

博士論文

論文題目 リングフィンガープロテイン43（RNF43）の
 発現調節機構と機能の解析

氏 名 高橋 則彦

リングフィンガープロテイン 43 (RNF43) の発現調節機構と機能の解析

高橋 則彦

目次

要旨	1
第 1 章 序文.....	3
第 1 節 諸言	3
第 2 章 材料と方法.....	9
第 1 節 細胞株.....	9
第 2 節 遺伝子サイレンシング	9
第 3 節 定量 RT-PCR	10
第 4 節 ウェスタンブロッティング	11
第 5 節 レポータープラスミドの作製	12
第 6 節 レポーターアッセイ	14
第 7 節 クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイ	15
第 8 節 ダイレクトシーケンシング	16
第 9 節 遺伝子発現マイクロアレイ解析.....	17
第 10 節 マイクロアレイデータ解析	19
第 11 節 テトラサイクリン誘導型 shRNA 発現大腸癌細胞株の作製.....	20
第 12 節 細胞免疫染色.....	21
第 3 章 結果.....	22

第1節 <i>RNF43</i> 発現調節機構の解析.....	22
第1項 β -catenin による <i>RNF43</i> 発現制御	22
第2項 <i>RNF43</i> プロモーター解析	24
第3項 <i>RNF43</i> イントロン 2 内の WRE の同定	27
第4項 WRE1 及び WRE2 の TCF4/ β -catenin 複合体との結合	34
第2節 RNF43 の機能解析	36
第1項 <i>RNF43</i> 高発現細胞株の検索.....	36
第2項 <i>RNF43</i> 遺伝子変異の検索	37
第3項 <i>RNF43</i> siRNA の選択	38
第4項 RNF43 ノックダウンによる遺伝子発現のマイクロアレイ解析 ...	39
第5項 RNF43 と発現が関連する遺伝子群	46
第6項 テトラサイクリン誘導型 shRNA 発現細胞株の作製	52
第7項 RNF43 ノックダウンによる EMT マーカーの変動	56
第4章 考察.....	59
第5章 結語.....	76
略語一覧.....	77
謝辞	85
参考文献.....	87

図目次

図 1. Adenoma-carcinoma sequence model for chromosomal instability in colorectal cancer.....	5
図 2. Canonical Wnt pathway	6
図 3. β -catenin ノックダウンによる RNF43 発現抑制	23
図 4. <i>RNF43</i> 転写開始点近傍のプロモーター活性	26
図 5. <i>RNF43</i> の転写因子結合推定部位とヒストン修飾	29
図 6. <i>RNF43</i> インترون 2 領域を用いたレポーターアッセイ	31
図 7. インترون 2 内の WRE のエンハンサー活性	33
図 8. WRE1、WRE2 を含む領域と TCF4/ β -catenin 複合体との結合	35
図 9. 大腸癌細胞株における <i>RNF43</i> 遺伝子発現量の比較.....	37
図 10. <i>RNF43</i> siRNA のノックダウン効果の比較.....	39
図 11. siRNF43 により発現変動する遺伝子セットのカテゴリー	40
図 12. RNF43 ノックダウンにより変動する遺伝子の Annotation Cluster ..	41
図 13. ベン図 (<i>RNF43</i> と負に相関する遺伝子)	43
図 14. ベン図 (<i>RNF43</i> と正に相関する遺伝子)	44
図 15. 遺伝子発現マイクロアレイデータ解析手順	45
図 16. 発現抑制候補遺伝子と <i>RNF43</i> の発現量の相関 (1/6)	47
図 17. 発現抑制候補遺伝子と <i>RNF43</i> の発現量の相関 (2/6)	48
図 18. 発現抑制候補遺伝子と <i>RNF43</i> の発現量の相関 (3/6)	49

図 19. 発現抑制候補遺伝子と <i>RNF43</i> の発現量の相関 (4/6)	50
図 20. 発現抑制候補遺伝子と <i>RNF43</i> の発現量の相関 (5/6)	51
図 21. 発現亢進候補遺伝子と <i>RNF43</i> の発現量の相関 (6/6)	52
図 22. shRNA 発現大腸癌株の RNF43 発現抑制効果	54
図 23. WiDr 由来 shRNA 発現細胞株の shRNA 発現	55
図 24. SW480 由来 shRNA 発現細胞株の shRNA 発現.....	56
図 25. RNF43 ノックダウン細胞における E-cadherin 発現量変化.....	57
図 26. RNF43 ノックダウン細胞における N-cadherin 発現変化	58
図 27. RNF43 ノックダウン細胞における vimentin 発現変化.....	59
図 28. Hypermuted type 別の遺伝子変化	71
図 29. MLH1 silencing 別の遺伝子変化	71
図 30. RNF43 プロモーターのメチル化と mRNA 発現の関係.....	72
図 31. Hypermuted type における <i>RNF43</i> と遺伝子修復酵素群および POLE 遺伝子変化.....	73
図 32. Methylation subtype 別の遺伝子変化	74
図 33. MSI status 別の遺伝子変化	74

表目次

表 1. 使用した siRNA	10
表 2. 定量 PCR 用プライマー	11
表 3. クローニング用プライマー	13
表 4. 部位特異的変異導入用プライマー	14
表 5. 変異導入確認用シークエンシングプライマー	14
表 6. ChIP アッセイ用プライマー	16
表 7. ダイレクトシークエンシング用プライマー	17
表 8. 大腸癌株における <i>RNF43</i> 遺伝子ダイレクトシークエンシング結果...	37
表 9. RNF43 により発現が抑制されると予測される遺伝子	45
表 10. RNF43 によって発現が亢進すると予測される遺伝子	45

要旨

リングフィンガープロテイン (RNF43) は E3 ユビキチンリガーゼであり、ヒト大腸癌において頻繁に発現亢進している。*RNF43* 遺伝子の発現は Wnt 経路によって制御されていることが知られているが、その制御領域は明らかにされていない。本研究では *RNF43* 遺伝子が TCF4/ β -catenin 複合体の直接的な標的であり、その制御がイントロン 2 に存在する 2 つの Wnt-responsive element (WRE) を含む領域によって行われていることを初めて明らかにした。大腸癌細胞株を用いたレポーターアッセイにより、WRE への変異導入がレポーター活性を減少させることを示した。また、siRNA を用いた β -catenin のノックダウンによってもレポーター活性の低下が確認された。加えて、ChIP アッセイにより、TCF4/ β -catenin 複合体が 2 つの WRE に結合することを示した。これらの結果から *RNF43* の発現が、TCF4/ β -catenin 複合体とイントロン 2 の 2 つの WRE との結合を介した Wnt/ β -catenin 経路によって制御されていることが示された。また、RNF43 をノックダウンさせた大腸癌細胞の網羅的遺伝子発現解析により、上皮間葉転換 (EMT) 関連遺伝子群の変動が認められた。テトラサイクリン誘導型 shRNF43 発現細胞株を用いた細胞免疫染色の結果から、RNF43 ノックダウンにより E-cadherin の減少と N-cadherin 及び vimentin の発現亢進が誘導されることを示した。これらの結果は RNF43 が上皮細胞の維持を担っている可能性を示唆している。本成果は RNF43 の発現制御機構及び癌との関連性の理解に有用であり、Wnt 経路に関連したネットワー

クの解明に役立つであろう。また RNF43 の発現あるいは機能制御を介したヒト腫瘍の治療法開発や予防法開発に貢献することが期待される。

第1章 序文

第1節 諸言

大腸癌は世界で最も一般的ながんの一つであり、日本とアメリカにおいて癌の死因の3位である。アメリカにおいては2013年に新たに142,820人が罹患し、50,830人の患者が死亡すると予測されている(1)。大腸癌全体の罹患率は大腸癌スクリーニングテストにより発見された初期のポリープ切除によって、年々減少傾向にあるが、50歳未満のスクリーニングテスト非対象者においては未だ増加している。そして日本においては食の欧米化によって粗死亡率は増加し続けている。癌の初期段階では手術のみで治癒を望めるが、進行がんにおいては手術のみでは再発することが稀でなく、化学療法や放射線療法との併用療法が行われる。近年、ベバシズマブ、セツキシマブ、パニツムマブなどの分子標的薬が進行大腸癌に対する併用療法として承認され、化学療法の効果を改善している。しかしながら、転移性癌の5年生存率は未だ12%を超えておらず、新規治療法の開発が望まれている。さらに分子標的薬は標的分子に対する特異性が高く副作用が少ないことが期待されるが、治療抵抗性の獲得の問題も孕んでいる。それに対応するためには、他の分子標的薬との併用や伝統的な制癌剤との併用が必要と考えられている。また、セツキシマブ治療におけるk-ras変異のように、患者の遺伝子型によって薬剤効果が認められない場合もある。それ故に、新たな治療薬開発が必要である。

大腸癌の発癌機序として、1990年に Fearon と Vogelstein により多段階発癌

モデルが提唱され、基本概念として現在も広く支持されている。組織学的検証と分子生物学的検証から、まず前がん病変である腺腫が発生し、さらに腺腫から癌へと進行する過程で、遺伝子の欠失や変異などの蓄積が観察されている。

現在のモデルでは、まず最初に APC や β -catenin を含む Wnt 経路の異常、次いで *KRAS* 変異に代表される RAS/MAPK 経路の活性化、更に癌抑制システムである p53 経路の異常などが段階的に蓄積されるとされている。また TGF- β 経路異常は、アポトーシスの抑制、EMT の誘導、浸潤の亢進などを惹起し、癌の悪性化に関与している (図 1)。これらの遺伝子異常は、染色体不安定性 (Chromosomal Instability: CIN)、マイクロサテライト不安定性 (Microsatellite instability: MSI)、CpG island methylator phenotype (CIMP) の少なくとも 3 つの機序により引き起こされると考えられている。

CIN は細胞分裂に関わる機構の異常 (紡錘体チェックポイント異常や centrosome 形成異常など) により、MSI はミスマッチ修復機構異常 (*MSH2*、*MLH1*、*MSH6*、*PMS2* の生殖細胞における変異、あるいは後天的な *MLH1* プロモーターのメチル化) により、CIMP は DNA のメチル化による遺伝子発現異常 (多くが MSI を呈し、*BRAF* 変異が多い。*MLH1* プロモーターのメチル化によるミスマッチ修復機構の異常) が腫瘍発生に寄与していると理解されている。

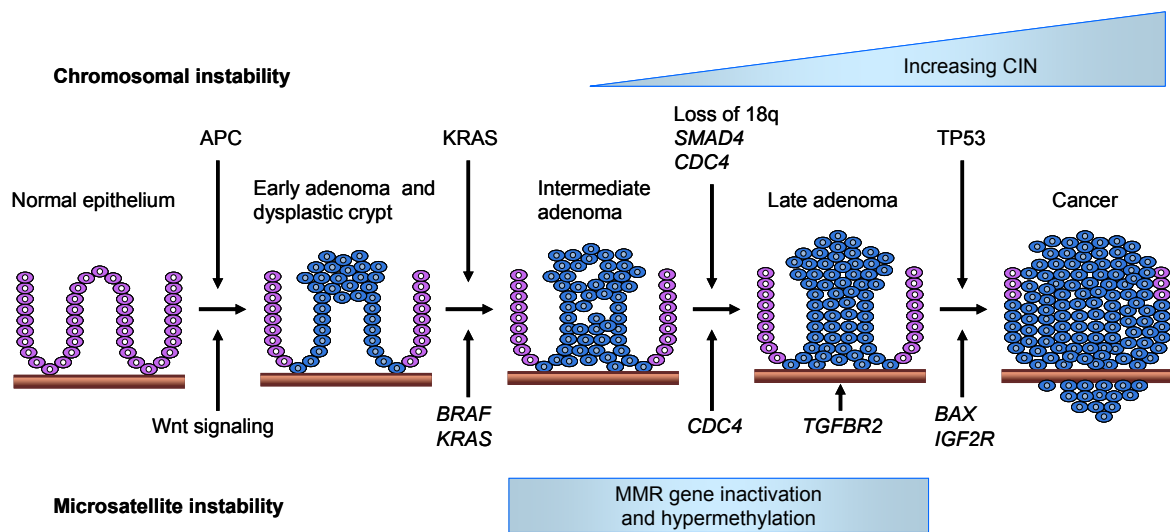


図 1. Adenoma-carcinoma sequence model for chromosomal instability in colorectal cancer. (Nature Reviews Cancer Vol. 9, p489-499 より改変し引用)

近年の分子生物学的研究により、Wntシグナル経路の異常が大腸癌の発生・進展に関与していることが明らかにされている。最近の網羅的解析によると、93%の大腸癌においてWntシグナル経路の異常が見つかった（2）。Wntシグナル経路は、細胞の分化、増殖、コンパートメントや腸上皮の細胞運命を制御していることが知られている。Wntシグナルにおけるキーマディエーターの一つである β -cateninは、cadherinと結合することにより、細胞間接着において構造的な役割も果たしている（3）。 β -cateninは、Wnt刺激のない状態では、APC、Axin/Axin2（コンダクチン）、GSK3 β などからなる複合体（destruction complex）によりリン酸化され、それが引き金となってユビキチン化されることによりプロテアソームでの分解が誘導される（4）。Wntタンパク質は、Frizzledファミリー受容体とlow density lipoprotein receptor-related protein

(LRP)の複合体に結合することにより、Dishevelled (Dvl)を活性化し、GSK3 β の活性を阻害する(5)。その結果、分解が抑制された β -cateninが蓄積し、さらに核に移行することにより、転写因子TCF/LEFと複合体を形成し、その転写活性が誘導される(6, 7)。

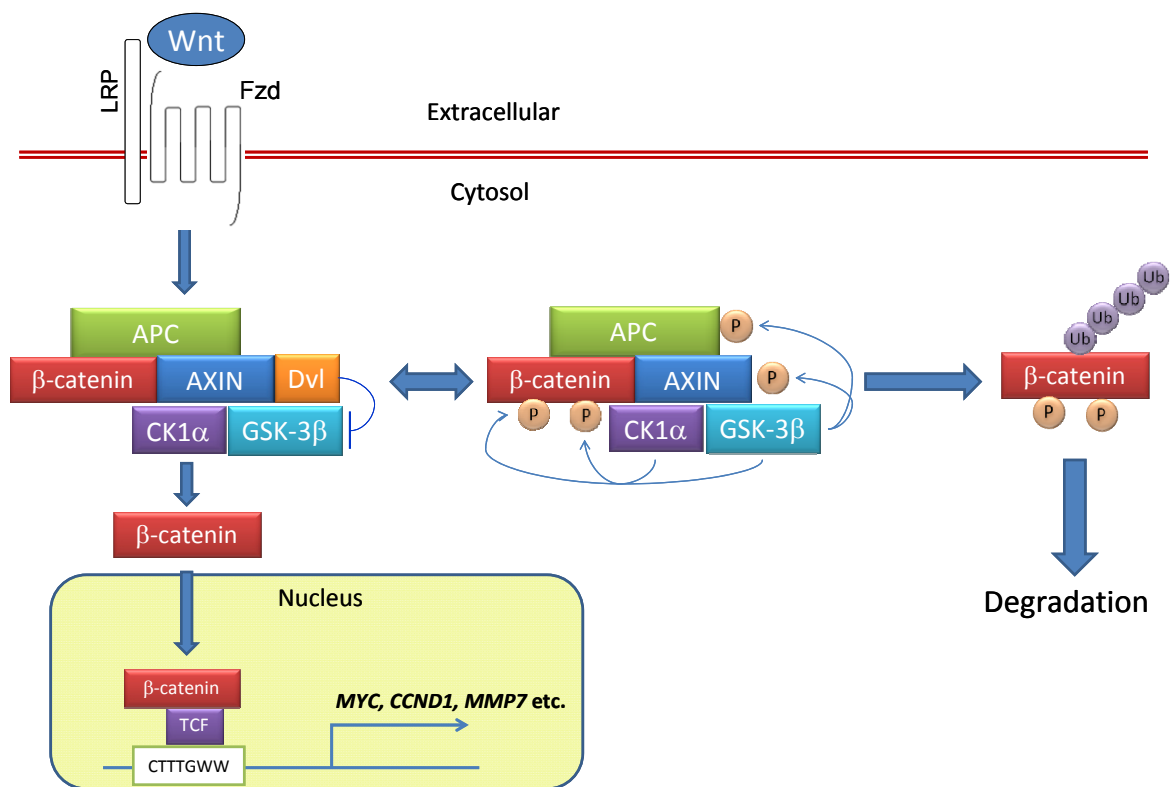


図 2. Canonical Wnt pathway

大腸癌においては、家族性大腸腺腫症の原因遺伝子であるAPCと β -catenin (*CTNNB1*)の変異が約80%を占める(2, 5, 8)。APCの変異のほとんどがAPCタンパク質の合成が途中で停止するtruncation変異で、 β -cateninやAXIN1との結合ができず、その結果 β -cateninの分解に障害をきたす。また*CTNNB1*の

変異は、destruction complexによる分解に対する耐性を獲得する変異である。いずれの遺伝子の変異も、 β -cateninの蓄積によりTCF/LEFの転写活性化を引き起こす。肝細胞癌においては、*CTNNB1* と *AXIN1* において頻繁に変異がみられる (5, 9, 10)。これらの変異は相互排他的である。このことはこれらの変異が一つ存在すればcanonical Wnt経路を活性化するのに十分であることを示唆している。TCF4/ β -catenin複合体はDNAを屈曲させ、離れた位置からRNAポリメラーゼIIが結合しやすいクロマチン構造を形成させると考えられている (11)。それにより、c-myc (12)、cyclinD1 (13)、MMP-7 (14, 15)、urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) (16)、コネキシン 43 (17)、CD44 (18)、PPAR- δ (19)、AF17 (20)、ENC1 (21)、Laminin-5 γ 2 (22)、Claudin-1 (23)、MT1-MMP (24)、LGR5 (25) などの下流遺伝子の発現を亢進させる。Wnt経路関連遺伝子の変異は、恒常的なTCF4/ β -catenin複合体の活性化を引き起こし、下流遺伝子の異常発現を介して腫瘍発生を誘導すると考えられている。

以前FLJ20315 として登録されていたRNF43 は核タンパク質であるHAP95と結合するE3 ユビキチンリガーゼである (26)。最近、2つの研究グループが、RNF43 がfrizzledを含むWnt受容体の分解を亢進させることを報告した。一方のグループは、RNF43 がR-spondinとの相互作用を介してfrizzledとLRP6 の分解を促進すること (27, 28)、他方はLGR5 陽性腸幹細胞において、RNF43 がFZD5 のエンドサイトーシスを誘導することを報告した (29)。これらの発

見はRNF43 がWnt/ β -catenin経路とWnt/PCP経路の重要な制御因子であることを示唆している。興味深いことに、最近*RNF43*の変異が膵癌（30, 31）、胆管癌（32）、大腸癌（33）、粘液性卵巣癌（34）で報告され、*RNF43*の変異によるWntシグナル経路の異常が腫瘍発生に関係することが明らかになった。

我々の研究室における先行研究で、RNF43 は大腸癌および肝細胞癌において高頻度に発現亢進していることを見出している（35, 36）。他の研究グループからもRNF43 が大腸腺腫でも発現亢進していること（37）、大腸癌細胞株LS174TにおいてドミナントネガティブTcf4 の導入により発現が減少すること（38）、Wnt3aを含む培養上清の添加により発現亢進すること（27）などが報告されている。これらの報告は*RNF43* がWntシグナル経路によって制御される下流遺伝子であることを強く示唆しているが、その発現制御領域は明らかにされていない。本研究ではRNF43 発現の制御領域を明らかにし、*RNF43* がTcf4/ β -cateninの直接的な標的であることを示すこと、RNF43 のがん細胞における機能を明らかにすることを目的とした。

第2章 材料と方法

第1節 細胞株

ヒト大腸癌細胞株 HCT116、SW480、WiDr は American Tissue Culture Collection より購入した。HCT116 は 10%ウシ血清 (FBS) 及び抗生物質を含む McCoy's 5A 培地を用いて 37°C、5%CO₂ を含む大気中で培養した。SW480 は 10%FBS 及び抗生物質を含む Leibovitz's L-15 培地を用いて 37°C、大気中で培養した。WiDr は 10%FBS 及び抗生物質を含む RPMI1640 培地を用いて 37°C、5%CO₂ を含む大気中で培養した。

第2節 遺伝子サイレンシング

ヒト *CTNNB1* siRNA (siCTNNB1)、ヒト *RNF43* siRNA (siRNF43#9、siRNF43#10、siRNF43#11、siRNF43#12)、及びコントロール siRNA (siControl) は Dharmacon 社より購入した。HCT116 あるいは SW480 を siRNA 処理前日に 6 ウェルプレートに 2×10^5 個 (HCT116) あるいは 4×10^5 個 (SW480) 播種し、翌日に siCTNNB1 あるいは siControl を終濃度 15 nM で Lipofectamine RNAiMAX を用いて導入し、48 時間培養した。

表 1. 使用した siRNA

Name	Product Name	Cat. No.
siControl	ON-TARGETplus Non-targeting pool	D-001810-10
siCTNNB1	SMART pool: ON-TARGETplus CTNNB1 siRNA	L-003482-00
siRNF43#9	Individual: ON-TARGETplus RNF43 siRNA	J-007004-09
siRNF43#10	Individual: ON-TARGETplus RNF43 siRNA	J-007004-10
siRNF43#11	Individual: ON-TARGETplus RNF43 siRNA	J-007004-11
siRNF43#12	Individual: ON-TARGETplus RNF43 siRNA	J-007004-12

第3節 定量 RT-PCR

細胞を PBS(-)で洗浄後、細胞に直接 QIAzol を加え可溶化させて回収した。

メーカーの使用説明書に従い、miRNeasy Mini Kit (Qiagen 社) を用いて total RNA を抽出した。1 µg の total RNA より Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (ロシュ・ダイアグノスティクス社) を用いて cDNA 合成を行った。リアルタイム PCR は StepOnePlus (ライフテクノロジーズ社) を用いて SYBR Green 法により検出した。使用したプライマー配列を表 2. に示した。

