

論文審査の結果の要旨

氏名 小林 和善

本論文は5章からなる。第1章は、イントロダクションであり、前半部にはクロマチン構造変換因子 SWI/SNF 複合体と microRNA について、それぞれの機能やがんとの関連性等の研究背景が述べられており、後半部には本論文提出者の所属研究室から発表され本論文の研究背景となる先行研究の紹介と研究目的について述べられている。

第2章は実験結果であり、SWI/SNF 複合体の触媒サブユニットである Brm、microRNA の1種である miR-199a、転写因子 EGR1 により形成される遺伝子発現制御ネットワークが上皮がん由来の細胞株における足場非依存増殖活性に重要な役割を果たすことについて述べられている。本研究に用いた様々な上皮がん由来の細胞株 (12種) は、このネットワークが形成されており、type 1 : Brm (+), miR-199a (-), EGR1 (-)、または type 2 : Brm (-), miR-199a (+), EGR1 (+) のどちらかに分類することができ、この type 1 と type 2 の生物学的活性の差異を調べたところ、*in vitro* における腫瘍形成試験である軟寒天中でのコロニー形成試験において、type 1 に属する細胞は全てコロニー形成活性を示すのに対し、type 2 に属する細胞はいずれもこの活性を示さなかったことが述べられている。これは、type 1 のいくつかの細胞に Brm の発現を特異的に抑制する short hairpin (sh) RNA を導入した細胞を用いた実験においても、Brm の発現抑制がこの活性を抑制することから Brm がこの活性に重要であることを示している。

次に、type 1 の細胞特異的に発現する遺伝子群を同定するために、miR-199a の標的として既に報告されている遺伝子群をその候補とし、スクリーニングを行ったところ、CD44, MET, CAV1, CAV2 の発現が mRNA、タンパク質ともに有意に type 1 特異的に発現していることを示している。これら type 1 特異的に対する shRNA を作成し、それらのコロニー形成活性に対する効果を検証したところ、解析した type 1 細胞においてはいずれの遺伝子発現抑制も、この活性を抑制したことが示されている。次に、これらの遺伝子が実際に Brm または EGR1 の制御下にあるかを解析しており、CD44, MET は Brm により正に制御され、CAV1, CAV2 は EGR1 により負に制御されることが示唆され、Brm/miR-199a/EGR1 により形成される遺伝子発現ネットワークがこれらの発現を決定し、がん細胞の足場非依存増殖に重要な役割を果たしていることが述べられている。これまでの一連の実験結果は12種類の細胞を用いた実験結果であるため、このネットワークが他の細胞株についても成立するか検証を行い、計26種の細胞株

で Brm, miR-199a, EGR1 の発現を解析したところ、23 種の細胞株は type 1 または type 2 に分類できることを述べている。

最後にヒト非小細胞肺がんのうち扁平上皮がんの病理切片を用いた免疫染色および *in situ hybridization* 法を用いた解析を行ったところ、角化という終末分化がみられる症例において、より未分化な部位において type 1 様の染色性がみられ、角化部位においては type 2 様の染色性が観察されたことが述べられている。この結果は *in vitro* において形成されるネットワークが *in vivo* においても成立していることを示しているため大変評価できる。

第 3 章には第 2 章で得られた結果に対する考察が述べられており、第 4 章には本論文で用いた実験手法、第 5 章には謝辞、第 6 章には引用文献が記されている。本論文において得られた知見は、先行研究で示唆された Brm/miR-199a/EGR1 を軸 (axis) として形成されるネットワークが足場非依存増殖という生物学的活性に重要な役割を果たすことを示し、さらにこの結果は病理切片を用いた *in vivo* 解析でも同様の結果が得られている。なお本研究で示した axis の構成成分 (Brm, miR-199a, EGR1) の挙動は、今回調べた細胞株及び病理解析を行ったがん種以外のがんにおいても幅広く成立されていることが十分に考えられ、今後は公開データベースを用いた解析や肺扁平上皮癌以外の病理解析にも応用可能であると考えられる。

なお、本論文第 2 章は、櫻井浩平、平松寛明、稲田健一、塩竈和也、中村真也、末政英実子、小林郷介、井元清哉、原口健、伊藤寛明、石坂彩、堤寛、伊庭英夫との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験、解析及び検証を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (理学) の学位を授与できると認める。