウンしたところ BMP-4 の作用の増強が見られ、*in vivo* での腫瘍形成能も有意に抑えられた。さらに RNA-seq や DNA microarray で BMP の新たな標的遺伝子の同定に成功した。

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

（東京大学医科学研究所・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 受容体の阻害剤の臨床試験など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。一方、TGF- β ファミリーの因子である BMP については、BMP が脳腫瘍幹細胞の分化を促進することは Piccirillo らによって 2006 年に報告されたが、その後は実験の困難さもあってほとんど研究が進められていないのが現状であった (Piccirillo et al. Nature 2006)。

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. Cell Stem Cell 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。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た。

本研究では、TGF- β ファミリーの因子がどのような経路を介し、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、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ことを目的として研究を行った。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た。平成 24 年度は平成 23 年度に引き続き Luciferase 発現脳腫瘍幹細胞をマウス頭蓋内に移植することにより、マウスを屠殺することなく、腫瘍の形成・増大をリアルタイムで検出することを試みた。さらに BMP の脳腫瘍幹細胞に対する作用を検討した。BMP-4 の標的遺伝子を探索し、BMP-4 の機能を阻害する細胞外タンパク質 Noggin や細胞内タンパク質 Smad6 について、siRNA でノックダウンすることで BMP-4 の *in vitro* 及び *in vivo* の作用を検討した。さらに RNA-seq や DNA microarray で BMP の新たな標的遺伝子の同定に成功した。

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、免疫組織染色はすでに報告した手法 (Ikushima et al. 2009; Katsumo et al., 2012) により行った。Lentiviral vector による細胞の遺伝子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) 本年度はヒト脳腫瘍細胞の RNA-seq による遺伝子解析を行うことから、東京大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会において審査のうえ、承認を得て行った (平成 24 年 5 月 7 日承認: G3532)。

5) 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) 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 ファミリー経路の新規標的遺伝子の探索のためにゲノムワイドに標的遺伝子の探索を行う予定で研究を進めた。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った。

また Luciferase 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・増大をリアルタイムで検出する実験系を確立した。我々はさらにマウスを屠殺して脳腫瘍組織の免疫染色を行った。平成 23 年度まで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。本年度は、未分化マーカーである Musashi や分化マーカーである GFAP を用いて

免疫組織染色を行ったが、Musashi 陽性細胞は主に血管周囲のほか、脳室及び脳周囲組織に見られた。脳内の大きな病変部位には明らかな陽性部位はまれであった。一方で GFAP は Musashi とは逆に脳内の大きな病変部位における染色性が強く、脳室及び脳周囲の病変は陰性であった。

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、TGF- β とは対象的に BMP は脳腫瘍幹細胞の分化を促進した。BMP-4 は、BMP-6 や BMP-9 に比べてより強力に脳腫瘍幹細胞に作用し、CD133 や Olig2、Sox2 の発現を低下させた。BMP-4 単独の処理では *in vivo* での腫瘍形成能には大きな影響を与えなかった。このため、BMP-4 の標的遺伝子を探索したところ、BMP-4 の機能を阻害する細胞外タンパク質 Noggin や細胞内タンパク質 Smad6 の発現が BMP-4 投与により上昇することが明らかとなった。このため、Noggin や Smad6 の発現を siRNA でノックダウンしたところ BMP-4 の作用の増強が見られ、CD133 や Sox2 の発現が顕著に減少した。また *in vivo* での腫瘍形成能も BMP-4 の単独処理に比較して、有意に抑えられることが明らかとなった。

3) BMP-4 の脳腫瘍幹細胞における標的遺伝子の同定

ChIP-seq 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。網羅的な標的遺伝子同定のため、平成 23 年までに我々は幹細胞という限られた量のサンプルから、RNA-seq を行う方法を確立し、研究を進めた。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。さらに本年度は RNA-seq 及び DNA microarray を行い、BMP-4 の標的遺伝子を中心に検討を行った。その結果、DNA microarray では BMP シグナル関連遺伝子、Transcription 関連遺伝子、Differentiation 関連遺伝子、Proliferation 関連遺伝子などが得られた。さらに脳腫瘍の予後との関連から有望な遺伝子の絞り込みを行い、約 100 個の BMP-4 標的遺伝子の絞り込みに成功した。

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。また BMP の脳腫瘍に対する有効性は、基礎研究成果は報告されているもののその後の研究の進展がほとんどなく、今後の

臨床応用に向けてその分子機構の研究が極めて注目されている。

平成24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を駆使して BMP の脳腫瘍幹細胞に対する作用を検討した。また、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。本研究の成果によって、将来 TGF- β 阻害剤や BMP-4 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。

BMP-4 はすでに欧米では整形外科領域などで骨や軟骨の誘導因子として臨床応用されているタンパク質で、脳腫瘍への応用が可能となればその臨床的有用性は極めて高いと考えられる。BMP-4 の前処理のみでは脳腫瘍の *in vivo* での腫瘍形成や増大には有意な効果が得られなかったが、Smad6 や Noggin をノックダウンすることで BMP-4 の効果を増強し、*in vivo* での腫瘍形成能を有意に抑制することが可能となった。我々は BMP-4 の標的遺伝子の同定に成功しており、今後、BMP のシグナル経路や標的遺伝子がさらに詳細に明らかになれば新たな治療法の開発につながるものと期待された。

