

研究報告書

「リプログラミング技術を用いた遺伝性血管疾患の新規治療標的の同定」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 渡部 徹郎

1. 研究のねらい

本研究の目的は Loey-Dietz 症候群(LDS)など transforming growth factor (TGF)- β ファミリーシグナル伝達因子の遺伝子に異常がある遺伝性血管疾患の発症要因を明らかにすることである。そのために LDS 患者から iPS 細胞を樹立し、その iPS 細胞を用いて in vitro 分化系により得られた血管細胞の細胞生物学的性質を検討することを目指している。また線維芽細胞から iPS 細胞を樹立する過程の最初のステップにおいて、線維芽細胞が上皮細胞の性質を獲得していることが報告されているが、TGF- β ファミリーシグナルが発生過程やがんの浸潤・転移過程などにおいて上皮間葉移行(Epithelial-to-Mesenchymal Transition: EMT)を誘導することから、iPS 細胞へのリプログラミング過程における TGF- β ファミリーシグナルの役割についても検討を試みた。

2. 研究成果

(1) 概要

人工多能性幹(iPS)細胞は成体の体細胞から作成できる胚性幹(ES)細胞のようにさまざまな臓器に分化する能力を有した細胞である。その分化能から遺伝性または後天的に機能不全な細胞を補う再生医療への応用が期待される中、疾患モデルがないために発症機構が不明の疾患の研究について、患者の細胞に由来する疾患特異的 iPS 細胞を用いる取り組みが進められている。本研究においては、まず Loey-Dietz 症候群(LDS)という TGF- β シグナルに異常がある遺伝性血管疾患の発症要因を明らかにするために、LDS 患者から iPS 細胞を樹立し、その iPS 細胞を用いて in vitro 分化系により得られた血管細胞の細胞生物学的性質を検討することを試みた。TGFBR2 (TGF- β タイプ 2 受容体)遺伝子に変異を有する LDS 患者の皮膚線維芽細胞から樹立された iPS 細胞の未分化性が各種未分化マーカーでの免疫染色ならびにアルカリフォスファターゼ染色で確認された。これら iPS 細胞における TGF- β シグナルの伝達を検討したところ、正常 iPS 細胞と比較して有意な変化は見られなかった。これらの iPS 細胞を LDS の発症に最も関与すると考えられる平滑筋細胞に分化させて、正常 iPS 細胞由来の平滑筋細胞と比較して相違があるか、また TGF- β シグナルの伝達において差があるか検討する予定である。

さらに本研究では安全な iPS 細胞を効率良く樹立するために、iPS 細胞の樹立過程における間葉上皮移行(Mesenchymal-to-Epithelial Transition: MET)と MET を調節する TGF- β シグナルの役割を検討した。線維芽細胞から iPS 細胞が作製される過程の最初のステップにおいて、線維芽細胞が MET を介して上皮細胞の性質を獲得しているが、私はまず山中因子の中で KIF4 が単独でマウス胎生線維芽細胞(MEF)の MET を誘導することを明らかにした。さらに MET を阻害する TGF- β シグナルを低分子化合物により抑制することで、リプログラミング

の初期段階において MET が誘導され、Klf4 なしで (Oct3/4、Sox2、c-Myc の 3 因子で) iPS 細胞が効率良く作成できることが示された。以上の結果から TGF- β シグナルの阻害が MET を誘導することにより、Klf4 の作用を代替し、効率良く iPS 細胞を樹立することが示唆された。

(2) 詳細

研究テーマ A. 遺伝性血管疾患 iPS 細胞の樹立と解析

Loeys-Dietz 症候群(LDS)はマルファン症候群2型とも呼ばれ、大動脈の乖離や破裂が1型よりも早期に起こり、さらに口蓋裂や眼角乖離などの症状なども見られることが知られている。LDS の患者においては TGF- β シグナル伝達因子の遺伝子に異常が同定されている。TGF- β は細胞膜上の I 型 β R-I) ならびに II 型受容体 β R-II) からなる受容体複合体に結合する(図 1)。TGF- β の結合により活性化された I 型受容体は細胞内シグナル伝達因子である

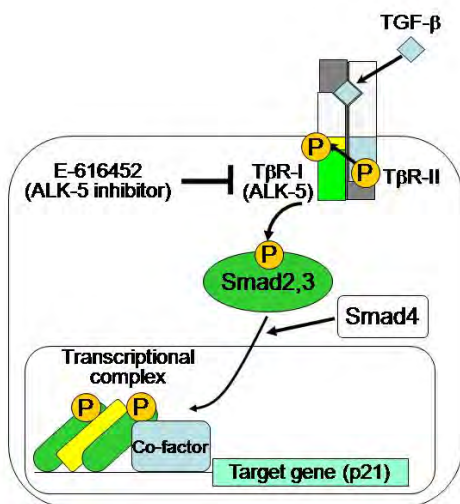


図 1. TGF- β シグナル伝達経路

Smad2 タンパク質のリン酸化を介して、そのシグナルを細胞内に伝達する、リン酸化された Smad2 は Smad4 と結合して核内に移行し、標的遺伝子の発現を調節する。LDS の患者においては I 型 β R-I) ならびに II 型受容体 β R-II) 遺伝子において変異が存在することが報告されており、TGF- β シグナルの変化が発症の要因であることが予測されている。我々を含む複数の研究室が LDS 患者において同定される TGF- β 変異受容体のシグナル伝達能力を検討したところ、これらの変異体は TGF- β シグナルを伝達できないことが見出された。

