

論文の内容の要旨

論文題目

Wnt signaling suppresses interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats in colorectal cancer cells

(大腸癌においてWntシグナル経路により発現制御されるインターフェロン誘導タンパク質の解析)

氏 名 大杉 友之

【研究背景および目的】

大腸癌・乳癌・肝癌など腫瘍において、Wnt シグナルの異常が腫瘍発生・進展に関与することが広く知られている。なかでも大腸癌の発生においては、約90%の大腸癌でWnt経路に関わる遺伝子の異常が見つかっており、APCと β -cateninの変異がその約80%を占める。いずれの変異も核内での β -cateninの過剰な蓄積をもたらし、 β -catenin/TCF/LEFの転写活性を誘導する。

これまでに、 β -catenin/TCF転写複合体が直接発現誘導する多くの標的遺伝子が同定されており、これら発現誘導される遺伝子が果たす役割が明らかになっている。例えば、*c-myc*は細胞増殖、*cyclin D1*は細胞周期、*LGR5*は幹細胞性の維持に関わっており、Wnt経路の異常な活性化はこれら標的遺伝子の発現亢進を介し、腫瘍の発生や進展に関与することが示されている。

一方、発現が抑制される遺伝子群についての解析はほとんど行われていない。そこで本研究では、大腸癌の発生初期のステップでWnt経路の活性化に伴い発現が抑制される遺伝子群に着目した。これらの遺伝子は、がんの発生や進展に不利に働くために発現抑制されている可能性が考えられる。Wnt経路の活性化に伴い発現が亢進する直接の標的遺伝子群と同様に、抑制される遺伝子群の同定とその機能解析は、Wnt経路の異常に関わる腫瘍において網羅的な遺伝子発現変化が及ぼす役割の理解を深め、新たなバイオマーカーや治療戦略の発見に繋がると考えた。

【方法】

1. qRT-PCR

IFIT1、*IFIT2*、*IFIT3*、*IFIT5*特異的なPCRプライマーを作製し、 β -cateninまたはコントロールsiRNAで48時間処理した大腸癌細胞株SW480、HCT116からRNAを抽出して作製したcDNAを鋳型として、real-time PCRを行った。対照としては、GAPDH遺伝子の発現を用いた。

2. *IFIT*ファミリーの転写制御解析

IFIT1、*IFIT2*、*IFIT3*の5'-flanking領域(それぞれ-627~+22、-1366~+169、-1029~+76)をpGL3レポータープラスミドにクローニングした。さらに*IFIT2*については、-20~+169、+20~+169、+56~+169をもつpGL3プラスミドを作製した。これらのレポータープラスミドとpRL-TKプラスミドと共に大腸癌細胞株SW480に導入し、 β -cateninまたはコントロールsiRNA処理後48時間にデュアルルシフェラーゼアッセイを行った。

3. IFITファミリーの転写を活性させる IRF遺伝子の同定

IRFファミリーを Myc タグ付き pCMV 発現プラスミドにクローニングし、IFITファミリーのレポータープラスミドと共に大腸癌細胞株 SW480 にトランスフェクションし、48 時間後にレポーター活性を測定した。

4. ユビキチンプルダウンアッセイ

ユビキチン発現プラスミド(pME-FLAG/HIS-Ub)、それぞれの IRF 発現プラスミドと β -catenin siRNA および dnTCF4 発現プラスミドを SW480 細胞に導入し、細胞溶解後、Co ビーズを用いてユビキチン化したタンパクを沈降し抽出した。

5. レトロウイルスを用いた IFIT ファミリー高発現細胞株樹立

pMX レトロウイルスベクターに IFIT1, 2, 3(Ctrl:EGFP)それぞれの CDS をクローニングした。これらのプラスミドを PLAT-A パッケージング細胞に遺伝子導入してウイルスを作出し、大腸がん細胞株 SW480、HCT116 に感染させた。その後、puromycin でセクションを行い、IFIT1, 2, 3 それぞれの高発現細胞株を樹立した。(HCT116: 1 μ g/ml and SW480: 2.5 μ g/ml)

