

審査の結果の要旨

高畑 麻美

本研究は細胞の癌化と密接に関わるとされている Transforming growth factor- β (TGF- β)シグナルにおける MEL1 の役割と、そのメカニズムとして TGF- β シグナルのコリプレッサーである SKI との協調作用について解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 種々の癌細胞株における SKI と MEL1 の発現を real-time RT-PCR で検討したところ、胃癌細胞株において SKI と MEL1 両遺伝子が共に高発現する傾向が認められた。FISH法を用いて SKI、MEL1 高発現胃癌細胞株 MKN28 の SKI、MEL1 遺伝子座を観察すると、両遺伝子は共に第 1 染色体長腕に転座して増幅していた。
2. 胃癌の臨床検体を用いた免疫組織染色による検討では、SKI タンパク質の発現が全 120 症例中 114 症例に認められた。組織型の分類から、SKI は未分化型癌よりも分化型癌で強く発現する傾向が認められた。また、正常組織と胃癌組織での SKI、MEL1 mRNA の解析では、両 mRNA が胃癌組織で同時に発現上昇する傾向があることが明らかになった。
3. 胃癌細胞株における SKI、MEL1 と TGF- β シグナルの関係を調べるために、MKN28 細胞にレンチウイルスを用いて miRNA を導入し、内因性 SKI と MEL1 をノックダウンした細胞株を樹立し、TGF- β 反応性を検討した。その結果、一方のみのノックダウンに比して両者の同時ノックダウンにより、効果的に TGF- β の標的遺伝子 PAI-1 と p21 mRNA の発現誘導が認められ、TGF- β による細胞増殖抑制作用も回復した。続いて *in vivo* での MKN28 細胞の腫瘍形成への両遺伝子の作用を検討したところ、ヌードマウスへの皮下移植実験で、ダブルノックダウン細胞株は control の細胞株に比べ、腫瘍形成が抑制された。これらのことより、SKI と MEL1 は胃癌細胞株において、TGF- β シグナルを協調的に抑制していることが示唆された。
4. TGF- β シグナルにおける MEL1 の解析から、MEL1 は Smad2、Smad3 に結合し、Smad3 へ HDAC1 をリクルートすることによってヒストンの脱アセチル化を促進して、Smad による標的遺伝子の転写活性化を抑制することが示唆された。また、MEL1 の TGF- β シグナル抑制作用のメカニズムの一部として、CtBP1 との結合が関与している可能性が示唆された。

5. TGF- β シグナルに対する SKI と MEL1 の協調的抑制作用に着目し、そのメカニズムの解析をおこなったところ、SKI と MEL1 は結合し、さらに互いに Smad3 との結合を増強することが明らかになった。また、Smad 結合配列を使用した DNA affinity precipitation assay によって、SKI と MEL1 両者は協調的に Smad3 の DNA 結合を促進することを見いだした。そして MKN28 細胞の SKI、MEL1 ノックダウンによって、内因性の Smad2/3 と HDAC1 の TGF- β 標的遺伝子のプロモーターへの結合が減少することがクロマチン免疫沈降法により明らかになった。これらの結果より、SKI と MEL1 は HDAC1 を含む不活性な Smad 複合体をプロモーター結合領域に留め、コアクチベーターを含む活性型 Smad 複合体の結合を妨げ、より効率的に転写の抑制をおこなっていることが示唆された。
6. MEL1 のシグナル抑制作用に対しての SKI の必要性について検討したところ、SKI と結合しない MEL1 mutant (MEL1 (1-2214))では Smad3、HDAC1 の結合は維持されているにもかかわらず、Smad3 への HDAC1 のリクルートが殆どできなくなり、ルシフェラーゼアッセイにおける TGF- β シグナル抑制作用も強く減弱した。これらのことより、MEL1 のシグナル抑制において SKI との結合が重要であることが示された。

以上、本論文は胃癌細胞株においてコリプレッサーSKIとMEL1両者が遺伝子増幅により同時に高発現して協調的に作用することで、TGF- β の抗腫瘍作用を効果的に抑制している可能性を示した。本研究はMEL1のTGF- β シグナル抑制メカニズムを解明し、TGF- β のコリプレッサーとして働くSKIとMEL1が物理的に結合して協調的に作用を発揮するということを明らかにしており、癌におけるシグナル異常の新たなメカニズム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。