

審査の結果の要旨

氏名 榎本 裕

本研究は、表皮角化細胞の分化過程において中心的な役割を果たしている転写因子 hSkn-1a が角化細胞由来の悪性腫瘍に対する分化誘導療法の機能分子となりうるか明らかにするため、テトラサイクリンによる誘導系、トランスフェクションあるいはアデノウイルスベクターによる遺伝子導入系を用いて、hSkn-1a の癌細胞株に対する作用を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 角化細胞に由来する培養細胞株(HeLa S3, SiHa, CaSki, HaCaT, C-33A)、角化細胞以外に由来する培養細胞株(COS-1, HEK293, Alexander, HepG2)における hSkn-1a の発現の有無をウエスタンブロット法で解析したが、いずれの細胞株においても検出感度以下であった。
2. HeLa を親細胞として、テトラサイクリンで hSkn-1a の発現を誘導できる細胞株 HeLa/Tet-On/hSkn-1a を作成した。この細胞は、培地中にドキシサイクリンを  $2\mu\text{g/ml}$  添加することによってすべての細胞がすみやかに hSkn-1a を発現していた。この細胞は hSkn-1a の発現に伴って角化細胞の分化マーカーであるケラチン 10 が誘導され、細胞の分化が誘導できた。また、hSkn-1a の発現に伴って細胞形態の扁平化、細胞増殖の遅延、DNA 合成の低下、細胞周期の分布の変化(細胞周期回転の遅延、G<sub>2</sub>/M 期の停止)が観察された。さらに、ゲノム DNA の断片化によってアポトーシスが検出された。
3. HeLa で観察された現象が他の細胞株でも再現するか検証するために、hSkn-1a とネオ

マイシン耐性遺伝子を同時に発現するプラスミドをトランスフェクションし、ネオマイシン耐性コロニーの形成能を比較するコロニーアッセイを行った。それにより、角化細胞由来のすべての細胞株で hSkn-1a の増殖抑制効果が見られた。角化細胞以外に由来する細胞株では、COS-1、Alexander で増殖抑制が見られたが HEK293、HepG2 では増殖抑制が見られなかった。ケラチン 10 の発現誘導を指標に hSkn-1a による分化誘導を検討したところ、角化細胞由来の細胞株ではすべて hSkn-1a のトランスフェクションによってケラチン 10 が誘導された。角化細胞以外の細胞株でもケラチン 10 の誘導が見られるものもあったが、増殖抑制効果とは並行していなかった。hSkn-1a 発現組み換えアデノウイルスベクターでは、HeLa S3、SiHa、HepG2 にケラチン 10 の発現誘導とアポトーシスの誘導を認めた。Alexander ではケラチン 10 の発現は認めなかったがアポトーシスは誘導された。

4. これらの結果から、hSkn-1a は角化細胞由来の癌細胞に対して分化を誘導し、増殖抑制からアポトーシスにいたる変化を惹起できることが示された。角化細胞以外に由来する癌細胞でも同様の効果が見られるものがあったが、各反応は並行して起こっているわけではなかった。

以上、本論文は表皮分化を誘導する転写因子 hSkn-1a の発現が角化細胞由来癌細胞に及ぼす効果を詳細に検討し、癌細胞に対しても分化誘導、増殖抑制、アポトーシス誘導を起こしうる事を示した。本研究は、特に角化細胞由来の悪性腫瘍の分化機構の解明や分化誘導療法の開発に対して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。