

## 論文の内容の要旨

論文題目 : **Smad4 Silencing in Pancreatic Cancer Cell Lines Using Stable RNA**

**Interference and Gene Expression Profiles Induced by**

**Transforming Growth Factor- $\beta$**

和訳 : 恒常的 RNAi 手法を用いた Smad4 ノックダウン膵臓癌細胞での TGF- $\beta$  の刺激による遺伝子発現プロファイル解析

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 14 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 : ジャザグ アマラサナー

### 研究の背景

TGF- $\beta$  は上皮系細胞の強力な増殖抑制因子であり、そのシグナルは主に Smad と呼ばれるシグナル伝達分子によって伝わることで知られている。Smad ファミリーには 1) 受容体によりリン酸化される R-Smad, 2) R-Smad と結合して細胞質から核へ移行する Co-Smad, 3) R-Smad のシグナルを抑制する I-Smad がある。TGF- $\beta$  は、まずセリン/トレオニンキナーゼである II 型および I 型受容体と複合体を作る。すると、活性化された I 型受容体が R-Smad である Smad2 及び 3 をリン酸化し、リン酸化 Smad2 及び 3 は Co-Smad である Smad4 と結合して核に移行する。核内で Smad 複合体はさらに他の転写因子や転写のコアクチベーター、コリプレッサーと結合し、最終的に標的遺伝子の転写を制御することになる。TGF- $\beta$  による細胞増殖抑制のメカニズムとして TGF- $\beta$  により CDK inhibitor (cyclin dependent kinase inhibitor) p21, p15 の発現が増強し、その結果細胞周期を停止するためと考えられている。一方 TGF- $\beta$  のシグナル伝達系に何らかの異常が生じ、シグナルがうまく伝わらなくなると、細胞は増殖抑制を免れて増殖するようになり、それがひいては発癌と関与すると推測される。実際にヒトの癌において、このシグナル伝達系のさまざまな

遺伝子の異常や発現レベルの異常が見つかっており、このシグナル伝達系は癌抑制因子として働くと従来考えられてきた。膵癌では、Smad4 遺伝子の異常が 50% もの高率に認められ、Smad4 の機能異常による Smad シグナルの伝達異常は他の癌に比べて特に膵癌に特徴的に認められる。一方、TGF- $\beta$  のシグナルは、癌化過程の遅い時期では、癌細胞の浸潤や転移を促進するなど、逆に癌に有利に働くことが分かってきた。膵癌でも TGF- $\beta$  の産生の亢進が知られており、また膵癌は高い浸潤能・転移能を示すため、TGF- $\beta$  のシグナルによって浸潤や転移にかかわる多数の遺伝子が制御されている可能性が考えられ、特に膵癌の特徴である Smad4 に異常のある癌細胞でそのような影響が強いのではないかと考えられた。近年 RNA 干渉 (RNAi) は哺乳類細胞内因性分子の機能阻害実験を行うツールとして汎用されるようになり、今回我々は、プラスミドベクターを用いて Smad4 を恒常的にノックダウンした膵癌細胞株を用い、TGF- $\beta$  シグナルの Smad4 非依存的な標的遺伝子の同定を試みた。

## 方法

東京大学大学院工学系研究科多比良研究室から siRNA プラスミドベクターを供与していただき Smad4 ノックダウンプラスミドベクターを作成した。このプラスミドは、ヒト U6 プロモーター制御下に Smad4 遺伝子の部分配列を含む shRNA を産生し、これが 2 本鎖の short interfering RNA (siRNA) となり、宿主ゲノムの Smad4 遺伝子と結合する。すると Smad4 遺伝子が RNA-induced silencing complex (RISC) という複合体に取り込まれ切断されるため、Smad4 の発現がノックダウンされる。ノックダウンしようとする遺伝子のどの配列を用いるかということが、ノックダウンの効率はノックダウンしようとする遺伝子の配列に依存するために、効率良いノックダウンの予測される配列を 5 ヶ所選択してプラスミドを作成し、(Smad4 RNAi ベクター No. 1 から No. 5) それぞれ Smad4 発現プラスミドとともに細胞内に一過性に発現させウエスタンブロットで Smad4 タンパク質の発現を検討した。その中で最もノックダウン効果の高い No. 5 を選び、以降の実験に用いた。Smad4 及び Smad シグナルの正常な膵癌細胞株 PANC-1 にピューロマイシン耐性遺伝子が組み込まれた siRNA 発現プラスミド導入し、1  $\mu$ g/ml Puromycin でセレクションを行い、恒常的に内因性の Smad4 をノックダウンした細胞株 PANC-1-S4KD を樹立した。同時に空ベクターを導入した Smad4 の正常なコントロール株も樹立した。ノックダウンの確認は Western Blot で検討した。シグナル伝達が抑制されていることは Smad pathway の reporter CAGA-luc を使った luciferase assay で確認し、Smad4 の mRNA の発現量は定量的 RT-PCR で検討した。遺伝子発現プロファイルは S4KD およびコントロール細胞それぞれを TGF- $\beta$  で刺激し、2 時間後に RNA を抽出、刺激によって制御される標的遺伝子をクロンテック社の 3756 個 cDNA が搭載されたマイクロアレイにて網羅的に解析した。Smad4 恒常的ノックダウン細胞とコントロール細胞の表現型の比較のため *in vitro* での運動能アッセイ (wound closure assay) を行った。