それにも関わらず LDS 患者の血管平滑筋細胞において TGF- β シグナルの活性化の指標である Smad2 のリン酸化は上昇することが報告されており、LDS の発症機序については未解明な部分が多く残されている。

私は熊本大学の江良先生との共同研究で T β RII 遺伝子において変異が存在する LDS 患者の線維芽細胞から樹立した疾患 iPS 細胞を用いて、LDS の発症機構の解明を進めている。まず、樹立された iPS 細胞の未分化性を検討するために、各種未分化マーカーでの免疫染色ならびにアルカリフォスファターゼ染色を行ったところ、これら2ラインの iPS 細胞が未分化性を有していることが示された(図 2)。またこれら iPS 細胞における TGF- β シグナルの伝達を検討したところ、正常 iPS 細胞と比較して有意な変化は見られなかった。

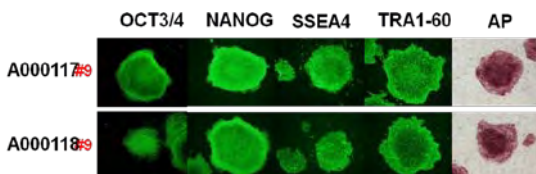


図 2. LDS 疾患 iPS 細胞の解析

そこでこれらの iPS 細胞を LDS の発症に最も関与すると考えられる平滑筋細胞に分化させて、正常 iPS 細胞由来の平滑筋細胞と比較して相違があるか、また TGF- β シグナルの伝達において差があるか検討している。

研究テーマ B. iPS 細胞の作製過程における TGF- β シグナルの役割の解析

iPS 細胞を再生医療などの目的に利用していくことを考えた場合に、現在 iPS 細胞を作成するために導入している外来性の Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc(山中因子)をいかに数を少なくしていくかが課題である。そのためにはこれらのリプログラミングを誘導する因子がどのように作用しているかについての分子機序を解明していくことが重要であるが、これら山中因子の作用については未解明な部分が多く残されている。

近年の報告により、線維芽細胞から iPS 細胞が作製される過程は多段階から構成されており、その最初のステップにおいて、線維芽細胞が上皮細胞の性質を獲得していることがあきらかになっている(図3)。

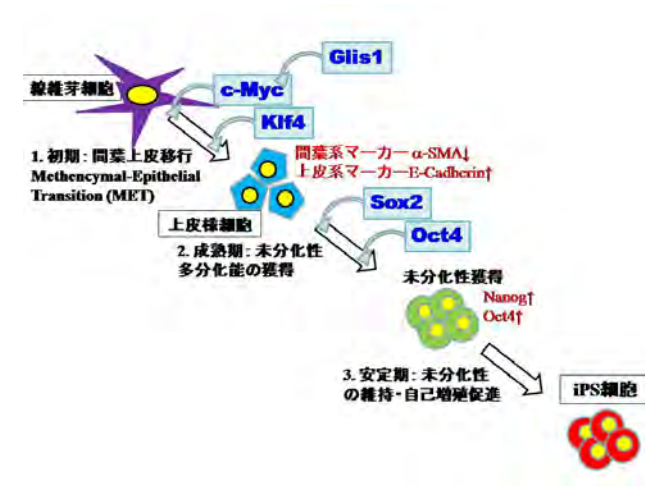


図 3. 線維芽細胞からの iPS 細胞樹立における多段階モデル

この現象は間葉上皮移行(Mesenchymal-to-Epithelial Transition: MET)と呼ばれており、腎臓の上皮細胞の形成などにおいてみられる現象である。私はまず山中因子の中で Klf4 が単独でマウス胎生線維芽細胞(MEF)の MET を誘導することを明らかにした。

一方がんの浸潤・転移過程などにおいて上皮細胞が間葉細胞へ移行(Epithelial-to-Mesenchymal Transition: EMT)することもわかっており、TGF- β ファミリーシグナルが中心的な役割をはたしていることが示されている。TGF- β シグナルの阻害が iPS 細胞の樹立の効率を向上させることは報告があったが、リプログラミングの初期段階・MET における検討はされていなかった。私は TGF- β シグナル阻害剤(E-616452)がリプログラミングの初期段階において MET を誘導し、TGF- β シグナルを阻害すると Klf4 なしで(Oct3/4、Sox2、c-Myc の 3 因子で) iPS 細胞が効率良く作成できることを示した。以上の結果から TGF- β シグナルの阻害が MET を誘導することにより、Klf4 の作用を代替することが示唆された。

