

審査の結果の要旨

氏名 中村 真樹

がんの発生から進展で重要となる細胞の異常増殖には Ras 経路の活性化が重要な働きをしていることが知られており、がん細胞の細胞増殖機構における Ras 経路の役割を明らかにすることは、がんの基礎研究における重要な課題のひとつである。

本研究は、マウスの骨芽細胞において TGF- $\beta$  の刺激により発現が上昇する遺伝子として同定された Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-stimulated clone-22 (TSC-22)の機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. IPTG により Ras-G12V (Ras の活性型) を発現する Ba/F3 細胞、ならびに  $\beta$ -estradiol によって Raf が活性化する Ba/F3 細胞を用いてウェスタンブロットを行い、TSC-22 が Ras および Raf の下流でタンパクレベルで発現上昇することを確かめた。また NIH3T3 細胞においても、同様に Ras の下流で TSC-22 がタンパクレベルで発現上昇することを確認した。また、Ras-G12V を発現させた細胞から抽出した RNA を用いた realtime-PCR 法により、TSC-22 が Ras の下流でメッセンジャーRNA レベルで発現上昇することを確認し、TSC-22 のプロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイにより、TSC-22 の転写活性が Ras の活性化に伴って上昇することを確かめた。  
これらの実験により、TSC-22 が Ras/MAPK の下流で発現上昇する遺伝子であることを確かめた。
2. TSC-22 を発現させた NIH3T3 細胞を用いて、TSC-22 が細胞の増殖を抑制することが確認された。さらに EdU 取り込みアッセイ、細胞周期観察により、TSC-22 を発現した細胞では DNA 合成が低下し G0/G1 期の細胞が増加していることを確認した。  
また、TSC-22 の deletion mutant を用いた解析により、TSC-22 のうち TSC-box という部分が細胞増殖抑制効果の発揮に重要な役割を担っていることを確かめた。  
ソフトアガーコロニーアッセイ、NOD/SCID マウスを用いた Xenograft モデルにおいて、Ras-G12V ならびに TSC-22 を発現した細胞はコロニー形成、腫瘍形成が抑制されていたことから、TSC-22 が活性型 Ras による NIH3T3 細胞の形質転換を抑制することが示唆された。
3. TSC-22 ならびにその deletion mutant と GST の融合タンパクを作成し、プルダウンアッセイを行った。この実験により、TSC-22 と H-Ras がタンパクレベルで会合していることが確かめられた。Deletion mutant の解析により TSC-22 の N 末端の Nuclear Export Signal (NES)がこの結合に重要であることが確認された。
4. 共焦点顕微鏡を用いた細胞内局在の観察により、TSC-22 は定常状態では細胞質に局在していることが確かめられた。また、Ras の活性化に伴って TSC-22 が細胞質から核内へ移行していることが確認された。
5. 野生型マウスならびに TSC-22 欠損マウスからマウス胎児繊維芽細胞 (Mouse Embryo Fibroblast ; MEF)を作成して、Ras-G12V を発現させて細胞老化

(Senescence)を誘導したところ、TSC-22欠損MEFは野生型MEFに比べてSenescenceに誘導されにくいことが確認された。Senescenceは細胞ががん化を免れる機序の一つと考えられており、TSC-22を欠損した細胞はがん化しやすい傾向にあることが示唆された。

6. TSC-22欠損マウスを用いた発がん実験を行った。ジエチルニトロサミン (DEN)を生後15日のマウスの腹腔に単回投与する肝臓がんモデル、N'-ブチル-N'-ニトロサミン (BBN)を20週間内服させる膀胱がんモデルにおいて、いずれもTSC-22欠損マウスではより多くの腫瘍が発生することが確認された。これらの実験によってTSC-22欠損マウスは何らかの機序でがんを発生しやすいことが確かめられた。しかし、これらのマウスモデルにおいては腫瘍におけるRasの活性化は不明であり、RasとTSC-22の関係を明らかにするには至らなかった。
7. 東京大学泌尿器科において膀胱全摘除術を施行した患者のサンプルを用いて、TSC-22の免疫染色をおこなった。TSC-22が細胞質に染色される場合と、核に染色される場合の二つのパターンがあることが分かった。しかし、これらのサンプルから得たゲノムDNAを用いてH-Rasコドン12および13の変異を検索したところ、染色パターンと遺伝子変異の間に関連性はみられず、何らかの他の機序でTSC-22の染色パターンが変化している可能性が示唆された。

以上、本論文はTSC-22がRas/MAPKの下流で発現上昇し、細胞の増殖を抑制することを明らかにした。また、Rasとの関連は不明であるが、TSC-22欠損マウスはがんを発生しやすいことを確かめた。本研究はTSC-22の細胞増殖抑制効果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。