## 結果

## ノックダウン細胞株の樹立

このようにして、我々はヒト膵癌細胞株 PANC-1 の Smad4 恒常的ノックダウン細胞株 (PANC-1-S4KD) とコントロール細胞株 (PANC-1-puro) を樹立した。ピューロマイシンで選択した細胞集団である pool (S4KD pool, puro pool) およびモノクローナル細胞についてまずウエスタンブロットで Smad4 タンパク質の発現を調べると、S4KD では Smad4 タンパク質のバンドがほぼ完全に消失していた。次に TGF- $\beta$ -Smad シグナルをレポーターアッセイで検討したところ、S4KD 細胞では著明にシグナル伝達が抑制されていることが分かり、一方コントロール細胞ではシグナルが保たれていることが分かった。また、この Smad4 のノックダウン効果は継代を重ねても保たれていた。

## Smad4 恒常的ノックダウン膵癌細胞株における TGF- $\beta$ シグナルの新規標的遺伝子の同定 (マイクロアレイを用いた解析)

我々は Smad4 の恒常的ノックダウン細胞 (PANC-1-S4KD pool) と Smad4 の正常なコントロールの膵癌細胞 (PANC-1-puro pool) を TGF- $\beta$  1 (10ng/ml) で刺激し、比較的早期 (刺激 2 時間後) に発現が上昇もしくは低下する標的遺伝子をマイクロアレイでスクリーニングした。その結果、Smad4 ノックダウン細胞においてもコントロールと同等の数の遺伝子が TGF- $\beta$  刺激で動いており、そのうち共通して動く遺伝子は非常に少なかった。このことから、Smad4 の機能しない細胞でも TGF- $\beta$  シグナルは遮断されているのみではなく、Smad4 正常細胞と異なるメカニズムでシグナルが伝達されていることが示唆された。得られた標的遺伝子の一部について定量的 RT-PCR を施行し、マイクロアレイの結果と同じ傾向であることを確認した。これら標的遺伝子を機能別に分類してみると Smad4 ノックダウン細胞とコントロール細胞とでは細胞の接着、運動、増殖にかかわる遺伝子の発現パターンに差が見られた。また、これらの遺伝子と TGF- $\beta$  との関係性を過去の文献で調べた結果、今回得られたもののうち 246 遺伝子が過去に報告のない新規標的遺伝子と考えられた。

## Smad4 恒常的ノックダウン膵癌細胞の表現型の変化

今回我々は、Smad4 恒常的ノックダウン細胞が、コントロール細胞と比べてどのような表現型の変化を来すかということについても検討を加えた。*in vitro* での細胞増殖および細胞周期の G1 期停止については、明らかな変化が認められず、ともに増殖が抑制され G1 期停止を来した。今回の結果から Smad4 の機能は細胞周期停止の必要条件ではないということが示唆された。*in vitro* での浸潤能についてマトリゲルでコートしたフィルターでのアッセイを施行したが、これも有意差は認めなかった。また *in vivo* での造腫瘍性について、ヌードマウスおよび SCID マウスにこれらの細胞を皮下注射および脾臓内注射したが、いずれも腫瘍を形成しなかった。さらに *in vitro* での運動能アッセイ (wound closure assay) を施行したところ、コントロール細胞に比べ、Smad4 ノックダウン細胞では運動能が低下することが分かった。TGF- $\beta$  刺激下ではその差がより明瞭化した。

## 考察

現在行われている RNAi は double strand RNA を一過性に導入する方法が一般的であるが、今

回我々の用いたプラスミドベクターを用いた手法では恒常的ノックダウン細胞株を樹立できる利点がある。

RNAiによる恒常的ノックダウンを行い、そこにサイトカイン刺激を加えて反応をマイクロアレイで網羅的に解析するという報告もこれまでなく、本研究の特徴でもある。アレイ結果の解析によると Smad4 の機能しない細胞でも TGF- $\beta$  シグナルは遮断されているのみではなく、Smad4 正常細胞と異なるメカニズムでシグナルが伝達されていることが示唆された。TGF- $\beta$  の標的遺伝子を機能別に分類してみると Smad4 ノックダウン細胞とコントロール細胞とでは細胞の接着、運動、増殖にかかわる遺伝子の発現パターンに差が見られた。表現型の変化として Smad4 ノックダウン細胞では細胞運動能の低下が認められたがその分子メカニズムは不明であり、今後検討を要する。

### 結語

今回の解析で、我々は Smad4 ノックダウン細胞を用いて Smad4 非依存的な TGF- $\beta$  の標的遺伝子を多数見いだした。また Smad4 ノックダウン細胞では細胞運動能の低下が認められた。今後どの標的遺伝子が細胞運動能の変化と相関しているのかについて検討が必要であり、このような解析を通じて、膵癌の治療に有用な新たな分子標的を発見したいと考えている。プラスミドベクターを用いた恒常的 RNAi は、プラスミドの扱いが簡便であり、トランスフェクション効率による影響を除外でき、比較的長期にわたる解析も可能となる。また、これまで欠損した分子のレスキューをして元の細胞と比較する実験がなされてきたが、その場合目的の分子の発現が過剰になりがちであった。恒常的 RNAi では、正常細胞と目的分子のノックダウン細胞とをより生理的条件に近い状態で比較検討できる。