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 の阻害剤は国外で臨床試験が開始され、その効果が期待されている。一方で本研究により TGF- β や BMP 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、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) Morikawa M, Koinuma D, Miyazono K, Heldin CH. (2013) Genome-wide mechanisms of Smad binding. **Oncogene**. 32 (13): 1609-1615.
- 2) Suzuki HI, Mihira H, Watabe T, Sugimoto K, Miyazono K. (2012) Widespread inference of weighted microRNA-mediated gene regulation in cancer transcriptome analysis. **Nucleic Acids Res**. 41 (5): e62.
- 3) Sundqvist A, Zieba A, Vasilaki E, Herrera Hidalgo C, Söderberg O, Koinuma D, Miyazono K, Heldin CH, Landegren U, ten Dijke P, van Dam H. (2012) Specific interactions between Smad proteins and AP-1 components determine TGF β -induced breast cancer cell invasion. **Oncogene**. 2012 Aug 27. doi: 10.1038/onc.2012.370. [Epub ahead of print]
- 4) 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.
- 5) Ishii R, Isogaya K, Seto A, Koinuma D, Watanabe Y, Arisaka F, Yaguchi S, Ikushima H, Dohmae N, Miyazono K, Miyazawa K, Ishitani R, Nureki O. (2012) Structure of a dominant-negative helix-loop-helix transcriptional regulator suggests mechanisms of autoinhibition. **EMBO J**. 31 (11): 2541-2552.
- 6) Ehata S, Yokoyama Y, Takahashi K, Miyazono K. (2013) Bi-directional Roles of Bone Morphogenetic Proteins in Cancer: Another Molecular Jekyll and Hyde? **Pathol Int**. in press.
- 7) Koga T, Maruyama K, Tanaka M, Ino Y, Saito N, Nakagawa K, Shibahara J, Todo T. (2012) Extended field stereotactic radiosurgery for recurrent glioblastoma. **Cancer**. 118 (17): 4193-4200.
- 8) Tsuji T, Nakamori M, Iwahashi M, Nakamura M, Ojima T, Iida T, Katsuda M, Hayata K, Ino Y, Todo T, Yamaue H. (2013) An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced *in vivo* antitumor effect against human gastric cancer. **Int J Cancer**. 132 (2): 485-494.
- 9) Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Todo T, Ino Y, Saito N, Aburatani H, Funato K, Echizen K, Sugano H, Haruta R, Matsui M, Takahashi R, Manabe E, Oda T, Akiyama T (2012) The critical role of cyclin D2 in cell cycle progression and tumorigenicity of glioblastoma stem cells. **Oncogene**. (published online 2012 Sep 10).
- 10) Tanaka M, Tsuno NH, Fujii T, Todo T, Saito N, Takahashi K. (2013) Human umbilical vein endothelial cell vaccine therapy in patients with recurrent glioblastoma. **Cancer Sci**. 104 (2): 200-205.
- 11) Shibui S, Narita Y, Mizusawa J, Beppu T, Ogasawara K, Sawamura Y, Kobayashi H, Nishikawa R, Mishima K, Muragaki Y, Maruyama T, Kuratsu J, Nakamura H, Kochi M, Minamida Y, Yamaki T, Kumabe T, Tominaga T, Kayama T, Sakurada K, Nagane M, Kobayashi K, Nakamura H, Ito T, Yazaki T, Sasaki H, Tanaka K, Takahashi H, Asai A, Todo T, Wakabayashi T, Takahashi J, Takano S, Fujimaki T, Sumi M, Miyakita Y, Nakazato Y, Sato A, Fukuda H, Nomura K. (2013) Randomized trial of chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy with nimustine (ACNU) versus nimustine plus procarbazine for newly diagnosed anaplastic astrocytoma

and glioblastoma (JCOG0305). **Cancer
Chemother Pharmacol.** 71 (2): 511-512.

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 ファミリーシグナル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 24 年度は TGF- β ファミリーの因子である BMP 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。BMP-4 は、BMP-6 や BMP-9 に比べてより強力に脳腫瘍幹細胞に作用したことから BMP の I 型受容体のなかでも ALK-3 や ALK-6 が重要であると考えられた。BMP-4 は CD133 や Olig2、Sox2 などの未分化マーカーの発現を低下させた。BMP-4 の標的遺伝子を探索したところ、BMP-4 の機能を阻害する細胞外タンパク質 Noggin や細胞内タンパク質 Smad6 の発現が BMP-4 投与により上昇することが明らかとなった。このため、Noggin や Smad6 の発現を siRNA でノックダウンしたところ BMP-4 の作用の増強が見られた。

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、IGF- 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 受容体の阻害剤の臨床試験など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。一方、IGF- β ファミリーの因子である BMP については、BMP が脳腫瘍幹細胞の分化を促進することは Piccirillo らによって 2006 年に報告されたが、その後は実験の困難さもあってほとんど研究が進められていないのが現状である (Piccirillo et al. Nature 2006)。

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. Cell Stem Cell 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。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、TGF- β ファミリーの因子がどのような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、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明らかにすることを目的として研究を行った。平成 24 年度は平成 23 年度に引き続き BMP の脳腫瘍幹細胞に対する作用

を検討した。とくに、BMP-4 の標的遺伝子を探索し、BMP-4 の機能を阻害する細胞外タンパク質 Noggin や細胞内タンパク質 Smad6 について、siRNA でノックダウンすることで BMP-4 の作用を検討した。

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、免疫ブロットティング、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。

(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) 本年度はヒト脳腫瘍細胞の RNA-seq による遺伝子解析を行うことから、東京大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会に

において審査のうえ、承認を得て行った（平成 24 年 5 月 7 日承認：G3532）。

5) 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) BMP-4 の脳腫瘍幹細胞に対する *in vitro* 作用

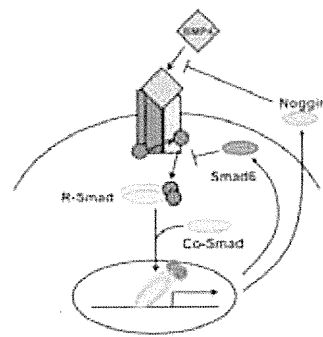
これまで我々は TGF- β の脳腫瘍幹細胞を中心に研究を進めて来たが、TGF- β ファミリーの他の因子の作用についても検討を行った。その結果、既報 (Piccirillo et al. 2006) のとおり、TGF- β とは対象的に BMP は脳腫瘍幹細胞の分化を促進した。BMP ファミリーの因子についてその作用を比較したところ、BMP-4, 6, 9 はいずれも分化促進作用が見られたが、とくに BMP-4 は、BMP-6 や BMP-9 に比べてより強力に脳腫瘍幹細胞に作用し、CD133 や Olig2、Sox2 の発現を低下させた。このことは BMP の 4 種類の I 型受容体のうち、とくに ALK-3 と ALK-6 が重要であり、ALK-2 や ALK-1 の関与は少ないことを示すものであった。

2) BMP-4 阻害因子 Smad6 と Noggin の作用

BMP-4 の標的遺伝子を探索したところ、BMP-4 の機能を阻害する細胞外タンパク質 Noggin や細胞内タンパク質 Smad6 の発現が BMP-4 投与により上昇することが明らかとなった。このため、Noggin や Smad6 の発現を siRNA でノックダウンしたところ BMP-4 の作用の増強が見られ、CD133 や Sox2 の発現が顕著に減少した。