転写産物量は *GAPDH* を内部コントロールとして relative standard curve 法を用いて決定した。

表 2. 定量 PCR 用プライマー

Name	Sequence (5' to 3')	Location	Product size
qRNF43-F	TTATCCGCACTGCCAGGT	exon9	75 bp
qRNF43-R	ACAGCCTGTTTCACACAGCTC	exon10	
qGAPDH-F	AGCCACATCGCTCAGACA	exon2	66 bp
qGAPDH-R	GCCCAATACGACCAAATCC	exon2-3	

第 4 節 ウェスタンブロッティング

細胞を PBS(-)で洗浄後、細胞に SDS バッファー (62.5 mM トリス・HCl, pH6.8, 2% SDS, 10% グリセロール) を加え、可溶化させて回収した。回収した細胞溶解液を 95℃で 5 分間処理し、BCA プロテインアッセイ (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いてタンパク質濃度を測定した。30 µg のタンパク質溶液を SDS-PAGE で分離した後、ニトロセルロース膜あるいは PVDF 膜に転写した。転写膜は 5%スキムミルクを含む PBS でブロッキングした後、各抗体 (β-catenin ; C19220、1:500、トランスダクションラボラトリーズ社、RNF43 ; 1:250、HPA008079、シグマアルドリッチ社、βアクチン ; 1:500、AC-15、シグマアルドリッチ社) を用いて 4℃で一晩反応させた。それぞれに対応する HRP 標識二次抗体を反応させた後、ECL ウェスタンブロッティング検出システム (GE ヘルスケア社) あるいは ECL Plus ウェスタンブロッティング検出システム (GE ヘルスケア社) を用いて検出した。

第5節 レポータープラスミドの作製

プロモーター近傍領域の増幅には 3 セットのプライマー (RNF43-5'-1 ; RNF43-MluI-F1 及び RNF43-XhoI-R1、RNF43-5'-2 ; RNF43-MluI-F1 及び RNF43-XhoI-R2、RNF43-5'-3 ; RNF43-MluI-F1 及び RNF43-XhoI-R3) を用いた (表 3)。フォワードプライマーには *MluI* 認識配列を、リバースプライマーには *XhoI* 認識配列を付加し、さらに 5'末端に 3 塩基を加えた。PCR 産物を *MluI* 及び *XhoI* で消化し、同酵素で消化した pGL3-Basic ベクター (プロメガ社) に挿入した。また、イントロン領域のクローニングには 3 セットのプライマー (RNF43-int2 ; RNF43-MluI-F2 及び RNF43-XhoI-R3、RNF43-int2-A ; RNF43-MluI-F2 及び RNF43-XhoI-R4、RNF43-int2-B ; RNF43-MluI-F3) を用いて増幅し (表 3)、PCR 産物を *MluI* 及び *XhoI* で消化した後、同酵素で消化した pGL3-Promoter ベクター (プロメガ社) に挿入した。TCF4 結合配列 (CTTTGWW) を CTTTGGC に変換するための部位特異的変異導入は、RNF43-mTBM-1F と RNF43-mTBM-1R あるいは RNF43-mTBM-2F と RNF43-mTBM-2R を用いて (表 4)、QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (アジレント・テクノロジー社) により作製した。変異導入の確認はサンガーシークエンシング法によって行った。すなわち、作製したプラスミドと表 5 のプライマー及び BigDye Terminator 3.1 を用いてサイクルシークエンシング反応を行った (96°C、20 秒、50°C、30 秒、60°C、4 分、30 サイクル)。反応産物をエタノール沈殿にて回収し、ホルムアミドに再溶解した後、

キャピラリーシーケンサー（ABI PRISM3100、アプライドバイオシステムズ社）を用いてシーケンスを決定した。

表 3. クローニング用プライマー

Name	Sequence (5' to 3')	Location
RNF43-MluI-F1	AAA <u>ACGCGT</u> CTACAGGGGAAACAATGTTGAAGGTCAATAGGCT	chr17:56,496,098-56,496,131 (5'-UTR)
RNF43-XhoI-R1	AA <u>ACTCGAG</u> CTGCAACCAAACCAAGTGCCCC	chr17:56,494,505-56,494,526 (exon1)
RNF43-XhoI-R2	AA <u>ACTCGAG</u> TGGCCAGGTTTCTAGGCCCACTGC	chr17:56,493,599-56,493,622 (intron1)
RNF43-XhoI-R3	AA <u>ACTCGAG</u> TGGCAAAGAGAATGCCAACTGGTGCTGT	chr17:56,491,044-56,491,071 (intron2)
RNF43-MluI-F2	AAA <u>ACGCGT</u> AGACTATTTGGCTGTCTCAAAGTCATTGCC	chr17:56,472,580-56,472,609 (intron2)
RNF43-MluI-F3	AAA <u>ACGCGT</u> CACCAGGGCCTATGCCCCAC	chr17:56,470,232-56,470,251 (intron2)
RNF43-XhoI-R3	AA <u>ACTCGAG</u> CCAGGGCCCAGCATTGTGCCT	chr17:56,468,435-56,468,455 (intron2)
RNF43-XhoI-R4	AA <u>ACTCGAG</u> TGGGGCATAGGCCCTGGTG	chr17:56,470,233-56,470,251 (intron2)

下線部は制限酵素認識配列を示す（*MluI* : ACGCGT、*XhoI* : CTCGAG）。

表 4. 部位特異的変異導入用プライマー

Name	Sequence (5' to 3')
RNF43-mTBM-1F	TGGCCTGCTTTGG <u>C</u> CTTCTTGTCTGT
RNF43-mTBM-1R	ACAGACAAGAAGG <u>C</u> CAAAGCAGGCCA
RNF43-mTBM-2F	AAGGGCTCTTTGG <u>C</u> AATATCTGACGG
RNF43-mTBM-2R	CCGTCAGATATTG <u>C</u> CAAAGAGCCCTT

下線部は変異導入部位を示す。

表 5. 変異導入確認用シーケンシングプライマー

Name	Sequence (5' to 3')
RNF43-int2-SP-F1	ACACTTCCTGTTGTTATTCTTG
RNF43-int2-SP-R1	AAGGTAAACTACAAAAGGAAAC
RNF43-int2-SP-F2	CACCTAATTCATGCTGATCC
RNF43-int2-SP-R2	TGAAAAATTAAATTTCTAATTCCAG

第6節 レポーターアッセイ

HCT116 及び SW480 を 6 ウェルプレートに播種し、翌日に 1 μ g のレポータープラスミド及び 0.1 μ g の pRL-TK プラスミド（プロメガ社）を、FuGENE6（ロシュ・ダイアグノスティクス社）を用いて導入した。12 時間後、終濃度 15 nM の siCTNNB1 あるいは siControl で処理し、さらに 36 時間インキュベ

ートした。レポーター活性はピッカジーンデュアル (TOYO B-Net 社) 及び Lumat LB9507 (ベルトールド社) を用いて測定した。

第7節 クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイ

ChIP アッセイは Agilent Mammalian ChIP プロトコルを改変して行った。HCT116 あるいは SW480 を 15 cm ディッシュ 3 枚に播種した。翌日 1%ホルムアルデヒド溶液で室温にて 10 分間固定した後、0.4M グリシンで室温 5 分間処理し反応を停止させた。クロマチン抽出物はマイクロコッカルヌクレアーゼで部分消化し、抗マウス抗体コート DynaBeads に結合させた 3 μ g の抗 TCF4 モノクローナル抗体 (6H5-3、Upstate 社)、抗 β -catenin モノクローナル抗体 (14/ β -catenin、BD Transduction Laboratories 社) あるいは非免疫マウス IgG (Santa Cruz 社) で免疫沈降させた。得られたタンパク質-DNA 複合体より通常の方法を用いて DNA を抽出し、表 6 のプライマーセット (RNF43-int2-A ; RNF43-int2f-F 及び RNF43-int2f-R、RNF43-int2-B ; RNF43-int2r-F 及び RNF43-int2r-R) を用いてリアルタイム PCR で解析した。ネガティブコントロールとして RNF43 の転写開始点 (TSS) 上流-4861 から-4761 の領域を増幅するプライマーセット (RNF43-5'UTR-F 及び RNF43-5'UTR-R) を用いた。ポジティブコントロールは、c-Myc のエンハンサー領域を増幅するプライマーセット (MYC-ChIP-F 及び MYC-ChIP-R) を用いた。

表 6. ChIP アッセイ用プライマー

Name	Sequence (5' to 3')	Location	Product size
RNF43-int2f-F	TCAACTCTCTGGATAAGGTGGAATAGC	chr17:56,472,300-56,472,326	120 bp
RNF43-int2f-R	GACTTTTGGGGTGGGTGGGAAATA	chr17:56,472,207-56,472,230	
RNF43-int2r-F	TCGGGCACCTGGCCAAGATACA	chr17:56,469,018-56,469,039	137 bp
RNF43-int2r-R	TGGACGCCCTGGCTTCTGAG	chr17:56,468,903-56,468,922	
RNF43-5'UTR-F	CAAGGCTAGTCTGCCTCCAG	chr17:56,499,662-56,499,681	94 bp
RNF43-5'UTR-R	AGCGCTTTCCAAAGGAGGAA	chr17:56,499,736-56,499,755	
MYC-ChIP-F	GCTCAGTCTTTGCCCTTTGTGG	chr8:128,755,380-128,755,402	77 bp
MYC-ChIP-R	AACACCTTCCCGATTCCCAAGTG	chr8:128,755,434-128,755,456	

第 8 節 ダイレクトシーケンシング

WiDr、NCI-H498 及び SNU-C4 由来 cDNA を 3 セットのプライマー（フラグメント 1 ; RNF43-F 及び RNF43 SP-R2、フラグメント 2 ; RNF43-F1 及び RNF43 SP-R4、フラグメント 3 ; RNF43-F3 及び RNF43-R）を用いて RNF43 断片を増幅した。増幅産物を 1.5%アガロースゲル電気泳動で展開した後、目的バンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit を用いて DNA 断片を回収した。得られた DNA 断片と表 7 のプライマー及び BigDye Terminator 3.1 を用いてサイクルシーケンシング反応を行った (96℃、20 秒、50℃、30 秒、60℃、

4 分、30 サイクル)。反応産物をエタノール沈殿にて回収し、ホルムアミドに再溶解した後、キャピラリーシーケンサー（ABI PRISM3100、アプライドバイオシステムズ社）を用いてシーケンスを決定した。

表 7. ダイレクトシーケンシング用プライマー

Name	Sequence (5' to 3')	A of 1st ATG as position 1
RNF43-F	ATGAGTGGTGGCCACCAGCTGCAGC	1-24
RNF43 SP-F1	AATGACGCTGAGAAGCTGATG	499-519
RNF43 SP-F2	CAAGAACCAGGTCGAAGACTC	997-1017
RNF43 SP-F3	GCAGCTCCCTAAGCAGTGAC	1493-1512
RNF43 SP-R1	GCTCGATCCTCAGTGATGTC	418-437
RNF43 SP-R2	CAGCAGGGAGGTGGTAGTG	1048-1066
RNF43 SP-R3	CTGATGTCCGTGCAGTTGAC	1438-1457
RNF43 SP-R4	TGAGTTGGATCTGGTGACTIONG	1789-1809
RNF43-R	TCACACAGCCTGTTACACAGCTCC	2328-2352

第 9 節 遺伝子発現マイクロアレイ解析

WiDr 細胞に 15 nM のヒト *RNF43* siRNA (siRNF43#10、siRNF43#11、siRNF43#12) あるいはコントロール siRNA (siControl) を Lipofectamine

RNAiMAX（ライフテクノロジーズ社）を用いて導入して 48 時間インキュベート後、細胞を回収した。各 siRNA 処理はデュプリケートで行った。回収細胞から miRNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出し、RNA 6000 Nano Lab-On-chip を用いて Agilent 2100 バイオアナライザ（アジレント・テクノロジーズ社）により品質確認を行った。RNA は Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color（アジレントテクノロジーズ社）を用いて、使用説明書に従って Cy3 ラベリングし、マイクロアレイ（SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ 8x60K v1、アジレント・テクノロジーズ社）にハイブリダイズした。すなわち、トータル RNA 200 ng を、T7 プロモーター配列を付加したオリゴ dT プライマーを用いて二本鎖 cDNA を合成し、合成された cDNA を鋳型に T7 ポリメラーゼと Cy3 ラベルされた CTP を含む基質を用いて、in vitro transcription とラベリングを行った。得られた cRNA を RNeasy Mini Kit（キアゲン社）を用いて精製した。精製された cRNA の濃度と Cy3 取り込み率は e-Spect（ビーエム機器）を用いて確認した。ラベリングされた cRNA のフラグメンテーションを行い、ハイブリダイズ用のサンプルとした。ハイブリダイゼーションは 10 rpm で回転させながら 65°C で 17 時間行った。ハイブリダイズ後のマイクロアレイはオゾンフリーブース内でバッファー洗浄を行った後、直ちにスキャンした。マイクロアレイの検出には Agilent DNA マイクロアレイスキャナ（G2505、アジレント・テクノロジーズ社）を用いた。得られた画像ファイルは Agilent Future Extraction Software9.5.3.1（アジレン

ト・テクノロジーズ社) を用いて数値化を行った。

第10節 マイクロアレイデータ解析

マイクロアレイ解析により得られた数値データをGeneSpring GX11.5 software package (アジレント・テクノロジーズ社) にインポートし、OneWay ANOVA で $p < 0.05$ 、かつ少なくとも2種類のsiRNF43により1.5倍以上変動のみられる遺伝子を抽出した (siRNF43 遺伝子セット)。比較に用いた臨床大腸癌検体マイクロアレイデータ (GSE4183、GSE20916、GSE23878) はNCBIホームページ上のGene Expression Omnibus (GEO) よりダウンロードし、GeneSpringによる解析を行った。GEOより得たそれぞれのデータベースについてRNF43 遺伝子発現と相関 ($0.4 \leq r \leq 1.0$ 、あるいは $-1.0 \leq r \leq -0.4$ 、 r : ピアソン相関係数) のある遺伝子セットを抽出した (GEO遺伝子セット)。GEO遺伝子セットとsiRNF43 遺伝子セットにおいて共通する遺伝子セットを抽出した。Molecular Signature Database (MSigDB) とのオーバーラップはGene Set Enrichment Analysis (GSEA) ホームページ内のMolecular Signature Database (39) タブよりInvestigate Gene Setsを選択し、C2: curated gene sets (4722 gene sets) に対するオーバーラップを計算した (FDR $q\text{-value} < 0.05$) (40, 41)。アノテーション解析には、ウェブ上の解析ツールThe Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID ; DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH,

<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (42, 43) を用いた。得られた 262 遺伝子のリストを DAVID 上にアップロードし、Functional Annotation Clustering (GO_TERM_BP_FAT) を行った。

第 11 節 テトラサイクリン誘導型 shRNA 発現大腸癌細胞株の作製

Trans-Lentiviral shRNA Packaging Kit with Calcium Phosphate (サーモサイエンティフィック社) を用いてレンチウイルスベクターを作製した。パッケージングミックスと TRIPZ Human RNF43 shRNA (V2THS_173684 あるいは V2THS_173688、サーモサイエンティフィック社) あるいは TRIPZ inducible Lentiviral Non-silencing shRNA Control (#RSS4743、サーモサイエンティフィック社) を HEK293T 細胞に共導入した。翌日、培地を 5%FBS 含有 DMEM に交換し、さらに 2 日間培養した。培養上清を回収し、Lenti-X Concentrator (タカラバイオ社) を用いてレンチウイルスを濃縮した。得られたレンチウイルス濃縮液を、WiDr 及び SW480 培養プレートに添加し感染させた。感染細胞をピューロマイシンにより選択し、テトラサイクリン誘導型 shRNA 発現大腸癌細胞株 (WiDr-shRNF43#84、WiDr-shRNF43#88、SW480-shRNF43#84、SW480-shRNF43#88) を得た。細胞は 3 日ごとに 1 $\mu\text{g/mL}$ のドキシサイクリンを添加して shRNA を 6 日間誘導した。

第 1 2 節 細胞免疫染色

WiDr-shRNF43#84 、 WiDr-shRNF43#88 、 SW480-shRNF43#84 、 SW480-shRNF43#88 をチャンバースライドに播種し、24 時間後に 1 $\mu\text{g/mL}$ のドキシサイクリンを添加して shRNA を 6 日間誘導した。細胞に 4%パラホルムアルデヒドを加え、室温で 1 時間固定した。細胞膜を 0.1% Triton X-100 で 4°C、3 分間透過処理した。3%ウシ血清アルブミンを用いて 4°Cで 1 時間ブロッキングした後、1 $\mu\text{g/mL}$ の抗 E-cadherin 抗体 (HECD-1、タカラバイオ社)、抗 N-cadherin 抗体 (610920、BD Transduction 社)、あるいは抗 Vimentin 抗体 (V9、sc-6260、Santa Cruz 社) を加え、4°Cで一晩反応させた。TBS で洗浄後、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウス IgG 抗体 (1:3000、Abnova 社) を加え、室温で 1 時間反応させた。TBS で洗浄後、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (ベクターラボラトリーズ社) を用いて封入し、共焦点蛍光顕微鏡 (A1、ニコン社) を用いて観察及び撮影を行った。

第3章 結果

第1節 *RNF43* 発現調節機構の解析

第1項 β -catenin による *RNF43* 発現制御

RNF43 が Wnt/ β -catenin 経路によって調節されていることを確認するために、HCT116 と SW480 を siCTNNB1 あるいは siControl で処理し、*RNF43* 発現量を測定した (図 3A)。HCT116 及び SW480 は、それぞれ *CTNNB1*、*APC* の変異によって恒常的に Wnt 経路が活性化している。予想通り β -catenin をノックダウンすると *RNF43* 発現量が顕著に減少することが示された (図 3B)。また、SW480 において siCTNNB1 処理により *RNF43* タンパク質が減少していることが示された (図 3A)。HCT116 は *RNF43* にホモ接合性のフレームシフト変異が存在することが知られている。今回用いた抗 *RNF43* 抗体では変異型タンパク質は検出されなかった。しかしながら、*RNF43* 転写産物の減少は SW480 よりも HCT116 で著明であるため、転写調節領域の解析には HCT116 を用いた。

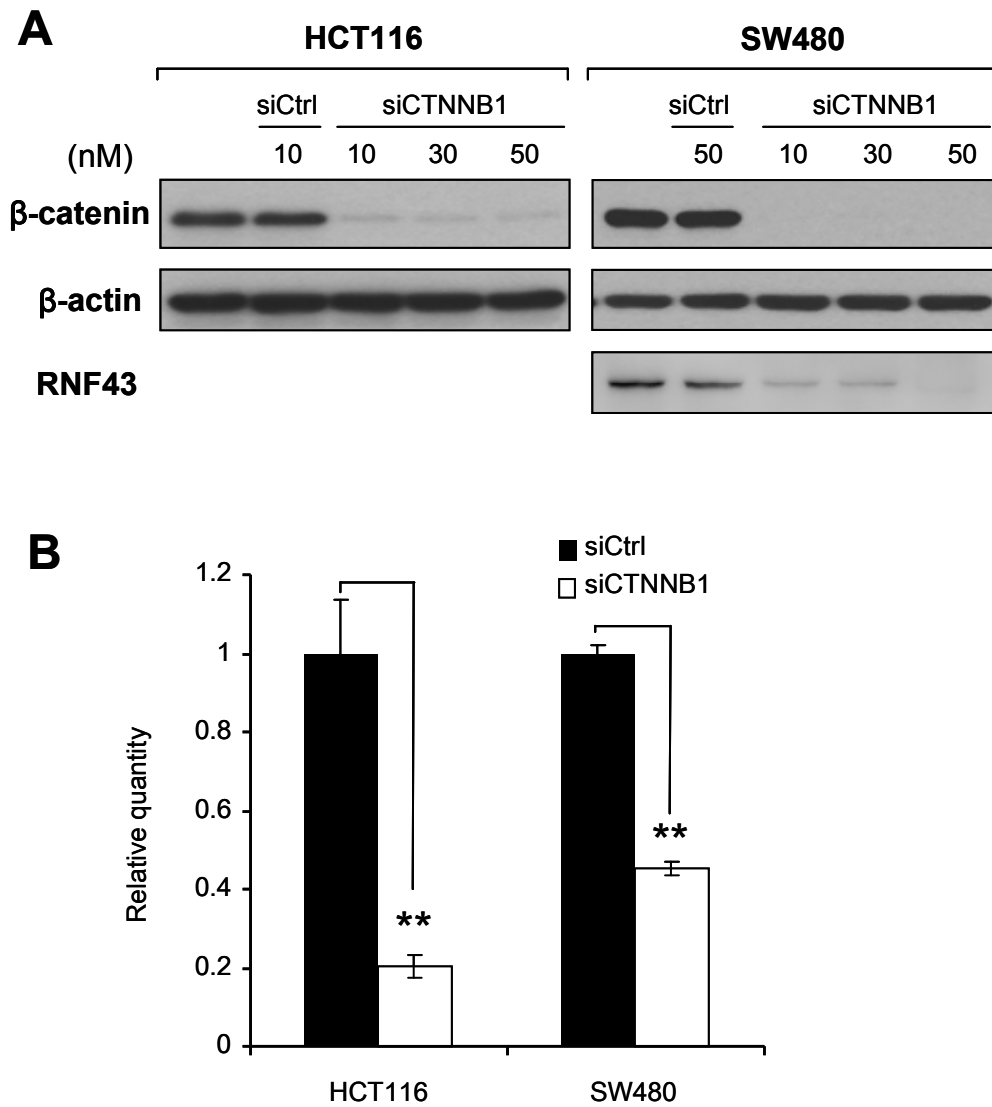


図 3. β-catenin ノックダウンによる RNF43 発現抑制

A) β-catenin siRNA (siCTNNB1) によるノックダウン効果。HCT116 及び SW480 を表記した濃度の siCTNNB1 あるいは siControl (siCtrl) で処理し、β-catenin と RNF43 の発現量をウェスタンブロッティングで検出した。 B) RNF43 の発現量を定量 PCR により解析した。図には siControl 処理細胞に対する相対発現量 (平均±標準偏差) を示した。統計学的有意差は Student's t-test により検証した (**; $P < 0.01$)。

