

審査の結果の要旨

氏名 東條眞義

本研究は多様な生命現象に関わっている TGF- $\beta$ シグナルの抑制の細胞生物学的役割を明らかにする目的で、新規 TGF- $\beta$ レセプターキナーゼ阻害剤の探索と作用機序の検討及び Smad7 コンディショナルノックアウトマウスの作成と解析を行い、下記の結果を得ている。

1. TGF- $\beta$ 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、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。
2. A-83-01 は R-Smad である Smad2 のリン酸化や TGF- $\beta$ 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。これらの結果から A-83-01 とその関連分子が TGF- $\beta$ 、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。
3. 生体内での TGF- $\beta$ シグナルのより詳細な抑制機構の解析を目的として、抑制型 Smad で他のシグナルとクロストークする際にも重要である 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、生体内での機能解析を行った。
4. 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 C57BL6 の系統からは成体となる Smad7 ノックアウトマウスは数多くの交配を行ったにもかかわらず、わずかしかが得られなかった。
5. ICR の ayu-1 cre トランスジェニックマウスと掛け合わせた系統から得たノックアウトマウス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。
6. Mouse embryonic fibroblast を用いた免疫ブロッティングの解析で Smad7 の欠失、無刺激の状態でもリン酸化 Smad2、ALK-5 の発現上昇を認め、内因性に TGF- $\beta$ シグナルが上昇していることが考えられた。

以上、本論文は TGF- $\beta$ シグナルを強力に抑制する新規阻害剤を見だし、TGF- $\beta$ シグナルの抑制因子である Smad7 のコンディショナルノックアウトマウスを作成し、生体内での機能を解析した。TGF- $\beta$ シグナルが関与する生命現象や疾患のメカニズム解明や治療に重要である、TGF- $\beta$ シグナルの抑制機構の解明に本研究は重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。