

# 論文審査の結果の要旨

氏名 朱 赤

本論文は1つの章から構成されているが、内容は遺伝子発現解析とクロマチン免疫沈降法による $\beta$ -catenin / TCF7L2 複合体標的遺伝子の探索と、新規標的遺伝子 FERM domain-containing protein 5 (FRMD5)の同定、 $\beta$ -catenin / TCF7L2 複合体によるFRMD5 の転写調節領域同定、大腸がん組織におけるFRMD5 遺伝子の発現と患者の予後との関連、FRMD5 が腫瘍細胞に与える影響など、新たな知見が含まれている。

序文では、大腸がん発生・進展に関与する遺伝子やパスウェイ、その中でも Wnt シグナルの重要性について概説し、Wnt シグナルの調節因子や下流遺伝子の発がんにおける役割などを説明している。さらに今回着目した分子 FRMD5 について、これまでの論文報告内容を述べている。特に、その発現が肺がんで低下していること、FRMD5 をノックアウトすると、がん細胞の増殖が亢進することが紹介されている。

結果では、まず $\beta$ -catenin / TCF7L2 複合体の新たな標的遺伝子を同定するために、マイクロアレイを用いた3種類の細胞の遺伝子発現プロファイルの変化から、複合体の活性を抑制した場合に発現低下する134遺伝子をまず同定した。次に抗TCF7L2抗体を用いたクロマチン免疫沈降シーケンス解析を行い、TCF7L2 が結合するゲノム領域周辺遺伝子に着目し、134遺伝子の中から11の新規標的遺伝子候補が同定された。それらの候補遺伝子について、2種類の $\beta$ -catenin siRNAによる発現変化を確認した結果、4つの遺伝子が直接の標的遺伝子候補であることが示されている。

更に大腸がん組織でのFRMD5の発現を、公共の遺伝子発現データベースを利用して調べた結果、4種類のデータで、正常大腸粘膜に比べがん組織で有意な発現上昇が認められた。大腸腫瘍の多くで $\beta$ -catenin / TCF7L2 複合体転写活性が増加していることから、このデータはFRMD5が同複合体で転写活性化されるという申請者の発見に一致していた。

また、抗TCF7L2抗体クロマチン免疫沈降シーケンス解析結果から、FRMD5のイントロン1内にTCF7L2結合領域があることが判明した。この領域を用いたレポーターアッセイで、この結合領域の転写活性化能は $\beta$ -cateninで調節されていることが証明されている。さらに、この領域内にあるTCF結合モチーフに変異を挿入すると、レポーター活性が低下することも示されている。これらの結果は、この領域に $\beta$ -catenin / TCF7L2が結合し、転写を活性化していることを示唆している。

大腸がん細胞におけるFRMD5の働きを解明するために、HCT116細胞を用いてFRMD5をノックダウンしたときに発現変動する遺伝子群をマイクロアレイにて同定し紹介している。この結果からGene Set Enrichment Analysisを行い、FRMD5の発現が細胞周期と細胞運動に関与するとのデータを得ている。確かに、FRMD5をノックダウンしたHCT116細胞では、S期の減少が示されている。しかしDLD1細胞やLST174T

細胞、HCT15 細胞では細胞周期の変動はない。細胞のタイプ依存的に細胞周期に関与している可能性を提示している。Transwell を用いた細胞運動の解析と、E-cadherin の発現を指標とした Epithelial Mesenchymal Transition の解析では、統一された結果は示されていない。

本論文には、FRMD5 が canonical Wnt 経路の $\beta$ -catenin / TCF7L2 複合体の標的であり、イントロン 1 内の TCF 結合領域が発現調節に重要であることが、新たな発見として示している。さらに大腸がんでの発現が高いこと、患者の予後と相関すること、細胞周期の制御に関与する可能性があることなど、これまでほとんど明らかとなっていなかった FRMD5 の発現制御機構とがん進展の関連が明らかになった。FRMD5 の機能については更なる解析が必要であるが、これらの結果は、Wnt 経路を介した大腸がん発生・進展に関わる、新たな機構の解明に寄与するものであると考えられる。また、その発現は、患者の予後の新たなバイオマーカーとなる可能性がある。さらに、肺がんでは発現が低下すると報告されているが、大腸がんでは発現亢進していることは注目すべき点である。

なお、山口 貴世志、大杉 友之、寺門 侑美、野口 玲、池上 恒雄、古川 洋一との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験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。

以上のことから、本論文提出者の朱 赤氏は、博士（ 医科学 ）の学位を授与できるものと認める。