Smad6 と Noggin はともに BMP-4 の比較的特異的な阻害分子である。Smad6 は活性化された BMP の I 型受容体 ALK-3 などに結合し、細胞内でシグナルを抑制する。一方で Noggin は細胞外で BMP-4 などある種の BMP タンパク質と結合し、BMP の作用を抑える。脳腫瘍幹細胞で Smad6 や Noggin をノックダウンしたところ、Smad6 のノックダウンでは脳腫瘍幹細胞の Sphere 形成能の低下が見られ、増殖抑制やアポトーシスの促進が誘導されている所見を得た。一方で Noggin のノックダウンでは脳腫瘍幹細胞の形態変化が見られ、分化誘導がより顕著に見られ、Smad6 と Noggin の役割に相違が見られることが示唆された。

細胞外と細胞内における BMP-4 の阻害因子



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 BMP の脳腫瘍に対する有効性は、基礎研究成果は報告されているもののその後の研究の進展がほとんどなく、今後の臨床応用に向けてその分子機構の研究が極めて注目されている。平成 24 年度までに我々は BMP の脳腫瘍幹細胞に対する作用を明らかにすることに成功し、その作用の検討を行った。その結果、BMP-4 は脳腫瘍幹細胞に作用して CD133 や Olig2 などの未分化マーカーの発現を低下させることを確認した。

BMP-4 はすでに欧米では整形外科領域などで骨や軟骨の誘導因子として臨床応用されているタンパク質で、脳腫瘍への応用が可能となればその臨床的有用性は極めて高いと考えられる。分担研究者の研究成果により、BMP-4 の前処理のみでは脳腫瘍の *in vivo* での腫瘍形成や増大には有意な効果が得られなかったが、Smad6 や Noggin をノックダウンすることで BMP-4 の効果を増強し、*in vivo* での腫瘍形成能を有意に抑制することが明らかとなった。今後、BMP のシグナル経路や標的遺伝子がさらに詳細に明らかになれば新たな治療法の開発につながるものと期待された。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morikawa M, Koinuma D, Miyazono K, Heldin CH. (2013) Genome-wide mechanisms of Smad binding. *Oncogene*. 32 (13): 1609-1615.
- 2) Suzuki HI, Mihira H, Watabe T, Sugimoto K, Miyazono K. (2012) Widespread inference of weighted microRNA-mediated gene regulation

in cancer transcriptome analysis. **Nucleic Acids Res.** 41 (5): e62.

- 3) Sundqvist A, Zieba A, Vasilaki E, Herrera Hidalgo C, Söderberg O, Koinuma D, Miyazono K, Heldin CH, Landegren U, ten Dijke P, van Dam H. (2012) Specific interactions between Smad proteins and AP-1 components determine TGF β -induced breast cancer cell invasion. **Oncogene**. 2012 Aug 27. doi: 10.1038/onc.2012.370. [Epub ahead of print]
- 4) 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.
- 5) Ishii R, Isogaya K, Seto A, Koinuma D, Watanabe Y, Arisaka F, Yaguchi S, Ikushima H, Dohmae N, Miyazono K, Miyazawa K, Ishitani R, Nureki O. (2012) Structure of a dominant-negative helix-loop-helix transcriptional regulator suggests mechanisms of autoinhibition. **EMBO J**. 31 (11): 2541-2552.
- 6) Ehata S, Yokoyama Y, Takahashi K, Miyazono K. (2013) Bi-directional Roles of Bone Morphogenetic Proteins in Cancer: Another Molecular Jekyll and Hyde? **Pathol Int**. 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・特任准教授

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。

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た。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 seq の方法を確立し、データ取得と解析を行った。さらに DNA microarray を行い、BMP-4 の標的遺伝子を中心に検討を行った。その結果、BMP シグナル関連遺伝子、Transcription 関連遺伝子、Differentiation 関連遺伝子、Proliferation 関連遺伝子などが得られた。さらに脳腫瘍の予後との関連から有望な遺伝子の絞り込みを行い、約 100 個の BMP-4 標的遺伝子の絞り込みに成功した。

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 受容体の阻害剤など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. Cell Stem Cell, 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(Ikushima et al. J Biol Chem, 2011)。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 ファミリーのシグナル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、前年度まで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。平成 24 年度は RNA-seq や DNA マイクロアレイによりデータを取得して TGF- β や BMP-4 投与時の遺伝子発現変化につき網羅的な検討を行った。

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。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 (Horiguchi et al, 2012)。RNA-seq は東京大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得て行った。RNA は PolyA selection の後、Epicentre 社の Scriptseq V2 およびタカラバイオ社の SMARTer Ultra Low RNA kit for Illumina Sequencing でのサンプル調製を行った。データ取得は Illumina 社の Genome Analyzer Ix または HiSeq system を用いて行った。

(倫理面への配慮)

1) この研究で行なった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) 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。

3) 本年度はヒト脳腫瘍細胞の RNA-seq による遺伝子解析を行うことから、東京大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会において審査のうえ、承認を得て行った（平成 24

年 5 月 7 日承認 : G3532)。

4) 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) 脳腫瘍幹細胞における TGF- β ファミリー応答性遺伝子発現変化の網羅的解析

分担研究者はこれまで、TGF- β のシグナル伝達について ChIP-chip 法を用いて検討を行った。その結果、組織・細胞特異的に Smad ファミリー分子が標的遺伝子発現制御領域に結合して、特異的な転写制御を行っていることが明らかとなっている(Morikawa et al, 2013)。本研究では ChIP-seq による Smad をはじめとした直接の標的遺伝子を同様に同定することを当初目指したが、幹細胞という限られたサンプルからのデータ取得が結果として困難であったため、急速に手法が確立しつつあった RNA-seq を活用することとした。

平成 23 年度から開始した微量のサンプルからの RNA-seq についての複数のライブラリー調製試薬を用いた検討の結果、100 pg 以上のサンプルからのデータ取得に成功し、1 ng からある程度の定量性が確保されることが確認された。平成 24 年度は実際に脳腫瘍幹細胞を用いて比較検討のためのデータ取得を行った。

