

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 消化器癌細胞におけるTGF- $\beta$ - Smadシグナル伝達系異常の機能的検討

指導教官 小俣政男 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 伊地知秀明

[研究の背景および目的]

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) は、細胞の増殖の制御、細胞の分化、アポトーシス、細胞外マトリックスの増生など多様な機能を持つサイトカインであり、中でも上皮系細胞において、このシグナルは主に細胞増殖抑制効果を持つことが知られている。TGF- $\beta$  シグナル伝達系は TGF- $\beta$  type I receptor と type II receptor (T $\beta$ RI、T $\beta$ RII) および細胞内シグナル伝達分子 Smad 群から成り立つ。

このシグナル伝達系に異常があると細胞は増殖抑制を免れ、それによる癌化への寄与が推察されている。実際に T $\beta$ RII 遺伝子の変異が遺伝性非ポリポーシス性大腸癌やマイクロサテライト不安定性を示す散発性大腸癌・胃癌に、また Smad4 遺伝子の異常が膵癌や大腸癌に認められる。

これまでヒトの癌において TGF- $\beta$ -Smad シグナル伝達系の遺伝子の異常を個々に調べた報告は数々なされてきたが、シグナル伝達系全体としての機能異常を複数の消化器癌で比較検討した報告はなかった。そこで本研究では、「Rescue」の実験等、機能的解析を用いて、ヒト消化器癌（大腸癌、胃癌、膵癌、肝癌）における TGF- $\beta$ -Smad シグナル伝達系異常の頻度とその異常の原因分子を明らかにし、このシグナル伝達系の異常と各消化器癌との関与を明らかにしようとした。

## [方法と結果]

38種のヒト癌培養細胞株(大腸癌11種、膵癌9種、胃癌10種、肝癌8種)を用いた。

各細胞株における TGF- $\beta$ -Smad シグナルの伝達を plasminogen activator inhibitor-I 遺伝子及び collagenase-I 遺伝子のプロモーター配列の主要な部分を有する p3TP-lux というレポーターを用いたルシフェラーゼアッセイにて検討した。また Smad binding element を有する別種のレポーター SBE-luc を用いた検討も加えた。transfection 効率を内部コントロールを用いて補正した。TGF- $\beta$ 刺激による活性値の有意な上昇を示さない細胞株ではこのシグナル伝達系の機能が低下していると考えられた。大腸癌では 10/11 (91%)、膵癌では 6/9 (67%)、胃癌では 4/10 (40%)と高頻度にシグナル伝達の低下が認められたが、肝癌では8例全例でシグナルは正常に伝達されていた。

次にこのシグナル伝達低下を示した全20種の細胞株について、その低下の原因分子の解明を試みた。まず T $\beta$ RII 遺伝子 exon 3 のポリアデニン配列 (poly (A) stretch) の異常を蛍光標識プライマーを用いたPCR産物の電気泳動度の差により検出した。この結果、20種の細胞株中、大腸癌の5種にアデニン塩基の欠失が認められた。次に Smad4 蛋白の発現を Western blot にて検出した結果、20種の中で膵癌細胞4種及び大腸癌細胞1種において Smad4 蛋白発現が消失していることがわかった。更に、野生型の T $\beta$ RII または Smad4 蛋白を発現するプラスミドを p3TP-lux を用いたルシフェラーゼアッセイの際に co-transfection することにより、シグナル伝達の回復 (TGF- $\beta$  による有意な活性上昇) が得られるかを検討する「Rescue」実験を行った。この結果、野生型 T $\beta$ RII の発現によりシグナル伝達の回復を示した細胞株が20種中 5種 (大腸癌 4種と膵癌 1種)、野生型 Smad4 の発現によりシグナル伝達の回復を示した細胞株も20種中 5種 (膵癌 3種と大腸癌 2種) 得られた。

T $\beta$ RII 遺伝子 poly (A) stretch の変異もしくは T $\beta$ RII の発現によるシグナルの回復を示した細胞株では、T $\beta$ RII の機能喪失がこのシグナル伝達系異常の原因と考えられた。また Smad4 蛋白発現の消失もしくは Smad4 の Rescue によるシグナルの回復を示した細胞株では、Smad4 の機能喪失がこのシグナル伝達系異常の原因と考えられた。この結果、大腸癌では 7/10 (70%) が T $\beta$ RII の異常、膵癌では 4/6 (67%) が Smad4 の異常を示したが、胃癌では T $\beta$ RII 及び Smad4 には明らかな異常が認められなかった。

