

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 伊地知 秀明

本研究は、癌抑制遺伝子群として働くと考えられている TGF- β - Smad シグナル伝達系について、消化器癌におけるその機能低下の頻度及びメカニズムについて培養細胞株多数例を用いて解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. 38 種の消化器癌培養細胞株（大腸癌 11 種、膵癌 9 種、胃癌 10 種、肝癌 8 種）における TGF- β - Smad シグナル伝達を、TGF- β - Smad シグナルにより誘導される遺伝子 plasminogen activator inhibitor-1 と collagenase-1 の主要なプロモーター領域を有するレポーター p3TP-lux によるレポーターアッセイを用いて検討した結果、大腸癌では 10/11 例（91%）、膵癌では 6/9 例（67%）、胃癌では 4/10 例（40%）と高頻度にシグナル伝達の低下が認められた。対して肝癌では 8 例中全例でシグナルは正常に伝達されていることがわかった。Smad binding element を有するレポーター SBE-luc を用いたレポーターアッセイにおいても p3TP-lux と同様の結果を得た。
2. TGF- β - Smad シグナル伝達の低下した細胞株 20 種全例について、TGF- β - type II receptor (T β RII) 遺伝子 exon 3 のポリアデニン配列 (poly (A) stretch) の変異を蛍光標識 primer を用いた PCR 産物のポリアクリルアミドゲル電気泳動により検出した結果、20 種中大腸癌の 5 種にアデニン塩基の欠失が認められた。
3. TGF- β - Smadシグナル伝達の低下した細胞株20種全例について、Smad4 蛋白の発現をWestern blottingにて検出した結果、膵癌の4種と大腸癌の1種

にSmad4蛋白発現の消失が認められた。

4. TGF- β - Smadシグナル伝達の低下した細胞株20種全例について、野生型 T β RII 蛋白または野生型 Smad4 蛋白の発現プラスミドをレポーター-p3TP-luxと共にトランスフェクションし、シグナル伝達の回復をレポーターアッセイにて検討する「Rescue」実験を施行した。この結果、野生型 T β RII 蛋白の発現により 20種中 5種（大腸癌 4例と膵癌 1例）に、また野生型 Smad4 蛋白の発現により 20種中 5種（膵癌 3例と大腸癌 2例）にシグナル伝達の回復が認められた。

5. 2、3、4の結果を総合すると、大腸癌では7/10例（70%）に T β RII の機能異常が存在し、膵癌では4/6例（67%）にSmad4 の機能異常が存在すると考えられた。対して胃癌では T β RII 及び Smad4 には明らかな異常が認められなかった。

6. T β RII 及び Smad4 に明らかな異常を示さない細胞株について TGF- β -type I receptor (T β RI), Smad2, Smad3 の「Rescue」実験を4.と同様に施行した結果、胃癌細胞株1例でのみ T β RI の機能異常が示された。その他の胃癌3/4例（75%）では異常を示す分子が明らかとならなかった。

以上、本論文は各消化器癌における TGF- β - 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を、培養細胞株を用いた機能的解析を中心として明らかとした。このシグナル伝達系は大腸癌、膵癌、胃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。本研究は各消化器癌の診断・治療における標的分子の解明や発癌メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。