脳腫瘍幹細胞の刺激には TGF- β のほか、TGF- β 受容体阻害剤 LY364947 を用いたサンプルを用意した。さらに TGF- β ファミリーの一つである Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4)が TGF- β とは反対に強力に脳腫瘍幹細胞分化を誘導することから、BMP-4 刺激のサンプルも合わせてデータ取得を行った。その結果ダイナミックレンジの大きい発現データセットを取得することに成功した。また、期待されたように得られたデータから機能未知の多くの転写産物が各種刺激によって発現変動することが見出された(図)。

さらに本年度は DNA マイクロアレイを行い、BMP-4 の標的遺伝子を中心に検討を行った。その結果、BMP シグナル関連遺伝子、Transcription 関連遺伝子、Differentiation 関連遺伝子、Proliferation 関連遺伝子などが得られた。さらに脳腫瘍の予後との関連から有望な遺伝子の絞り込みを行い、約 100 個の BMP-4 標的遺伝子の絞り込みに成功した。



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られる。

本研究で得られた RNA-seq データは各サンプル間のシーケンスタグ数の定量評価により、脳腫瘍幹細胞の分化誘導に伴い如何に遺伝子発現応答が劇的に変化しているか、その全体像を把握することが可能であった。RNA-seq によるデータ取得により、これまで見過ごされてきたものの近年その役割が非常に注目されている各種 non-coding RNA をはじめ、シグナル下流の重要な制御因子、機能因子を今後絞り込むことができるものと考えられる。その上で 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ことで、有効な治療法開発に向けた分子標的或いは診断マーカーの同定につながっていくことが期待された。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

- 論文発表
 - 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 down-regulation of ESRP. **Oncogene** 31 (26): 3190-3201.
 - 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.
 - Morikawa M, Koinuma D, Miyazono K, and Heldin C-H. (2013) Genome-wide mechanisms

- of Smad binding. **Oncogene** 32 (13): 1609-1615.
- 4) Sundqvist A, Zieba A, Vasilaki E, Herrera Hidalgo C, Söderberg O, Koinuma D, Miyazono K, Heldin CH, Landegren U, Ten Dijke P & van Dam H (2013) Specific interactions between Smad proteins and AP-1 components determine TGF- β -induced breast cancer cell invasion. **Oncogene**, in press. doi: 10.1038/onc.2012.370.
 - 5) Ishii R, Isogaya K, Seto A, Koinuma D, Watanabe Y, Arisaka F, Yaguchi S, Ikushima H, Dohmae N, Miyazono K, Miyazawa K, Ishitani R, Nureki O. (2012) Structure of a dominant-negative helix-loop-helix transcriptional regulator suggests mechanisms of autoinhibition. **EMBO J.** 31 (11): 2541-2552.

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・医科学研究所・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 ファミリーシグナル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、平成 23 年度に引き続き、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。また Luciferase 発現脳腫瘍幹細胞をマウス頭蓋内に移植することにより、マウスを屠殺することなく、腫瘍の形成・増大をリアルタイムで検出することを可能にした。Luciferase 発現脳腫瘍幹細胞を BMP-4 単独で処理したところ、in vivo で腫瘍形成能には大きな影響を与えなかった。このため、BMP-4 の機能を阻害する細胞外タンパク質 Noggin や細胞内タンパク質 Smad6 の発現を siRNA でノックダウンしたところ BMP-4 の作用の増強が見られ、in vivo で腫瘍形成能も有意に抑えられた。

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 受容体の阻害剤の臨床試験など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。一方、TGF- β ファミリーの因子である BMP については、BMP が脳腫瘍幹細胞の分化を促進することは Piccirillo らによって 2006 年に報告されたが、その後は実験の困難さもあってほとんど研究が進められていないのが現状であった (Piccirillo et al. Nature 2006)。

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. Cell Stem Cell 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。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た。

また、脳腫瘍幹細胞を移植した後、腫瘍の形成・増大をリアルタイムで検出することは手技上困難であり、これまでは屠殺して腫瘍の形成を見る以外に有効な方法がなかった。

本研究では、TGF- β ファミリーの因子が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 vivo で明らかにすることを目的と

して研究を行った。さら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た。

平成 24 年度は平成 23 年度に引き続き Luciferase 発現脳腫瘍幹細胞をマウス頭蓋内に移植することにより、マウスを屠殺することなく、腫瘍の形成・増大をリアルタイムで検出することを試みた。さらに BMP の脳腫瘍幹細胞に対する作用を検討し、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。幹細胞マーカーの発現、RNAi による遺伝子ノックダウン、免疫組織染色はすでに報告した手法 (Ikushima et al. 2009; Katsuno et al., 2012) により行った。

(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。

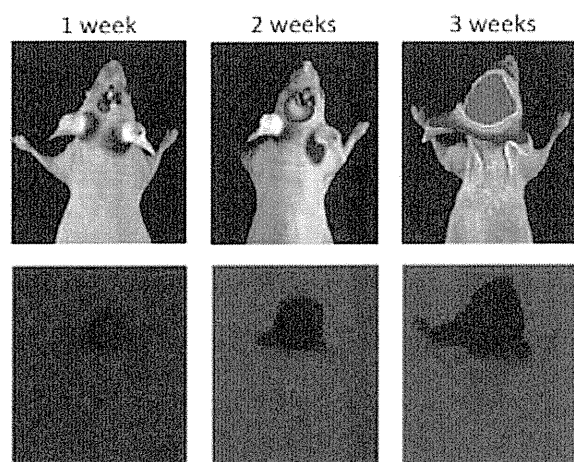
3) ヒトの遺伝子解析を行う研究は本研究計画には予定されていない。ヒト ES 細胞を用いた研究は本研究計画には予定されていない。

C. 研究結果

1) 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

平成 23 年度に引き続き我々は 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った。

また Luciferase 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・増大をリアルタイムで検出する実験系を確立した(下図)。我々はさらにマウスを屠殺して脳腫瘍組織の免疫染色を行った。平成 23 年度まで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。本年度は、未分化マーカーである Musashi や分化マーカーである GFAP を用いて免疫組織染色を行ったが、Musashi 陽性細胞は主に血管周囲のほか、脳室及び脳周囲組織に見られた。脳内の大きな病変部位には明らかな陽性部位はまれであった。一方で GFAP は Musashi とは逆に脳内の大きな病変部位における染色性が強く、脳室及び脳周囲の病変は陰性であった。



2) BMP-4 の脳腫瘍幹細胞に対する *in vivo* 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、TGF- β とは対象的に BMP は脳腫瘍幹細胞の分化を促進した。しかし、BMP-4 単独で脳腫瘍幹細胞を前処理した場合には *in vivo* での腫瘍形成能には

