

論文の内容の要旨

論文題目: Synexpression group-restricted regulation of TGF- β signaling

和訳: 協働発現遺伝子群特異的な TGF- β シグナル経路の制御

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 18 年 4 月入学
医学博士課程
病因・病理学専攻

生島 弘彬

増殖因子は細胞の増殖・分化を制御し、細胞間のコミュニケーションを担うことで、多細胞生物の恒常性の維持に必須のネットワークを形成している。そのため、そのネットワークの破綻は種々の疾患につながり、その中でも特に、細胞増殖シグナルの異常な亢進は悪性腫瘍の発生に大きく寄与している。この考えに基づき、これまでに、細胞増殖シグナルの抑制を目的として、様々な増殖因子シグナル経路を標的とした抗腫瘍薬の開発が進められてきた。

しかしながら、それら多くの増殖因子群の中で transforming growth factor (TGF)- β シグナルは、悪性腫瘍の発生という観点から見ると、他の増殖因子とは大きくことなつた性質をもっている。TGF- β シグナルは上皮系の多くの正常細胞や上皮系由来の悪性腫瘍細胞に対しては増殖抑制作用をもつが、線維芽細胞や骨肉腫細胞、神経膠腫細胞に対しては増殖促進の作用を示す。また、TGF- β シグナルは多くの細胞に対してアポトーシス誘導作用を持つが、特定の環境下ではアポトーシス抑制的に働くことも知られている。さらに、TGF- β シグナルは上皮間葉転換の誘導、細胞運動能の亢進、細胞外マトリックスの産生制御等を通じて、悪性腫瘍

細胞の転移を促進する作用も持ち合わせている。ゆえに、悪性腫瘍発生・進展における TGF- β シグナルの作用は、腫瘍促進的な側面と腫瘍抑制的な側面とがあり、それは細胞の起源、組織型、周囲微小環境等の無数のパラメーターによって決定されることになる。そのため、TGF- β シグナルが悪性腫瘍の発生・進展に大きな作用を持つことがこれまでに知られていながら、抗腫瘍薬の標的因子として TGF- β シグナルをとらえた際に、シグナルを増強すべき対象であるのか、抑制すべき対象であるのかの判断がつかず、例えば、TGF- β シグナルの阻害剤を用いた動物腫瘍モデルの治療実験においても、モデル次第で腫瘍増大の効果も腫瘍縮小の効果も報告されてきていた。さらには、いかにして TGF- β シグナルが細胞の状況によって異なった作用をもたらしているのかというメカニズムについてもこれまで全く解明されてはこなかった。

本研究においてはまず、新規 Id 様タンパク質 HHM (Human Homolog of Maternal Id-like molecule) が TGF- β シグナルの新規抑制因子であることを見出した。しかしながら、HHM は TGF- β シグナル依存的な Smad タンパク質の核移行には影響を及ぼさず、核内での転写レベルによる TGF- β シグナルへの作用が示唆された。さらに、HHM は TGF- β シグナルによって引き起こされる細胞応答のうち、細胞増殖抑制作用、細胞運動能亢進作用には抑制的に働くが、上皮間葉転換に対しては抑制的な作用を示さず、HHM が細胞応答特異的な TGF- β シグナル抑制作用をもつことを見出した。また同時に、HHM は、TGF- β 刺激によって誘導される下流遺伝子のうち、一部の遺伝子の発現のみを抑制することを見出した。定量的 RT-PCR の結果から、HHM は *PAI-1* (*Serpine1*), *Smad7*, *p21^{WAF1}*, *p15^{INK4b}* などの TGF- β 下流遺伝子の発現に対しては抑制的に作用するが、*Snail*, *LIF* などの TGF- β 下流遺伝子の発現に対しては有意な発現調節を及ぼさないことが確認された。

細胞表面の受容体に TGF- β リガンドが結合すると、それは、受容体のリン酸化、Smad タンパクのリン酸化へと情報形態を変え、最終的にはリン酸化した Smad タンパクが核内で TGF- β の標的遺伝子のプロモーター領域に結合することで、下流遺伝子の発現を制御している。しかし、Smad タンパク (Figure 1、青四角) のみでは、DNA への結合能は弱く、プロモーター領域へ結合するためには、他の DNA 結合性転写因子 (cofactor: Figure 1、赤・黄・

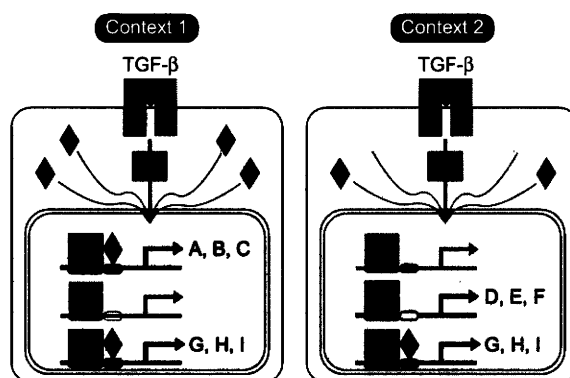


Figure 1.

