

論文の内容の要旨

論文題目 **TGF- β ファミリーシグナルの抑制機構と iPS 細胞樹立への応用**

氏名 神家 有斗

生体内のシグナル伝達経路は過剰に活性化されると細胞の恒常性が損なわれるため、多くの場合内因性の抑制機構を兼ね備えている。また、病態において過剰に活性化されたシグナルを調節するために、近年では受容体などの酵素活性を阻害する低分子化合物が開発され、医療への応用に注目が集まっている。TGF- β ファミリーは、TGF- β 、アクチビン、骨形成因子 (BMP) 等によって構成され、そのシグナルは、胚発生から成体組織の恒常性維持に至るまでさまざまな場面で重要な働きを担う。また、ヒトにおける TGF- β ファミリーシグナル伝達の異常は様々な疾患の原因となることが知られている。TGF- β ファミリーシグナルの制御機構を詳細に解明するため、本研究の前半部では内因性の主要な TGF- β ファミリーシグナルの抑制因子である抑制型 Smad が TGF- β ならびに BMP シグナルを特異的に抑制する分子機構の解析を行い、後半部では低分子化合物による TGF- β シグナルの抑制が人工多能性幹 (iPS) 細胞の樹立において果たす役割について検討した。

抑制型 Smad である Smad6 と Smad7 は特異型 Smad と共有型 Smad を介した TGF- β ファミリーシグナル経路のアンタゴニストとして働く内因性の主要な因子である。抑制型 Smad は様々な機序で TGF- β ファミリーシグナルを抑制することが知られているが、I 型受容体に直接相互作用する過程がシグナル抑制に最も重要であるとされている。哺乳類で 7 種類同定されている TGF- β ファミリーの I 型受容体は、TGF- β /アクチビン型のシグナルを伝える ALK-4/5/7 サブファミリーと BMP 型のシグナルを伝える ALK-1/2 サブファミリーおよび ALK-3/6 サブファミリーの 3 つに分類される。Smad7 は全ての I 型受容体サブファミリーとの親和性が強く TGF- β /アクチビンと BMP シグナルの広範囲な抑制機能を持つ一方、Smad6 は BMP シグナルを伝える I 型受容体の中でも ALK-3/6 サブファミリーとの親和性が選択的に強く、特異的なシグナル抑制機能を持つ。この Smad7 と Smad6 の I 型受容体サブファミリー選択的な抑制はお互いの相互作用の様式の差異に起因していることが過去の報告により明らかにされている。Smad7 と Smad6 の両方とも ALK-3/6 サブファミリーに MH2 ドメインを介して結合し、そのシグナルを抑制する。Smad7 は TGF- β I 型受容体である ALK-5 に MH2 ドメインを介して結合するものの、その結合は Smad7 の N ドメインによって亢進

され、MH2 ドメインのみでは TGF- β シグナルを抑制するのに不十分である。また、Smad7 の MH2 ドメイン内の塩基性グルーブ（塩基性アミノ酸から構成される溝）が ALK-5 への結合に重要な役割を果たす。さらに Smad6 は ALK-3/6 サブファミリーと安定的に結合するが ALK-1/2 サブファミリーとの親和性は低く、受容体サブファミリー選択的な BMP シグナル抑制活性を持つ。つまり Smad7 と Smad6 の間には I 型受容体への親和性にサブファミリーごとの多様性があり、その結果、シグナル抑制活性に違いが生まれる。その選択性により TGF- β ファミリーシグナルが精緻に調節されていると考えられている。しかし、各抑制型 Smad と I 型受容体の相互作用を司る詳細な分子機構は十分に解明されていない。そこで本研究においては、ALK-2 が Smad6 と Smad7 に対して異なる抑制感受性を持っているという事を利用し、Smad7 における I 型受容体相互作用領域の同定を試みた。

まず、Smad6 と Smad7 の N ドメインと MH2 ドメインのどちらに ALK-2 シグナル抑制能の違いを生み出す要因があるのかを検討した。それぞれの領域を交換したキメラタンパク質の ALK-2 シグナルの抑制能と ALK-2 への結合能を検討した結果、ALK-2 シグナルに対する Smad7 選択的な抑制作用は MH2 ドメインに依存していることが示された。さらに、全ての Smad タンパク質の C 末端近傍に存在して、受容体特異型 Smad においては I 型受容体に選択的に相互作用するのに必要な L3 ループと呼ばれるループ構造の役割を検討した。その結果、抑制型 Smad の L3 ループは受容体との結合に必須であるものの、ALK-2 に対する抑制効果および親和性の差異を決定する領域ではないということが示された。さらに、Smad7 と Smad6 の間のキメラタンパク質を段階的に作成し、ALK-2 に対する抑制効果および結合能を検討した結果、Smad7 のアミノ酸残基 331-361 領域と 379-386 領域が ALK-2 に結合し、そのシグナルを強く抑制するために重要であることが示された。今回新たに同定された 2 つの領域は以前より I 型受容体との相互作用に関与していることが示唆されていた塩基性グルーブや L3 ループといった構造とは別のものである。予測プログラムを用いた Smad7 の MH2 ドメインの 3 次元立体構造の構築により、以上の結果から同定した領域の分子構造上の位置のマッピングを行なったところ、これらの領域はアミノ酸配列上では離れて位置するが、立体構造上ではそれぞれ L3 ループと同じ分子面でループ構造を持ち、three-finger like 構造を形成していた。よって、Smad7 は three-finger like 構造を介して 3 本の指で掴むようにして BMP I 型受容体に結合すると思われる。一方、塩基性グルーブは L3 ループを挟んでループ構造とは異なる分子面に位置しており、Smad7 は 2 つの異なる分子面を利用して BMP I 型受容体に結合することが示唆された。さらに、過去の報告や本論文における Smad6 と Smad7 の構造比較から、新たに同定した 2 つの領域は Smad6 と Smad7 の間で特に構造が異なる領域であることが予測された。また、Smad6 は塩基性グルーブのみを介して ALK-3 と結合することが示唆されたことから、2 つのループ構造が Smad7 特有な I 型受容体相互作用様式の維持に重要であるということが考えられた。