有意な影響を与えなかった。このため、BMP-4 の機能を阻害する細胞外タンパク質 Noggin や細胞内タンパク質 Smad6 の発現を siRNA でノックダウンしたところ *in vivo* での腫瘍形成能も BMP-4 の単独投与に比較して、有意に抑えられることが明らかとなった。

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 BMP の脳腫瘍に対する有効性は、基礎研究成果は報告されているもののその後の研究の進展がほとんどなく、今後の臨床応用に向けてその分子機構の研究が極めて注目されている。平成 24 年度までに我々は BMP の脳腫瘍幹細胞に対する作用を明らかにすることに成功した。

平成 24 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を駆使して BMP の脳腫瘍幹細胞に対する作用を検討した。本研究の成果によって、将来 TGF- β 阻害剤や BMP-4 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。

BMP-4 はすでに欧米では整形外科領域などで骨や軟骨の誘導因子として臨床応用されているタンパク質で、脳腫瘍への応用が可能となればその臨床的有用性は極めて高いと考えられる。BMP-4 の前処理のみでは脳腫瘍の *in vivo* での腫瘍形成や増大には有意な効果が得られなかったが、Smad6 や Noggin をノックダウンすることで BMP-4 の効果を増強し、*in vivo* での腫瘍形成能を有意に抑制することが可能となった。

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 の阻害剤は国外で臨床試験が開始され、その効果が期待されている。一方で本研究により TGF- β や BMP 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、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

- 論文発表
- 7) Koga T, Maruyama K, Tanaka M, Ino Y, Saito N, Nakagawa K, Shibahara J, Todo T. (2012) Extended field stereotactic radiosurgery for

- recurrent glioblastoma. **Cancer**. 118 (17): 4193-4200.
- 8) Tsuji T, Nakamori M, Iwahashi M, Nakamura M, Ojima T, Iida T, Katsuda M, Hayata K, Ino Y, Todo T, Yamaue H. (2013) An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced in vivo antitumor effect against human gastric cancer. **Int J Cancer**. 132 (2): 485-494.
 - 9) Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Todo T, Ino Y, Saito N, Aburatani H, Funato K, Echizen K, Sugano H, Haruta R, Matsui M, Takahashi R, Manabe E, Oda T, Akiyama T (2012) The critical role of cyclin D2 in cell cycle progression and tumorigenicity of glioblastoma stem cells. **Oncogene**. (published online 2012 Sep 10).
 - 10) Tanaka M, Tsuno NH, Fujii T, Todo T, Saito N, Takahashi K. (2013) Human umbilical vein endothelial cell vaccine therapy in patients with recurrent glioblastoma. **Cancer Sci**. 104 (2): 200-205.
 - 11) Shibui S, Narita Y, Mizusawa J, Beppu T, Ogasawara K, Sawamura Y, Kobayashi H, Nishikawa R, Mishima K, Muragaki Y, Maruyama T, Kuratsu J, Nakamura H, Kochi M, Minamida Y, Yamaki T, Kumabe T, Tominaga T, Kayama T, Sakurada K, Nagane M, Kobayashi K, Nakamura H, Ito T, Yazaki T, Sasaki H, Tanaka K, Takahashi H, Asai A, Todo T, Wakabayashi T, Takahashi J, Takano S, Fujimaki T, Sumi M, Miyakita Y, Nakazato Y, Sato A, Fukuda H, Nomura K. (2013) Randomized trial of chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy with nimustine (ACNU) versus nimustine plus procarbazine for newly diagnosed anaplastic astrocytoma and glioblastoma (JCOG0305). **Cancer Chemother Pharmacol**. 71 (2): 511-512.

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 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------|-----------|------|
| Morikawa M, <u>Koinuma D</u> , <u>Miyazono K</u> , Heldin CH. | Genome-wide mechanisms of Smad binding | Oncogene | 32 (13) | 1609-1615 | 2013 |
| Suzuki HI, Mihira H, Watabe T, Sugimoto K, <u>Miyazono K</u> . | Widespread inference of weighted microRNA-mediated gene regulation in cancer transcriptome analysis | Nucleic Acids Res | 41 (5) | e62 | 2012 |
| <u>Miyazono K</u> , Ehata S, <u>Koinuma D</u> . | Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer | Ups J Med Sci | 117 (2) | 143-152 | 2012 |
| Ishii R, Isogaya K, Seto A, <u>Koinuma D</u> , Watanabe Y, Arisaka F, Yaguchi S, Ikushima H, Dohmae N, <u>Miyazono K</u> , Miyazawa K, Ishitani R, Nureki O. | Structure of a dominant-negative helix-loop-helix trans- criptional regulator suggests mechanisms of autoinhibition | EMBO J | 31 (11) | 2541-2552 | 2012 |
| Koga T, Maruyama K, Tanaka M, Ino Y, Saito N, Nakagawa K, Shibahara J, <u>Todo T</u> . | Extended field stereotactic radiosurgery for recurrent glioblastoma | Cancer | 118 (17) | 4193-4200 | 2012 |

REVIEW

Genome-wide mechanisms of Smad binding

M Morikawa^{1,2}, D Koinuma², K Miyazono^{1,2} and C-H Heldin¹

A dual role of transforming growth factor β (TGF- β), to both suppress and promote tumor progression and metastasis, has been well established, but its molecular basis has remained elusive. In this review, we focus on Smad proteins, which are central mediators of the signal transduction of TGF- β family members. We describe current knowledge of cell-type-specific binding patterns of Smad proteins and mechanisms of transcriptional regulation, obtained from recent studies on genome-wide binding sites of Smad molecules. We also discuss potential application of the genome-wide analyses for cancer research, which will allow clarification of the complex mechanisms occurring during cancer progression, and the identification of potential biomarkers for future cancer diagnosis, prognosis and therapy.

