

審査の結果の要旨

村井 文彦

本研究は肺がんの中でも予後不良な小細胞肺がんにおける新規治療法の確立を視野に入れ、小細胞肺がん細胞の生存に関わる分子メカニズムを明らかにする研究を行った。これまでに、以下の結果を得ている。

1. 小細胞肺がんでは Transforming growth factor- β (TGF- β) type II receptor (T β RII)の発現低下により、TGF- β シグナルの伝達が抑制されている。

分子生物学的解析により多くの小細胞肺がん細胞では、TGF- β シグナル伝達による Smad2 のリン酸化ならびに SMAD7 の発現上昇が観察されなかった。このため、TGF- β シグナル伝達に関係する遺伝子の発現を解析したところ、小細胞肺がん細胞では T β RII をコードする遺伝子 *TGFBR2* の発現が低下していた。更に、過去に行われた網羅的遺伝子発現解析の結果からも、小細胞肺がん細胞では正常肺上皮細胞と比べて *TGFBR2* の発現が低下していた。これらの結果から、小細胞肺がんでは T β RII の発現低下により、TGF- β シグナルの伝達が抑制されていることが分かった。

2. T β RII の強制発現で TGF- β による小細胞肺がん細胞の apoptosis が誘導され、腫瘍形成能が低下する。

小細胞肺がんでは TGF- β が腫瘍抑制的に機能すると考えられたので、T β RII の発現が認められない細胞には T β RII の強制発現を行ったところ、*in vivo* における腫瘍形成が抑制された。また、そのような細胞では *in vitro* における細胞増殖が TGF- β により抑制された。細胞周期解析や apoptosis 進行の指標である poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)の切断を評価したところ、TGF- β による腫瘍抑制には apoptosis が関係することを見出した。

3. 小細胞肺がん細胞における T β RII の発現低下には、分子 X が関与している。

小細胞肺がんにおいて見られる T β RII の発現低下メカニズムに焦点をあて研究を行った。網羅的遺伝子発現解析の結果から、T β RII の発現と逆相関するものの中に X が含まれていた。X は mRNA レベルでもタンパク質レベルでも小細胞肺がん細胞において高発現していた。X を knockdown したところ *TGFBR2* の発現が回復し TGF- β シグナルが伝達されるようになった。更に、X の knockdown により、TGF- β による apoptosis 誘導ならびに *in vivo* における腫瘍形成の低下や縮退が見られた。

4. TGF- β は直接的に Smad 依存的な経路を介して、小細胞肺癌細胞における分子 Y の発現を低下させる。

TGF- β の標的遺伝子を網羅的に探索することで小細胞肺癌細胞の生存に関係する遺伝子を同定することにした。抗 Smad2/3 抗体を用いたクロマチン免疫沈降シークエンシングや遺伝子発現解析により、遺伝子 Y が TGF- β の新規標的遺伝子であり TGF- β により発現低下を受けることを見出した。そこで、Y が TGF- β により発現制御を受けるメカニズムを生化学的実験から検討したところ、Y は TGF- β の直接的な標的遺伝子であり Smad 依存的な経路により発現低下する遺伝子であると分かった。

5. 分子 Y は小細胞肺癌細胞の TGF- β シグナルの活性化による apoptosis を抑制している。

Y は正常肺上皮細胞と比較して小細胞肺癌細胞において高発現している遺伝子である。そこで、Y の機能を解析するために Y の knockdown を行ったところ、apoptosis が誘導され、細胞増殖が抑制された。また、Y の強制発現を行うと TGF- β による apoptosis の増強が観察されなかった。Y は TGF- β シグナルの活性化による apoptosis 誘導に重要な役割を果たしていると思われた。

6. ヒト小細胞肺癌組織では、分子 X が高発現、T β RII は低発現、分子 Y が高発現している。

ヒト臨床検体を用いて免疫組織化学染色を行い、これまでの結果の妥当性を検証した。ヒト正常肺組織では X の発現はほとんど無く、T β RII は発現し Y の発現も低下していた。これに対して、ヒト小細胞肺癌組織では X は高発現しており、T β RII は低発現し Y が高発現しており、ヒト臨床検体においてもこれまでの結果を支持する結果であった。他の肺癌組織型を用いた解析では、小細胞肺癌組織以外にも扁平上皮がん組織や大細胞神経内分泌がん組織においても X の発現が認められたが、小細胞肺癌組織ほど高いレベルで発現していなかった。このような組織でも T β RII の発現は X の発現と逆相関していた。Y については小細胞肺癌組織と大細胞神経内分泌がん組織において発現が認められた。

以上から、正常肺上皮細胞では T β RII が発現しているために、TGF- β が Smad 依存的な経路により Y の発現を低下させ apoptosis を誘導し異常な細胞増殖を抑制することで、腫瘍抑制的に作用していると考えられた。これに対して、小細胞肺癌細胞では X が高発現しているために、T β RII の発現は低下し TGF- β シグナルは遮断されている。これが Y の高発現を維持させ apoptosis から回避しており、TGF- β の腫瘍抑制作用が破綻していることを明らかにした。本研究は X や Y を標的とした小細胞肺癌の治療の可能性を示唆するものであり、学位の授与に値する研究であると考えられる。