

論文の内容の要旨

論文題目 TGF- β シグナルの抑制の細胞生物学的役割

指導教員 宮園浩平教授

東京大学大学院医学系研究科

平成16年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

東條眞義

TGF- β family は TGF- β 、Activin、Nodal、bone morphogenetic protein (BMP) などからなる多機能性のサイトカインで細胞の増殖、分化、接着、移動、アポトーシス等多彩な生物活性を有する。TGF- β シグナルは type I、II と呼ばれる 2 種類のセリン・スレオニンキナーゼ型レセプターを介して伝えられる。リガンドが結合すると type II レセプターが Activin receptor-like kinase (ALK) と呼ばれる type I レセプターをリン酸化し、それによって様々なタンパク質が活性化され細胞内にシグナルを伝える。ALK family は ALK-1-7 まで同定されている。ALK-4、5、7 は構造的に類似しており、TGF- β は ALK-5、Activin は ALK-4 にそれぞれ結合する。Nodal のシグナルは ALK-4、7 を介して伝えられる。ALK-1、2、3、

6はBMPと結合する。ALK-1は内皮細胞によく発現しており、TGF- β とも結合することが知られている。

TGF- β familyの細胞内の主要なシグナル伝達因子はSmadと呼ばれる。Smadは哺乳類では8種類存在し、レセプター特異型Smad (R-Smad)、共有型Smad (Co-Smad)、抑制型Smad (I-Smad)の3つのグループに分類される。Smad2、3はTGF- β 、Activin、NodalのレセプターであるALK-4、5、7によって活性化されるR-Smadで、Smad1、5、8はBMP特異的なR-Smadである。type Iレセプターによってリン酸化されたR-SmadはTGF- β familyに共通のCo-SmadであるSmad4と複合体を形成し、細胞質から核内へ移行し標的遺伝子の発現を誘導する。Smad6、7はI-Smadに分類されSmad6は主にBMPを抑制し、Smad7はTGF- β 、Activin、BMPいずれも抑制する。

(1) 新規 TGF- β レセプターキナーゼ阻害剤の探索と作用機序の検討

TGF- β シグナルが関係する疾患は癌、線維性疾患等があるが、特に癌において重要な役割が報告されている。TGF- β は強い細胞増殖抑制作用を持つため癌の種類によっては腫瘍の増大を抑制することができる。しかし病変が進展すると癌細胞はTGF- β の細胞増殖抑制作用に対し不応性になり、TGF- β が過剰に発現するようになる。そのため癌細胞の上皮間葉移行 (Epithelial-to-mesenchymal transition、EMT) を誘導し、さらに免疫抑制、細胞外マトリックス産生、血管新生を促進し癌の浸潤、転移を促進する増悪因子として作用する。そのためTGF- β シグナルの阻害剤の開発は進行癌を含む多くの疾患の分子標的治療として期待される。

TGF- β シグナルの伝達ではALKレセプターが特異性において重要であ

り、これらを標的とすることで特異的で根本的なシグナルの抑制効果が得られる可能性が考えられる。本研究では新規の TGF- β レセプターキナーゼ阻害剤の探索を目的として TGF- β の type I レセプターである ALK-5 の恒常活性型を用いてルシフェラーゼアッセイを行い17種類の合成化合物を評価したところ、ALK-5 の恒常活性型による転写活性上昇を強力に抑制する A-83-01 を見いだした。その効果は既存のキナーゼ阻害剤の 2 - 10 倍の強さを持ち、R-Smadである Smad2 のリン酸化や TGF- β による細胞増殖阻害作用、癌転移の成立に重要なEMTの誘導作用を抑制した。また A-83-01 は Activin や Nodal のレセプター活性を阻害したが、BMPレセプターや MAPK シグナルに対しては効果を示さないか、高濃度でのみ活性を阻害した。以上の結果から A-83-01 とその関連分子が TGF- β 、Activin、Nodal シグナルを強力に抑制し、進行癌を含む特定の疾患の治療に役立つ可能性が考えられた。

(2) Smad7 ノックアウトマウスの作成と機能解析

TGF- β family は多様な生命現象に関わっているため、その異常は多くの疾患と関わりがあり、TGF- β シグナルの上昇は線維性疾患や癌の悪性化に関係する一方で、シグナルの減少はアレルギー、自己免疫疾患等の発症、増悪に関係することが報告されている。そのため TGF- β シグナルの強さは厳密に調節されており臓器や細胞系列に応じて一定の範囲内であると考えられる。TGF- β シグナルの阻害剤が進行癌を含む多くの疾患の治療となりうることは本研究以外にも複数報告されているが、生体内での TGF- β シグナルの抑制によって重篤な副作用を引き起こす可能性も

否定できない。また TGF- β シグナルの抑制機構の障害自体で炎症性腸疾患を引き起こすことが報告されている。以上のことから TGF- β シグナルの抑制機構の機能解析は関係する疾患の発症メカニズム解明や治療法の開発において重要であると考えられる。生体内での TGF- β シグナルの抑制機構の詳細な機能解析を目的として、I-Smad である Smad7 の Cre-loxp 系を用いたコンディショナルノックアウトマウスを作成した。はじめに全身で Smad7 を欠失させるために、Cre リコンビナーゼが受精卵で発現している *ayu-1 cre* トランスジェニックマウスと掛け合わせ表現型の解析を行った。その結果 C57BL/6 の系統からは Smad7 ノックアウトマウスが誕生せず、遺伝的背景が異なる ICR と交配させた系統では体の縮小や体重減少が認められた。また多くの臓器でも縮小を認め、とくに胸腺の縮小は著明であった。組織学的解析では明らかな異常を認めなかったが、胸腺で BrdU による免疫組織化学を行ったところ BrdU の取り込み減少を認め細胞増殖の低下が示唆された。Mouse embryonic fibroblast を用いた免疫ブロッティングの解析で Smad7 の欠失、無刺激の状態でリン酸化 Smad2、ALK-5 の発現上昇を認め、内因性に TGF- β シグナルが上昇していることが考えられた。

本研究で報告する新規 TGF- β レセプターキナーゼ阻害剤と Smad7 コンディショナルノックアウトマウスを用いて、より詳細な TGF- β シグナルの抑制の細胞生物学的役割が明らかとなることが示唆された。