第2項 *RNF43* プロモーター解析

RNF43 の Wnt シグナリングの調節エレメントを同定するために、5'-flanking 領域とイントロン領域を含む 3 種類のレポータープラスミド (RNF43-5'-1、RNF43-5'-2、RNF43-5'-3) を作製した。RNF43-5'-1 は約 1.6kb (chr17: 56494505-56496131, GRCh37)、RNF43-5'-2 は約 2.5kb (chr17: 56493599-56496131, GRCh37)、RNF43-5'-3 は約 5.1kb (chr17: 56491044-56496131, GRCh37) の領域をそれぞれ含む (図 4A)。これらの領域は TSS より -274 から -268 と -54 から -48 に、TCF/LEF 結合モチーフ (CTTTGWW) に類似した 2 つの配列 (5'-CTTTGAG-3'、5'-CTTTGTC-3') を含んでいる。これらのレポータープラスミドを一過性に HCT116 細胞に導入しレポーター活性を測定した。その結果、RNF43-5'-1 と RNF43-5'-2 において、コントロールプラスミド (EV: empty vector) に比べてそれぞれ約 3.0 倍と約 2.5 倍の活性上昇が認められた (図 4B)。すなわち、RNF43-5'-1 および RNF43-5'-2 領域には発現調節領域が含まれていることが示唆された。一方、RNF43-5'-3 の活性は、コントロールプラスミドと同等であった。したがって、RNF43-5'-3 のクローニング領域の 3'側には転写抑制領域が含まれる可能性が示唆された。

RNF43-5'-1 及び RNF43-5'-2 の転写活性に対して、 β -catenin が影響を及ぼしているかどうか調べるため、細胞に siCTNNB1 あるいは siControl を処理後、レポーター活性を測定した。その結果、siControl と比較して siCTNNB1 によ

り活性は減少せず、むしろ増加した（図 4C）。このことから、これらの領域には Tcf4/ β -catenin 複合体により活性化される転写調節領域が存在しないことが強く示唆された。

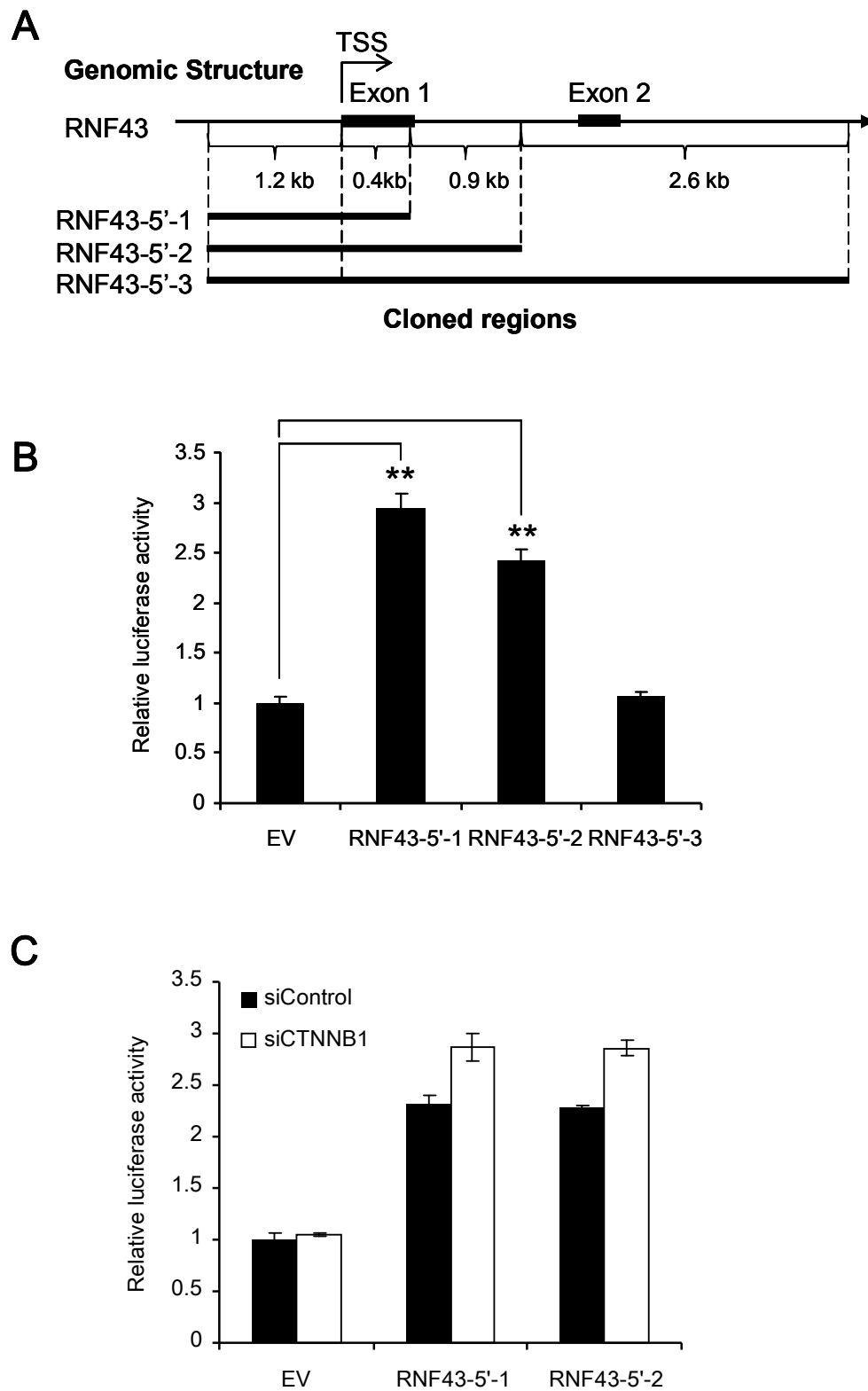


図 4. *RNF43* 転写開始点近傍のプロモーター活性

A) *RNF43* の転写開始点近傍のゲノムマップ及びレポータープラスミド (pGL3-basic) へクローニングした領域。TSS : 転写開始点。B) レポータープラスミドのプロモーター活性 (平均±標準偏差、** ; $P < 0.01$ 、Student's t-test)。C) β -catenin のノックダウンによるプロモーター活性への影響 (*RNF43*-5'-1、*RNF43*-5'-2)。EV : empty vector。

第3項 *RNF43*イントロン2内のWREの同定

次に、公開されている ENCODE プロジェクトのデータベース (http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?position=chr17:56431038-56494931&hgside=355387975&refGene=pack&hgFind.matches=Nm_017763) を用いて、*RNF43* 遺伝子の制御領域を検索した。ENCODE の ChIP-seq のデータの中で、抗 TCF4 抗体によって濃縮されるゲノム領域を検索したところ、4つの領域が存在した (図 5、赤丸)。TSS 上流 (-517~+100) に1領域、イントロン2に2領域、イントロン3に1領域が含まれていた。TCF4は High mobility group タンパク質の一員で DNA を屈曲させヒストン修飾を補助することにより RNA ポリメラーゼ II 結合の場を構築し転写を促進すると考えられている。そのため、転写促進活性をもつ TCF4 結合領域近傍には抗 RNA ポリメラーゼ II 抗体によって濃縮される領域 (青丸) がオーバーラップすると予想される。RNA ポリメラーゼ II (pol II) の結合領域 (図 5、青丸) とのオーバーラップを検討したところ、イントロン2の2領域はオーバーラップしていたが、イントロン3の領域はオーバーラップしていなかった。注目すべきは、イントロン2内の2領域は、エンハンサー領域に特徴的なヒストン H3K4 モノメチル化領

域とヒストン H3K27 アセチル化領域ともオーバーラップしていることである。

一方、TSS 近傍-517~+100 の領域はプロモーター領域に特徴的な pol II 結合、ヒストン H3K4 トリメチル化、ヒストン H3K27 アセチル化がみられるが、ヒストン H3K4 モノメチル化はみられなかった。これらの情報から、イントロン 2 の 2 領域が TCF4 を介した転写エンハンサーとして働くかどうかを検討した。

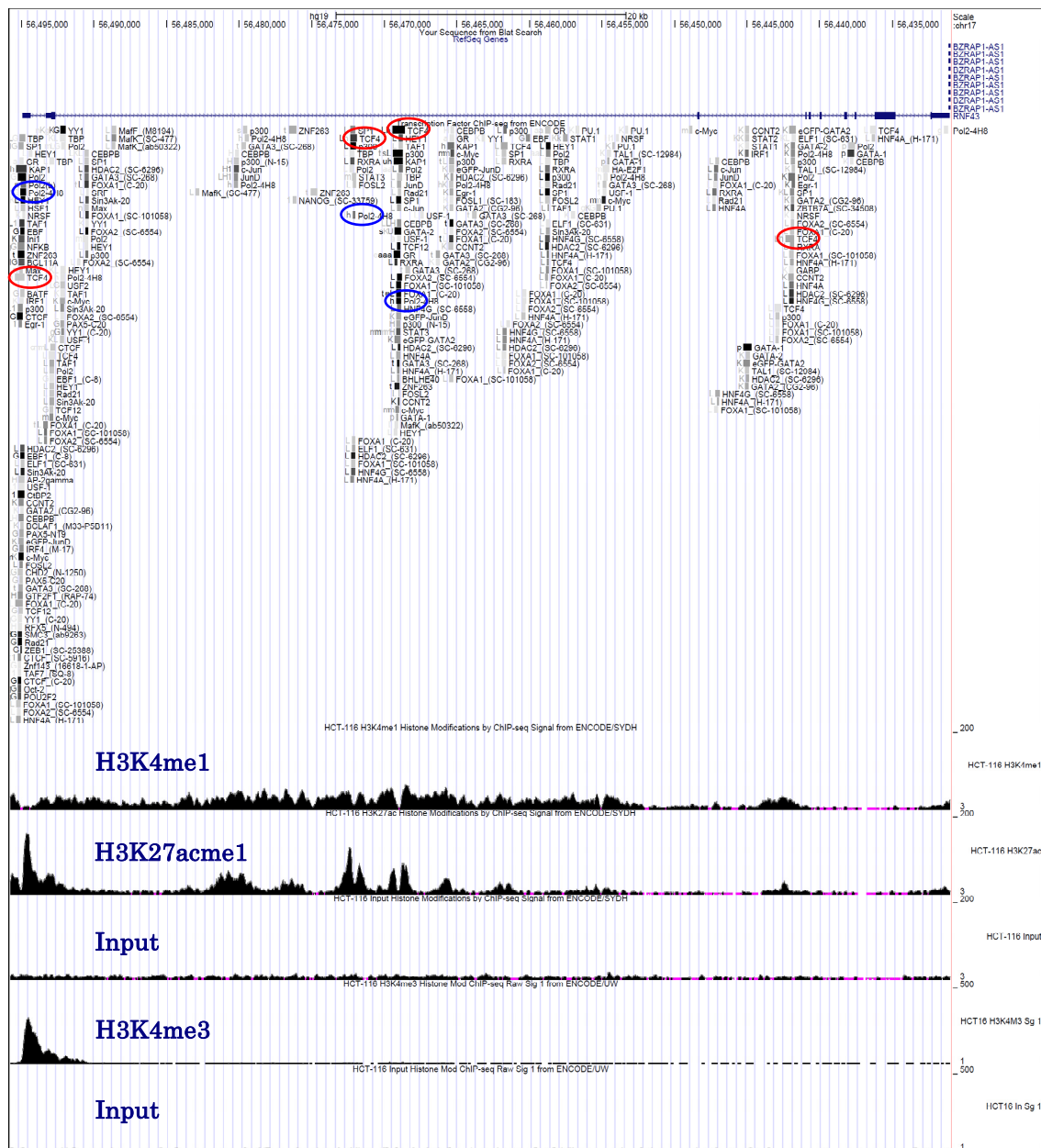


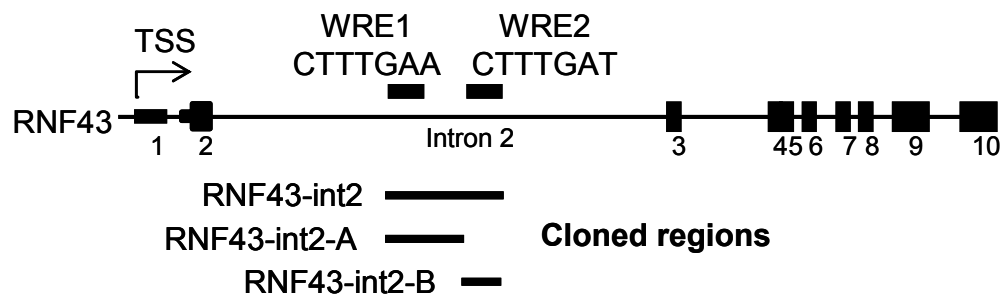
図 5. *RNF43* の転写因子結合推定部位とヒストン修飾

UCSC Genome Browser を用いて ChIP-seq の結果（表示トラック：Transcription Factor ChIP-seq from ENCODE、HCT116 H3K4me1 Histone Modifications by ChIP-seq Signal from ENCODE/SYDH、HCT116 H3K27Ac Histone Modifications by ChIP-seq Signal from ENCODE/SYDH、HCT116 Input Histone Modifications by ChIP-seq Signal from ENCODE/SYDH、HCT116 H3K4me3 Histone Modifications by ChIP-seq Signal from ENCODE/UW、HCT116 Input Histone Modifications by

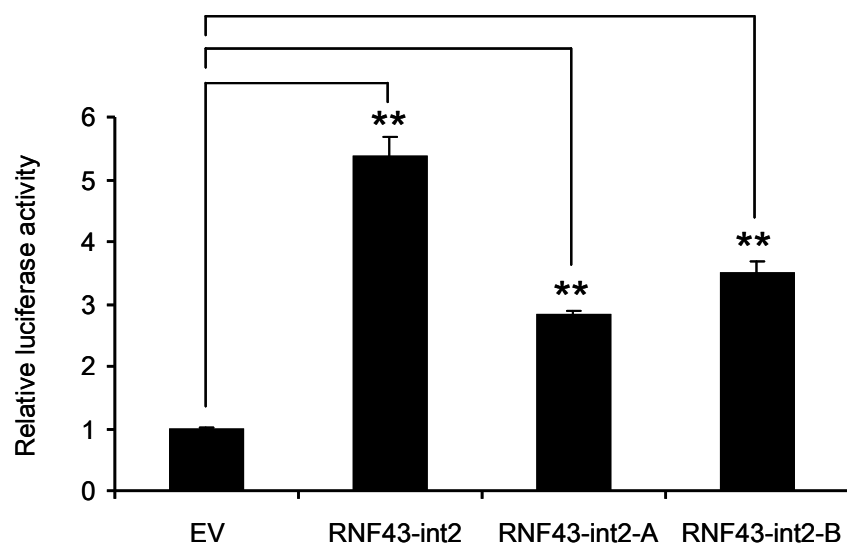
ChIP-seq Signal from ENCODE/UW) を表示させた。赤丸：TCF4 で濃縮された領域、青丸：RNA ポリメラーゼ II で濃縮された領域。

イントロン 2 の 2 つの抗 TCF4 抗体により濃縮されるゲノム領域を含む 4.2 kb (chr17: 56468435-56472609, GRCh37) を挿入したレポータープラスミド (RNF43-int2) を作製し (図 6A)、HCT116 においてレポーターアッセイを行った。その結果、コントロールプラスミド (EV: empty vector) と比して約 5 倍の活性増加が確認された (図 6B)。さらに、その活性は siCTNNB1 処理により有意に低下した (図 6C)。これらの結果は 4.2kb の領域が Wnt 依存性の転写活性化に関与することを強く示唆した。

A Genomic Structure



B



C

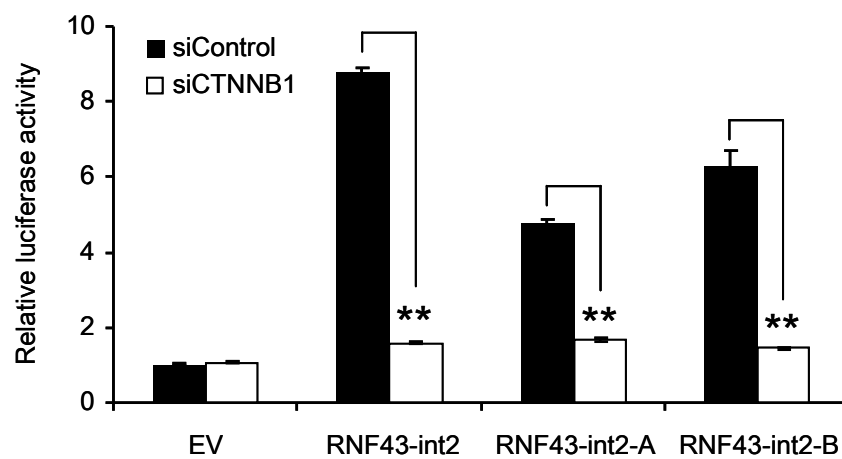


図 6. *RNF43* イントロン 2 領域を用いたレポーターアッセイ

A) ENCODE データより Tcf4 で濃縮された領域を模式的に示した。pGL-Promoter ベクターに挿入した領域を太線で示した。WRE : Wnt-responsive element。B) イン トロン 2 領域を挿入したレポータープラスミド (RNF43-int2, RNF43-int2-A, and RNF43-int2-B) のエンハンサー活性。試験は 3 重測定で行い、平均±標準偏差を示した。有意差判定は Dunnett's test を用いた (** ; $P < 0.01$)。C) β -catenin のノック ダウンによるエンハンサー活性の変化 (** ; $P < 0.01$, Student's t-test)。EV : empty vector。

TCF4 濃縮領域内に TCF/LEF 結合モチーフ (CTTTGWW) 配列を探索した ところ、2 つの推定上の TCF/LEF 結合エレメント (5'-CTTTGAA-3' と 5'-CTTTGAT-3') が存在し、それぞれを Wnt-responsive element 1 および 2 (WRE1、WRE2) と命名した (図 6A)。いずれのエレメントが *RNF43* の転 写活性化に重要かを確かめるために、WRE1 と WRE2 をそれぞれ含むレポー タープラスミド (RNF43-int2-A、RNF43-int2-B) を作製し、レポーターアッ セイを行った。RNF43-int2-A、RNF43-int2-B とともに、RNF43-int2 と比べて 低い (57%、65%) もの、コントロールプラスミドに比べ、有意に高いレポ ーター活性を認めた (図 6B)。また β -catenin のノックダウンにより、それぞ れのレポーター活性は有意に抑制された (図 6C)。さらにこれらの TCF/LEF 結合エレメントの重要性を確認するために、RNF43-int2 内の WRE1 (CTTTGAA)、WRE2 (CTTTGAT) を CTTTGGC に改変したプラスミド (RNF43-int2-mut1、RNF43-int2-mut2) を作製し (図 7A)、RNF43-int2 (野生型) とレポーター活性を比較した。その結果、WRE1、WRE2 いずれの 改変プラスミドにおいてもレポーター活性の減少が見られた

(RNF43-int2-mut1 ; 34%減少、RNF43-int2-mut2 ; 14%減少) (図 7B)。これらの結果は SW480 株を用いた場合でも、同様に認められた (図 7C)。また、2 つの WRE (WRE1、WRE2) 両方を改変したプラスミドを用いたところ、HCT116 では 36%、SW480 では 71%の活性の減少がみられた。これらの結果は、少なくとも WRE1、WRE2 の両方が β -catenin/TCF 依存的な *RNF43* 転写活性化に重要な役割を果たしていることを意味している。

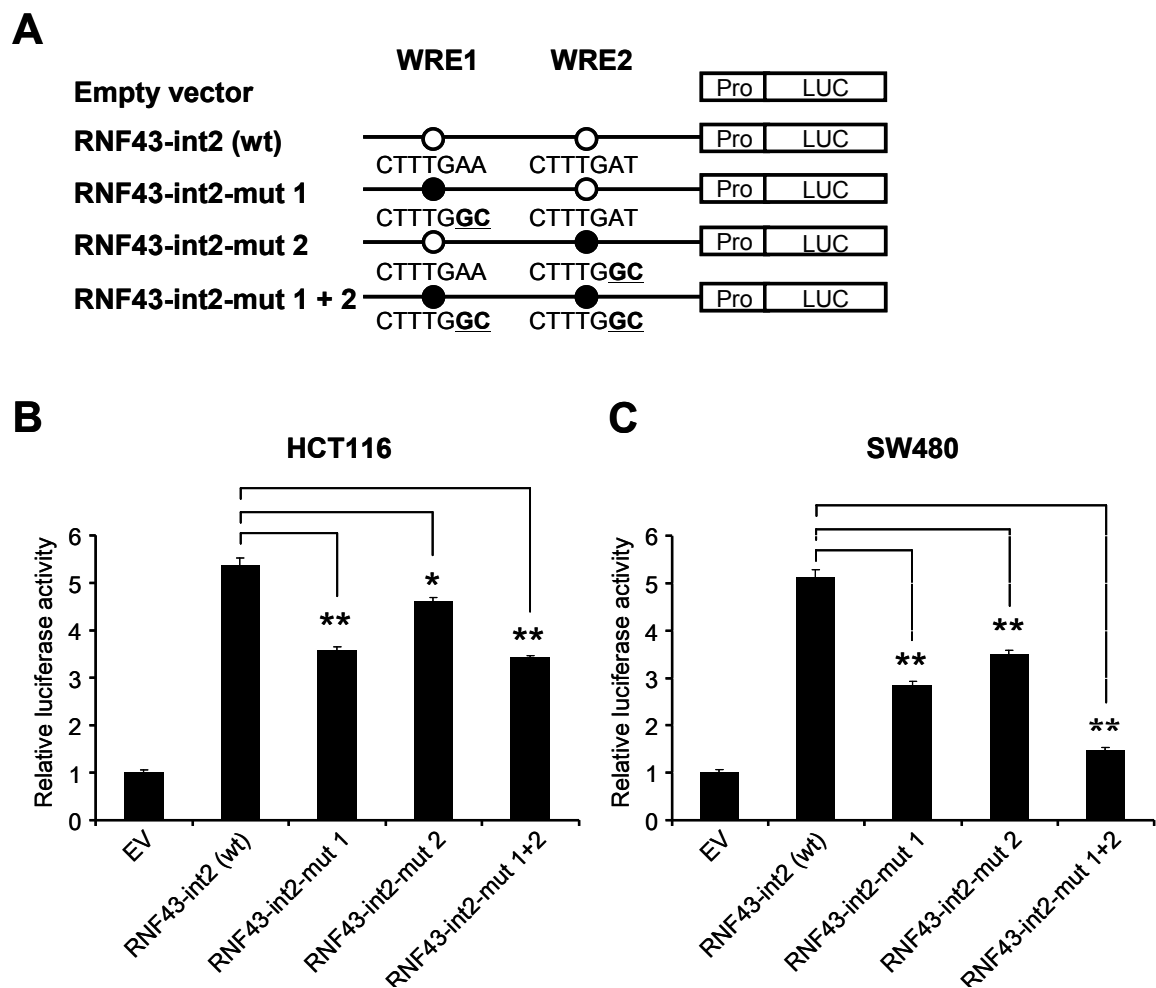


図 7. イントロン 2 内の WRE のエンハンサー活性

A) イントロン 2 内の WRE を含む野生型(RNF43-int2)、変異型(RNF43-int2-mut1、RNF43-int2-mut2、and RNF43-int2-mut1+2) レポータープラスミドの模式図。B、C) 野生型あるいは変異型レポータープラスミドのレポーター活性 (B) HCT116 あるいは (C) SW480 に導入し、3 回測定を行った。平均値±標準偏差を示した。有意差検定には Dunnett's test を用いた (*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$)。EV: empty vector。

