京都大学	博士（医学）	氏　名	有村　純暢
論文題目	Reduced Level of Smoothened Suppresses Intestinal Tumorigenesis by Down-Regulation of Wnt Signaling (Smoothened の発現レベルの低下は、Wnt シグナル伝達経路を遮断することにより、腸管腫瘍形成を抑制する)		

（論文内容の要旨）

【目的】Hedgehog(Hh)経路は、Hhリガンドが受容体Patched(Ptch)に結合することにより、7回膜貫通型受容体Smoothened(Smo)への抑制が解除され、転写因子Gliの核内移行が促進し、その標的遺伝子の転写を誘導するシグナル伝達経路である。Hh経路は、発生における器官・形態形成に重要な役割を担うが、近年、多くの癌でHh経路活性化の関与が示唆されている。即ち、*Ptch*の不活性化や*Smo*の活性化は、基底細胞癌や髄芽腫等の発生を引き起こし、また、消化器癌を含む様々な腫瘍においても、リガンド依存的なHh経路の活性化が報告されている。更に、これらの腫瘍のHh経路を阻害薬やHhリガンド中和抗体を用いて遮断すると、腫瘍細胞の増殖抑制又はアポトーシスが引き起こされることから、Hh経路は癌治療の新たな分子標的として注目されている。しかしながら、大腸癌へのHh経路の関与はこれまで不明であった。本研究は、腸管腫瘍形成におけるHh経路の役割の解明を目的とした。**【方法】**家族性大腸腺腫症のモデルである$Apc^{+/\Delta 716}$マウスに発生する腸管腫瘍でのHh経路関連因子の発現をqRT-PCR, western blot及び*in situ* hybridization法にて検討した。更に、*SMO*遺伝子に特異的なsiRNAを大腸癌細胞株に導入し、細胞増殖及び細胞周期に与える影響を増殖曲線解析及びフローサイトメトリー法にて検討した。また、$Apc^{+/\Delta 716}Smo^{+/-}$複合変異マウスを作出し、腸管腫瘍における表現型を解析した。Hh及びWnt経路の活性は、ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法、及び標的遺伝子のmRNAレベルをqRT-PCR法により測定し、検討した。**【結果】**$Apc^{+/\Delta 716}$マウスの小腸・大腸腫瘍では、正常上皮に比較して、腫瘍上皮特異的にSmoが高発現していた。しかしながら、Hh経路の標的遺伝子及び関連因子の発現は、殆ど変化していなかった。また、SMOを高発現していたヒト大腸癌細胞株SW480及びHCT116において、その発現をsiRNA処理により減少させると、G1期からS期への移行が遮断されて、細胞増殖は有意に抑制された。一方、$Apc^{+/\Delta 716}Smo^{+/-}$複合変異マウスでは、$Apc^{+/\Delta 716}$マウスと比較して、より大きいサイズの腫瘍が顕著に減少し、腫瘍の増殖も抑制されていた。また、意外にも、腸管腫瘍におけるSmoの発現抑制は、Hh経路には影響を与えず、β-catenin依存的なWnt経路の活性化を抑制していた。即ち、Smoの発現抑制は、GLI反応性レポーターの活性やHh経路標的遺伝子である*PTCH1*及び*GLI1*のmRNAレベルを変化させなかったものの、β-catenin依存性レポーターの活性や種々のWnt経路標的遺伝子の発現レベルを有意に低下させた。その機序として、Smoの発現抑制によって、活性型β-cateninのタンパク量が減少すること、並びにその活性型β-cateninの局在が核内から細胞質に変化することが明らかになった。**【結論】**腸管腫瘍において、Hh経路の活性化は認められなかったが、Smoは一部の腸管腫瘍で高発現しており、その発現は腸管腫瘍の増殖・拡大に寄与していた。その分子機序として、SmoがcanonicalなHh経路ではなく、β-catenin 依存的なWnt経路を正方向に制御することが示唆された。これらの結果は、Hh経路の活性化の有無に関わらず、Smoの発現抑制が、大腸腺腫症及び大腸癌に対する新たな治療戦略となる可能性を示すと考えられる。

（論文審査の結果の要旨）

近年、様々な癌種において、Hedgehog(Hh)経路の活性化の関与が示唆されており、Hh経路を標的とした癌治療の可能性が注目されている。しかし、腸管の腫瘍形成におけるHh経路の役割は不明である。

本研究では、腸管腫瘍においてHh経路及びその構成因子が果たす役割について解析が行われた。*Apc*遺伝子のヘテロ接合ノックアウトマウス(*Apc*マウス)の腸管腺腫やヒト大腸癌細胞株において、Hh経路の活性化は認められなかったが、Hh経路の重要なシグナル分子であるSmoothened(Smo)は*Apc*マウスの腸管腫瘍上皮細胞と一部の大腸癌細胞株で高発現していることが示された。また、siRNAによる発現抑制実験及び*ApcSmo*($Apc^{+/\Delta 716}Smo^{+/-}$)複合変異マウスを用いた解析から、Smoの発現は腫瘍細胞の増殖・拡大に寄与していることが明らかにされた。意外にも、その分子機序は、Smoがcanonica1なHh経路を活性化するではなく、安定型β－cateninの核移行を調節することにより、β－catenin依存的なWnt経路を正方向に制御することが示された。

以上の研究は、腸管の腫瘍形成におけるSmoothenedの役割を明らかにし、Smoothened　を標的とした大腸癌の治療法の発展に寄与するところが大きい。

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認める。なお、本学位授与申請者は、平成21年5月28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。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降