

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 米 田 光 宏

本研究は、細胞増殖・腫瘍形成・癌と密接に関係していると考えられている Tob/BTG 増殖抑制因子ファミリーに属する ANA の癌発症への影響やその分子メカニズムを明らかにするため、ANA 遺伝子欠損 (*ANA*^{-/-}) マウスによる個体レベルでの解析やヒト肺癌由来細胞株を用いた細胞レベルおよび分子生物学的な解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. *ANA* 遺伝子座の Tob/BTG ファミリータンパク質に相同性の高い領域をコードするエクソンを *NLS-LacZ* 遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子と置換することにより、*ANA*^{-/-}マウスを作製した。病理学的な解析を行い、長期飼育した *ANA*^{-/-}マウスにおいて、肺腺癌を含む腫瘍形成が高頻度に観察され、*ANA* は、マウス個体において腫瘍および腫瘍形成を抑制する作用をもつ事が示された。
2. ノーザンプロット解析により、*ANA* は正常肺組織に高い発現を示し、また real-time RT-PCR 法を用いた解析により、肺癌由来細胞株および肺癌組織において、*ANA* の発現が低下している事が示された。さらに、X-gal 染色による組織学的解析により、*ANA* は腺癌の主な由来と考えられている II 型肺胞上皮細胞に特異的に発現している事を見出した。*ANA* の発現低下が肺癌、中でも肺腺癌発症に何らかの影響を及ぼすことが示唆された。
3. *ANA* はサル腎臓由来細胞株 (COS7) の過剰発現による免疫共沈実験を行い、Smad3 および Smad7 と相互作用する事が示された。また、ヒト肺腺癌由来細胞株 (A549) を用いた TGF-β response element での転写活性をみる Luciferase assay において *ANA* を強制発現させることにより、TGF-β 依存的な転写活性化が低下する事を見出した。
4. TGF-β による腫瘍進展を有利にする働き、すなわち細胞外マトリックス・プロテアーゼなどの発現誘導は Smad3 依存性であり、Smad2 の関与は小さいといわれている。本研究の結果より、*ANA* は TGF-β 刺激により伝わるシグナルを抑制する機能を持つが、Smad2 とは結合せず、Smad3 と特異的に結合することが明らかになった。また、TGF-β response element での転写活性をみる Luciferase assay において、Smad3 を共発現させた場合でも、転写の活性化を抑制していた。さらに、ヒト肺癌由来細胞株に *ANA* を強制発現させると、浸潤・転移に関わっている TGF-β 標的分子の *Matrix*

metalloproteinase2 (*MMP2*) や *Plasminogen activator inhibitor-1* (*PAI-1*) の発現量が減少する事が示された。従って、ANA は Smad3 と結合することにより、選択的に癌の浸潤・転移に関わる TGF- β シグナルを制御している可能性が示唆された。*PAI-1* は TGF- β 刺激後の転写活性化や発現の制御は、Smad2 に比して Smad3 により依存的であることが知られており、ANA による *PAI-1* 発現制御は、さらにその可能性を支持している。

以上、本論文は ANA が、Smad3 と結合することで、TGF- β シグナルに抑制的に働き、肺腺癌を含む腫瘍の進展の進展、主に浸潤・転移に関与する可能性を示唆した。また、長期飼育した *ANA*^{-/-}マウスにおいて、実際に腫瘍が形成される事を明らかにした。本研究は、これまで未知に等しかった、ANA の発現低下と癌の進展との関連性の解明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。