

審査の結果の要旨

氏名：生島 弘彬

本研究は transforming growth factor (TGF)- β シグナルによって引き起こされる種々の細胞応答の選択的な制御を目的としたものであり、TGF- β シグナルによる各種細胞応答のうち特定の一部の細胞応答のみを選択的に抑制する新規因子 Human Homolog of Maternal Id-like molecule (HHM) の発見及び *in vitro*, *in vivo* での解析を通じて、下記の結果を得ている。

1. HHM は、TGF- β シグナルによって活性化されるプロモーターの活性を負に制御した。その一方で、TGF- β シグナルの細胞質から核内への伝達因子である Smad2/3 の核内移行には影響を及ぼさなかった。このことから、HHM は新規 TGF- β シグナル抑制因子であり、かつ核内の転写レベルで TGF- β -Smad シグナルを制御していることが示唆された。
2. TGF- β シグナルによって引き起こされる各種細胞応答のうち、細胞増殖抑制等の細胞応答は HHM によって抑制されるが、同一細胞・同一タイムコースであっても、上皮間葉転換等の細胞応答は HHM によって抑制されなかった。このことから、HHM は TGF- β シグナルによって引き起こされる種々の細胞応答のうち特定の一部の細胞応答のみを選択的に抑制することが見出された。
3. さらに、HHM は TGF- β シグナルの標的遺伝子のうち、一部の遺伝子の発現のみを抑制することを見出した。定量的 RT-PCR の結果から、HHM は *PAI-1 (Serpin1)*, *Smad7*, *p21^{WAF1}*, *p15^{INK4b}* などの TGF- β 下流遺伝子の発現に対しては抑制的に作用するが、*Snail*, *LIF* などの TGF- β 下流遺伝子の発現に対しては有意な発現調節を及ぼさないことが確認された。
4. HHM による TGF- β シグナルの細胞応答特異的・標的遺伝子特異的な抑制作用のメカニ

ズムを探る目的で、Mass Spectrometry を用いて、HHM 結合タンパク質を網羅的に探索したところ、DNA 結合性転写因子である oligodendrocyte transcription factor 1 (Olig1) が同定された。

5. DNA-affinity purification (DNAP) 法及び chromatin immunoprecipitation (ChIP) 法により、Olig1 が Smad 複合体と協調的に TGF- β 標的遺伝子のプロモーター上に作用し、その発現を誘導していること、並びに、その協調的な発現誘導が TGF- β 標的遺伝子のうち、そのプロモーター領域に Olig1 結合配列と Smad 結合配列とを近接して持つ遺伝子においてのみ見られることを見出した。このことから、Olig1-Smad 複合体は TGF- β シグナル下流遺伝子のうち一部の遺伝子のみの発現を制御し、"Olig1-Smad synexpression group"を形成していることが明らかとなった。
6. さらに、タンパク免疫沈降法を用いて、HHM が Olig1 に結合することで内在性の Olig1-Smad 複合体の形成を阻害していることを示すと同時に、HHM によって Olig1-Smad 複合体が標的遺伝子のプロモーター上から解離することを、DNAP 法・ChIP 法を用いて見出した。このことにより、HHM は Olig1 に結合することで Olig1-Smad 複合体の形成を阻害し、その結果 Olig1 だけでなく、単独では DNA 結合能が弱い Smad タンパク質が標的遺伝子のプロモーター上から遊離することを促していることが明らかとなった。このことから、HHM は、少なくとも"Olig1-Smad synexpression group"を含む複数かつ一部の synexpression group のみに作用することで、細胞応答特異的・下流遺伝子特異的に TGF- β シグナルに対して抑制作用を発揮していることが示された。また、マイクロアレイによる発現プロファイルを用いて、以上の現象が一般化されることを確認した。
7. "Olig1-Smad synexpression group"に属する一因子である *PDGF-B* が膠芽腫細胞内でその増殖に大きく寄与していることから、本研究にて新規同定した HHM 及び"Olig1-Smad synexpression group"の生体内での作用を検討する目的で、Olig1, HHM それぞれを microRNA によってノックダウンした膠芽腫細胞をマウスに移植し、その生体内での

増殖を検討した。その結果、Olig1 をノックダウンした細胞では陰性対象に比較して増殖が抑制されること、及び、HHM をノックダウンした細胞では増殖が大きく亢進することが明らかとなった。

以上、本論文は新規に TGF- β シグナルに対する抑制因子として HHM を同定し、その抑制作用が細胞応答特異的・標的遺伝子特異的であることを見出し、さらにその作用機序として、synexpression group 特異的な制御機構という新規の機序を明らかにした。本研究は、TGF- β シグナルによる cellular context 特異的な細胞応答の誘導機構の解明、及び TGF- β シグナルに対する転写制御を中心とした新規パラダイムに基づく抗腫瘍薬の研究開発に重要な貢献をなすと評価でき、学位の授与に値するものと考えられる。