

## 審査結果の要旨

氏名 神家 有斗

胚発生過程、ヒトのさまざまな疾患および人工多能性幹 (iPS) 細胞樹立において TGF- $\beta$  ファミリーシグナルは重要な役割を担っていると考えられている。本研究の前半部では TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの制御機構を詳細に解明するため、内因性の主要な TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの抑制因子である抑制型 Smad (Smad6 および Smad7) が TGF- $\beta$  ファミリー I 型受容体 (ALK-1-7) を介した TGF- $\beta$  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- $\beta$  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をリプログラミング初期過程に誘導される間葉-上皮移行 (MET) に着目した解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ALK-2 を介した BMP シグナルは 2 つの抑制型 Smad のうちでも Smad7 によって効果的な抑制作用を受けることが恒常活性型 ALK-2 を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより示された。Smad6 と Smad7 をそれぞれ N 末端側の N ドメインと C 末端側の MH2 ドメインに分けて ALK-2 シグナルを検討したところ、ALK-2 シグナル抑制能の差異は MH2 ドメインに依存していることが示された。
2. 特異型 Smad において I 型受容体選択性を決定することが知られる L3 ループの役割を検討した結果、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。
3. 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ことが示された。
4. 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考えられた。

5. これまで TGF- $\beta$  I 型受容体である ALK-5 との結合に重要であるとされていた Smad7 の塩基性グループも ALK-2/3 との相互作用に関与するということが示された。塩基性グループは L3 ループを挟んで three-finger like 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。また、Smad6 は塩基性グループのみを介して 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。
6. 分化した細胞の iPS 細胞へのリプログラミングを誘導する Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 因子を線維芽細胞 (MEF) にレトロウイルスにより導入すると、リプログラミングの初期で間葉-上皮移行 (MET) に特徴的なマーカー遺伝子の発現変動が定量的 RT-PCR によって示された。4 因子の導入により MEF の細胞形態が間葉系細胞に特徴的な紡錘形から上皮細胞に特徴的な敷石状に転換することが認められた。
7. 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。
8. 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- $\beta$  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示された。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。
9. E-616452 が 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 Nanog-GFP ノックインマウス由来の MEF を用いて検討した結果、E-616452 処理を行った場合のみで GFP 陽性の iPS 細胞様のコロニーが形成されることが示された。GFP 陽性コロニーの形成効率は 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高いことが示された。

以上、本論文は前半部で Smad7 における新規の TGF- $\beta$  ファミリー I 型受容体相互作用様式を明らかにし、本研究で得られた機能特異的な領域の同定は TGF- $\beta$  ファミリーシグナルが異常に亢進することに起因する疾患に対する 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。また、後半部では Klf4 非導入による iPS 細胞の誘導に TGF- $\beta$  シグナルの阻害剤が有用であることが示唆されたことから、より安全で効率の良い iPS 細胞樹立法の確立に貢献すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。