Oncogene (2013) 32, 1609–1615; doi:10.1038/onc.2012.191; published online 21 May 2012

Keywords: ChIP-chip; ChIP-sequencing; TGF- β ; BMP; Smad

INTRODUCTION

Members of the transforming growth factor β (TGF- β) family, which include three TGF- β isoforms, as well as activins, nodal and bone morphogenetic proteins (BMPs), regulate a variety of cellular processes including differentiation, proliferation, migration and cell death in cell-type-specific and context-dependent manners.^{1–3} The biological effects of TGF- β family members are highly contextual, for example, their responses may differ in different tissues, local environments and stage of disease. Since TGF- β activates cytostatic and cell death processes that maintain homeostasis in mature tissues, it functions as a suppressor of epithelial cell tumorigenesis at early stages. Inactivation of the TGF- β signaling pathway through mutation and/or loss of heterozygosity of TGF- β receptors or Smad proteins has been found in certain types of cancer and is related to poor prognosis for the patients (reviewed in Levy and Hill⁴). However, TGF- β promotes tumor progression by enhancing migration, invasion and survival of tumor cells during the later stages of tumorigenesis, through stimulating extracellular matrix deposition and tissue fibrosis, perturbing immune and inflammatory function, stimulating angiogenesis and promoting epithelial–mesenchymal transition (reviewed in Yoshimura *et al.*⁵, Roberts and Wakefield⁶, Moustakas and Heldin⁷ and Miyazono *et al.*⁸). Accumulating evidences also indicate critical roles of TGF- β /activin signaling in the maintenance of stem cell-like properties of certain cancer-initiating cells, such as glioma-initiating cells,^{9,10} breast cancer-initiating cells,¹¹ pancreatic cancer-initiating cells,¹² and leukemia-initiating cells in chronic myeloid leukemia.¹³ Intriguingly, small molecular inhibitors for type I receptors have therapeutic effects at least in animal models.^{9,10,12,13} These observations suggest that targeting the TGF- β /activin signaling pathways could be an attractive therapy in certain advanced cancers, although it is possible that shutdown of these pathways in normal tissues will increase the risk for the development of other tumors. Thus, one of the major questions that remain to be addressed in this field is what defines the dual role of TGF- β in cancer biology.

Identification of the signaling components of TGF- β family members, including membrane receptor serine/threonine kinases and Smad transcription factors, has led to an understanding of the molecular mechanisms underlying this highly contextual process.^{14,15} Genome-wide transcriptome analyses in various cell types have identified many target genes that are required for ligand-mediated cellular responses. Direct binding of Smad complexes was confirmed by *in vitro* binding assays, promoter assays and chromatin immunoprecipitation (ChIP) followed by polymerase chain reaction. Until recently, however, regulatory elements were mainly identified in the promoter regions of the target genes, especially 1–2 kb upstream of their transcription start sites.

ChIP with promoter array analysis (ChIP-chip) and ChIP followed by sequencing (ChIP-seq) have become powerful tools to analyze genome-wide mapping of protein-binding sites and epigenetic marks.^{16,17} In this case, a DNA sample obtained after ChIP procedure is analyzed using promoter-tiling arrays, or massively parallel sequencing (Supplementary Figure 1), which provides a comprehensive chromatin-binding landscape of target transcription factors. Information obtained by these analyses has shed light on previously unrecognized mechanisms and sometimes challenged notions previously characterized in a specific situation. Recently, several groups have reported that Smad proteins tend to co-occupy target sites with cell-type-specific master transcription factors.^{18–20} The results also indicate that co-occupied regions mainly overlap with enhancer elements, although previous studies have identified numerous Smad-responsive elements in the promoter regions of their target genes. In addition, recent ChIP-chip/ChIP-seq studies have identified a group of direct target genes, or target gene signatures, in specific cell types and cellular contexts. Intriguingly, Kennedy *et al.*²¹ reported that the TGF- β /Smad4 target gene signature identified in ovarian cancer cell lines predicts patient survival.

In this review, we discuss current knowledge of cell-type-specific binding patterns of Smad proteins and mechanisms of transcriptional regulation obtained from recent ChIP-chip/

¹Ludwig Institute for Cancer Research, Science for Life Laboratory, Uppsala University, Biomedical Center, Uppsala, Sweden and ²Department of Molecular Pathology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan. Correspondence: Professor K Miyazono, Department of Molecular Pathology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan.

E-mail: miyazono@m.u-tokyo.ac.jp

Received 1 March 2012; revised 5 April 2012; accepted 13 April 2012; published online 21 May 2012

ChIP-seq studies (Supplementary Table 1). We also highlight applications of the genome-wide analyses for cancer research. These insights contribute to the unraveling of the complex mechanisms of TGF- β signaling in cancer biology.

OVERVIEW OF SIGNALING PATHWAYS OF TGF- β FAMILY MEMBERS

The TGF- β family consists of 33 members in mammals. Two types of serine/threonine kinase transmembrane receptors, that is, type II and type I receptors, are required for intracellular signal transduction by the TGF- β family members.¹⁴ Five type II receptors and seven type I receptors are present in mammals.²² Ligand binding assembles specific type II and type I receptors into heterotetramers. Then the type II receptor transphosphorylates and activates the type I receptor, which subsequently transduces the signal by phosphorylating the carboxyl terminus of receptor-regulated (R)-Smad. In most cell types, TGF- β and activin induce phosphorylation of Smad2 and Smad3 (activin/TGF- β -specific R-Smads, or AR-Smads) and BMPs induce phosphorylation of Smad1, Smad5 and Smad8 (BMP-specific R-Smads, or BR-Smads). Activated R-Smads form heterooligomeric complexes with common-partner (co)-Smad (Smad4). The complexes translocate into the nucleus where they regulate the expression of target genes, such as the genes for *Serpine1* (plasminogen activator inhibitor-1), inhibitory (I)-Smads (Smad6 and Smad7) and *Id1* (inhibitor of differentiation-1 or inhibitor of DNA binding-1) (Figure 1). Because of their relatively low DNA-binding affinity, Smad complexes interact with a wide variety of DNA-binding proteins and cooperatively regulate a synexpression group of target genes (Figure 2a).² So far, several transcription factors, such as AP-1,²³ ETS,^{24,25} basic helix-loop-helix proteins,^{26,27} C/EBP β ,²⁸ FoxH1^{29,30} and FoxO³¹ have been identified and validated as important cofactors of TGF- β /BMP signaling pathways. In addition, Smad complexes recruit coactivators, such as p300 and CREB-binding protein,^{32,33} or corepressors, such as ATF-3.³⁴ For example, TGF- β represses transcription of the *Id1* gene in epithelial cells through formation of a complex with ATF-3, while TGF- β induces *Id1* in cells which do not express ATF-3, such as glioma-initiating cell-like cells.³⁵ Since ATF-3 is induced by tumor necrosis factor- α , signaling crosstalk between TGF- β and tumor necrosis factor- α pathways determines the transcriptional regulation of *Id1*. Thus, crosstalk with other signaling pathways and interaction with other DNA-binding cofactors define the specific binding patterns of Smads; in addition, interaction with coactivators/corepressors modulates their transcriptional activity (Figure 1).

