

審査の結果の要旨

氏名 ジャザグ アマラサナー

本研究は、恒常的 RNAi の手法を用いた Smad4 ノックダウン膵癌細胞株での TGF- β の刺激による遺伝子発現プロファイルについて検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ノックダウン細胞株の樹立。このようにして、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- β -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。

2. 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- β 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- β 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- β 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。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- β 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。

3. 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- β 刺激下ではその差がより明瞭化した。 新生に関与することを示している。

以上、本論文では Smad4 ノックダウン細胞株を樹立し、TGF- β の刺激による遺伝子発現プロファイル解析した結果、246 の新規標的遺伝子が同定され、さらに Smad4 ノックダウンによる表現型の変化 (運動能が低下) が認められた。

膀胱癌の治療に有用な新たな分子標的の発見につながることを期待され、学位の授与に値するものと考えられる。

尚、審査会時点から、論文の内容について以下の点が改訂された。

1. 全体の文章構成については、Conclusion を追加した。
2. Introduction に、なぜ PANC-1 細胞を選んで実験を行ったかについて説明を加えた。 Ijichi et al., の論文を引用した。
3. Materials and Methods に、siRNA のターゲットになった Smad4 の遺伝子配列、BrdU incorporation assay 方法、及び PCR の primer の記載を追加した。
4. Figure 4, Figure 5 を修正した。全ての Figure と Figure Legend の間にスペースを空けた。
5. BrdU incorporation assay の結果を加えた (Figure7)。
6. 全ての Supplementary Table を全体に挿入した。
7. Results and Discussion に Smad4 ノックアウトについて文献的なコメントを記載した。
8. Results and Discussion に、なぜ single clone ではなく cell pool を用いたかについて説明を加えた。
9. Results and Discussion に、審査の際に指摘された 2005 年 9 月発表の論文 (Levy et al.,) について Discussion を追加した。

10. Acknowledgements に、共同研究者や指導教官、妻と子供に対して感謝の言葉を加えた。