【結果】

1. 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

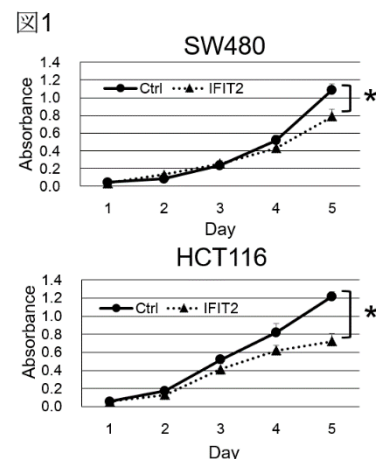
前任者が行った大腸癌細胞株 SW480、HCT116 における β -catenin ノックダウンによる遺伝子発現プロファイルデータ、公開されている LS174T におけるドミナントネガティブ TCF4による遺伝子発現プロファイルデータから、Wnt 経路の活性化により発現抑制される候補遺伝子群のリストを作成した。私はこのリストの上位 20 遺伝子の中に、2 つの IFIT(interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats)ファミリー遺伝子 (IFIT1、IFIT2) が含まれていたため、この IFITファミリーに着目した。まず、IFIT1、IFIT2、IFIT3、IFIT5 の発現が β -catenin により調節されるか qRT-PCR により検討した。その結果、 β -catenin のノックダウンにより、発現がそれぞれ 15.5 倍、7.8 倍、3.4 倍、1.8 倍増加した。これらの遺伝子の発現をパブリックなデータベース (<https://www.oncomine.org>) で調べたところ、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発現低下していたが、IFIT3 の発現は有意な変化はなかった。

2. 大腸がんにおける IFIT ファミリーの機能解析

IFIT1, 2, 3 それぞれの高発現細胞株を樹立し機能解析を行った。
IFIT2 高発現細胞株のみコントロール細胞に比べ、細胞増殖の減退が見られた (図 1)。細胞周期を調べると、G1, S, G2 期に変化はないが、sub-G1 値が IFIT2 高発現細胞株のみ上昇していた。これらの結果から IFIT2 は大腸がんにおいて細胞死誘導に関わる可能性が示唆された。

3. β -catenin による IFITファミリー発現制御

次に IFIT1、IFIT2、IFIT3 の 5' -flanking 領域をもつレポーター



プラスミドを大腸癌細胞株 SW480 に導入し、レポーター活性が β -catenin により調節されるかどうか調べたところ、これら 3 つの遺伝子の 5' -flanking 領域に、 β -catenin により制御される領域が存在することを見出した。 β -catenin のノックダウンにより最も活性が変化した *IFIT2* には 5' -flanking 領域の -20/+20 に、この遺伝子の発現を制御することが知られている IRF ファミリーの結合領域 IRF-E が複数存在した。これらの結合領域が β -catenin による *IFIT2* の転写調節に関わるかどうか、IRF-E を含むレポータープラスミドと含まないプラスミドを作成し、レポーター活性を比較ところ、IRF-E を含むレポータープラスミドのみ β -catenin ノックダウンにより活性が上昇した。これらの結果から、大腸癌では β -catenin の蓄積により、IRF ファミリーを介して *IFIT* ファミリーの発現が抑制されている可能性が示唆された。

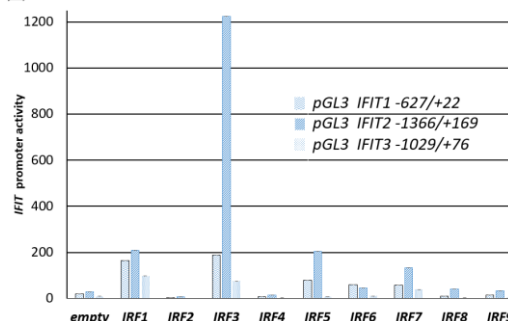
4. 大腸癌細胞における *IRF* ファミリー高発現による *IFIT1, 2, 3* の転写活性

IRF は 9 つのメンバーから構成されるファミリーを形成している。次に、どの IRF が *IFIT2* -20/+20 の領域を調節しているのか明らかにするために、すべての IRF メンバーの発現プラスミドを作製し、pGL3-*IFIT2*-20/+16 と pGL3-*IFIT2*+20/+169 のレポーター活性に対する IRF1~9 の影響を検討した。その結果、*IRF1*、3、6 および 7 の過剰発現はそれぞれ 25 倍、31 倍、8 倍、15 倍 pGL3-*IFIT2*-20/+169 のレポーター活性を増加させたが、IRF-E を欠失した pGL3-*IFIT2*+20/+169 のレポーター活性にはほとんど影響を与えなかった。

また、*IFIT1*~3 のレポーター活性は β -catenin ノックダウンにより増加することから、これら 3 つのレポーター活性をすべて増加させる IRF ファミリーを探索したところ、*IRF1*、3、5 および 7 が同定された。以上の 2 つのレポーターアッセイの結果から重複して *IFIT* のレポーター活性を上昇させていた IRF1、3、7 のいずれか、

