

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 佐 藤 博 之

多段階発癌は「自然選択によるクローン選択での進化の過程」であり、その方向付けには、異常となる遺伝子そのものの作用だけでなく、微小環境における選択様式も大きな役割を果たす可能性がある。この仮説を支持する知見として、**c-myc** と **EJ-ras** 導入ラット胎児線維芽細胞 (REF) による *in vitro* の発癌モデルの系において、個体密度による自然選択モデルである「*r* 選択と *K* 選択」が細胞に与える影響を解析した報告がある。*r* 選択では **p53** のヘテロ接合性消失 (**loss of heterozygosity, LOH**) クローンが、*K* 選択では大型の多倍体クローンが優位性を獲得することがすでに確認されている。しかしこの「*K* 選択」下で腫瘍細胞に優位性を付与する遺伝子はまだ同定されていない。

本研究はがん遺伝子導入 REF による発癌モデルにレトロウイルスによる遺伝子導入法を応用して、*K* 選択下に選択優位性を付与する遺伝子を同定し、さらに同定した遺伝子につきその機能及び発現を解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. すでに *K* 選択を受けた REF 由来の細胞株より **cDNA** ライブラリーを作製し、レトロウイルス化し親株細胞に発現導入した上で *r* 選択もしくは *K* 選択を行った。選択された細胞から **cDNA** を **RT-PCR** で回収した結果、**14-3-3 $\sigma$**  遺伝子および **pyruvate kinase** 遺伝子が複数の培養から回収された。しかし、**14-3-3 $\sigma$**  遺伝子のみ *r* 選択後と *K* 選択後の細胞間で **mRNA** の発現変化を認め、*r* 選択で発現低下、*K* 選択で発現亢進が認められた。
2. **p53** に点突然変異を持ち高率に **p53 LOH** となる **MR5** 細胞の亜株を *K* 選択した細胞について **14-3-3 $\sigma$**  の発現を解析した。その結果、**14-3-3 $\sigma$**  の高発現は **p53 LOH** の出現と関連がなく、*K* 選択下での 4 倍体出現との関連が認められた。ただし *K* 選択後に 4 倍体でありながら **14-3-3 $\sigma$**  の高発現を認めない細胞も存在することから、**14-3-3 $\sigma$**  高発現は 4 倍体細胞の維持に必須ではないと考えられた。

3. レトロウイルスベクターによる **14-3-3 $\sigma$** 強制発現細胞を用い、その選択優位性や、機能解析を行ったところ、**14-3-3 $\sigma$** 強制発現細胞の **K** 選択での優位性は僅かに認められたが、これまでに報告されている抗 **apoptosis** 作用や、細胞周期停止作用は確認されなかった。
4. **K** 選択後に高発現となった **14-3-3 $\sigma$** の発現調節について検討したところ、ユビキチン・プロテアソーム経路での蛋白分解作用の関与は否定的だった。一方、プロモーター領域の **CpG** アイランドの修飾による発現調節については、**r** 選択後に **97.5%**、**K** 選択後に **0.0%**と著明なメチル化の差が検出され、発現との強い関連を認めるとともに脱メチル化による発現増強を確認した。
5. 親株細胞の **2** つのアレルに由来するメチル化状態に多様性が存在したことから、メチル化状態の可塑性が認められた。一方 **MR5** 細胞の亜株のメチル化状態は **r** 選択後一様にメチル化したのに対し、**K** 選択においてもメチル化の進行が確認され、一旦進行したメチル化の不可逆性が示唆された。

以上、本論文は **K** 選択標的遺伝子の候補として **14-3-3 $\sigma$** 遺伝子を単離し、その発現解析から **K** 選択下に脱メチル化と高発現が、**r** 選択下にメチル化と発現低下が誘導されることを見出した。そして多段階発癌におけるメチル化と選択様式の密接な関連を示唆するとともに、メチル化が持つ可塑性と不可逆性の **2** つの側面を示した。大局的には、本研究は古典的実験系である癌遺伝子導入による **REF** の発癌モデルがジェネティクスのみならず、エピジェネティクスの実験モデルにもなりうることを初めて示したものであり、多段階発癌でのエピジェネティクス解析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。