

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 瀬戸 元子

Hedgehog (HH)シグナルは、様々な癌において重要な役割を果たしていると報告されているが、消化器癌における恒常的なシグナル活性上昇のメカニズムは不明である。一方で、消化器癌において、RAS/mitogen-activated protein kinase (MAPK)シグナルや phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT シグナルといった、増殖因子によって活性化されるシグナル群の異常が報告されてきた。近年、HH シグナルが、epidermal growth factor (EGF)などの増殖因子によって引き起こされる他の細胞内シグナル伝達系の活性化によって影響を受けることが報告されているが、それらのシグナル伝達経路による HH シグナルの調節機構の詳細については依然はっきりしておらず、また癌における検討はなされていない。本研究は消化器領域の腫瘍においてみられる HH シグナルの恒常活性のメカニズムを解明するため、こういった消化器領域での基本的な増殖シグナルの刺激が HH シグナルに与える影響について解析しており、下記の結果を得ている。

1. 胃癌細胞株 AGS での GLI レポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイにおける検討により、EGF 刺激により GLI レポーター活性が上昇することが示された。また、定量的 RT-PCR における検討で EGF 刺激により HH シグナルの標的遺伝子の発現量が増加することが示された。従って、胃癌細胞への EGF 刺激により、GLI 転写活性が増強することが示された。
2. 恒常活性型 KRAS、BRAF、MEK1、p110 α の発現プラスミドと MEK1/2 阻害剤を用いたルシフェラーゼアッセイにおける検討より、EGF 刺激による HH シグナルの活性化は、KRAS-MAPK カスケードを介しており、一方で PI3K-AKT シグナルは GLI の活性調節に影響を及ぼさないことが示された。
3. 胃癌組織検体の免疫組織化学における検討により、ERK の活性化を示す症例は PTCH の高発現を伴っていることが示された。
4. GLI1 を強制発現させたルシフェラーゼアッセイにおける検討により、MAPK カスケードは GLI1 のタンパク量を変化させることなく、その転写活性を増強させることが示された。
5. GLI1 の N 末端の deletion コンストラクトを用いたルシフェラーゼアッセイにおける

検討より、GLI1 の N 末端領域が MEK1 による GLI の転写活性調節に関与していることが示された。

6. 恒常活性型 KRAS、MEK1 発現プラスミドと SUFU 発現プラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイにおける検討より、MAPK カスケードは SUFU による GLI1 の活性抑制機能に影響しないことが示された。

以上、本論文は MAPK カスケードによる HH シグナルの活性に対する影響を解析することにより、胃癌において HH シグナルと、増殖因子によって活性化された MAPK カスケードの間のクロストークについて検討した初めての報告であり、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. HH シグナルと、MAPK シグナルや PI3K シグナルの関係を調べるために、その上流である EGF に着目したということを記述し、HH シグナルと MAPK シグナルの interaction について最近報告されている事柄を引用し、今回の実験の目的に至る背景を論理的になるように訂正した。
2. 「結果」の各段落で、目的・方法・結果の順に文章を記述し、各実験の目的・方法についても模式図を図に追加した。また、小括を挿入した。
3. 臨床検体を用いた免疫組織化学の評価方法について、判定方法を記述し、引用文献を追記した。
4. 強制発現系での実験による問題点について指摘し、コメントした。