緑ダイヤモンド) と結合し協調的に作用する必要がある。この際、この DNA 結合性転写因子の発現プロファイルの違い、及びその DNA 結合配列の有無により、転写が誘導される遺伝子に違いが生じてくる。このように特定の "Smad-cofactor" 複合体によって誘導される遺伝子群

は"synexpression group" (協働発現遺伝子群) と呼ばれ、特定の synexpression group により一つの細胞応答が引き起こされるというモデルが提唱されている。

前述の通り、HHMは細胞応答特異的に TGF- β シグナルを抑制することが分かったが、HHMの一次構造が転写抑制因子として知られている Id タンパクと類似していることから、この HHM が特定の synexpression group にのみ作用し、その結果特定の細胞応答のみを抑制しているという作業仮説を立て、プロテオミクス解析によりその標的因子の探索を行った。その結果、Olig1 (oligodendrocyte transcription factor 1) と呼ばれる DNA 結合性転写因子が新規 HHM 結合タンパク質として同定された。Olig1 はこれまでにその中央部分に basic helix-loop-helix 領域と呼ばれる DNA 結合性領域を持つことが分かっているが、その他の機能的な解析や TGF- β シグナルとの関与については報告がない。

Olig1 についてさらなる解析を進めた結果、Olig1 が Smad2, Smad3 と TGF- β シグナル依存的に複合体を形成し、さらに Smad 結合配列及び Olig1 結合配列を含む DNA 配列に TGF- β シグナル依存的に結合することを見出した。加えて、Olig1 の発現をノックダウンした状況下では、TGF- β シグナル下流遺伝子のうち一部の遺伝子のみについて TGF- β 刺激による誘導が減弱するが、同一条件下でも TGF- β 刺激による誘導に有意な変化が認められない下流遺伝子も存在することが分かった。また、TGF- β 刺激によって形成された Olig1-Smad 複合体が、TGF- β シグナル下流遺伝子のうち一部の遺伝子のプロモーター領域にのみ作用し、転写を活性化していることも明らかにした。これらの結果から、

1. Olig1 は Smad タンパク質と TGF- β シグナル依存的に複合体を形成する
2. Olig1-Smad 複合体は TGF- β シグナル下流遺伝子のうち、そのプロモーター領域に Olig1 結合配列と Smad 結合配列とを近接して持つ遺伝子の発現のみを制御し得る
3. その結果、Olig1 は TGF- β シグナル下流遺伝子のうち一部の遺伝子のみを発現を制御し、"Olig1-Smad synexpression group"を形成している

ということが示された。

加えて、HHM が Olig1 に結合することで、内在性の Olig1-Smad 複合体の形成を阻害していることを、タンパク免疫沈降法を用いて示し、さらに HHM によって Olig1-Smad 複合体が標的遺伝子のプロモーター上から解離することを、DNAP (DNA-affinity precipitation) 法、ChIP (chromatin immunoprecipitation) 法を用いて見出した。このことにより、HHM は Olig1 に結合することで Olig1-Smad 複合体の形成を阻害し、その結果 Olig1 だけでなく、単独では DNA 結合能が弱い Smad タンパク質が標的遺伝子のプロモーター上から遊離することをも促していることが明らかとなった。定量的 RT-PCR の結果から、このように Olig1-Smad 複合体

によって発現が制御されている "Olig1-Smad synexpression group" には、*PAI-1*, *Smad7* などの TGF- β 下流遺伝子が含まれ、また、*p21^{WAF1}*, *p15^{INK4b}*, *Snail*, *LIF* などが含まれないことが確認された。このことから、HHM は、少なくとも "Olig1-Smad synexpression group" を含む複数かつ一部の synexpression group のみに作用することで、細胞応答特異的に TGF- β シグナルに対して抑制作用を発揮していることが示された。

HHM は TGF- β 下流遺伝子のうち、*PAI-1*, *Smad7*, *p21^{WAF1}*, *p15^{INK4b}* の発現に対しては抑制的に作用し、また、そのうち *PAI-1*, *Smad7* は Olig1 によって発現が誘導され、"Olig1-Smad synexpression group" に含まれることが明らかとなったが、定量的 RT-PCR の結果から、*p21^{WAF1}*, *p15^{INK4b}* についてはこの synexpression group には含まれないことが分かった。つまり、"Olig1-Smad synexpression group" 以外にも HHM の標的となる synexpression group が存在するということになる。以上の知見に加えて、microarray の結果 (Figure 2) をもとに、TGF- β 下流遺伝子は以下の 3 群に分類されることが、本研究により明らかとなった (Figure 3)。

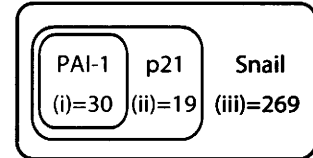


Figure 2.

