

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15610

研究課題名(和文)骨形成因子(BMP)による未分化性維持と腫瘍化機構の解明

研究課題名(英文) Roles of bone morphogenetic protein (BMP) in pluripotency and tumorigenesis

研究代表者

森川 真大 (Morikawa, Masato)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：80775833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、転写因子Smad1とゲノム上で相互作用するエピジェネティック因子(酵素A)を新たに同定した。また、この結合に重要なのがSmad1のMH2ドメインであり、DNA結合を介さないことを示した。さらに、MEF(マウス胚性線維芽細胞)からiPS細胞へのリプログラミング効率を指標にすることで、MH2ドメインがSmad1全長と同等に、未分化状態へのリプログラミングを促進することを示した。これらの結果から、Smad蛋白が酵素Aを介して細胞のエピジェネティック制御に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨形成因子(BMP)は、既に骨再生を担う蛋白として臨床応用され、また今後他臓器の再生医療で利用されることが予想される蛋白である。しかし、BMPは未分化性維持・腫瘍化に関係することも知られていた。本研究では、BMPによって活性化され、BMPシグナルで中心的役割を果たすSmad蛋白が、DNAに結合して転写因子として機能するだけでなく、エピジェネティック制御に影響を与えることが示唆された。この分子機構をより詳細に明らかにすることで、再生医療における効率性・経済性や安全性の改善につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that an epigenetic regulator made complex with Smad1. We also showed that Smad1 MH2 domain, which is not related to the DNA-binding capacity, was critical for the interaction. Using a MEF-iPS reprogramming system, we found that Smad1 full-length and Smad1 MH2 domain were able to enhance reprogramming at an equivalent level, suggesting that interaction with the regulator is important. Thus, our data suggests that Smad1 affects epigenetic regulation through interacting with the regulator, which is independent of induction of Smad-target genes.

研究分野：分子病理学、TGF-β / BMPファミリーが関係する病態に関する解析

キーワード：骨形成因子(BMP) エピゲノム 未分化性維持

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

骨形成因子 (BMP, bone morphogenetic protein) は TGF- $\beta$  ファミリーに属するサイトカインで、名前の由来である骨形成誘導以外にも生体内で多彩な機能を持つ。幹細胞の分野では、BMP は未分化性維持と分化促進という相反する機能を果たすことが知られている。マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) では、BMP-4 は白血病阻止因子 (LIF) とともに未分化状態を維持するために必須の液性因子とされ、BMP の細胞内シグナル伝達因子 Smad を介した標的遺伝子 Id1 の誘導が重要であるとされていた (Ying et al, 2003)。逆に、ヒト ES 細胞やマウスエピプラスト幹細胞といった分化段階へプライムされた幹細胞では、BMP-4 は胚体外組織や中胚葉系への分化を促進する。また、BMP は心臓や腎臓など中胚葉系への分化を促進するが、特定の分化段階で BMP 経路をむしろ抑制することで心筋分化効率が増幅することが知られている (Yuasa et al, 2005)。さらに、BMP-2 や BMP-7 が歯科口腔外科や整形外科領域で既に臨床応用されているが、比較的高用量の BMP が必要で、新たながん・肉腫発生のリスクが指摘されつつある。このように、BMP シグナルの特性を理解し、各分化段階において未分化性維持・腫瘍化と、分化促進という二面性を適切に制御することが、再生医療における効率性・経済性や安全性の観点から重要である。

研究代表者は、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析法、特にクロマチン免疫沈降シーケンシング法 (ChIP-seq) を用いることで、BMP を含む TGF- $\beta$  ファミリー分子の細胞種依存的機能の解析を行ってきた。幹細胞における BMP シグナルの研究としては、未分化状態のマウス ES 細胞をナイーブな条件とプライムされた条件で比較し、マウス ES 細胞における BMP シグナルの役割を再評価した。特に、発現遺伝子の網羅的解析や Smad 蛋白の ChIP-seq 解析、ゲノム編集法などを駆使することで、マウス ES 細胞を未分化な状態に維持するためには Smad 経路の活性化は必ずしも必要ではなく、BMP-4 によって活性化される別の経路 (MEK5-ERK5 経路) が担っていることを明かにした (Morikawa et al, 2016)。オランダのグループも我々と同様の結論を同時に発表したが (Gomes Fernandes et al, 2016)、これらは「未分化性維持に Smad 経路が必須である」という定説を見直す結果だった。一方、転写因子 Smad がマウス ES 細胞で機能を持つのか、未分化性維持に関係していないとすれば ES 細胞の分化を制御するのか、新たな問いとして重要になってきた。