第 4 項 WRE1 及び WRE2 の TCF4/ β -catenin 複合体との結合

TCF4 と β -catenin が WRE1 及び WRE2 に結合しているかどうかを確かめるために、HCT116 において抗 TCF4 抗体あるいは抗 β -catenin 抗体を用いた ChIP アッセイを行った。抗 TCF4 抗体を用いた免疫沈降と定量 PCR により、WRE1 と WRE2 を含む各領域においてそれぞれ 7.3 倍と 28.1 倍の濃縮が確認された (図 8A)。コントロールとして用いた TCF4/ β -catenin 複合体の直接の標的とされる c-Myc の 3'領域の WRE においても 13.6 倍の濃縮であった。抗 TCF4 抗体を用いた結果に一致して、抗 β -catenin 抗体を用いた場合でも、同様に WRE1 と WRE2 の濃縮が確認された (図 8C)。また SW480 においても、HCT116 より濃縮率は低いものの、同様の結果が認められた (図 8B、6D)。これらの結果は TCF4/ β -catenin 複合体が *RNF43* のイントロン 2 にある WRE1 及び WRE2 と結合していることを示している。

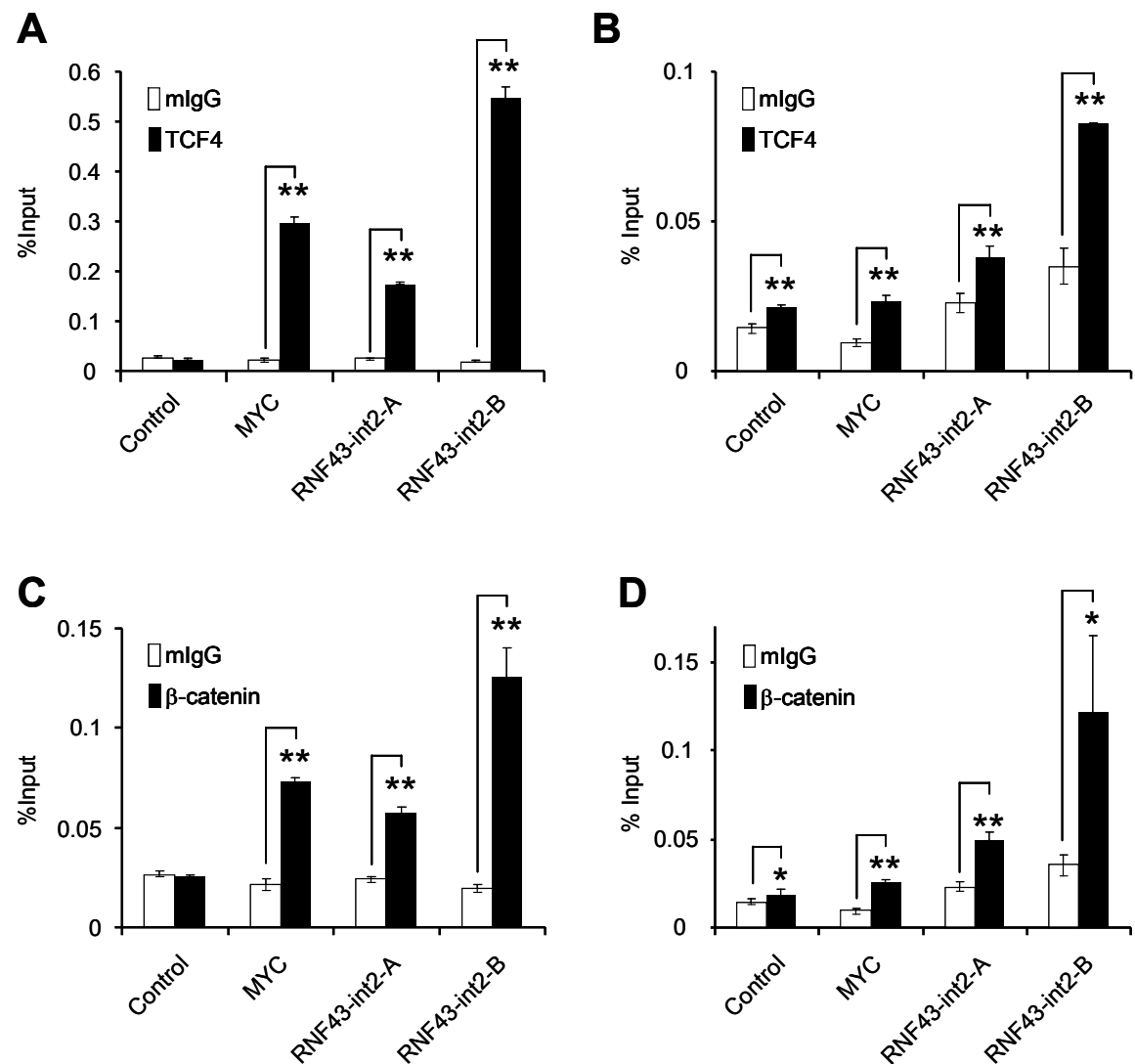


図 8. WRE1、WRE2 を含む領域と TCF4/β-catenin 複合体との結合

A、B) HCT116 (A) または SW480 (B) における抗 TCF4 抗体を用いた ChIP アッセイ。抗 TCF4 抗体により濃縮された DNA (TCF4: 黒い Box) を、非免疫マウス IgG 処理サンプル (mIgG: 白い Box) と比較した (平均値±標準偏差)。C、D) HCT116 (C) または SW480 (D) における抗β-catenin 抗体を用いた ChIP アッセイ (β-catenin: 白い Box、mIgG: 黒い Box)。有意差検定は Student's t-test により行った (*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$)。Control: RNF43 TSS 上流約 5 kb 領域、MYC: c-Myc 3'エンハンサー領域。

第2節 RNF43 の機能解析

第1項 *RNF43* 高発現細胞株の検索

RNF43 は、Wnt レセプターに対するネガティブ・フィードバック機構が報告されていますが、いくつかの核タンパク質との結合も報告されており、単一の機能のみではないことが予想された。そこで、大腸癌における RNF43 の機能を俯瞰的に理解するために、網羅的遺伝子発現解析を行うこととした。まず最初に、RNF43 ノックダウンによる遺伝子発現変化を解析するために、RNF43 高発現株の選択を行った。大腸癌細胞株 17 株 (LoVo、SNU-C5、DLD-1、LS174T、NCI-H747、SW480、SW948、WiDr、HCT15、HT29、SNU-C2A、SNU-C4、HCT116、NCI-H498、NCI-H684、CaCo2、RKO) より total RNA を抽出して定量 RT-PCR 法を行い、*RNF43* mRNA 量を測定した。定量 PCR による comparative Ct method (User Bulletin #2: ABI PRISM7700 Sequence Detection System (2001) Applied Biosystems) を用いて発現量を比較した。その結果、SNU-C4、NCI-H498、WiDr で特に発現が高いことがわかった (図 9)。

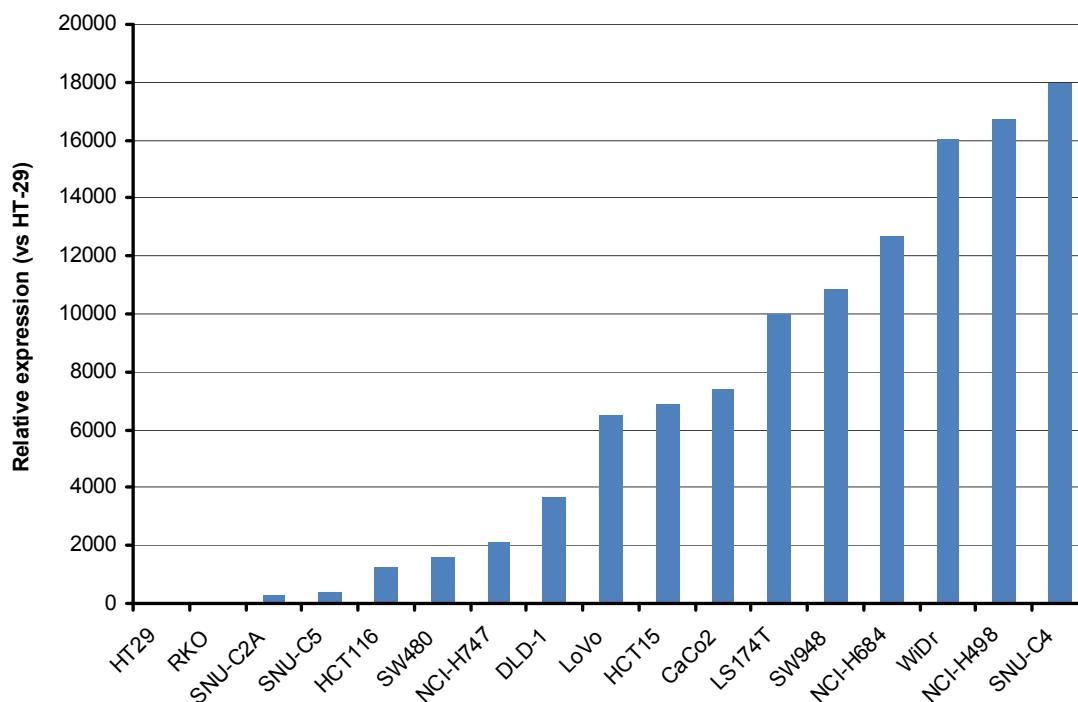


図 9. 大腸癌細胞株における *RNF43* 遺伝子発現量の比較

第 2 項 *RNF43* 遺伝子変異の検索

上記の *RNF43* 高発現株 3 株 (SNU-C4、NCI-H498、WiDr) について、*RNF43* 遺伝子変異の有無をダイレクトシーケンシング法により解析した。SNU-C4 では欠損変異 (c.673delC、heterozygous) が確認された。一方、NCI-H498 及び WiDr からは Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) は検出されたが、遺伝子変異は確認されなかった (表 8)。NCI-H498 に関しては盲腸癌の腹腔転移層由来の粘液性癌という特殊な細胞株であることから、以降の実験には WiDr を用いることとした。

表 8. 大腸癌株における *RNF43* 遺伝子ダイレクトシーケンシング結果

Cell Line	AA mutation	CDS mutation	Zygosity	rs#	MAF/Minor Allele Count
WiDr	p. I47V	c. 139 A>G	Homozygous	rs3744093	C = 0.392/857
	p. R117H	c. 350 G>A	Heterozygous	rs2257205	T = 0.193/422
	p. P231L	c. 692 C>T	Heterozygous	rs2680701	A = 0.104/227
NCI-H498	p. P231L	c. 692 C>T	Homozygous	rs2680701	A = 0.104/227
SNU-C4	p. I47V	c. 139 A>G	Homozygous	rs3744093	C = 0.392/857
	p. 225fs*193	c. 673delC	Heterozygous	-	-
	p. L418M	c. 1252 C>A	Heterozygous	rs2526374	T = 0.397/868

第3項 *RNF43* siRNA の選択

Thermo 社から 4 種類の配列の *RNF43* に対する siRNA (siRNF43#9、siRNF43#10、siRNF43#11、siRNF43#12) を購入し、WiDr に導入した。48 時間処理後 total RNA を抽出し、定量 RT-PCR により *RNF43* の発現抑制を確認した。その結果、siRNF43#9、siRNF43#10、siRNF43#11、siRNF43#12 で処理した細胞での相対的発現量は、siControl 処理細胞に対し、それぞれ 79%、36%、28%、22%であった (図 10)。よって、以降の実験には、siRNF43#10、siRNF43#11 及び siRNF43#12 を用いた。

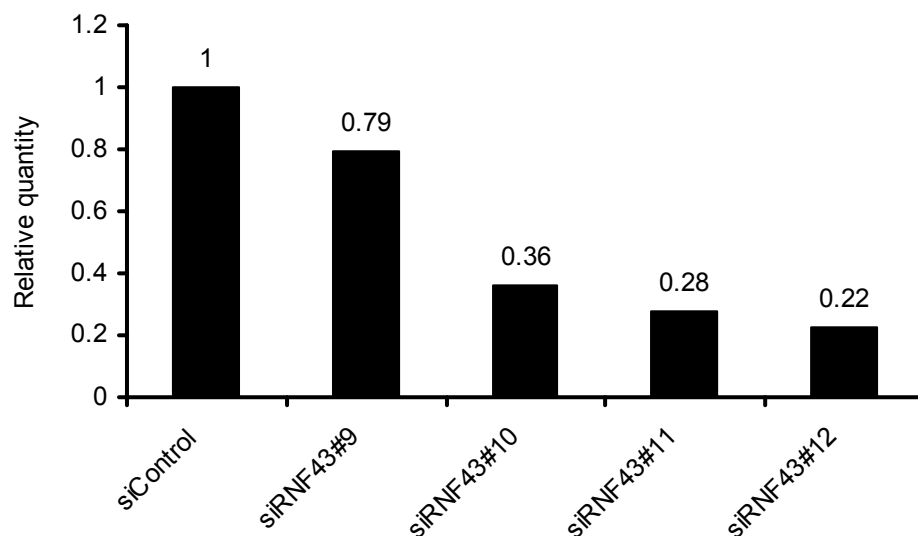


図 10. *RNF43* siRNA のノックダウン効果の比較

第 4 項 RNF43 ノックダウンによる遺伝子発現のマイクロアレイ解析

WiDr を異なる 3 種の *RNF43* siRNA (siRNF43#10、siRNF43#11、siRNF43#12) でそれぞれ処理し、遺伝子発現の変化を、マイクロアレイを用いて解析した。その結果、siControl 処理に比べて、siRNF43#10、siRNF43#11、siRNF43#12 処理により発現が 1.5 倍以上増加・減少した遺伝子の数は、それぞれ 333 遺伝子 (408 エンティティ：エンティティは DNA マイクロアレイにおける 1 分子を指す。プローブ数に相当。)、325 遺伝子 (416 エンティティ)、1305 遺伝子 (1643 エンティティ) であった。3 種類の siRNA のうち少なくとも 2 種の siRNA 処理細胞によって、1.5 倍以上の変動が確認された遺伝子群 262 遺伝子 (393 エンティティ) を抽出し (siRNF43 遺伝子セット)、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) の molecular signature database (MSigDB)

と比較した。オーバーラップの多い遺伝子セット上位 100 個 ($q\text{-value} \leq 6.98 \times 10^{-5}$) を抽出し、それらの遺伝子セットをキーワードで分類したところ、「癌」が 16 セットと最も多く、次いで「上皮間葉転換 (EMT) / 転移」が 12 セットと第 2 位であった (図 11)。

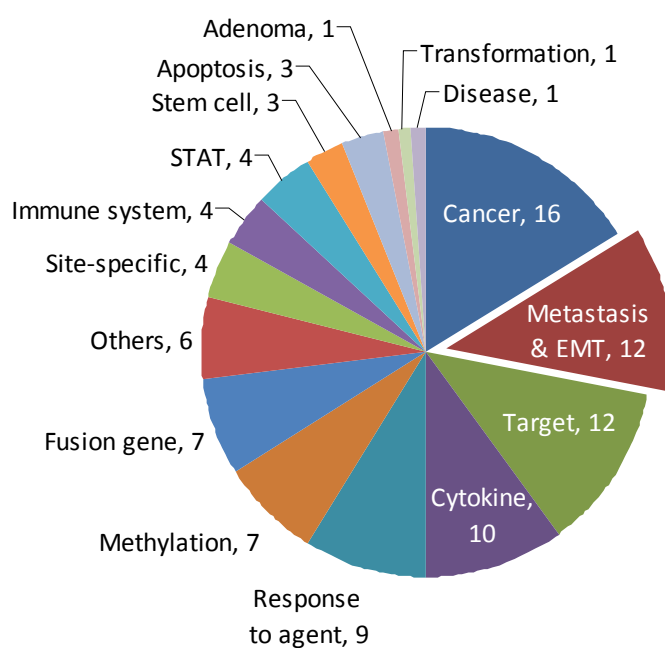



図 11. siRNF43 により発現変動する遺伝子セットのカテゴリー

siRNF43 遺伝子セット (262 遺伝子) を Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) の Molecular Signature Database (MSigDB) と比較し、オーバーラップする上位 100 遺伝子セットのカテゴリーを示した。

同じく siRNF43 遺伝子セット 262 遺伝子を database for annotation, visualization, and integrated discovery (DAVID ; DAVID Bioinformatics

Resources 6.7, NIAID/NIH) (42, 43) を用いて Functional Annotation Clustering (GO_TERM_BP_FAT) を行ったところ、細胞移動に関する Term (localization of cell, cell motility, cell migration, cell motion) が最上位クラスターとして選出された (Enrichment Score: 1.28) (図 12)。



BIOINFORMATICS
 DATABASE

DAVID Bioinformatics Resources 6.7
 National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH

Functional Annotation Clustering

[Help and Manual](#)

Current Gene List: List_1
 Current Background: Homo sapiens
 2568 DAVID IDs

Options
 Classification Stringency
 Medium

Rerun using options
 Create Sublist

44 Cluster(s)
 [Download File](#)

Annotation Cluster	Enrichment Score		Count	P_Value	Benjamini
Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 1.28				
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	localization of cell	RT	9	4.0E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	cell motility	RT	9	4.0E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	cell migration	RT	8	6.0E-2	9.9E-1
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	cell motion	RT	11	7.7E-2	9.9E-1
Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 1.24				
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	odontogenesis	RT	4	3.0E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	sensory perception of sound	RT	5	3.4E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	sensory perception of mechanical stimulus	RT	5	4.1E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	ossification	RT	5	5.7E-2	9.9E-1
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	bone development	RT	5	6.9E-2	9.9E-1
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	skeletal system development	RT	7	2.1E-1	9.8E-1
Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 1.04				
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	ion transport	RT	18	1.7E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	cation transport	RT	12	8.9E-2	9.9E-1
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	monovalent inorganic cation transport	RT	7	2.1E-1	9.8E-1
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	metal ion transport	RT	9	2.3E-1	9.8E-1
Annotation Cluster 4	Enrichment Score: 0.87				
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	mesenchymal cell differentiation	RT	3	1.3E-1	9.8E-1
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	mesenchymal cell development	RT	3	1.3E-1	9.8E-1
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	mesenchyme development	RT	3	1.4E-1	9.8E-1
Annotation Cluster 5	Enrichment Score: 0.86				
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	skin development	RT	3	5.1E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	epidermis development	RT	6	8.2E-2	9.9E-1
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	ectoderm development	RT	6	1.1E-1	9.8E-1
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_FAT	response to abiotic stimulus	RT	4	8.5E-1	1.0E0

図 12. RNF43 ノックダウンにより変動する遺伝子の Annotation Cluster

Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) を用い

て siRNF43 遺伝子セット (262 遺伝子) を Functional Annotation Clustering を行った。上位 5 クラスターを示した。

さらに Gene Expression Omnibus (GEO) データベースより大腸癌臨床検体を用いた遺伝子発現マイクロアレイデータ (GSE4183、GSE20916、GSE23878) を取得し、GeneSpring 上で *RNF43* 遺伝子発現と相関のある遺伝子セット (臨床検体遺伝子セット)、GSE4183 より 9276 エンティティ (負の相関 : 3859 エンティティ、正の相関 : 5417 エンティティ)、GSE20916 より 6875 エンティティ (負の相関 : 2473 エンティティ、正の相関 : 4402 エンティティ)、GSE23878 より 9798 エンティティ (負の相関 : 4438 エンティティ、正の相関 : 5360 エンティティ) を抽出した (ピアソン相関係数 r ; $-1.0 \leq r \leq -0.4$ あるいは $0.4 \leq r \leq 1.0$)。それぞれの臨床検体遺伝子セットから抽出された負の相関遺伝子セット及び siRNF43 遺伝子セットの関係をベン図で示した (図 13)。全てのエンティティにおいて共通する 30 遺伝子 (30 エンティティ) を得た。

