Osaka University Knowledge Archive

Title	Suppression of Anchorage-independent Growth of Human Cancer Cell Lines by the drs Gene
Author(s)	山下, 敦子
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41769
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【 1 】

氏　　名	山　下　敦　子（やまし　あつこ）
博士の専攻分野の名称	博　　士（医　　学）
学 位 記 番 号	第　14806　号
学位授与年月日	平成11年5月6日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 病理系研究科　医学系専攻
学 位 論 文 名	Suppression of Anchorage-independent Growth of Human Cancer Cell Lines by the *drs* Gene （*drs* 遺伝子によるヒト癌細胞株の足場非依存性増殖の抑制）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授　上田　重晴 （副査） 教 授　島田　和典　　教 授　野島　　博

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

我々の研究室においてラット初代培養細胞cDNA発現ライブラリーから新規に分離した *drs* 遺伝子（downregulated by v-*src*）はセレクチンファミリーに共通にみられる3つの繰り返し配列（CR）と一つの膜貫通ドメインを持ち、ラット細胞株においてv-*src*やv-*ras*などの癌遺伝子によってそのmRNAの発現が著しく抑制される。また *drs* 遺伝子はラット細胞株において高発現させるとこれらの癌遺伝子によるトランスフォーメーションを抑制する活性を示すことから、癌化に対して抑制的に働く新しい遺伝子であると考えられる。本研究は、*drs* 遺伝子がヒト癌の発生にも関与しているのか、またどのような機構で癌化を抑制するのかを明らかにすることを目的としている。

【方法ならびに成績】

drs 遺伝子のヒト癌発生における役割を明らかにするため、まず最初に *drs* のヒトホモログを分離し、ヒト正常組織や種々のヒト癌由来の癌細胞株における *drs* mRNAの発現を調べた。ヒト *drs* mRNAは脾臓、末梢血を除いてほとんどすべての組織において発現しており、特に心臓や大腸、小腸、卵巣などで高い発現が認められた。次に種々のヒト癌細胞株について検討したところ、胃癌、大腸癌、膀胱癌、卵巣癌などのさまざまな種類のヒト癌細胞株において *drs* mRNAの発現低下が認められた。特に調べたすべての大腸癌細胞株で *drs* mRNAの著しい発現低下が認められた。一方、これら細胞株のゲノム *drs* 遺伝子には大きな欠失あるいは再構成などは認められなかったことから、*drs* 遺伝子はヒト癌細胞株においても転写レベルで発現が抑制されている可能性が高いと考えられる。そこでこの遺伝子がヒト癌細胞においても抑制遺伝子として機能しうるかどうかを検討するために *drs* 遺伝子を組み込んだ組み換えレトロウイルスを作成し、発現抑制の認められたヒト癌細胞株（大腸癌細胞株のDLD-1、LoVo、WiDr、膀胱癌細胞株のT24および卵巣癌細胞株のMCAS）に導入しこの遺伝子を高発現させたところ、これら細胞株の軟寒天培地中でのコロニー形成能（足場非依存性増殖能）が著しく抑制された。このとき *drs* 遺伝子の導入による接着状態での細胞増殖への影響は認められなかったことから、この遺伝子による抑制活性は単なる細胞増殖能の抑制の結果ではなく重要な癌化形質である足場非依存性増殖能の特異的抑制によるものと考えられる。これらの結果から *drs* はヒト細胞において

も癌抑制遺伝子として働いている可能性が高いと考えられる。次に *drs* の癌化抑制活性に必要な領域を明らかにするために *drs* 遺伝子の種々の deletion mutant を作成し T24細胞に導入して検討したところ、細胞内領域と考えられる膜貫通領域のC末側および細胞外領域と考えられるN末側の繰り返し配列領域の両方が足場非依存性増殖の抑制に必要であることがわかった。そこでこの抑制の機構を明らかにするために、細胞を接着状態と非接着状態で培養する実験系を用い、FACS 解析によって細胞周期集団の変化をしらべたところ *drs* 遺伝子導入細胞は非接着状態ではコントロール細胞(ヒト癌細胞にベクターを導入したもの)と比べてS期の細胞の割合が減少し、大部分の細胞は G1/S 期の境界付近で停まっていることがわかった。そこで *drs* 遺伝子導入細胞における G1/S 期進行に関わる種々の細胞周期関連蛋白の発現を調べたところ、Cyclin E と Cyclin D および Cdk2、Cdk4 の発現、またこれらのキナーゼのインヒビターである p21や p27の発現、その結果としての Rb 蛋白のリン酸化は *drs* 遺伝子による影響は認められなかったのに対して、S期進行に直接関与していると考えられる Cyclin A の発現が *drs* 発現細胞において非接着時にのみ低下していることがわかった。また、この *drs* の発現による Cyclin A の発現低下は転写レベルで起こっていた。これらの結果から *drs* 遺伝子による足場非依存性増殖の抑制には少なくとも Cyclin A の発現抑制を介した G1/S 期での細胞周期の停止が関わっている可能性が考えられる。

【結括】

本研究においてヒト癌細胞株における *drs* 遺伝子の発現と機能を検討し、以下のことを明らかにした。

1) 大腸癌など種々のヒト癌細胞株において *drs* 遺伝子の転写レベルでの著しい発現抑制が認められた。

2) *drs* 遺伝子をこれら癌細胞株に導入し高発現させると重要な悪性化形質である足場非依存性増殖が抑制された。

3) この抑制活性には *drs* 遺伝子の細胞内と細胞外の両方のドメインが必要であった。

4) *drs* 発現細胞では非接着状態で Rb 蛋白リン酸化の系路を介さずに Cyclin A mRNA の発現が抑制されていた。

論文審査の結果の要旨

本研究では、*drs* 遺伝子の機能とヒト癌発生との関連を明らかにする目的で *drs* のヒトホモログの分離を行い、大腸癌など種々のヒト癌細胞株で *drs* mRNA の発現が著しく低下していること、またこれら癌細胞株に *drs* 遺伝子を導入すると癌化の指標である足場非依存性増殖が抑制されることを明らかにした。さらに、この抑制機構には少なくとも Cyclin A の発現抑制を介した細胞周期の G1/S 期進行の停止が関与していることも示された。これらの結果は *drs* 遺伝子がヒト癌細胞においても癌化に抑制的に働きうる因子であることを示しており、ヒト癌発生の機構を明らかにする上でも重要な知見であると考えられる。よって本研究は学位の授与に値するものと考える。