そこで T $\beta$ RII 及び Smad4 に明らかな異常を示さない6種の細胞株については T $\beta$ RI、

Smad2、Smad3 についても同様に「Rescue」実験を行ったところ、胃癌細胞株 1種でのみ T $\beta$ RI の機能異常が示された。

### [考察]

TGF- $\beta$ -Smad シグナル伝達系には、2種の受容体と Smad2, 3, 4 以外にも inhibitory Smad や核内の転写の corepressor の関与、また他のシグナル伝達系とのクロストークの存在が次々と明らかになってきている。従って、シグナル伝達系全体の機能を評価するには個々の遺伝子異常を調べるのみでは不十分である可能性がある。そこで、本研究ではルシフェラーゼアッセイによる TGF- $\beta$ -Smad シグナル伝達系全体の機能的検討を中心として癌細胞におけるこのシグナル伝達系の異常を検討した。その結果、大腸癌、膵癌、胃癌細胞では TGF- $\beta$ -Smad シグナル伝達の低下が高頻度に認められるが、肝癌細胞ではこのシグナル伝達が保たれていることがわかった。従って、肝癌においてはこのシグナル伝達系は癌抑制遺伝子群としての働きは果たしていないと考えられる。

膵癌細胞では、TGF- $\beta$ -Smad シグナル伝達の低下が高頻度 (67%) に認められ、Smad4 の機能喪失がこのシグナル伝達系異常の主原因と考えられた。

大腸癌細胞では TGF- $\beta$ -Smad シグナル伝達の低下が最も高頻度 (91%) に認められ、このシグナル伝達系異常の主原因は T $\beta$ RII の異常と考えられた。しかし大腸癌細胞における T $\beta$ RII の Rescue 実験では、T $\beta$ RII 遺伝子の poly (A) stretch に欠失のある細胞株中、T $\beta$ RII の Rescue によりシグナル伝達系の回復を示したのは 40%のみであり、正常な poly (A) stretch を持つ細胞株での Rescue 実験と同じ割合であった。このように T $\beta$ RII の Rescue 実験では、T $\beta$ RII 遺伝子 poly (A) stretch の変異解析との間にやや解離した結果が認められた。

この解離の理由としては、1) T $\beta$ RII 遺伝子の poly (A) stretch 以外の部分の変異や、T $\beta$ RII の発現自体の低下が存在する可能性 2) 細胞株によっては、transfection された野生型 T $\beta$ RII 蛋白の発現プラスミドが、細胞膜への T $\beta$ RII の局在阻害などの機序により十分機能しないという可能性 3) Rescue された T $\beta$ RII が正しく機能したとしても、T $\beta$ RII より下流の位置でクロストークなどによりシグナル伝達が阻害される可能性 等が考えられる。実際に下流に存在する分子である Smad4 の Rescue 実験においては、Smad4 蛋白の Western blot と明らかに相関する結果が得られた。

TGF- $\beta$ -Smad シグナル伝達の低下が認められた胃癌細胞株では、3/4 例 (75%) でシグナル伝達異常の原因分子が同定できなかった。これらの細胞では inhibitory Smad や転写の corepressor がシグナル伝達系異常の原因となっている可能性があり、更には、胃癌にはこのシグナル伝達系異常の新規のメカニズムが潜んでいる可能性がある。

本研究で複数の臓器由来の癌細胞株多数例について TGF- $\beta$ -Smad シグナル伝達系全体の機能を同時に比較検討した結果、各消化器癌により TGF- $\beta$ -Smad シグナル伝達系異常の頻度が異なり、その異常を来すメカニズムもそれぞれに特徴があることが明らかとなった。将来的には、このようなシグナル伝達系の機能とそれに関わるメカニズムを臨床検体で明らかにすることが望まれる。

### 【結論】

大腸癌、膵癌、胃癌、肝癌の培養細胞株多数例について TGF- $\beta$ -Smad シグナル伝達系の機能を比較検討した結果、このシグナル伝達系は大腸癌、膵癌、胃癌の発癌において癌抑制遺伝子群としての役割を担っていることが示唆されたが、肝癌においては同様の役割は果たしていないと考えられた。

また、大腸癌ではこのシグナル伝達低下の主原因は T $\beta$ RII の異常であり、膵癌においては Smad4 の異常と考えられたが、胃癌ではその大部分でシグナル伝達異常の原因が不明であり、未知のメカニズムが存在する可能性がある。

このように各消化器癌における TGF- $\beta$ -Smad シグナル伝達系異常の頻度とそのメカニズムが異なることが明らかとなり、各癌の診断・治療における標的分子の解明や発癌メカニズムの解明の一助となると考えられた。