

〔課程-2〕

審査の結果の要旨

氏名 白井陽太郎

本研究は、ヒトスキルス胃癌細胞株 OCUM-12、HSC-39、OCUM-2MLN を用いた *in vitro*、*in vivo* の実験から、スキルス胃癌細胞の増殖・進展における BMP シグナルの役割の解析をすすめ、難治癌であるスキルス胃癌の新たな分子標的の探索を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 上記ヒトスキルス胃癌細胞において、RT-PCR により BMP シグナルを伝達するために必要な伝達構成因子である I 型受容体、II 型受容体、Smad の発現が認められた。また、BMP2 もしくは BMP4 の少なくともどちらかが発現していることも確認された。そして、Smad1/5/8 のリン酸化および標的遺伝子である ID3 の発現が BMP-4 により誘導された一方で、BMPI 型受容体阻害剤である Dorsomorphin により抑制された。以上より、内因性および外因性の BMP シグナルが伝達し機能することが示唆された。

2. BMP-2/4 の特異的 I 型受容体である ALK3 の dominant-negative form (dnALK3) の過剰発現により、OCUM-12 細胞および HSC-39 細胞において、BMP-4 シグナルを抑制することが示された。dnALK3 発現により、*in vitro* においてはこれらの細胞の増殖速度に顕著な影響は認めなかったが、*in vivo* において皮下腫瘍の形成が亢進されることが示された。

3. 細胞増殖試験にて、BMP-4 により OCUM-12 細胞および HSC-39 細胞の細胞増殖が抑制されることが示された。そして、これらの細胞において BMP-4 により RB のリン酸化が抑制されることが western blotting で示された。また、OCUM-12 細胞において、BMP-4 により human Ki67 抗体である MIB-1 の陽性細胞が減少し、flow cytometry にて S 期、G2/M 期における細胞数が減少し、G0/1 期における細胞数が増加することが明らかとなった。以上より、スキルス胃癌細胞において、BMP-4 は細胞周期の停止を誘導することで細胞増殖を抑制することが示唆された。

4. CDK activator/inhibitor の中で、OCUM-12 細胞および HSC-39 細胞に共通して、BMP-4 が p21 の発現を誘導することが明らかとなった。OCUM-12 細胞において、Dorsomorphin および内因性の Smad4 のノックダウンにより、BMP-4 による p21 の発現誘導は抑制された。スキルス胃癌細胞において、Smad pathway を介して BMP-4 が p21 の発現を誘導していることが示唆された。

5. OCUM-12 細胞および HSC-39 細胞において、shRNA を用いて p21 を恒常的にノックダウンした細胞を樹立した。p21 をノックダウンした細胞では、BMP-4 による RB のリン酸化の抑制は殆ど認められず、また細胞増殖の抑制も減弱していることが示された。以上より、少なくとも部分的に p21 の発現誘導を介して、BMP-4 がスキルス胃癌細胞の増殖を抑制することが示唆された。

6. HSC-39 細胞において、ALK3 の constitutively active form (caALK3) を Tet-ON system を用いて恒常的に発現させる細胞を樹立した。Doxycycline による caALK3 の発現により、RB のリン酸化の抑制および細胞増殖の抑制が確認された。また、OCUM-2MLN 細胞においても、Tet-ON system を用いずに caALK3 恒常発現株を樹立した。caALK3 の発現により、OCUM-2MLN 細胞の皮下腫瘍の形成が抑制されることが示された。

以上、本論文は、BMP-2/4-ALK3 シグナルが Smad pathway を介して p21 の発現を誘導することで、スキルス胃癌細胞の増殖を抑制することを明らかにした。また、BMP-2/4 がスキルス胃癌の進展を抑制する腫瘍抑制因子のひとつである可能性も示唆された。本研究で得られた結果は、スキルス胃癌の病態の解明に貢献しており、さらに今後のスキルス胃癌の新たな治療の開発に結び付く重要な発見であると考えられる。以上より本研究は学位の授与に値するものであると考えられる。