### < 引用文献 >

Gomes Fernandes M, Dries R, Roost MS, Semrau S, de Melo Bernardo A, Davis RP, Ramakrishnan R, Szuhai K, Maas E, Umans L, Abon Escalona V, Salvatori D, Deforce D, Van Crielinge W, Huylebroeck D, Mummery C, Zwijssen A, de Sousa Lopes SM (2016) BMP-SMAD signaling regulates lineage priming, but is dispensable for self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Reports* 6: 85-94

Morikawa M, Koinuma D, Mizutani A, Kawasaki N, Holmborn K, Sundqvist A, Tsutsumi S, Watabe T, Aburatani H, Heldin CH, Miyazono K (2016) BMP sustains embryonic stem cell self-renewal through distinct functions of different Kruppel-like factors. *Stem Cell Reports* 6: 64-73

Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A (2003) BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115: 281-292

Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, Tanaka T, Sugimura K, Kinoshita M, Hattori F, Fukami S, Shimazaki T, Ogawa S, Okano H, Fukuda K (2005) Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23: 607-611

## 2. 研究の目的

上記問いに答えるため、ChIP-seq 法で明らかになった Smad のゲノム上の局在を再度詳細に解析したところ、マウス ES 細胞において Smad が結合する領域の約 40%が、ヘテロクロマチンのマーカー H3K9me3 が濃縮して存在する非エンハンサー領域であることを見出した。さらに、この領域では、GC-rich 配列が顕著に濃縮して存在していた。興味深いことに、この結合モチーフは、既に報告されている Zfp57-Trim28 の結合モチーフに類似していた。Zfp57 は、KRAB ドメインを有する C2H2 ジンクフィンガー蛋白である。Zfp57 はヘテロクロマチン結合タンパクである KRAB-associated protein 1 (KAP1、もしくは Trim28、Tif1 ) とともに、ヒストンメチル化酵素などとの会合を介して標的遺伝子の転写抑制やヘテロクロマチン構造の形成、DNA メチル化に関与していることが知られている。

そこで本研究では、Smad が関与するこれらの分子機構を詳細に解析した上で、BMP シグナルの下流で腫瘍化に関係する部分を抽出し、制御する方法の開発を目指す。具体的には下記 3 点に焦点を絞って解析を行うこととした：( 1 ) 転写因子 Smad 蛋白がエピジェネティック制御に与える影響を明らかにする。( 2 ) Smad とゲノム上で相互作用するエピジェネティック因子を同定する。( 3 ) Smad と候補因子の相互作用の影響を、細胞レベル・個体レベルで評価する。

### 3 . 研究の方法

( 1 ) 転写因子 Smad 蛋白がエピジェネティック制御に与える影響を明らかにする。

既に利用可能な Smad1/5 ダブルノックアウト ES 細胞、Smad4 ノックアウト ES 細胞を用い、RNA-seq 法や ChIP-seq 法によりエピジェネティックマーカーを評価することで、Smad 蛋白がヘテロクロマチン構造の変化などのエピジェネティック制御に与える影響を明らかにする。

( 2 ) Smad とゲノム上で相互作用するエピジェネティック因子を同定する。

既にマウス ES 細胞で取得済みの RNA-seq データや Smad1/5 の ChIP-seq データなどを用い、遺伝子の発現変動やヘテロクロマチン構造の変化から予想されるエピジェネティック因子に注目して解析を行う。その中から、Smad と相互作用し細胞分化・運命決定において機能を果たす蛋白を同定する。