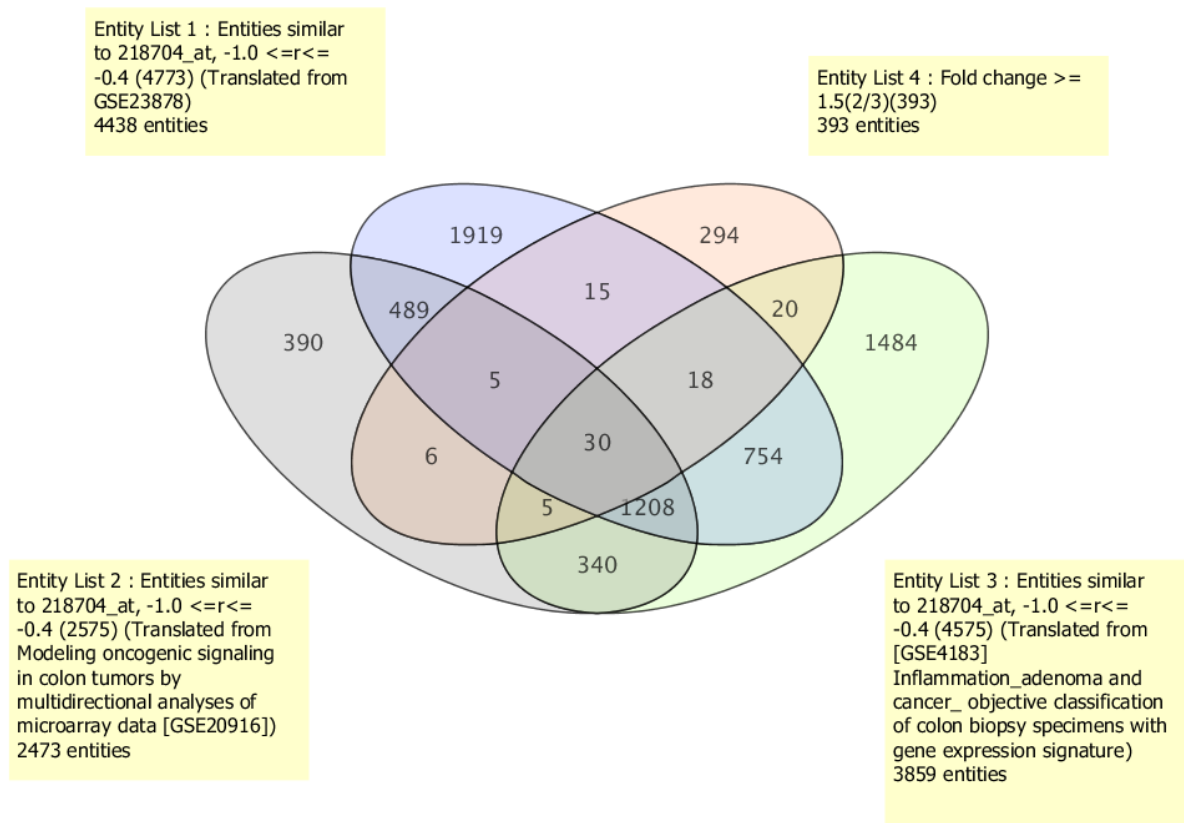


図 13. ベン図 (*RNF43* と負に相関する遺伝子)

同様にそれぞれの臨床検体遺伝子セットから抽出された正の相関遺伝子セット及び si*RNF43* 遺伝子セットの関係をベン図で示した (図 14)。共通する 10 遺伝子 (10 エンティティ) を得た。

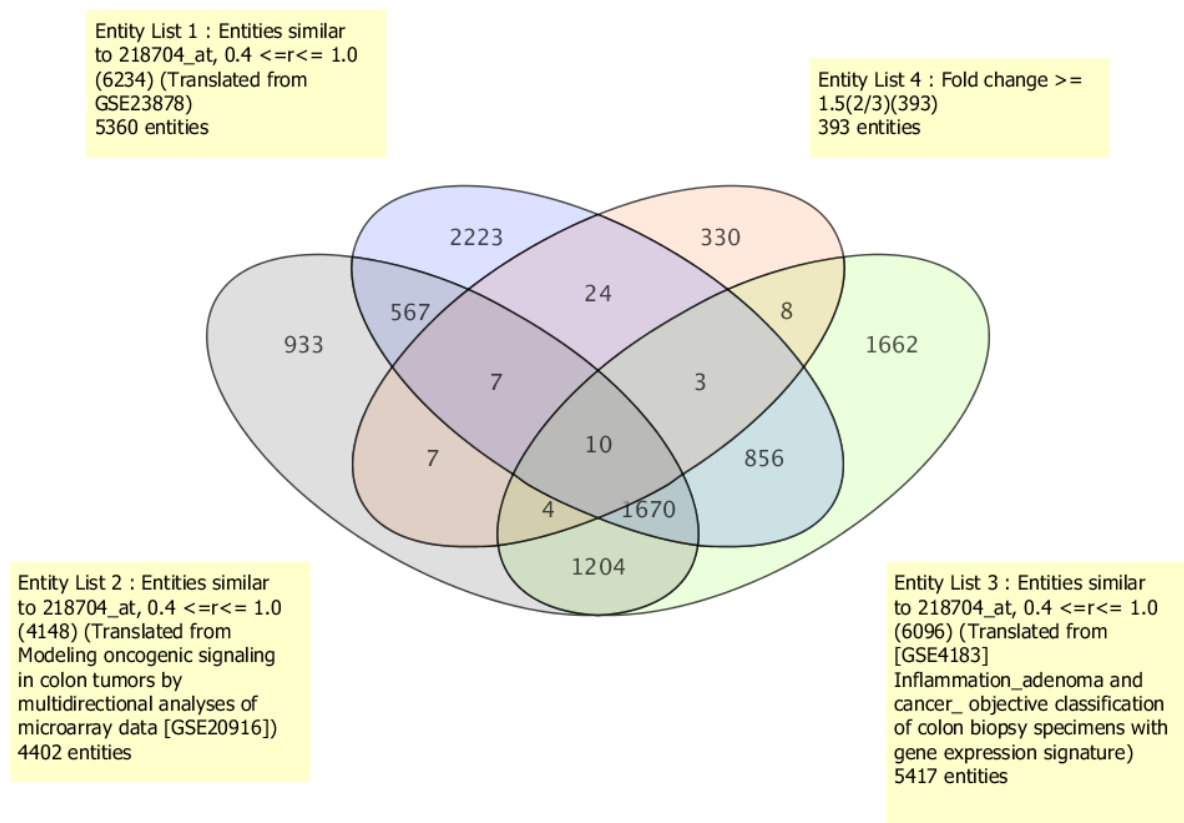


図 14. ベン図 (*RNF43* と正に相関する遺伝子)

得られた遺伝子セットから、変動方向に矛盾のある遺伝子を除外し(図 15)、最終的にsiRNF43により発現亢進した(*RNF43*と発現が負の相関を示す)遺伝子 15 個(表 9)と、siRNF43により発現抑制された(*RNF43*と発現が正の相関を示す)遺伝子 2 個(表 10)を得た。興味深いことに、*RNF43*と発現が負の相関を示す遺伝子にはE-cadherinの発現抑制因子であるZEB2 (44)が含まれていた。以上の結果は、RNF43の発現がEMTに関連することを示唆していた。

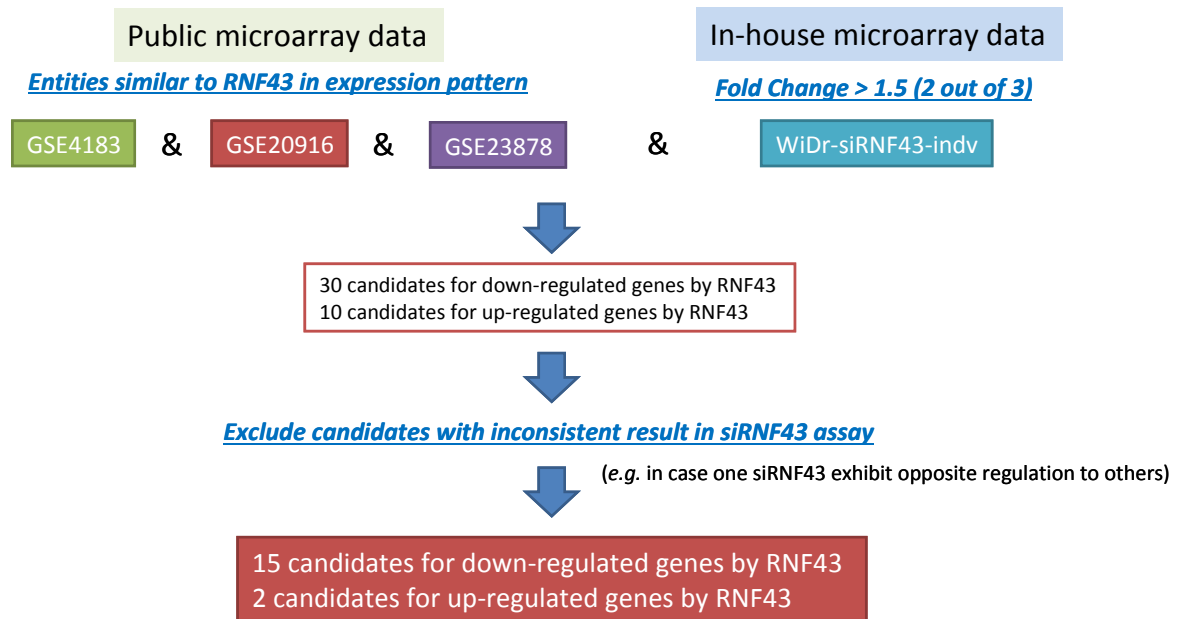


図 15. 遺伝子発現マイクロアレイデータ解析手順

表 9. RNF43 により発現が抑制されると予測される遺伝子

Gene Symbol	Correlation coefficient (vs RNF43)				Fold change (vs siCtrl)			Gene Title
	GSE4183	GSE20916	GSE23878	siRNF43	#10	#11	#12	
ZEB2	-0.80	-0.63	-0.75	-0.92	1.85	1.71	1.71	zinc finger E-box binding homeobox 2
C14orf132	-0.76	-0.56	-0.67	-0.92	1.75	3.69	3.24	chromosome 14 open reading frame 132
NOVA1	-0.53	-0.52	-0.76	-0.94	1.44	1.60	2.09	neuro-oncological ventral antigen 1
FLVCR2	-0.72	-0.70	-0.48	-0.85	1.78	1.37	2.17	feline leukemia virus subgroup C cellular receptor family, member 2
PCDH7	-0.59	-0.58	-0.70	-0.85	1.94	1.51	2.96	protocadherin 7
MAPK10	-0.51	-0.54	-0.79	-0.87	1.65	1.58	3.05	mitogen-activated protein kinase 10
SCIN	-0.41	-0.65	-0.67	-0.96	1.38	1.52	1.51	scinderin
SGCE	-0.67	-0.53	-0.84	-0.62	1.55	1.01	2.42	sarcoglycan, epsilon
FNBP1	-0.70	-0.51	-0.56	-0.83	1.57	1.73	1.41	formin binding protein 1
PRICKLE2	-0.61	-0.42	-0.65	-0.93	1.95	3.04	4.65	prickle homolog 2 (Drosophila)
ZFPM2	-0.58	-0.43	-0.67	-0.87	1.80	1.54	1.61	zinc finger protein, multitype 2
CLU	-0.61	-0.41	-0.74	-0.75	1.73	1.19	2.42	clusterin
CSRNP3	-0.44	-0.44	-0.64	-0.80	1.10	1.54	2.12	cysteine-serine-rich nuclear protein 3
SEPP1	-0.42	-0.68	-0.53	-0.65	1.89	1.11	5.23	selenoprotein P, plasma, 1
SECTM1	-0.63	-0.54	-0.44	-0.66	1.80	1.09	2.81	secreted and transmembrane 1

-1 0

表 10. RNF43 によって発現が亢進すると予測される遺伝子

Gene Symbol	Correlation coefficient (vs RNF43)				Fold change (vs siCtrl)			Gene Title
	GSE4183	GSE20916	GSE23878	siRNF43	#10	#11	#12	
SNTB1	0.65	0.82	0.55	0.74	1.60	-1.17	-1.57	syntrophin, beta 1
VEGFA	0.44	0.42	0.50	0.69	-1.62	-1.20	-3.83	vascular endothelial growth factor A

0 1

第5項 RNF43 と発現が相関する遺伝子群

臨床検体遺伝子セットと siRNF43 遺伝子セットで共通する 17 遺伝子のうち、*RNF43* と負の相関を示す 15 遺伝子のそれぞれの発現データとの相関を図 16～19 に示した。負の相関を示す遺伝子のうち *ZEB2* の発現と *RNF43* の発現との相関は、大腸癌マイクロアレイデータ GSE4183、GSE20916、GSE23878 で、相関係数がそれぞれ -0.80、-0.63、-0.75 を示し、また WiDr 細胞での相関係数は -0.92 であった。正の相関を示す遺伝子のうち *SNTB1* の発現と *RNF43* の発現との相関は、大腸癌マイクロアレイデータ GSE4183、GSE20916、GSE23878 で、相関係数がそれぞれ 0.65、0.82、0.55 を示し、また WiDr 細胞での相関係数は 0.74 であった。これらの 17 遺伝子の中で、*ZEB2* と *RNF43* との相関が臨床検体でも WiDr 細胞でも高いこと、*ZEB2* が E-cadherin の発現に関与すること (44)、パスウェイ解析で *RNF43* の発現が EMT や細胞運動に関与することから、*ZEB2* に絞って解析をすることにした。

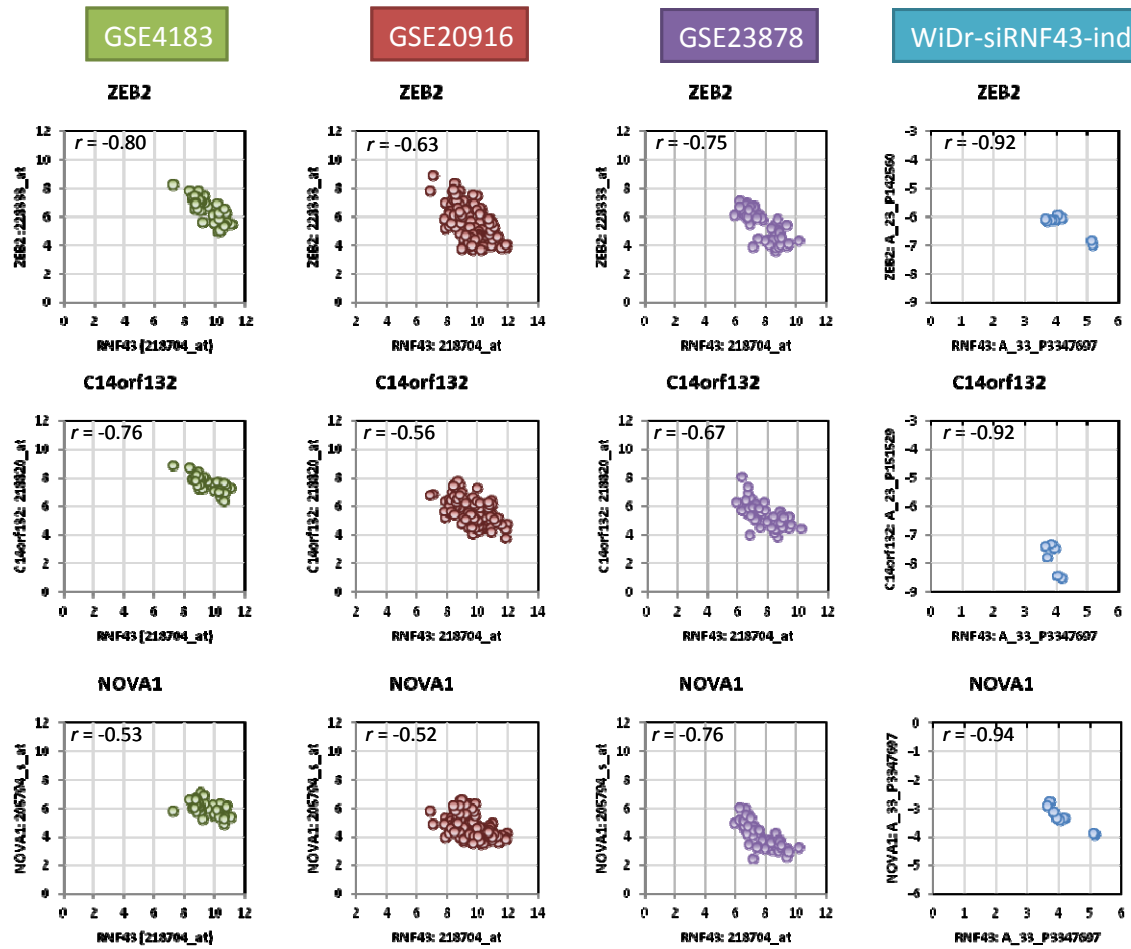


図 16. 発現抑制候補遺伝子と *RNF43* の発現量の相関 (1/6)

RNF43 遺伝子の発現量を横軸に、各発現抑制候補遺伝子 (*ZEB2*, *C14orf132*, *NOVA1*) の発現量を縦軸にプロットした。 r : ピアソン相関係数。

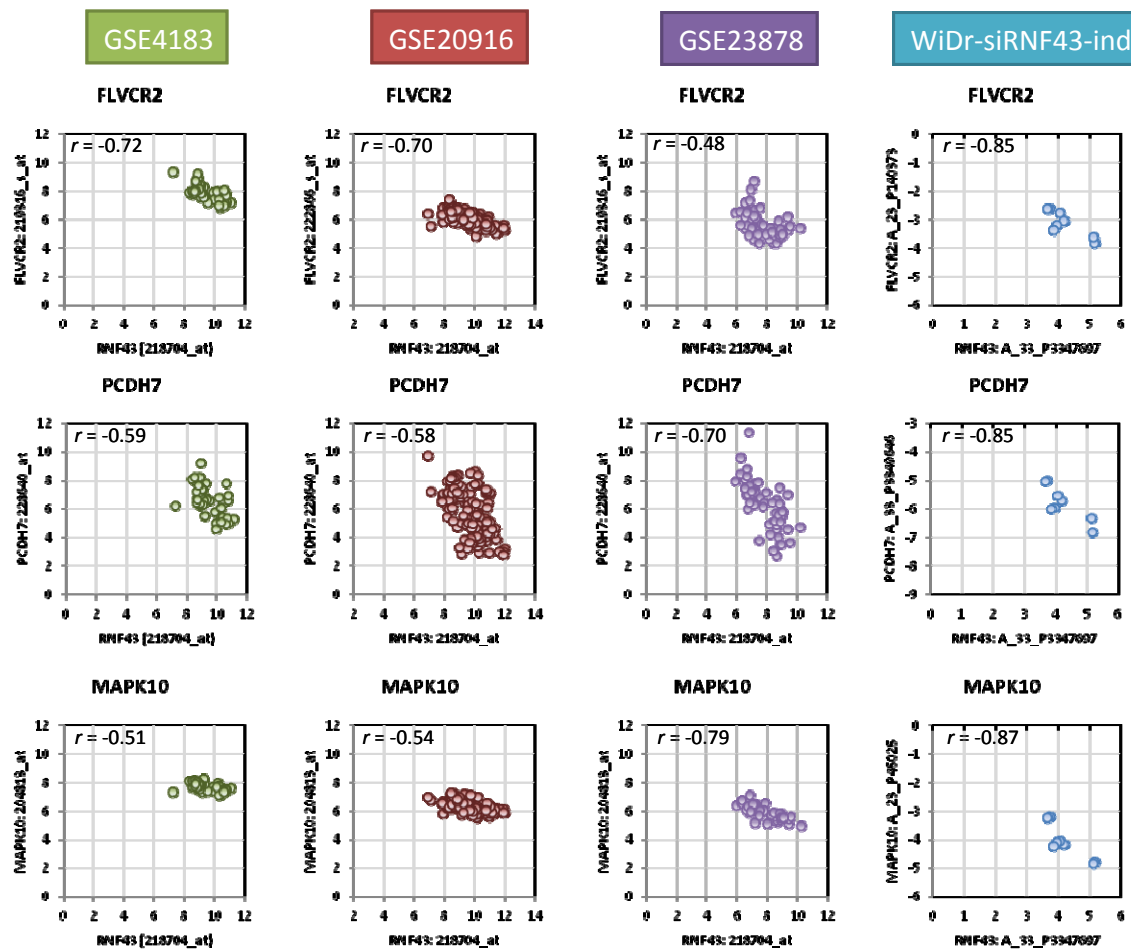


図 17. 発現抑制候補遺伝子と *RNF43* の発現量の相関 (2/6)

RNF43 遺伝子の発現量を横軸に、各発現抑制候補遺伝子 (*FLVCR2*、*PCDH7*、*MAPK10*) の発現量を縦軸にプロットした。 r : ピアソン相関係数。

