

審査の結果の要旨

氏名 大杉友之

本論文は4章からなり、第1章は β -catenin/TCF4 転写活性を抑制した際に発現上昇する遺伝子群の同定、および *IFIT* ファミリー遺伝子の大腸癌における機能解析、第2章は β -catenin による *IFIT2* 発現抑制メカニズム、第3章は Wnt シグナルによる IRF1 のユビキチン化調節メカニズム、第4章は IRF1 の大腸癌における機能解析、について述べられている。

第1章には、大腸癌において Wnt シグナルにより発現制御される新規ターゲット遺伝子として、*IFIT* (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats) 遺伝子ファミリーである *IFIT1*、*IFIT2* の同定について記載されている。大腸癌細胞株 SW480、HCT116、LS174T に、 β -catenin に対する siRNA あるいは TCF4 のドミナントネガティブ変異体を導入して網羅的遺伝子解析を行い、3種の細胞で共通して発現が上昇する54遺伝子を同定した。この54遺伝子でパスウェイ解析を行った結果、免疫系のシグナルが有意に変動していること、54遺伝子の中に3種の *IFIT* ファミリー遺伝子 (*IFIT1*、*IFIT2* および *IFIT3*) が含まれていることから、この3遺伝子に着目した。Wnt シグナルで抑制される遺伝子は、大腸腫瘍で発現が減少していることが予測されることから、3遺伝子の発現をがんの遺伝子発現データベース (<https://www.oncomine.org>) で調べた。その結果 *IFIT1* と *IFIT2* の発現は正常大腸粘膜と比べ大腸癌組織で有意に低下していた。しかし *IFIT3* の発現には有意な変化はなかった。そこで *IFIT1* と *IFIT2* に絞って機能解析を行った。*IFIT1,2* の大腸癌での機能を調べたところ、*IFIT2* 高発現細胞株で、細胞増殖の抑制・アポトーシス促進が認められた。これらの結果から、大腸がんでは Wnt シグナルが *IFIT2* の発現抑制を介して、アポトーシス誘導を抑制していることが示唆された。

第2章は、*IFIT2* の発現制御因子について記載されている。SW480細胞で β -catenin をノックダウンしたところ、*IFIT2* の発現が7.8倍の増加することが qRT-PCR 解析により示された。次に *IFIT2* の 5'-flanking 領域をレポータープラスミドにクローニングし、レポーターアッセイを行った結果、 β -catenin のノックダウンによりレポーター活性が上昇した。そして β -catenin により制御される領域が-20~+20の領域に存在すること、その領域に IRF ファミリーの結合領域 IRF-E が複数存在することを見出した。そこでどの IRF により調節されるかを調べるため、すべての IRF メンバーの発現プラスミドを作製し、大腸がん細胞株 SW480 に導入した。その結果、IRF1、5 および 7 の過剰発現は *IFIT2* タンパクの発現を誘導した。以上の結果から、IRF1、5 および 7 のいずれか、または複数が *IFIT2* の発現調節に関与していることが示唆された。

第3章では、IRF1、5 および 7 が Wnt/ β -catenin シグナルにより制御されるかどうかを検討するため、SW480細胞において β -catenin ノックダウンしたところ、IRF5 および 7 のタンパク質量に変化はなかったが、IRF1 のタンパク質量は増加した。また IRF1 の増加は HCT116、DLD-1 においても確認できた。IRF1 の発現増加は mRNA レベルで認められず、転写後調節であることが示唆された。そこでプロテオソーム阻害剤の

MG132 と、ライソゾーム阻害剤クロロキンによる影響を検討したところ、MG132 により顕著な IRF1 タンパク質の増加を認めた。また β -catenin ノックダウンにより IRF1 のユビキチン化が抑制されることを発見した。 β -catenin ノックダウンで IRF1 の安定化が確認された細胞に、2 種類の脱ユビキチン化酵素 (DUB) 阻害剤 PR-619 または HBX-41108 を処置したところ、IRF1 タンパク質の誘導が減少した。これらの結果から、Wnt/ β -catenin 経路抑制による IRF1 タンパク質安定化には、DUB が関与することが示唆された。

第 4 章では、大腸癌における IRF1 の機能について検討した。IRF1 を高発現する大腸がん細胞株を樹立し細胞増殖を検討した結果、コントロール細胞と比べ、細胞増殖の抑制が見られた。また、IRF1 高発現細胞株では G1・S・G2/M 期では変化していないが、subG1 分画は有意に増加していた。これらの結果から、IRF1 による細胞増殖の抑制には、アポトーシスが関与している可能性が示唆された。

Wnt シグナルによる IRF1 の抑制が、大腸癌においてどのような機能に影響を及ぼしているか探索するために、IRF1 の発現による網羅的遺伝子発現解析を行った。大腸がん細胞株 SW480 おいて β -catenin ノックダウンもしくは IRF1 を高発現させて、発現が共通に上昇する遺伝子群をマイクロアレイにて探索した。その結果 33 遺伝子が同定され、パスウェイ解析により、cytokine signaling, interferon signaling, interferon- α/β signaling, Interferon gamma signaling など、多数の免疫系のシグナルが有意に変動していることが明らかになった。以上の結果から、Wnt シグナルは IRF1 の発現低下を介して、免疫システムを制御している可能性が示唆された。

本成果は、Wnt 経路の異常が関与する腫瘍において、IRF1 および IFIT2 を介した腫瘍発生の機構を明らかにしたもので、新たなバイオマーカーや治療戦略の発見に繋がる事を期待する。

なお、本論文は、山口貴世志氏、朱 赤氏、池上恒雄氏、古川洋一氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、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 (医科学) の学位を授与にふさわしいと認める。

以上 1,961 字