Smad proteins are targets of protein modifications, such as phosphorylation, ubiquitination and ADP-ribosylation. The cyclin-dependent kinases (CDKs) CDK8 and CDK9, which are downstream effectors of extracellular-signal-regulated kinase (ERK) MAP kinase, phosphorylate the linker region of Smads in the nucleus.³⁶⁻³⁹ Glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) also phosphorylates the linker region of Smads, which requires priming phosphorylation by ERK MAP kinase.⁴⁰ These phosphorylations mark the proteins for polyubiquitination and promote proteasome-mediated degradation of Smad complexes. Several WW domain proteins have been reported to recognize the phosphorylated linker regions and interact with R-Smads.⁴¹ Smurf1 is a member of the E3 ubiquitin ligase family, which can target BR-Smads for degradation,⁴² while NEDD4L (also known as NEDD4-2) is an E3 ubiquitin ligase for AR-Smads.^{43,44} Consequently, endogenous ERK MAPK and GSK3 β signaling pathways are able to antagonize Smad activity through proteasome-mediated degradation. Recently, deubiquitinating enzymes (DUBs) for Smad proteins have been identified.^{45,46} Monoubiquitination of the lysine-519 (K519) residue of Smad4 prevents its association with R-Smads and negatively regulates TGF- β /BMP signaling pathway. USP9x (also

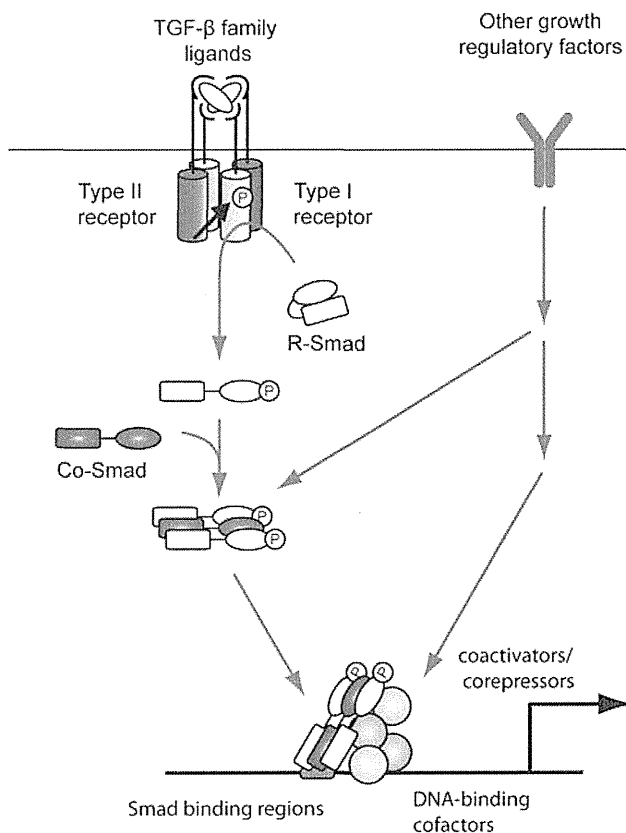


Figure 1. Signaling of TGF- β family members through Smad complexes. Smad proteins are central mediators of the signal transduction of TGF- β family members. Ligand binding assembles specific type II and type I receptors into heterotetramers. The type II receptor transphosphorylates (P) and activates the type I receptor, which subsequently activates receptor-regulated (R)-Smads. Activated R-Smads form heterooligomeric complexes with common-partner (co)-Smad. In the nucleus, Smad complexes interact with DNA-binding cofactors and cooperatively regulate a group of target genes. Crosstalk with other growth regulatory factors affects the specific binding patterns and transcriptional activity of Smads.

known as FAM) has been identified as a DUB that reverts this modification.⁴⁵ R-Smads are monoubiquitinated in their DNA-binding domains, which attenuates their affinity for DNA. This monoubiquitination is opposed by another DUB, USP15.⁴⁶ Recently, Lonn *et al.*⁴⁷ found that Smad proteins are targets of ADP-ribosylation. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) interacts with and ADP-ribosylates Smad3 and Smad4 in the nucleus, and affects the binding affinity of Smad complexes in a context-dependent manner.^{47,48} Thus, posttranslational modifications of Smad proteins affect their signal transduction capacities; some of these modifications are regulated by other signaling pathways (Figure 1).

SMAD-BINDING MOTIFS

The R-Smads and Smad4 are composed of two evolutionarily conserved domains named Mad Homology 1 and 2 (MH1 and MH2). The MH2 domain plays an important role for the formation of heterooligomeric Smad complexes and transcriptional activation, whereas the MH1 domain is responsible for sequence-specific DNA-binding activity. Using a polymerase chain reaction-based random-oligonucleotide selection process, an 8-bp palindromic DNA sequence, GTCTAGAC, was identified as a Smad3

and Smad4 binding motif.⁴⁹ In contrast to Smad3 and Smad4, Smad2 does not directly bind to DNA due to steric hindrance by an inserted sequence in the DNA-binding region.⁵⁰ The crystal structures of the MH1 domain of Smad1 and Smad3 have revealed that R-Smads recognize and directly bind to half of the palindrome, that is, GTCT or AGAC sequences, through an 11-amino-acid residue β -hairpin loop in the MH1 domain.^{51–53} The amino-acid sequences of the loop are completely conserved among R-Smads and show a high level of similarity between R-Smads and Smad4. The half-site sequences are usually referred to as the CAGA box or Smad binding element (SBE). Recent ChIP-chip/ChIP-seq studies have confirmed that the SBE is enriched in the Smad2/3-binding regions.^{18,24,26,54,55}

Although the MH1 domain of Smad1 has high affinity for SBE,^{52,53} BR-Smads seem to prefer a GC-rich sequence, such as GCCGnCGC, which was originally identified in *Drosophila*.⁵⁶ In mammals, GC-rich sequences, such as GCCG and (T)GGCGCC, have been identified in the promoter regions of several BMP target genes. Using a *de novo* motif-finding method, we identified a Smad1/5-binding motif, which is consistent with the previously reported GC-rich sequences and thus named as GC-rich SBE (GC-SBE).⁵⁷ Importantly, both GC-SBE and SBE are enriched in the Smad1/5-binding sites identified in both endothelial cells (ECs) and pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs).⁵⁷ Since binding motifs for R-Smads have been identified *in vitro* and *in vivo*, candidate Smad-binding sites can be predicted in the promoter regions of the target genes. However, these motifs are common throughout the genome, and the majority of them are not occupied by R-Smads when examined using ChIP-chip/ChIP-seq. Thus, additional mechanisms operate to determine the binding patterns of Smads.