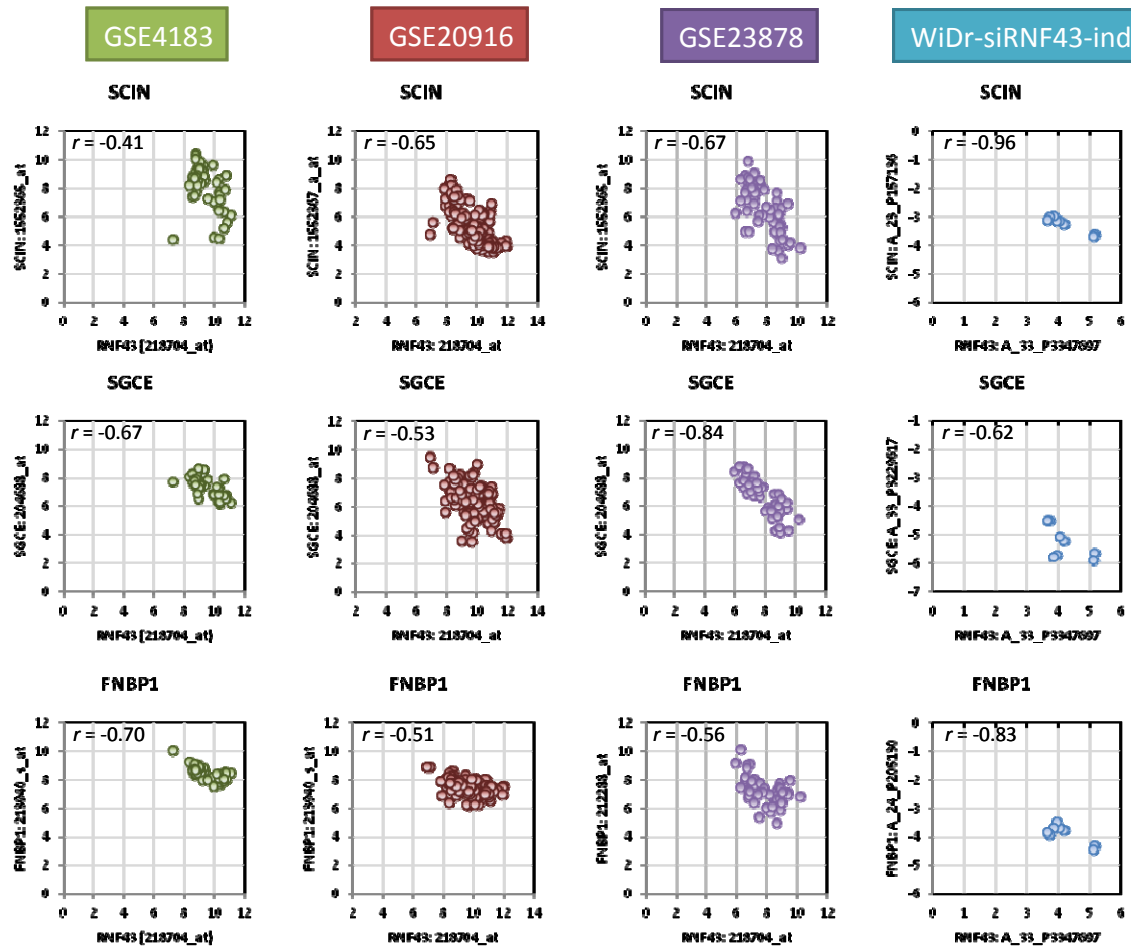


図 18. 発現抑制候補遺伝子と *RNF43* の発現量の相関 (3/6)

RNF43 遺伝子の発現量を横軸に、各発現抑制候補遺伝子 (*SCIN*、*SGCE*、*FNBP1*) の発現量を縦軸にプロットした。 r : ピアソン相関係数。

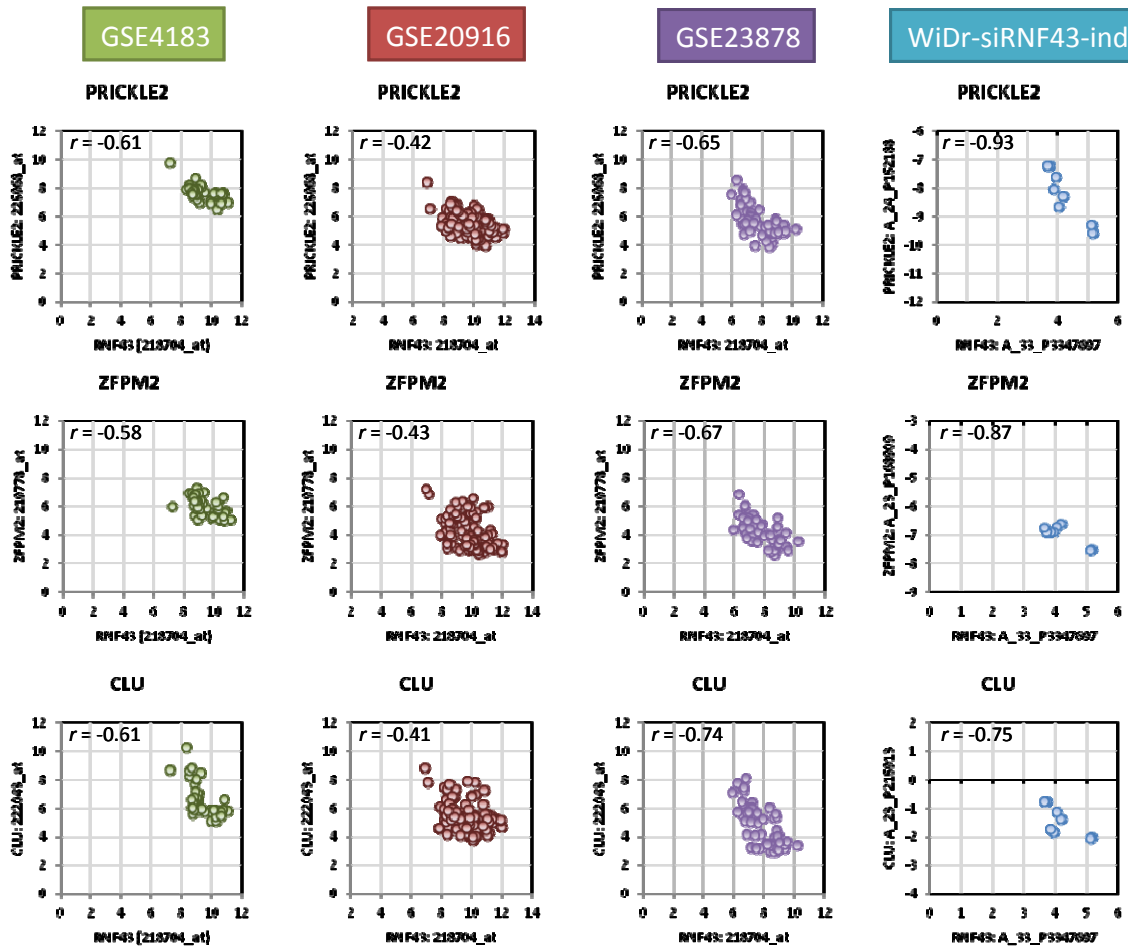


図 19. 発現抑制候補遺伝子と *RNF43* の発現量の相関 (4/6)

RNF43 遺伝子の発現量を横軸に、各発現抑制候補遺伝子 (*PRICKLE2*、*ZFPM2*、*CLU*) の発現量を縦軸にプロットした。 r : ピアソン相関係数。

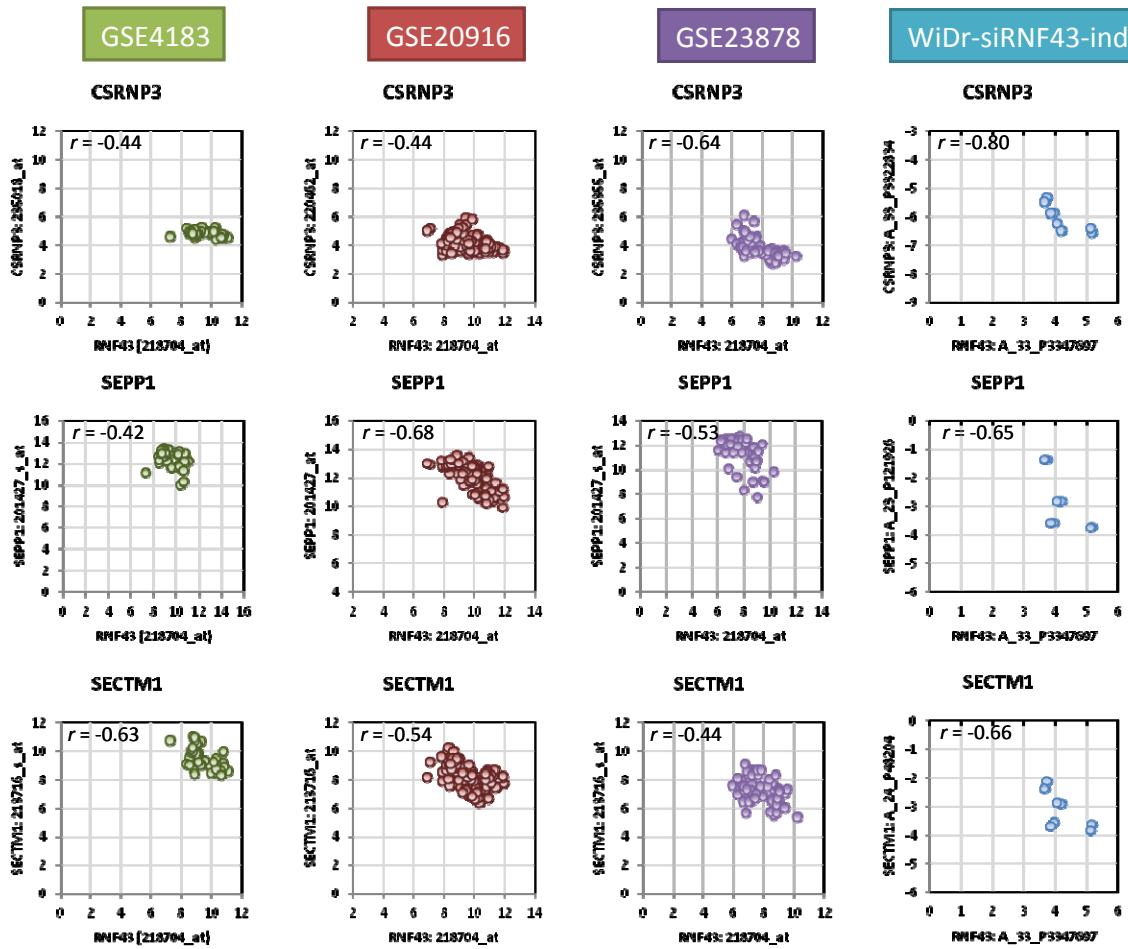


図 20. 発現抑制候補遺伝子と *RNF43* の発現量の相関 (5/6)

RNF43 遺伝子の発現量を横軸に、各発現抑制候補遺伝子 (*CSRNP3*、*SEPP1*、*SECTM1*) の発現量を縦軸にプロットした。 r : ピアソン相関係数。

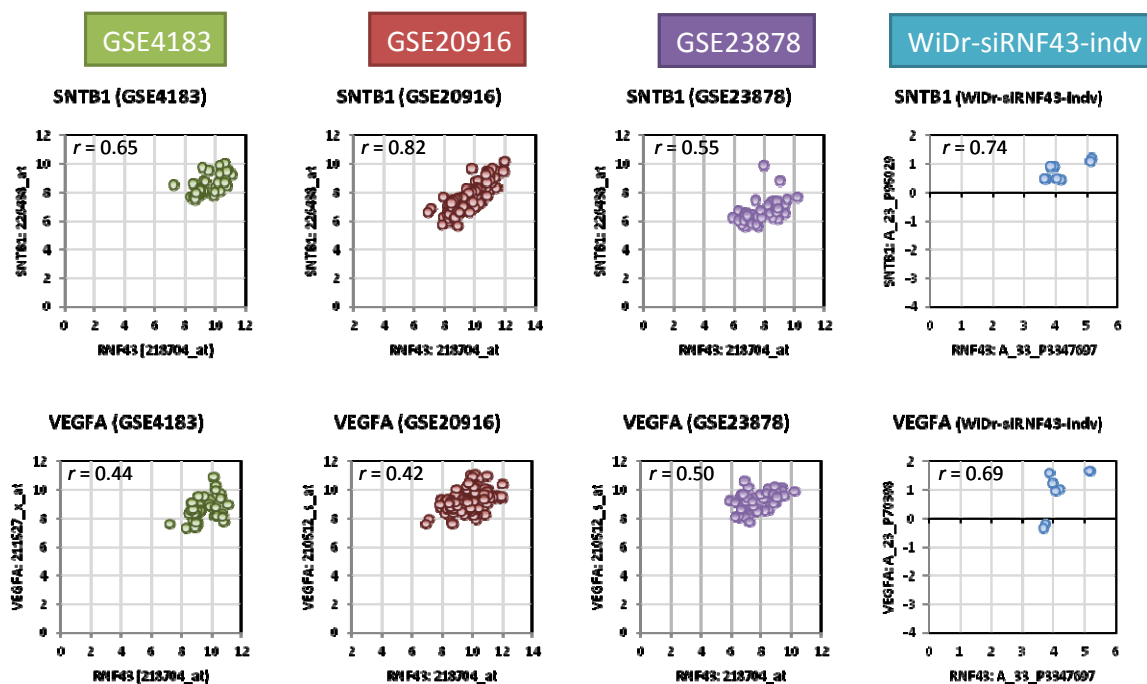


図 21. 発現亢進候補遺伝子と *RNF43* の発現量の相関 (6/6)

RNF43 遺伝子の発現量を横軸に、各発現亢進候補遺伝子 (*SNTB1*、*VEGFA*) の発現量を縦軸にプロットした。 r : ピアソン相関係数。

第 6 項 テトラサイクリン誘導型 shRNA 発現細胞株の作製

siRNF43 処理 WiDr 細胞の遺伝子発現マイクロアレイの結果から、*RNF43* と EMT との関係が示唆された。しかし、マイクロアレイデータからは、顕著な EMT マーカーの変動は見られなかった。このことは siRNA の処理期間が 2 日間であり、半減期の長い細胞骨格タンパク質の変動には不十分であることが原因と考えられた。siRNA の半減期は 3 日程度であるため、長期の発現抑制を維持するためには、複数回の siRNA の導入が必要となるが、細胞膜を高分子である核酸が透過する遺伝子導入は細胞にとって大きな負担であり、複数回のリポフェクションによる細胞毒性は免れないと思われた。また、遺伝子導入操

作自体によるストレスが遺伝子発現に影響を与える可能性があるため、長期の RNF43 発現抑制を実現するためにテトラサイクリン誘導型 shRNA 発現細胞株を用いることとした。2 種類のテトラサイクリン誘導型 shRNF43 カセットを持つレンチウイルスあるいは既知の哺乳動物遺伝子と相同でない配列を持つコントロール shRNA カセットを持つレンチウイルスを作製し、それぞれ WiDr 細胞及び SW480 細胞に感染させた。感染細胞をピューロマイシンで選択し、テトラサイクリン誘導型 shRNF43 発現大腸癌株 (WiDr-shRNF43#84、WiDr-shRNF43#88、SW480-shRNF43#84、SW480-shRNF43#88) を得た。またコントロールとなる細胞株 (WiDr-shCtrl、SW480-shCtrl) を作製した。得られた細胞株を 1 μ g/mL のドキサイクリン (Dox) で 6 日間処理した後、ウェスタンブロッティングで RNF43 ノックダウン効果を確認したところ、WiDr-shRNF43#84、WiDr-shRNF43#88、及び SW480-shRNF43#88 で顕著なノックダウン効果を確認した (図 22)。SW480-shRNF32#84 においては比較的效果は弱いものの、Dox 未処理細胞に比べ若干の減少が確認された (図 22)。

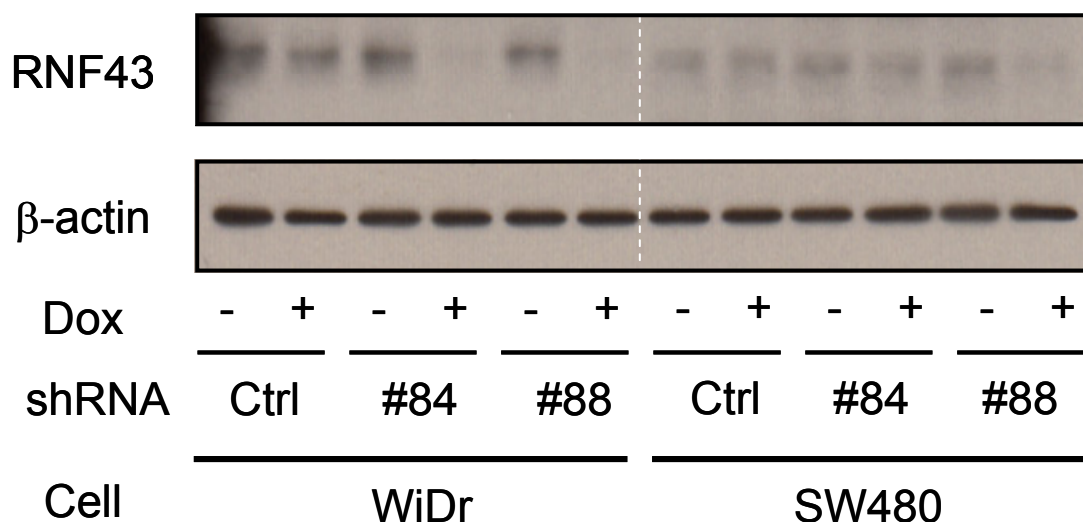


図 22. shRNA 発現大腸癌株の RNF43 発現抑制効果

テトラサイクリン誘導型 shRNF43 発現細胞株 (WiDr-shRNF43#84、WiDr-shRNF43#88、SW480-shRNF43#84、SW480-shRNF43#88) あるいはテトラサイクリン誘導型 shCtrl 発現細胞株 (WiDr-shCtrl、SW480-shCtrl) を 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のドキシサイクリン (Dox) で 6 日間処理し、抗 RNF43 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。内部コントロールとして β -actin を用いた。

テトラサイクリン誘導型 shRNA 発現カセットには tetracycline response element (TRE)の下流に turbo Red Fluorescent Protein (tRFP) が挿入されており、tRFP を検出することで shRNA の発現量を推量することができる。

WiDr-shRNF43#84 は WiDr-shRNF43#88 に比べて高いレベルで tRFP の発現がみられた (図 23)。同様にノックダウン効果のない WiDr-shCtrl においても tRFP の高い発現が確認されており、shRNA の特異性が確認された。

WiDr-shRNF43#88 は shRNA の発現量は比較的低いと推察されるが、ウェスタンブロッティングの結果から、ノックダウン効率は高いと考えられた (図

23)。一方、SW480 由来株は WiDr 由来株と同様に、SW480-shCtrl 及び SW480-shRNF43#84 で SW480-shRNF43#88 に比べて高いレベルでの tRFP の発現がみられた（図 24）が、すべての細胞株で WiDr 由来株と比し、tRFP の発現量は低かった。さらに、個々の細胞間で tRFP 発現効率が異なり、特に SW480 由来株では tRFP の発現が認められない細胞が多くみられた。これらのことにより、SW480 由来株においてウェスタンブロッティングでは RNF43 発現抑制効果が低くみられたと考えられた。しかしながら、shRNF43 の効果は確認されているため、個々の細胞について観察することにより、その効果が確認できると考えられた。よって、EMT マーカーの検出には細胞免疫染色法を用いることとした。

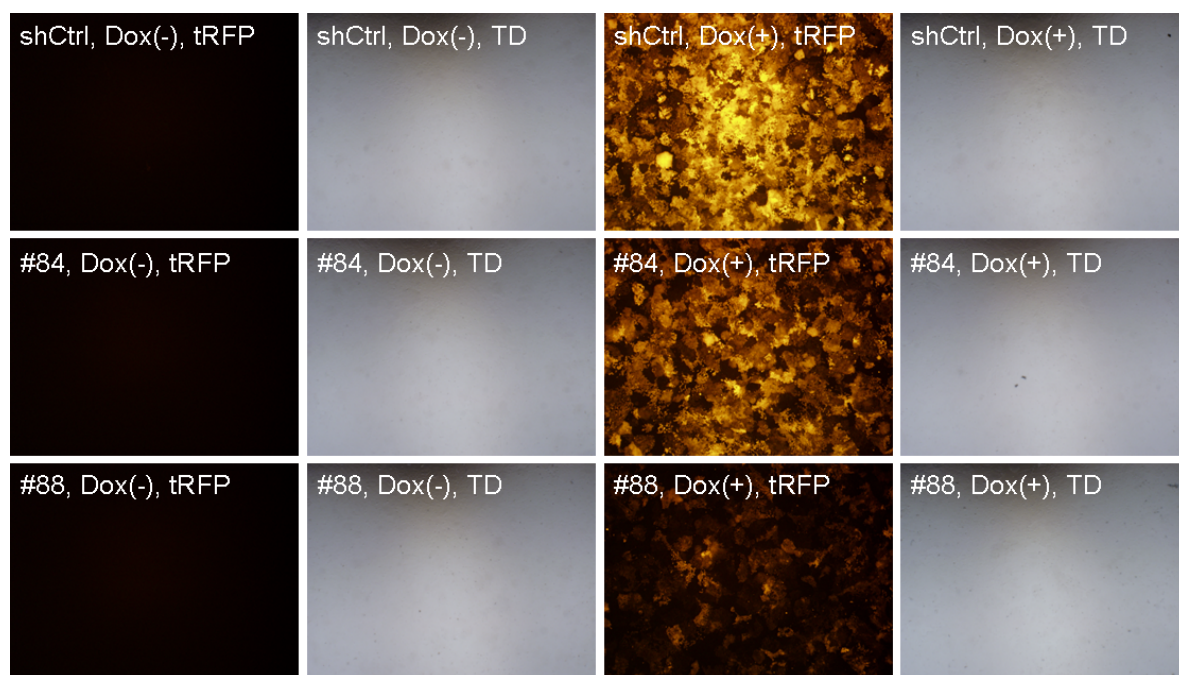


図 23. WiDr 由来 shRNA 発現細胞株の shRNA 発現

WiDr-shCtrl (shCtrl)、WiDr-shRNF43#84 (#84)、及び WiDr-shRNF43#88 (#88) を 1 µg/ml Dox で 6 日間処理し、蛍光顕微鏡にて観察した。Dox(-) : Dox 未処理細胞、Dox(+) : Dox 処理細胞、tRFP : turbo Red Fluorescent Protein、TD : 透過光。

