

[別紙2]

## 審査の結果の要旨

氏名 山道信毅

本研究は、ヒト癌由来細胞株を用いてクロマチンリモデリング因子SWI/SNF複合体の触媒サブユニットである*Brm*の発現制御とその抗癌活性を解析し、更にHDAC阻害剤の効果を調べて、下記の結果を得ている。

1. SWI/SNF複合体の構成因子である*Brm*・BRG1・Ini1はヒト癌やヒト腫瘍細胞株でしばしばその発現欠失が報告されてきたが、この論文ではWestern Blotting法を用いて約50種類の細胞株のスクリーニングを行ない、既に報告されていたものも含めて、*Brm*欠失細胞7株、BRG1欠失細胞5株、Ini1欠失細胞2株を同定した。このうちIni1とBRG1は癌抑制遺伝子であることが確立しているが、*Brm*と癌形質との関係が明らかでないため、その解明を目的として*Brm*の解析を行なった。

2. まず*Brm*欠失細胞株を用いて*Brm*遺伝子の発現解析を行ない、RT-PCR法ではmRNA・hnRNAは検出されないが、核run-onアッセイによる転写解析では初期転写が開始されていることを示した。更に核run-onアッセイのプロンプをcDNA上の複数箇所を作成し、転写が*Brm*遺伝子の全領域に渡って正常に進行していることを示した。これらの結果から、*Brm*発現欠失細胞株では*Brm*遺伝子は例外なく転写後制御を受け、しかもそれは転写が起こってから非常に早い段階で抑制されていることを示した。

3. 転写後抑制を受けている*Brm*欠失ヒト細胞株に対して様々な薬剤を用いて*Brm*の発現誘導を試みたところ、ヒストン脱アセチル化 (HDAC) 阻害剤の一過的な処理によって*Brm*が例外なく発現することが発見した。次に細胞増殖に影響がない濃度のHDAC阻害剤を用いて*Brm*欠失細胞株を3日間処理すると、*Brm* mRNA・*Brm*タンパク質が強く誘導され、薬剤を除去しても発現誘導が10～14日間まで保たれることを確認した。さらに「*Brm*の発現がMuLV型レトロウイルスの発現維持に必須である」という知見を利用して、HDAC阻害剤の処理前後で*Brm*欠失細胞株におけるレトロウイルスの発現維持を調べ、転写後抑制が解除されるという結果を得た。このことから、誘導された*Brm*タンパク質が全て機能的であることを示した。

4. *Brm*と癌形質の関係を調べるために、*Brm*欠失株PA-1を用いて3次元コーゲンゲル内包埋培養による浸潤能の解析を行ない、PA-1の持つ強い浸潤能がHDAC阻害剤の一過処理によって*Brm*を誘導した場合に失われることを示した。次に*Brm*欠失細胞2種類（SW13(vim-)細胞・NCC-IT細胞）を用いて軟寒天培地中でのコロニー形成能の解析を行ない、HDAC阻害剤の一過処理で*Brm*を誘導させた場合には、足場非依存性の増殖が抑制されることを示した。

5. さらに*Brm*・BRG1の安定発現株が作成出来たSW13(vim-)細胞を用いて軟寒天培地中でのコロニー形成能を調べると、*Brm*導入SW13(vim-)細胞では足場非依存性増殖の明らかな抑制が認められ、その効果は癌抑制遺伝子である*BRG1*遺伝子を発現させたBRG1導入SW13(vim-)細胞とほぼ同等の効果であることを示した。

以上、本論文は、クロマチン構造変換因子SWI/SNF複合体の触媒サブユニット*Brm*の発現が数多くのヒト腫瘍細胞株で欠失しており、その発現が転写後抑制という極めて特殊な制御下にあることを示した。また、こうしたエピジェネティカルな発現抑制を受けている*Brm*がHDAC阻害剤の一過的な処理によって長期間誘導され、それによって*Brm*型SWI/SNF複合体の機能が回復することを示した。さらに浸潤能・足場非依存性増殖能の検討から、*Brm*が癌抑制遺伝子としての側面を持つことを示した。これらの結果はクロマチン構造変換因子の発癌への関与を明らかにし、さらには「転写後抑制」という新たな制御機構の解明に貢献することが考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。