FACTORS THAT DETERMINE THE BINDING PATTERNS OF SMADS

Recent studies have suggested that Smad complexes colocalize with master transcription factors that specify and maintain cell identities.^{18–20} Chen *et al.*²⁰ pointed out that Smad1 colocalizes in the multiple transcription factor-binding loci with embryonic stem (ES) cell-specific transcription factors, such as Oct4 and Sox2 in mouse ES cells (mESCs). Mullen *et al.*¹⁸ reported that binding regions of Smad3 also overlap with those of Oct4 in both human and mouse ES cells. Intriguingly, at least some of these co-occupied regions are still enriched after tandem ChIP-re-ChIP experiments, indicating that Oct4 and Smad3 bind to similar regions in mESCs simultaneously.¹⁸ Moreover, Smad3 colocalizes with MyoD (encoded by *Myod1*) or PU.1, master transcription factors controlling muscle or hematopoietic differentiation, respectively, in specific cell types which express these genes; forced expression of MyoD in mESCs is sufficient to redirect Smad3 to muscle specific binding sites, where they colocalize.¹⁸ In addition, Trompouki *et al.*¹⁹ reported that induction of the myeloid lineage regulator C/EBP α shifted Smad1 to sites newly occupied by C/EBP α in the human erythroleukemia cell line K562. Overexpression of the erythroid regulator GATA1 restricts Smad1 binding to erythroid genes, while binding to genes expressed in other lineages is diminished.¹⁹ These findings suggest that Smad complexes are passively recruited to cell-type-specific binding sites through the interaction with master transcription factors.

On the other hand, we recently found that HNF4 α , one of the master regulators of hepatocyte differentiation and liver function, contributes to the hepatocyte-specific binding pattern of Smad2/3.⁵⁸ Interestingly, 32.5% of the Smad2/3-binding regions overlapped with those of HNF4 α . This is against the simple model in which cell-type-specific master regulators recruit R-Smads to their binding sites and determine their function. In addition, through the analysis of the distances between the Oct4 peak and the peaks of Sox2 and Smad3 in mESCs, Mullen *et al.*¹⁸ found that

Oct4 sites are more closely associated with Sox2 sites than Smad3 sites, suggesting that Oct4 and Smad3 do not interact in a direct manner. They revealed that nucleosomes were relatively depleted at the sites co-occupied by cell-type-specific master transcription factors and Smad3, and hypothesized that master transcription factors increase the accessibility of SBEs and contribute to Smad3 binding. Intriguingly, MyoD binding has been reported to be associated with local histone acetylation.⁵⁹ PU.1 and C/EBP α binding has been reported to induce nucleosome remodeling, followed by monomethylation of H3K4.⁶⁰ John *et al.*⁶¹ reported that cell-type-specific glucocorticoid receptor binding patterns are comprehensively predetermined by cell-specific differences in baseline chromatin accessibility patterns, with secondary contributions from local sequence features. Similarly, comparison of Smad1/5-binding patterns of ECs and PASMCs suggested that the endothelial-specific binding pattern of Smad1/5 is predetermined by baseline chromatin accessibility patterns.⁵⁷ Thus, these facts support the notion that Smad complexes determine their target sites together with other DNA-binding cofactors in two different ways: (1) cell-type- or lineage-specific transcription factors, or pioneer factors,⁶² open up local chromatin structure to make SBE and GC-SBE accessible and (2) DNA-binding cofactors, induced and activated in context-dependent manner, strengthen the interaction between Smad and DNA (Figure 2b).

Intriguingly, it has been observed that different levels of activation of Smad signaling pathways cause different binding patterns of Smad complexes, possibly correlating to the amount of activated Smad complexes in the nucleus.⁶³ It has been well described that different concentrations of activin regulate the expression of distinct subsets of target genes.⁶⁴ Lee *et al.*⁵⁴ confirmed that phospho-Smad2 is dose-dependently able to bind to different subsets of target genes and regulate their transcription in mESCs. Comparing the ChIP-seq data of different BMP isoforms in ECs, we found that each binding site has different binding affinity for Smad complexes and that the strength of Smad1/5 signaling affects the number and distribution of Smad-binding sites over the genome.⁵⁷ Thus, these findings suggest that a distinct dose-dependency occurs in the regulation of different subsets of target genes, which may cause phenotypic change.

SMAD BINDING AND HISTONE MODIFICATION MARKERS

As discussed above, local chromatin structure or accessibility affects the binding patterns of Smads. Recent studies have emphasized the importance of enhancers for the precise regulation of expression of target genes.^{18–20,54,57} On the other hand, several groups have found that most of the Smad-binding sites are located at promoters of known genes.^{30,65,66} Kim *et al.*³⁰ reported that 50–60% of Smad2/3 binding occurs in exons and promoters in human ES cells (hESCs), while only 10–15% of Smad binding occurs in exons and promoters in derived endoderm. This finding suggests that the preference of binding pattern of Smads to either promoters or enhancers is modulated by the differentiation stages.

Smad proteins have also been shown to induce local chromatin remodeling and modification at their binding sites. Both Smad1/5 and Smad2/3 have been reported to physically interact with a histone demethylase, KDM6B (also known as JMJD3), to recruit it to the *NOG* (encoding noggin) and *NODAL* promoter regions, respectively, and to cause the loss of the repressive mark histone H3 lysine-27 trimethylation (H3K27me3) in mESCs.^{67,68} Recently, Kim *et al.*³⁰ reported that Smad2/3 and KDM6B are simultaneously enriched in the *GSC* (encoding goosecoid) and *EOMES* (encoding eomesdermin) promoter of hESCs after activin treatment, followed by the loss of the H3K27me3 repressive mark (Figure 3a). Interestingly, Fei *et al.*⁶⁵ identified that KDM6B is one of