または複数が、Wnt/ β -catenin シグナルによる *IFIT* ファミリーの発現調節に重要な役割を演じているものと考えられた (図 2)。

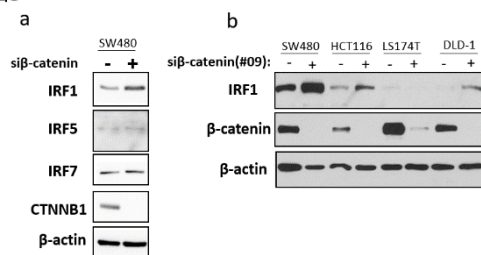
図2



5. Wnt シグナルが発現調節する *IRF* 遺伝子の同定

どの IRF が Wnt シグナルにより制御されているのかを明らかにするために、 β -catenin のノックダウンによる *IRF1* から *IRF9* の発現変動を qRT-PCR により検討した。しかしどの IRF メンバーも mRNA レベルでの発現変化は見られなかった。そこで、これらのタンパク質の発現調節を調べるために、まず、プロテアソームインヒビター (MG132) またはリソソームインヒビター (chloroquine)

図3

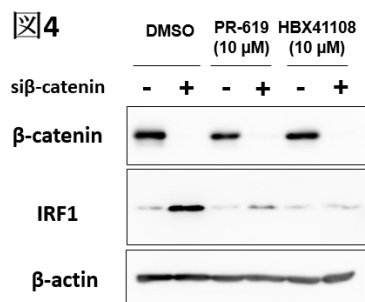


の処置による、IRFファミリータンパク質の安定化について検討した。その結果、IRF1、5、7のタンパク質がプロテアソーム系での分解により調節を受けることを見出した。そこで、ユビキチンプルダウンアッセイを行なった結果、 β -catenin もしくは dnTCF4 を処置するとコントロールと比べ、IRF1、IRF5、IRF7のユビキチン化の減少が見られた。このことから Wnt シグナルは IRF1、IRF5、IRF7 のタンパク質のユビキチン化を調節している可能性が示唆された。次に SW480 細胞において、IRF1、IRF5、IRF7 の発現が β -catenin ノックダウンにより変化するかどうか調べたところ、内在性 IRF1 のみタンパク質の安定化が観察された (図 3-a)。ノックダウンによる IRF1 のタンパク質の安定化は、SW480 細胞のほか HCT116、DLD-1 大腸がん細胞株で確認できた (図 3-b)。この結果と上記の IFIT ファミリーの転写活性に関わる IRF1、3、7 とを併せ考えると、Wnt シグナルによる IFIT ファミリータンパク質の調節は、ユビキチン化による IRF1 タンパク質の分解誘導が関与している可能性が示唆された。

6. Wnt シグナルによる IRF1 のユビキチン化調節機序

ユビキチン化にはユビキチンリガーゼや脱ユビキチン化酵素が関与するが、まずユビキチンリガーゼの検討を行った。前述の大腸癌細胞株 SW480、HCT116、LS174T におけるマイクロアレイデータの中で、Wnt シグナル活性化に伴い発現上昇する E3 ユビキチンリガーゼ遺伝子を探索したところ、RNF43、SKP2、HEI10 が同定された。そこで、これら

のタンパク質をノックダウンして、IRF1 タンパクの安定化を調べたが認められなかった。次に脱ユビキチン化酵素の検討を行った。 β -catenin ノックダウン下で IRF1 が安定化した細胞に、脱ユビキチン化酵素阻害剤 PR-619 と HBX-41108 を処置したところ、IRF1 タンパク質が減少したことから、Wnt/ β -catenin 経路により脱ユビキチン化酵素 (DUB) が抑制され、IRF1 タンパク質のユビキチン化と不安定化が増加することが示唆された (図 4)。



【まとめ】

本研究では、大腸癌細胞において Wnt/ β -catenin 経路によって発現抑制される遺伝子群の中から、IFIT ファミリーに着目して解析を行った。また IFIT2 の高発現細胞株は細胞死を誘導することから、IFIT2 の発現抑制により細胞死誘導から回避していることが推察された。また、Wnt 経路の活性化が抑制する転写因子 IRF1 を同定し、その発現調節機構に脱ユビキチン化酵素が関与している可能性を明らかにした。今後は、Wnt シグナルの下流で、負に調節される脱ユビキチン化酵素が IRF1 の安定化に関与しているかを明らかにするとともに、転写因子である IRF1 の低発現が大腸がんの発生と進展において、どのような役割を果たしているのかを解析する予定である。これらの解析により、Wnt 経路の異常に関わる腫瘍において網羅的な遺伝子発現変化が及ぼす役割の理解を深め、新たなバイオマーカーや治療戦略の発見に繋がる事を目指している。