

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 川畑 公人

本研究は悪性腫瘍の発症や進展にかかわるTransforming growth factor (TGF)- β ファミリーシグナルが、B細胞性腫瘍、とくにBurkittリンパ腫の進展において、どのような作用をもたらすかを解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. 半定量的RT-PCRを用い、Burkittリンパ腫細胞株RamosにおけるTGF- β ファミリーII型受容体、I型受容体、およびSmadの発現を評価したが、TGF- β およびBMPによるSmad依存的なシグナルが伝達されるために必要なシグナル伝達因子の発現が確認された。Ramos細胞をTGF- β 3およびBMP-4で刺激したところ、Smadのリン酸化、標的遺伝子の発現誘導が確認され、Ramos細胞におけるTGF- β およびBMPによるSmad依存的なシグナルの伝達を確認された。
2. BMP-4はRamos細胞の*in vitro*での増殖に影響しなかったが、TGF- β 3はRamos細胞の*in vitro*での増殖を抑制した。またflow cytometryを使用して細胞周期の解析をしたが、TGF- β 3はSub-G1分画の細胞の割合を増加させることがわかった。さらにTUNEL染色からTGF- β 3によりRamos細胞におけるDNAの断片化が増強することが分かり、TGF- β がRamos細胞のアポトーシスを誘導することで、細胞増殖を抑制することが判明した。
3. Ramos細胞はヌードマウスの皮下移植を行うと、腫瘍を形成する。この時、TGF- β シグナルを優性阻害的に作用するII型受容体変異体を安定発現した細胞 (Ramos-dnT β RII)では腫瘍形成能が亢進していた。Ramos-dnT β RII細胞から形成された腫瘍の凍結切片ではTUNEL陽性細胞が減少していたことから、dnT β RIIの発現はRamos細胞のアポトーシスの減少させることで*in vivo*での腫瘍形成能を亢進させていると考えられた。
4. 多くの癌細胞のアポトーシスの誘導においては、TGF- β によってc-MYCの発現が抑制されることが重要とされているが、TGF- β はRamos細胞のc-MYCの発現を制御することはなく、TGF- β によるRamos細胞のアポトーシスの誘導には、c-MYC以外の未知のTGF- β の標的遺伝子の発現変動が重要であると予想された。
5. Microarrayを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、Ramos細胞におけるTGF- β の標的遺伝子を検索した。その結果、新規候補遺伝子としてMembrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1 (MS4A1)が挙げられた。

6. 定量的Real-time RT-PCRとflow cytometryから、Ramos細胞における細胞内MS4A1 mRNA量、また細胞表面MS4A1タンパク量がTGF- β 刺激により抑制されることが確認された。一方でRamos細胞のMS4A1の発現がBMPによって抑制することはない、この発現制御機構はTGF- β に特異的なものであった。
7. MS4A1に対するモノクローナル抗体であるrituximabを添加した場合、Ramos細胞は凝集し、その後にアポトーシスによる細胞死が誘導される。これに対し、TGF- β 3で刺激されたRamos細胞では、rituximabにより誘導される細胞凝集が低下していることが確認された。TGF- β によるRamos細胞のMS4A1の発現低下が、Ramos細胞のrituximabへの感受性を低下させていると考えられた。

以上の結果より、本論文はTGF- β がB細胞性腫瘍におけるMS4A1の発現を抑制し、アポトーシスを誘導したことから、TGF- β がB細胞性腫瘍の進展に対し抑制的に作用している可能性が示唆された。さらに、B細胞性腫瘍のrituximab耐性の獲得にもTGF- β が関わっている可能性が示唆された。本研究はB細胞性腫瘍の進展、さらに治療抵抗性の獲得における分子機構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。