Smad7 の異常な発現により TGF- β ファミリーシグナルによって維持されている恒常性が崩れ、がんや免疫疾患の発症と関連が示唆されている。一方で、TGF- β や BMP シグナルが

線維症やがんの転移・悪性化に寄与するということが知られており、本研究で得られた機能特異的な領域の同定は Smad7 を利用した治療法の開発のために重要な意義を持つと考えられる。

TGF- β シグナルや BMP シグナルを制御する方法として抑制型 Smad の導入の他に、I 型受容体のキナーゼ活性を阻害する低分子化合物の開発が進められており、基礎研究から臨床などの場面で利用されつつあるが、近年では iPS 細胞の樹立効率を調節することが明らかになりつつある。iPS 細胞は、山中因子とよばれる Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc の 4 つの転写因子を導入することで分化した体細胞のリプログラミングを誘導し、人工的に多能性幹細胞としての性質を獲得した細胞である。リプログラミング過程は多段階であり、初期のステップでは線維芽細胞が間葉系の性質を失い、上皮系細胞特有の性質を獲得するいわゆる MET が起こる。続く中期過程で、内在性の未分化性マーカーの発現が上昇し、後期過程になると未分化性の維持と自己増殖能の亢進が起こることにより、多能性幹細胞としての性質が安定化する。TGF- β I 型受容体阻害剤はヒト iPS 細胞の誘導効率を飛躍的に向上させることが報告されており、TGF- β シグナルが上皮間葉移行 (EMT) を誘導することから、TGF- β シグナルの阻害による iPS 細胞の誘導効率の上昇が MET の誘導によるものだと考えられるが、実際にそのことを証明した報告はない。そこで本研究ではまず MET 誘導における各リプログラミング因子の役割を検討し、MET が起こる初期課程における TGF- β シグナル阻害剤の iPS 細胞樹立における効果を検討した。

Oct4、Sox2、Klf4 の各因子をそれぞれ単独あるいは種々の組み合わせでマウス胎生線維芽細胞(MEF)に導入した実験により、線維芽細胞の MET には Klf4 が最も重要な役割を担うが、Oct4 や Sox2 も Klf4 と協調的に働いて一部の上皮細胞マーカーの発現上昇に寄与することが示された。次に、上皮系マーカーの一つである Claudin11 の MEF における発現上昇を指標に、シグナル伝達経路を修飾する低分子化合物の中から探索することを試みた結果、TGF- β I 型受容体の阻害剤である E-616452 が Claudin11 の発現を強く上昇させることが明らかになった。しかし、Klf4 を導入した時と比べて他の MET 関連遺伝子の発現変動は限定的であった。最後に、iPS 細胞誘導の初期段階において TGF- β シグナルの阻害が山中 4 因子から Klf4 を除いた Oct4、Sox2、c-Myc の 3 因子導入による iPS 細胞誘導効率に影響を与えるかについて検討した。その結果、3 因子導入後翌日から E-616452 を加える方が導入後 7 日目以降から加えるよりも iPS 細胞様のコロニー形成効率が高いことが分かった。以上の結果より、TGF- β シグナル阻害剤はリプログラミング初期で重要な役割を果たす Klf4 の機能の一部を代替し、Klf4 非依存的な iPS 細胞の樹立に有用であることが示された。

TGF- β シグナル阻害剤は Sox2 代替作用も持つことが過去の報告より示唆されているが、リプログラミング初期ではなく中期以降でその効果を発揮することが示唆されている。TGF- β シグナルを阻害することは iPS 誘導過程の様々なステップでリプログラミングの亢進に寄与すると考えられる。また、TGF- β シグナルの抑制は限定的な MET 促進作用しか示さなかったが、今後より MET を広範囲に MET 関連遺伝子の変化を誘導する化合物を探索

することによって、さらに効率的に Klf4 非依存的に iPS 細胞を誘導できると期待される。