3. 今後の展開

本研究課題により、LDS という TGF- β 受容体遺伝子に変異がある遺伝性血管疾患において TGF- β シグナルの伝達能が変化していることが示された。これから LDS 患者由来の疾患 iPS 細胞を用いて疾患発症の機序が解明されていくことが期待される。

またTGF- β シグナルの阻害により、Klf4 の作用を代替できることが明らかになったことにより、より安全なiPS細胞の作成が可能になっていく可能性が示された。これからヒトiPS細胞の樹立においても同様の現象が観察できるか検討していくことが課題の一つである。

4. 自己評価

LDS 疾患 iPS 細胞の樹立と解析に時間がかかったために、血管平滑筋にまで分化させて解析をするまで至らなかったことは残念であったが、これからも解析を継続していく予定である。研究期間内に開始したiPS細胞の作製過程におけるTGF- β ファミリーシグナルの役割の解析については堅実な進捗が得られたことは本研究課題における成果である。この成果を論文として報告するのみならず、実用につながるようにさらに発展させていきたい。

5. 研究総括の見解

現在国を挙げての研究が始まっている疾患 iPS 研究のさきがけとして、得意の血管分野とTGFシグナルを組み合わせた疾患を選びiPSを使って研究する手堅いプランといえる。期待通り、患者さん由来のiPSを作製するところまでは進んでいるが、病態と相関する現象を試験管内で得られるというところまでは進展しなかった。これについては、今後も解決すべき多くの問題が残っていると思う。時間がかかっては是非、疾患iPSの有用性が示せるところまで研究を進展させてほしい。研究の過程で、TGF β 阻害剤がiPS化を促進するという発見をし、これがKLF4に媒介されている事を示した結果はこの分野の重要な貢献であると思う。早急に論文にする事を期待する。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Kawata M, Koinuma D, Ogami T, Umezawa K, Iwata C, **Watabe T**, Miyazono K. (2012) TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells. *J. Biochem.* 151:205-216.
2. Mihira H, Suzuki HI, Akatsu Y, Yoshimatsu Y, Igarashi T, Miyazono K, **Watabe T**. (2012) TGF- β -induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A. *J. Biochem.* 143:199-206.
3. Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Mihira H, Itoh T, Suehiro J, Yuki K, Harada K, Morikawa M, Iwata C, Minami T, Morishita Y, Kodama T, Miyazono K, **Watabe T**. (2011) Ets family members induce lymphangiogenesis through physical and functional interaction with Prox1. *J. Cell Sci.* 124:2753-2762.
4. Suzuki Y, Ohga N, Morishita Y, Hida K, Miyazono K, **Watabe T**. (2010) BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *J. Cell Sci.* 123:1684-1692.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等

講演

1. **Watabe T**, Kamiya Y, Taguchi L, Miyazono K. Inhibition of endogenous TGF- β signals enhances the efficiency of the generation of induced pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts through inducing mesenchymal-to-epithelial transition. The 10th *Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR) Meeting* (横浜) 2012 年 6 月 13~16 日
2. **Watabe T**, Kokudo T, Mihira H, Yoshimatsu Y, Miyazono K. Activation of Signaling and Transcriptional Networks during TGF- β -induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndMT). *The 17th International Vascular Biology Meeting* (Wiesbaden, Germany) 2012 年 6 月 2~5 日
3. **Watabe T**. Roles of BMP-9 signals during the formation of lymphatic vessels. *Gordon Research Conference Molecular Mechanisms in Lymphatic Function & Disease* (Ventura, U. S. A.) 2012 年 3 月 4~9 日
4. **Watabe T**. Roles of TGF- β superfamily signals during the endothelial-mesenchymal transition. *TGF- β Meeting in Uppsala* (Uppsala, Sweden) 2011 年 8 月 18~20 日
5. **Watabe T**, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Miyazono K. BMP9 induces proliferation of mouse embryonic stem cell-derived endothelial cells. *The 9th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR) Meeting* (Toronto, Canada) 2011 年 6 月 15~18 日
6. **Watabe T**, Yoshimatsu Y, Mihira H, Itoh T, Yuki K, Harada K, Iwata C, Yamazaki T, Morikawa M, Miyazono K. Ets family members induce lymphangiogenesis via physical and functional interaction with Prox1. *The 16th International Vascular Biology Meeting* (Los Angeles, U.S.A.) 2010 年 6 月 19~23 日
7. **Watabe T**, Yoshimatsu Y, Mihira H, Itoh T, Yuki K, Harada K, Iwata C, Yamazaki T, Morikawa M, Miyazono K. Ets family members induce lymphangiogenesis via physical and functional interaction with Prox1. *Gordon Research Conferences Molecular Mechanisms in Lymphatic Function & Disease* (Lucca, Italy) 2010 年 6 月 13 日~18 日