

審査の結果の要旨

氏名 宇野 直輝

本研究は発癌ストレスとして知られるAPCの不活化及び β -cateninの安定化に対するヒト正常細胞の反応を評価し、それらに対するヒト正常細胞の癌抑制機能を解明することを目的としている。ヒト正常線維芽細胞を用いたレトロウイルスによる遺伝子導入実験系で以下の結果を得ている。

1. APCに対する3種類のshRNAをレトロウイルスを用いてヒト正常線維芽細胞に導入した結果、良好なノックダウン効果が認められた2種類についてのみ、BrdUの取り込みが減少することが明らかになった。またAPCのノックダウンによって細胞増殖も抑制されることが明らかになった。
2. 細胞老化の表現型として知られる大きく扁平な細胞形態、SA- β gal染色陽性、SAHF (senescence associated heterochromatin foci)はいずれもAPCをノックダウンした場合と正常対象で有意な差は認められなかった。
3. FACSによる細胞周期の解析によって、APCのノックダウンは細胞周期をG1期で停止させることが明らかになった。
4. Western blottingの結果、APCのノックダウンによって、G1期を制御するCDK inhibitorsであるp16・p21・p27の発現はいずれも増加し、Rbは脱リン酸化し、E2F1の標的遺伝子の発現は低下することが明らかになった。
5. APCのノックダウンと同時にp53をノックダウンした結果、BrdUの取り込みの低下が回復したことから、APCのノックダウンによる細胞周期停止にはp53が機能的に必要とされることが明らかになった。しかしながら、p21をノックダウンした場合は細胞増殖抑制の回復は認められず、p21はAPCのノックダウンによる細胞増殖抑制に必要とされないことが示唆された。
6. APCのノックダウンによる細胞増殖抑制にアポトーシスが関与するかどうかを検討するため、Annexin VとPIを指標としてFACSを行った結果、アポトーシス細胞とされるAnnexin V陽性かつPI陰性の細胞分画は正常対象と同様にAPCのノックダウンでも認められなかった。培養過程で死細胞はほとんど認められないことから、APCのノックダウンによってアポトーシスは生じないと考えられた。
7. β -cateninの安定化がヒト正常線維芽細胞に及ぼす影響を検討した結果、 β -cateninの安定型変異体の過剰発現によって、細胞増殖抑制とBrdU取り込みの低下が認められた。
8. 安定型 β -cateninを過剰発現させた細胞では、癌型Rasの過剰発現で認められるような細胞老化の表現型は認められず、正常対象と比して有意な差が認められなかった。
9. FACSによる細胞周期分析によって、安定型 β -cateninは細胞周期をG1期で停止させることが明らかになった。
10. p53をノックダウンした細胞では、安定型 β -cateninによる細胞増殖抑制が回復したことから、安定型 β -cateninによる細胞増殖抑制にはp53が必要とされることが明らかになった。

11. APCのノックダウンによる細胞増殖抑制が β -catenin-TCF経路を介した表現型か否かを検討した結果、APCのノックダウンによって β -cateninの蛋白発現量は変化せず、 β -cateninの核内移行も認められず、TCF4のドミナントネガティブ変異体を過剰発現させても細胞増殖抑制は回避されなかったことから、APCのノックダウンによる細胞増殖抑制は β -catenin-TCF4経路を介さない可能性が示唆された。

以上の知見から、発癌ストレスとして知られるAPCの不活性化及び β -cateninの蓄積に対して、ヒト正常細胞はp53依存的に細胞周期停止を起こすことが明らかになった。この結果は発癌ストレスに対するヒト正常細胞の癌抑制機能に矛盾せず、ヒト正常細胞の新たな癌抑制機能を提示する発見として学位の授与に値すると考えられる。