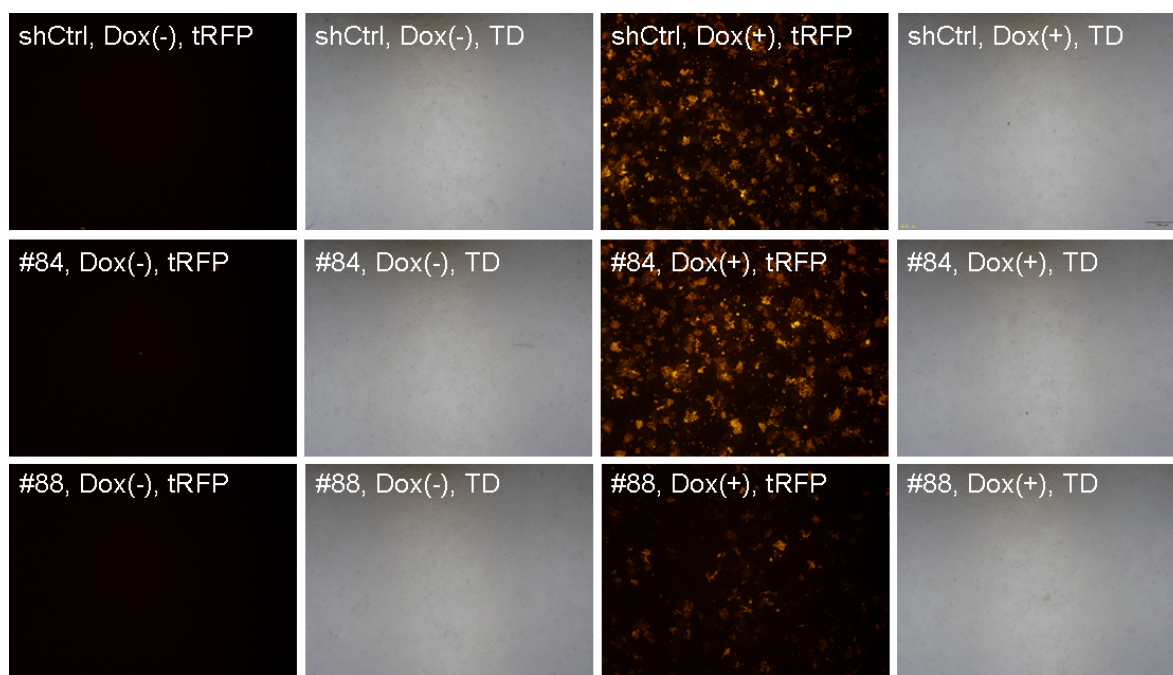


図 24. SW480 由来 shRNA 発現細胞株の shRNA 発現

SW480-shCtrl (shCtrl)、SW480-shRNF43#84 (#84)、及び SW480-shRNF43#88 (#88) を 1 µg/ml Dox で 6 日間処理し、蛍光顕微鏡にて観察した。Dox(-) : Dox 未処理細胞、Dox(+) : Dox 処理細胞、tRFP : turbo Red Fluorescent Protein、TD : 透過光。

第 7 項 RNF43 ノックダウンによる EMT マーカーの変動

WiDr-shRNF43#84 、 WiDr-shRNF43#88 、 SW480-shRNF43#84 、 SW480-shRNF43#88 をチャンバースライドに播種し、翌日から 1 µg/mL Dox で 6 日間処理した。培養開始 7 日後に細胞を固定し、EMT マーカー (E-cadherin、N-cadherin、vimentin) に対する抗体を用いて細胞免疫染色を行い、蛍光共焦

点顕微鏡で観察した。その結果、shRNF43 未発現細胞では、細胞膜上に E-cadherin が確認されるのに対し、shRNF43 発現細胞においては膜上から消失していた (図 25)。

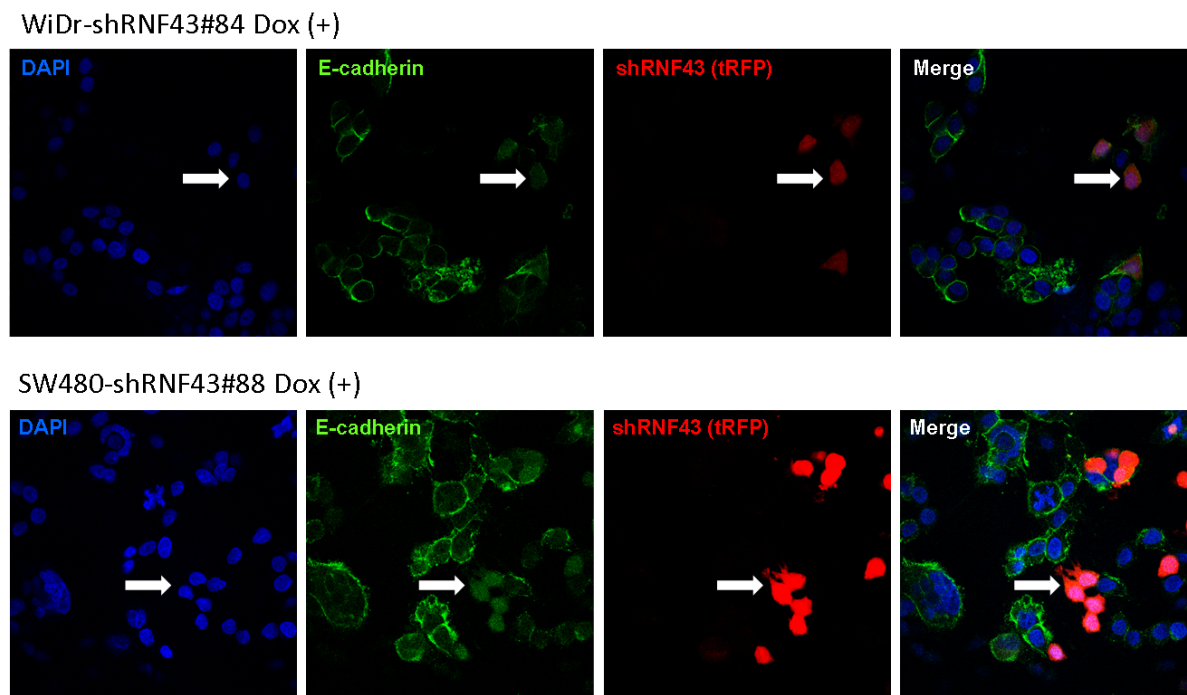


図 25. RNF43 ノックダウン細胞における E-cadherin 発現量変化

テトラサイクリン誘導型 shRNF43 発現 WiDr を Dox で 6 日間処理し、抗 E-cadherin 抗体を用いて細胞免疫染色を行った。上段は WiDr 由来細胞株 (WiDr-shRNF43#84)、下段は SW480 由来細胞株 (SW480-shRNF43#88) の結果を示した。shRNA 高発現細胞を矢印で示した。DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole、tRFP : turbo Red Fluorescent Protein。

一方、間葉系マーカーである N-cadherin 及び vimentin に関しては、shRNF43 誘導細胞で発現が上昇していた (図 26、図 27)。すなわち RNF43 のノックダウンにより E-cadherin の細胞膜での発現が減少し、N-cadherin 及

び vimentin の発現を誘導した。

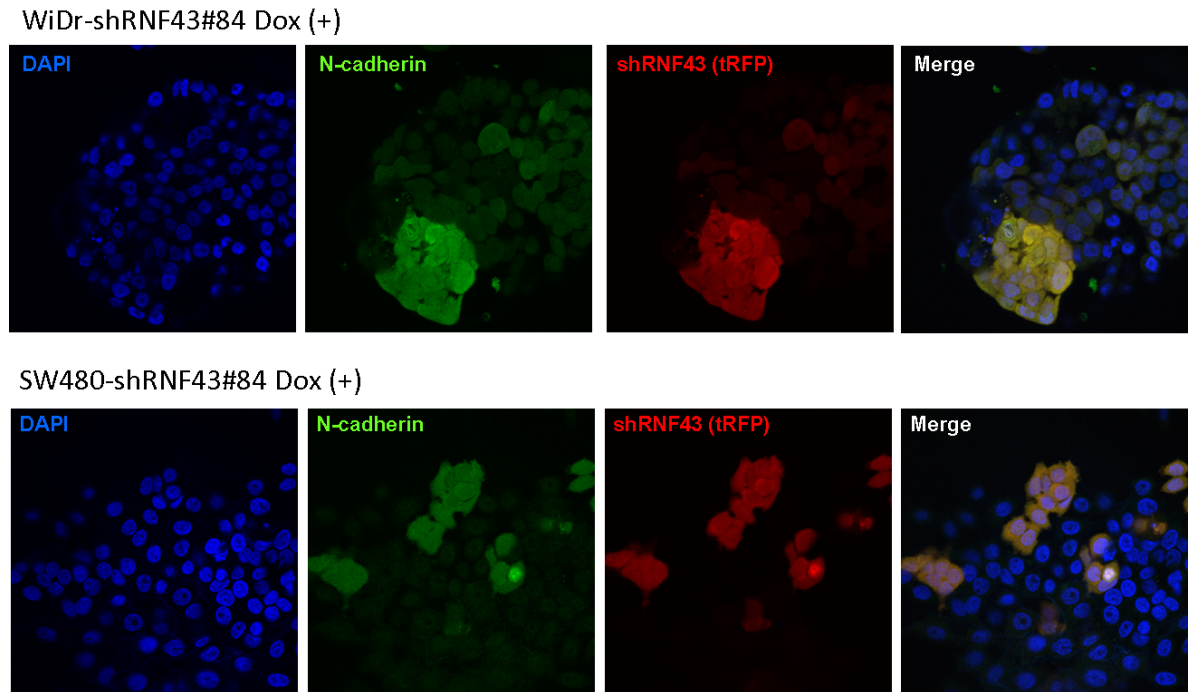


図 26. RNF43 ノックダウン細胞における N-cadherin 発現変化

テトラサイクリン誘導型 shRNF43 発現 WiDr を Dox で 6 日間処理し、抗 N-cadherin 抗体を用いて細胞免疫染色を行った。上段は WiDr 由来細胞株 (WiDr-shRNF43#84)、下段は SW480 由来細胞株 (SW480-shRNF43#84) の結果を示した。DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole、tRFP : turbo Red Fluorescent Protein。

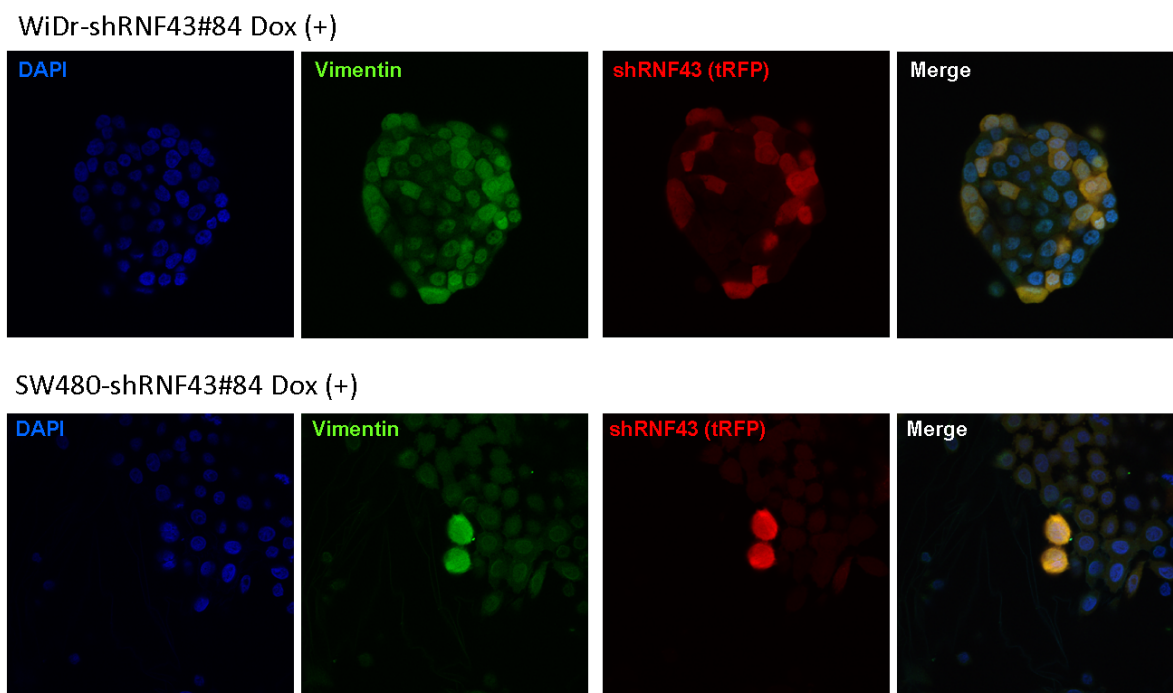


図 27. RNF43 ノックダウン細胞における vimentin 発現変化

テトラサイクリン誘導型 shRNF43 発現 WiDr を Dox で 6 日間処理し、抗 vimentin 抗体を用いて細胞免疫染色を行った。上段は WiDr 由来細胞株 (WiDr-shRNF43#84)、下段は SW480 由来細胞株 (SW480-shRNF43#84) の結果を示した。DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole、tRFP : turbo Red Fluorescent Protein。

第 4 章 考察

本研究において、*RNF43* の発現制御領域を同定し、*RNF43* 遺伝子が Tcf4/ β -catenin 複合体の直接的な標的であることを示した。また、RNF43 は EMT を抑制し、上皮細胞の維持を担っている可能性が示唆された。

最初の 5'上流領域を含むレポータープラスミドを用いたレポーターアッセイにおいて、その領域が転写活性化に関与することが示されたが、Wnt/ β -catenin シグナリングに関与する領域は同定されなかった。5'上流領域よりイントロン

2 の一部までを含むレポータープラスミド *RNF43-5'-3* においてはプロモーター活性がみられなかったため、イントロン 1 の 3'側領域からイントロン 2 の 5'側領域に転写抑制エレメントが存在する可能性が示唆された。

ENCODEプロジェクトのChIP-Seqデータベースを検索することにより、Tcf4 と結合する領域を絞り込むことができ、Wnt responsible elementの同定に成功した。ChIP-on-ChipやChIP-seqなどの網羅的解析手法を用いた転写因子、クロマチン占有状態、ヒストン修飾などのゲノム全体的な関連地図の有用性が示された。Tcf4 結合領域に関しては、Hatzisらによるタイリングアレイを用いた解析から 6,868 領域の報告がある (45)。彼らは、少なくとも一つの濃縮領域を含む約 1000 bpの 22 領域をレポーターアッセイによって検証した結果、10 領域において活性向上が確認され、そのうちの 9 領域においてドミナントネガティブTcf4 によって発現が抑制されることを示している。このことは濃縮された領域が必ずしも転写活性あるいはTcf4/ β -cateninとの結合に関与しているとは言えないことを示唆している。彼らの結果には*RNF43*のイントロン 2 にTcf4 抗体により濃縮されるピーク (chr17:53823246, NCBI35/hg17) があることを示しており、その領域は WRE2 (chr17:53824064-53824070, NCBI35/hg17) の近傍約 800 bpに位置している。この結果は、異なる細胞株を用いたデータにも関わらずTcf4 結合領域が一貫性を持っていることを示すとともに、タイリングアレイのデータでは正確な結合領域が予想できないこと、すべての結合領域を同定できないことを示唆している。彼らは、ゲノム全体に

渡って存在するTcf4 結合領域のうち 18%がTSSより 10 kb以上離れた遺伝子内に存在すると報告している。本研究で証明した*RNF43*の 2 つのWREも、TSS 下流約 22 kbに位置している。加えて彼らは、31%のピークがTSSから 100 kb 以上離れた 5'上流領域に位置することを示した。c-Mycを例にとると、400 kb を超える遺伝子上流にWREが存在し、血清マイトジェン刺激によるクロマチン ループ形成に関与していると考えられている (46)。したがって*RNF43*のTSS から離れた 5'上流領域にもWREが存在し、その転写制御を行っている可能性も 否定できない。

Tcf4 に加えて、Serial analysis of chromatin occupancy (SACO) やChIP-seq を含む網羅的解析手法により、 β -catenin結合領域の解析も行われている (47, 48)。本研究の結果と合致するように、SACOにより同定された 412 個の β -catenin結合領域には*RNF43* 遺伝子内のTcf4 結合モチーフ (chr17:53824041 NCBI35/hg17) を含み、それはWRE2 に対応している。同グループはその後、HCT116 株を用いた抗 β -catenin抗体によるChIP-seq解析を行い、2,168 個の濃縮領域を同定しており、そのうち 3 つ (chr17:53819951-53820630、chr17:53823671-53824270、chr17:53826701-53827401、NCBI36/hg18) が *RNF43*イントロン 2 に存在することを示している (48)。特にWRE1 とWRE2 はその中の 2 つに相当しており、このことからChIP-seqは転写因子の結合領域探索の強力な手段であることを示している。

本研究において、ヒストン修飾と pol II 結合データを組み入れて解析を行っ

た。ヒストン H3K4 モノメチル化及び pol II 結合は転写活性化エンハンサーの特徴であるとの見解と合致して、イントロン 2 の 2 つの WRE が転写活性化エンハンサーとして極めて重要な役割を果たすことが明らかとなった。一方、TSS の近傍 2.4 kb の領域は pol II 結合とヒストン H3K4 トリメチル化がみられており、この領域においてはヘテロクロマチン状態からユークロマチン状態への再構築を通して恒常的な転写活性化に寄与していることが示唆された。ENCODE のデータによると TSS 近傍領域においても Tcf4 結合ピークが存在するが、同領域にはその他の複数の転写因子による濃縮が確認されている。それ故に Tcf4 による濃縮ピークは偽陽性であるか、 β -catenin 非依存的な Tcf4 の結合である可能性が考えられる。あるいは、イントロン 2 に結合した Tcf4/ β -catenin 複合体によるクロマチンループ形成が引き起こす相互作用によるシグナルかもしれない。ヒストン修飾と pol II 結合は、転写因子結合領域のクロマチン構造と転写活性の予測に有用な情報をもたらす故、ヒストン修飾を加えた β -catenin 及び Tcf4 結合領域のゲノム全体的な関連地図作成に関する将来的な研究により、Tcf4/ β -catenin や Brg1、TRRAP、TIP60、CBP/p300、MLL (11) などのクロマチン修飾酵素による動的な転写制御機構の解明に有用な知見が得られると期待される。

最近の研究により、膜貫通型 E3 ユビキチンリガーゼである RNF43 と ZNRF3 が frizzled 受容体を選択的にユビキチン化することが報告された (27, 28, 29)。RNF43 とそのホモログである ZNRF3 は脊椎動物において高度に保存されてお

り、細胞膜上でfrizzled受容体とlow density lipoprotein receptor-related proteins (LRP5/6) と会合する。RNF43はFZD1とFZD3を含むfrizzled受容体のエンドサイトーシスを促進させ、Wnt/ β -catenin経路への反応を抑制する(29)。またZNRF3はfrizzled受容体とLRP6のターンオーバーを促進させる。興味深いことにZNRF3の阻害はWnt/ β -cateninシグナリングの活性化とともにWnt/PCPシグナリングの抑制を引き起こした(27)。これらの結果はZNRF3とRNF43がcanonical Wnt経路とともにnon-canonical Wnt経路を制御することを示唆している。本研究では、*RNF43*がTcf4/ β -catenin複合体の下流遺伝子であることを示したが、このことは他の報告でも示唆されているように、RNF43がcanonical Wnt経路のネガティブ・フィードバック調節因子として機能することを示唆している。この他にも、*AXIN2*や*DKK1*もcanonical Wnt経路の下流遺伝子で、異なるメカニズムでネガティブ・フィードバック調節因子として働いていることが報告されている(49, 50, 51, 52, 53)。膵癌、卵巣癌の腫瘍形成に関して言えば、*RNF43*の不活性化変異はcanonical Wntシグナリングの調節を破綻させ、その結果c-Mycやcyclin Dなどの発現を誘導して腫瘍化に関与するものと推察される。しかしながら、大腸癌や肝癌においては、*APC*や β -catenin遺伝子、*AXIN2*の変異によって亢進したTcf4の転写活性は、RNF43によるネガティブ・フィードバックを受けないものと考えられる。しかし一方で、大腸癌における*SFRP4*や*DKK1*の発現がWntシグナリングを減弱(53, 54)すると報告されており、RNF43が関わる複雑なWntシグナリング経路のネッ

トワークの解明が望まれる。

RNF43 の機能解析を開始した当初は、RNF43 の大腸癌、大腸腺腫での高発現や細胞増殖の亢進効果などの結果から、**tumor promoting factor**であると予測していた。しかし、近年の報告でRNF43 のWnt経路へのネガティブ・フィードバック機構が解明され (29)、さらにいくつかの癌において機能喪失型の変異が見つかるなど (30、31、32、34)、むしろ癌の進行には抑制的な働きを持つことが示唆された。更に、いくつかの結合実験によりHAP95、PSF、NONO、NEDL1 などがRNF43 と結合することが報告されている (26、55、56)。これらのタンパク質はいずれも核タンパク質であり、細胞膜上のWntレセプターの消去作用とは異なる機構を持っていることが予想された。そこで我々は大腸癌におけるRNF43 の機能を俯瞰的に理解するために、siRNAによるRNF43 ノックダウンを行い、網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、RNF43 が*ZEB2* の発現を負に制御すること、EMTや細胞運動に関与することを発見した。また、RNF43 はE-cadherinの細胞膜での発現維持に関与していることを示した。RNF43 はWnt経路を抑制することから、canonicalあるいはnon-canonical Wnt経路の下流でE-cadherinの発現が抑制されている可能性もある。しかしながらマイクロアレイのデータでは、RNF43 のノックダウンにより*AXIN2* や*c-Myc* などcanonical Wnt経路の遺伝子発現が増加しておらず、canonical Wnt経路の関与には否定的である。また、TGF- β 経路についてもWiDr及びSW480 でそれぞれ*SMAD4*のホモ接合性ナンセンス変異、ホモ接合性欠失を有しており (57)、