同定した候補因子について、未分化状態のマウス ES 細胞での解析を先行させる。マウス ES 細胞の親株や Smad ノックアウト株で、異所性発現による gain-of-function、shRNA による loss-of-function 実験を行い、Smad 蛋白と候補因子との関係やエピジェネティックマーカーへの影響を評価する。必要に応じて、候補因子に対する特異的抗体を用いて ChIP-seq 法による解析を行い、ゲノムワイドレベルで評価を行う。

( 3 ) Smad と候補因子の相互作用の影響を、細胞レベル・個体レベルで評価する。

予備実験として、Smad ノックアウト ES 細胞を免疫不全マウスに移植し、奇形腫形成能を評価する。この予備実験での検討で顕著な差が認められなかったことから、MEF からのリプログラミング ( iPS 化 ) を指標とした。

### 4 . 研究成果

( 1 ) 転写因子 Smad 蛋白がエピジェネティック制御に与える影響を明らかにする。

これまで報告された Smad1/5 double KO 細胞の RNA-seq データを再解析することにより、Smad1/5 が 2 細胞期特異的遺伝子 Zscan4 やレトロウイルス配列である MERVL の発現に関係していることを明らかにした。さらに、Zscan4 遺伝子や MERVL の発現に影響を与える因子として報告のある遺伝子に注目し、Smad との結合を指標にスクリーニングを行った結果、エピジェネティック因子 ( 酵素 A ) に注目することとした。

( 2 ) Smad とゲノム上で相互作用するエピジェネティック因子を同定する。

上記の通り、Smad と相互作用する脱メチル化酵素 A を同定した。Smad が酵素 A と結合する部位の範囲を狭めていったところ、Smad の MH2 ドメインが酵素 A との結合に重要であることを明らかにした。この酵素 A に関しては既にノックアウト ES 細胞も報告されており、Smad1/5 ノックアウト ES 細胞とは逆の表現型を示すことが報告されている。従って、Smad が酵素 A の機能を阻害することが予想された。実際に、Smad-酵素 A の相互作用の結果、酵素 A-クロマチンの結合が減弱する傾向にあることを、293T 細胞の核抽出物、もしくは精製蛋白を用いた in vitro の系で確認し、さらにヒストンペプチドアレイを用いた系で網羅的に評価し、確認した。

( 3 ) Smad と候補因子の相互作用の影響を、細胞レベル・個体レベルで評価する。

既に SMAD がリプログラミングを促進することは報告されている。これまで、SMAD が標的遺伝子を誘導することでリプログラミング効率を改善するとされていたが、MH2 ドメインのみでも SMAD 全長と同等のリプログラミング効率改善が認められた。従って、標的遺伝子の誘導を介さない、上記の SMAD ( MH2 ) -酵素 A の関係が重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上より、SMAD-酵素 A の関係が生体内で機能を果たしていることが示唆され、BMP が関係する腫瘍化の過程に重要である可能性が予想された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

Masato Morikawa, Anders Sundqvist, Jiang Ren, Eleftheria Vasilaki, Natsumi Kawasaki, Mai Kobayashi, Daizo Koinuma, Hiroyuki Aburatani, Kohei Miyazono, Carl-Henrik Heldin, Hans van Dam, Peter ten Dijke, JUNB governs a feed-forward network of TGF-beta signaling that aggravates breast cancer invasion, 11<sup>th</sup> AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine, Maui, Hawaii, USA, Feb 2019 (Poster)

Erna Raja, Masato Morikawa, Ryo Tanabe, Yasushi Ino, Nobuhito Saito, Tomoki Todo, Kohei Miyazono, Tyrosine kinase receptor EphA6 sensitizes glioblastoma cells towards BMP-induced apoptosis, 11<sup>th</sup> AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine, Maui, Hawaii, USA, Feb 2019 (Poster)

Masato Morikawa, Yoshihide Mitani, Katarina Holmborn, Daizo Koinuma, Ryoichiro Kageyama, Kazuo Maruyama, Carl-Henrik Heldin, Kohei Miyazono, The ALK-1/SMAD/ATOH8 axis protects against hypoxia and development of pulmonary arterial hypertension, 12<sup>th</sup> International BMP Conference, Tokyo, Japan, Oct 2018 (Oral)

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/morikawa/index.html>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。