

氏名	はせがわ かず のり 長谷川 和 範
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第3148号
学位授与の日付	平成19年7月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Restoration of RUNX3 Enhances TGF- $\beta$ -Dependent p21 Expression in a Biliary Tract Cancer Cell Line (胆道癌細胞株における RUNX3 による TGF- $\beta$ 依存性 p21 発現誘導の検討)
論文調査委員	(主査) 教授 上本伸二 教授 松田道行 教授 武藤 誠

### 論 文 内 容 の 要 旨

1p36 に位置する *RUNX3* は、Runt ドメインを有する RUNX ファミリーに属し、Smad2/3 と結合することにより TGF- $\beta$  シグナル伝達調節に深く関与する遺伝子と考えられている。さらに、*RUNX3* ノックアウトマウスの解析を行うと胃上皮粘膜の肥厚が観察され、その原因として胃上皮細胞の増殖亢進と TGF- $\beta$  刺激によるアポトーシスの抑制が見られること、胃癌における *RUNX3* の発現低下が見られること、および *RUNX3* に mutation のある胃癌細胞をヌードマウスに皮下接種すると腫瘍形成の増加を認めることなどにより *RUNX3* は癌抑制遺伝子であると考えられている。この 1p36 領域は胃癌、胆道癌、膵癌などの消化器癌をはじめ、様々な癌細胞において高頻度に欠失が認められることは既に報告されている。一方、胆道癌や膵癌においては TGF- $\beta$ /Smad 経路の障害はその腫瘍化に重要な役割を持つと考えられている。そこで本研究は TGF- $\beta$  シグナルにおける *RUNX3* の機能解析について胆道癌細胞株において検討した。

(方法と結果) TGF- $\beta$ /Smad 経路は正常で *RUNX3* を発現していない胆道癌細胞株 Mz-ChA-2 に *RUNX3* 発現プラスミド *pcDNA3.1/RUNX3* とベクタープラスミド *pcDNA3.1* をトランスフェクションし、4 種類の *RUNX3* 発現 Mz-ChA-2 クローンとコントロールクローンを得た。これらの細胞を用いて細胞増殖実験、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット法により *RUNX3* の機能を解析した。コントロールの細胞では TGF- $\beta$  による増殖抑制は軽度であったが、*RUNX3* 発現 Mz-ChA-2 においてはこの増殖抑制が有意に増強され、フローサイトメトリーによる解析では TGF- $\beta$  依存性の細胞周期 G1 期停止が有意に増強された。どのクローンにおいても TGF- $\beta$  によるアポトーシスは増強されなかった。ウェスタンブロット法による細胞周期関連因子の経時的な解析ではコントロールの細胞における TGF- $\beta$  による p21 の発現誘導は軽度であったものが *RUNX3* 発現 Mz-ChA-2 において増強され、それに伴う cyclin D1 および cyclin E の発現抑制がみられた。また *RUNX3* siRNA により TGF- $\beta$  依存性 p21 発現誘導は減少し、*SMAD4* siRNA によりこの p21 発現誘導はみられなくなった。さらにヌードマウスにおける in vivo の実験では *RUNX3* の発現量に比例して腫瘍形成の抑制がみられた。

(結語) 胆道癌細胞株 Mz-ChA-2 において *RUNX3* を強発現させることで TGF- $\beta$  による増殖抑制がより増強されることを証明した。またそのメカニズムとして *RUNX3* は TGF- $\beta$  依存性 p21 の発現誘導およびその結果としての細胞周期停止による増殖抑制において重要な役割を担っていると考えられた。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

1p36 に位置する *RUNX3* は Runt ドメインを有する RUNX ファミリーに属し、Smad2/3 と結合し TGF- $\beta$  シグナル伝達調節に深く関与している。また *RUNX3* は様々な癌細胞において高頻度に不活化され、癌抑制遺伝子であると考えられている。本研究で申請者は TGF- $\beta$  シグナルにおける *RUNX3* の機能解析について胆道癌細胞株で検討した。まず *RUNX3* を発現していない胆道癌細胞株 Mz-ChA-2 に *RUNX3* を強発現させた細胞を用いて機能解析を行った。その結果 *RUNX3* を強制発現させることで TGF- $\beta$  刺激によるシグナルが増強されることを TGF- $\beta$  に反応する領域をプロモーターとしたルシフェ

レーザーアッセイで確認した。また TGF- $\beta$  依存性のアポトーシスよりも TGF- $\beta$  依存性 G1 期停止が有意に増強され、TGF- $\beta$  依存性増殖抑制が誘導されることを確認した。ウェスタンブロット法による細胞周期関連因子の経時的解析では TGF- $\beta$  刺激により p21 が誘導され cyclin D1 が抑制されることを RUNX3 発現細胞において確認した。さらにヌードマウスにおける実験では *RUNX3* の発現量に比例して腫瘍形成の抑制がみられた。以上より胆道癌細胞株への *RUNX3* 強発現により TGF- $\beta$  依存性に p21 が発現誘導され、その結果細胞周期停止による増殖抑制を引き起こすことで *RUNX3* が癌抑制遺伝子として機能していることが示唆された。

以上の研究は *RUNX3* の機能の解明に貢献し、癌抑制遺伝子の研究に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものとみとめる。

なお、本学位授与申請者は、平成 19 年 6 月 18 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。