(i) "Olig1-Smad synexpression group"

PAI-1 (*Serpine1*), *Smad7* を含み、HHM によって発現が抑制される遺伝子群
30 遺伝子

(ii) "HHM-targeted non-Olig1-Smad synexpression group"

p21^{WAF1}, *p15^{INK4b}* を含み、HHM によって発現が抑制されるが、Olig1 による制御は受けない遺伝子群
19 遺伝子

(iii) "not-HHM-targeted synexpression group"

Snail, *LIF* を含み、HHM による発現制御を受けない遺伝子群
269 遺伝子

また、"Olig1-Smad synexpression group" に属する一因子である *PDGF-B* が膠芽腫細胞内でその増殖に大きく寄与していることから、Olig1, HHM それぞれを microRNA によってノックダウンした膠芽腫細胞をマウスに移植し、その生体内での増殖を検討した。その結果、Olig1 をノックダウンした細胞では陰性対象に比較して増殖が抑制されること、及び、HHM をノックダウンした細胞では増殖が大きく亢進することが明らかとなった。

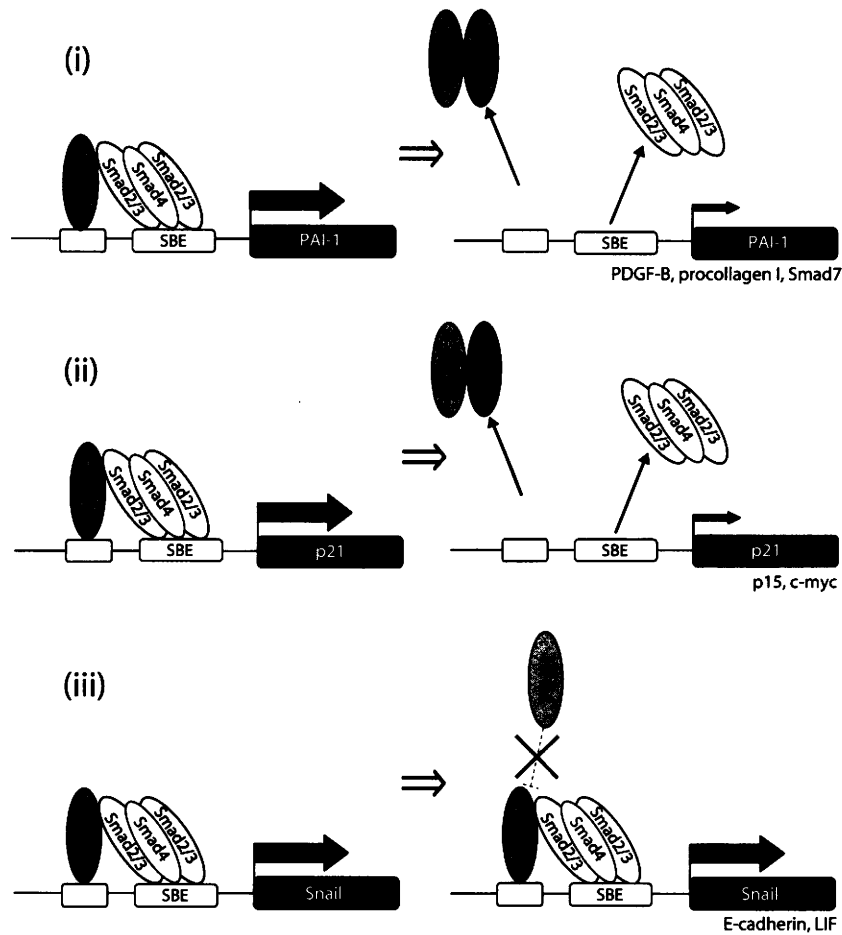


Figure 3.

本研究の結果、TGF-β 下流遺伝子を、包括的にではなく、個別の細胞応答単位で制御する可能性が初めて開かれた。前述の通り、TGF-β は腫瘍発生・進展に大きく関わる事が知られていながら、腫瘍促進的な作用と腫瘍抑制的な作用とを同時に併せ持ち、抗腫瘍薬の標的候補としては多くの難しい側面を抱えていた。しかしながら、本研究成果を基にして個別の細胞応答単位で TGF-β シグナルを制御することが可能となれば、腫瘍促進的な作用と腫瘍抑制的な作用とを独立して制御することが可能となり、転写制御を中心とした新規パラダイムに基づく抗腫瘍薬の開発を行うことができると考えられる。