その関与は否定される。ZEB2はZincフィンガープロテインであり、E-cadherinプロモーターのE2ボックス(CACCTG)を介してその発現を抑制し、浸潤を誘導することが知られている(44)。臨床的には膀胱癌、乳癌、大腸癌、胃癌、頭頸部癌、肝癌、卵巣癌、膵癌で発現亢進が確認されている(58)。大腸癌においては、浸潤先端部での発現が亢進しており、その発現が予後と関連すると報告されている(59)。したがって、RNF43がZEB2の抑制を介してE-cadherinの発現を増加させる可能性が示唆された。一方、Wnt経路の活性化がZEB1の誘導を介してE-cadherinの発現を減少させ、EMTを促進させるとの報告もある(60)。このことから、Wnt経路は複数の分子を介してEMTを制御しているのかもしれない。ZEB2の発現制御には、TGF- β 経路やmiR-200等が知られている(61、62)。今回使用した大腸癌細胞株は*SMAD4*にナンセンス変異または欠失を持つため、TGF- β 経路の影響は少ないと考えられるが、miRNAを含むその他の調節機構の関与について、今後の研究により明らかにされることが期待される。また、RNF43はFrizzledをinternalizationすることから(29)、Frizzledに細胞内で結合しているDvlやDapleを介するシグナルを調節している可能性が考えられる。DvlやDapleはRacの活性化による細胞移動制御(63)やRhoAによるEMT制御(64)などに関係するとの報告もある。RNF43はこれらの分子を介したnon-canonical Wnt経路、またはその他の制御機構によりEMTを抑制しているのかもしれない。

Xingらは肝細胞癌においてもRNF43の発現が亢進しており、その発現と脈

管浸潤、分化度、及びステージにおいて関連があることを報告している (65)。

またRNF43 のノックダウンにより、肝癌細胞株の増殖、浸潤、コロニー形成能、異種移植腫瘍増殖が抑制されることを示している。さらにRNF43 をノックダウンした肝癌細胞株を用いた遺伝子発現プロファイリングを行い、229 個の変動遺伝子を得ているが、本研究で抽出された遺伝子は含まれていなかった。このことは、癌種あるいは細胞の違いによりRNF43 の果たす役割が異なることを示しているのかもしれない。The Human Protein Atlasの免疫組織染色結果 (66) によると、大腸を含む腸管においてRNF43 発現が認められるが、正常肝組織ではRNF43 発現は認められていない。定常状態における発現量の違いはそれぞれの組織におけるRNF43 の持つ重要性に大きな違いがあることを示していると考えられる。

大腸上皮においてはWntシグナリングとTGF- β シグナリングが相互に作用し、恒常性を維持している。すなわち陰窩側の細胞ではWnt経路が活性化しており幹細胞の性質を維持する一方、管腔側ではTGF- β シグナルにより細胞増殖が抑制され、上皮系の性質が維持されている。特に陰窩の深部に存在するLGR5 陽性細胞は腸上皮幹細胞と考えられており、同時にRNF43 を発現していることが知られている (29)。LGR5 陽性幹細胞の維持にはR-spondinが必要とされる。その役割の一つは細胞膜に存在するLGR5 とRNF43 とに結合し、細胞表面からの消失を促進することでWnt経路のネガティブ・フィードバック機構を抑制することにあると考えられている。小腸上皮オルガノイドを用いた研究で、野

生型のマウスから調製したオルガノイドはR-spondin非存在下では 5 日以内に死滅するが、RNF43/ZNRF3 をダブルノックアウトするとR-spondinなしで 4 週間生存することができる (29)。これらのことは幹細胞様の形質を維持するためには、R-spondinによるRNF43 とZNRF3 の機能抑制が必要であることを示している。また、*RNF43/ZNRF3* ダブルノックアウトマウスでは腸上皮細胞の増殖亢進と、多くのパネート細胞及びLGR5 陽性細胞を含む腺腫が形成されることが知られている (29)。別の報告では、大腸癌の 10%においてR-spondin 遺伝子の融合遺伝子異常が見つかっており、Wnt経路を活性化することが示されている (67)。これらの遺伝子変異は*APC*変異と相互排他的であり、Wnt経路活性化において重要な役割を果たしていると考えられる。このこともRNF43/ZNRF3 の機能低下が発癌に寄与することを支持している (68)。

Barkerらは、マウスのLGR5 陽性細胞の*Apc*遺伝子を欠失すると腸腺腫が形成されるが、他の腸上皮細胞では起こらないことを示し、腸腫瘍の起源は正常の腸上皮幹細胞であると報告している (68)。Schepersらはlineage tracing systemを導入した*Apc*コンディショナルノックアウトマウスを用いて、*Lgr5* 陽性細胞が腺腫において多分化能を持つ癌幹細胞として働いていることを報告している (69)。これらの結果は癌発生の起源が正常の幹細胞であることを示唆しており、様々なタイプの癌に変化可能であるとも考えられる。Maniらは、変異型Rasを強制発現し癌化させたヒト乳房上皮細胞 (HMLE) にSnailあるいはTwistの導入によりEMTを誘導すると、癌幹細胞の機能を獲得できることを

示している (70)。RNF43 の異常が正常細胞から癌幹細胞への移行に関与しているかもしれない。大腸癌においてLGR5 と共発現するRNF43 に変異が見つかったことは興味深い。

粘液性卵巣癌においても大腸癌におけるadenoma-carcinoma sequenceに相当する進行モデルが提唱されており、良性嚢胞腺腫 (benign cystadenoma) から境界悪性腫瘍 (MBT : mucinous borderline tumour) を経て粘液性卵巣癌 (MOC : mucinous ovarian carcinoma) へ進行するとされている。良性嚢胞腺腫の段階では 40%の症例でMAPキナーゼ経路の活性化 (*RAS/BRAF*変異) 及びp16 の欠失がみられ、境界悪性腫瘍ではそれらの異常が 68%で観察される (71)。また、後期の境界悪性腫瘍から浸潤性粘液性卵巣癌においては*ERBB2* の増幅がみられ、これらのイベントが癌の進行と関連していると考えられている (72)。最近の粘液性卵巣癌における遺伝子解析の報告では、境界悪性腫瘍の 9%の症例で*RNF43* の変異が認められ、さらに進行した転移性の粘液性卵巣癌においては 21%の症例で変異がみられると報告されている (34)。その他、頻繁に見られる変異は*KRAS* (50%)、*BRAF* (42%)、*TP53* (42%) があるが、*RNF43* 以外のWnt経路に関係する遺伝子の変異は認められていない。また、膵臓の腫瘍性嚢胞の一部においても*RNF43* の変異が報告されている。腫瘍性嚢胞neoplastic cystはintraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN)、mucinous cystic neoplasm (MCN)、serous cystadenoma (SCA)、solid pseudopapillary neoplasm (SPN)の 4 種類に分類され、そのうちのIPMN、

MCN、SCAは良性であるが、IPMN、MCNは切除しない場合、転移性癌（PDA）に進行する可能性があることが知られている（73）。Wuらのwhole-exome sequencingの報告では、IPMNとMCNにおいて特徴的に*RNF43*の変異が検出されており（IPMN；75%、MCN；50%）、転移性膵癌への進行において*RNF43*が重要な役割を果たしていることが予想される。また悪性とされているSPNにおいては全症例で*CTNNB1*変異が認められるのに対し、IPMN、MCNにおいて*CTNNB1*変異は認められていない。Wnt経路の異常また、*RNF43*の機能相補分子である*ZNRF3*は粘液性卵巣癌、膵嚢胞性腫瘍において変異が確認されていない。このことは*RNF43*の特異的な機能の存在を示唆するものであり、その一つとしてEMT制御が挙げられるのかもしれない。一方、大腸癌においては粘液性癌あるいは非粘液性癌で*RNF43*変異の割合に差はみられなかった{粘液性癌：7.7% (2/26)、非粘液性癌：5.3% (8/152)、 $p = 0.16791$ (χ^2 検定)} (2)。

また、IPMN、MCN、MBT、MOCなどの粘液性癌ではナンセンス変異が多く、癌抑制因子としての役割が強いと考えられたが、大腸癌においてはほとんどがミスセンス変異であり、その機能の変化についての知見は多くは見られていない。最近の結晶構造解析の結果から、大腸癌でみられる一部の変異（L82S、M83T）が*RNF43*とR-spondinの結合領域に存在することが示されている。いずれの変異も疎水性アミノ酸から極性無電荷アミノ酸への変化であるが、L82S変異においてはマウスR-spondin 2との結合活性に差はみられていない（74）。したがってこのような変異は、結果であり原因ではない可能性も考えられる。

大腸癌における *RNF43* の変異頻度は比較的低い (COSMIC : 6.9%、TCGA : 5%)。The Cancer Genome Atlas (TCGA) Network の報告によると、大腸癌の遺伝学的タイプには 16% の hypermutated type と 84% の non-hypermutated type が存在することが報告されている。そこで *RNF43* の変異も hypermutated type での変異に分類されると予想し、TCGA のデータを用いて *RNF43* 変異症例を分類したところ、hypermutated type で 27% (8/30)、non-hypermutated type で 1% (2/155) 存在し、有意に hypermutated type で多いことが判明した ($p = 9.9 \times 10^{-15}$) (図 28)。さらに詳細に分類すると、このクラスターには *RNF43* mRNA の低発現症例 (Z-score < -1) が多く存在し、それらは MLH1 silencing 症例と非常に高い相関を示すことがわかった (図 29)。

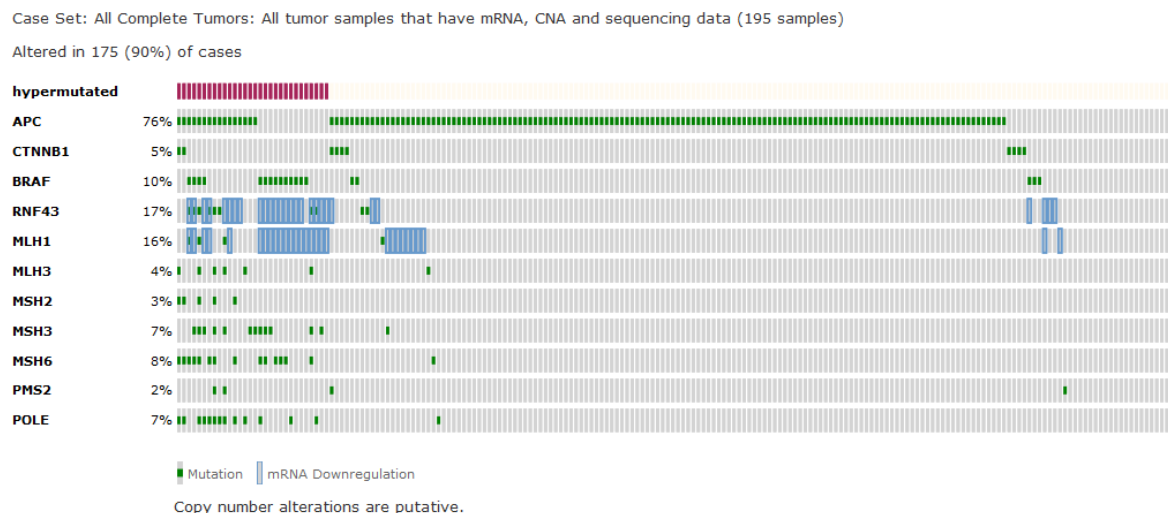


図 28. Hypermutated type 別の遺伝子変化

Case Set: All Complete Tumors: All tumor samples that have mRNA, CNA and sequencing data (195 samples)

Altered in 175 (90%) of cases

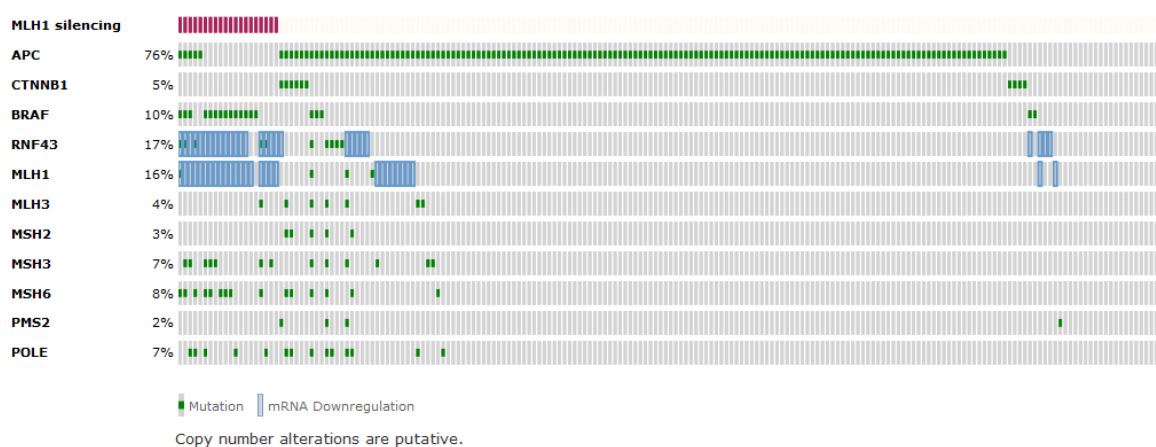


図 29. MLH1 silencing 別の遺伝子変化

RNF43 発現低下は*APC*変異を持つ症例においてもみられることから、*MLH1* と同様にエピジェネティックな制御を受けている可能性があると考えられた (図 30)。同じネガティブ・フィードバック調節因子である*Dkk1* もプロモーター領域のメチル化により、発現が抑制されていることが報告されており興味深い (75)。

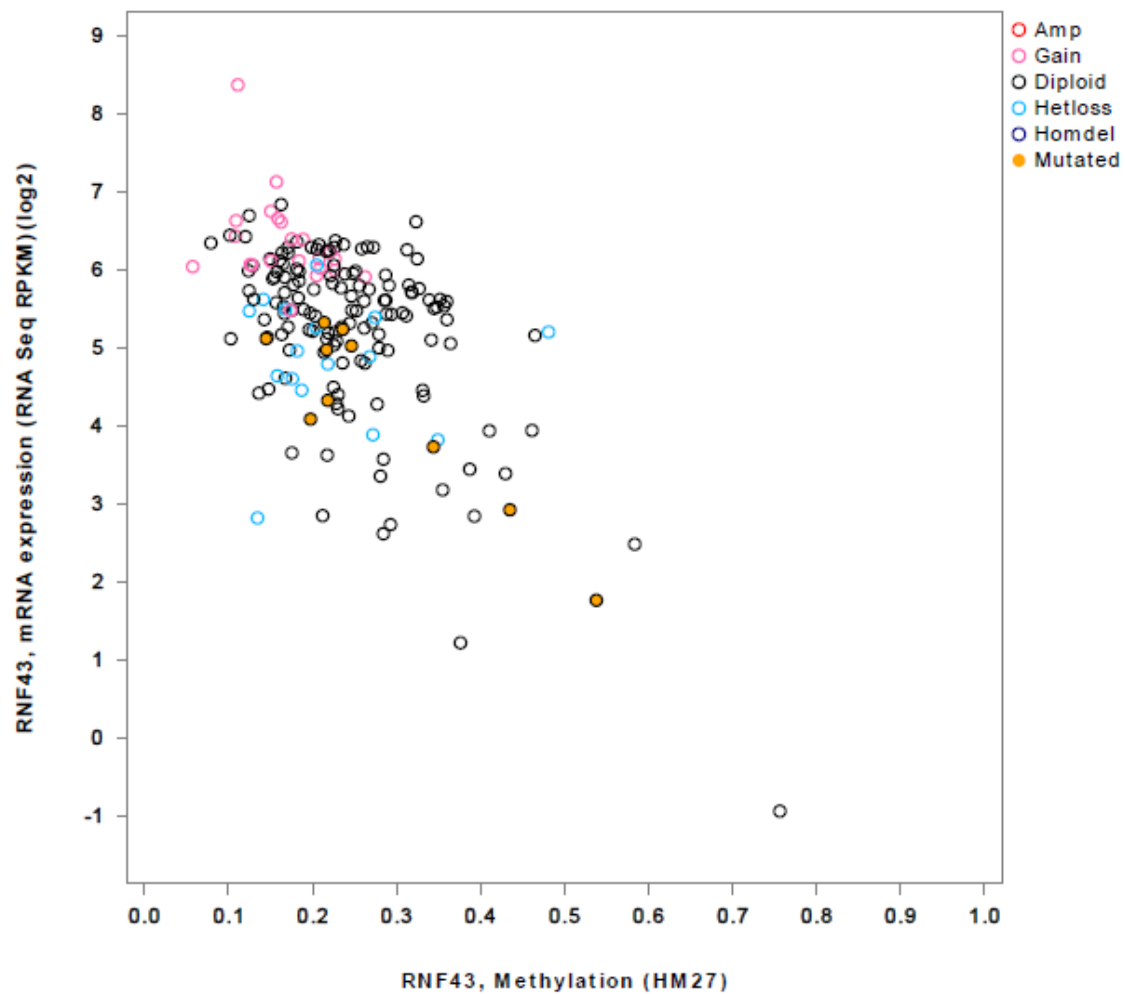


図 30. RNF43 プロモーターのメチル化と mRNA 発現の関係

一方、hypermutated typeにおいてRNF43 の発現低下がみられない症例ではミスマッチ修復遺伝子 (*MLH1*、*MLH3*、*MSH2*、*MSH3*、*MSH6*、*PMS2*) や*POLE*の変異が存在し (2、図 28、図 31)、Lynch症候群であると考えられた。RNF43 の機能低下がみられる症例は、*MLH1* silencingを示す。このクラスターはCIMPに分類され、多くがMSI陽性を示し、*BRAF*変異が多い (図 32、図 33)。このような腫瘍では予後が良いとされている。(76、77、78、79)。このこと

はIPMN、MCN、MBT、MOCでみられる癌の悪性化と*RNF43* 変異との関係に矛盾するように思えるが、あるいはYagyuらによって示されている細胞増殖亢進活性が影響しているのかもしれない (35)。

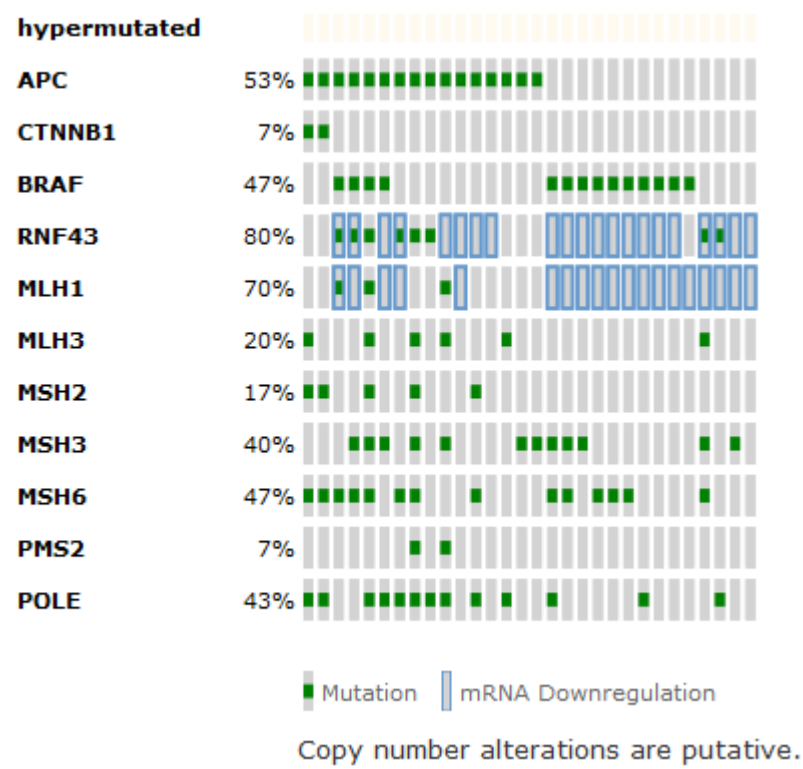


図 31. Hypermuted type における *RNF43* と遺伝子修復酵素群および POLE 遺伝子変化 (図 28 の拡大図)

Case Set: All Complete Tumors: All tumor samples that have mRNA, CNA and sequencing data (195 samples)

Altered in 175 (90%) of cases

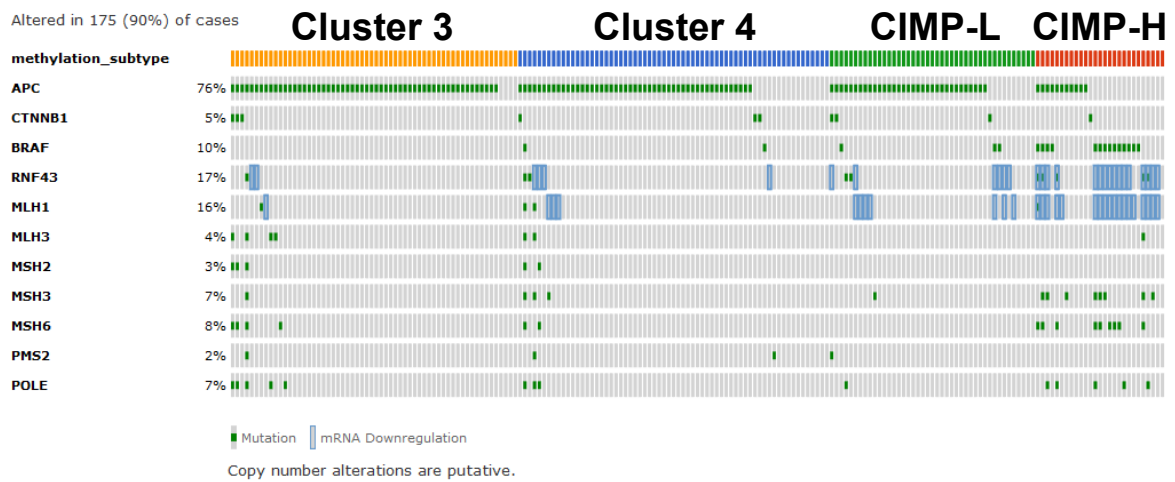


図 32. Methylation subtype 別の遺伝子変化

Case Set: All Complete Tumors: All tumor samples that have mRNA, CNA and sequencing data (195 samples)

Altered in 175 (90%) of cases

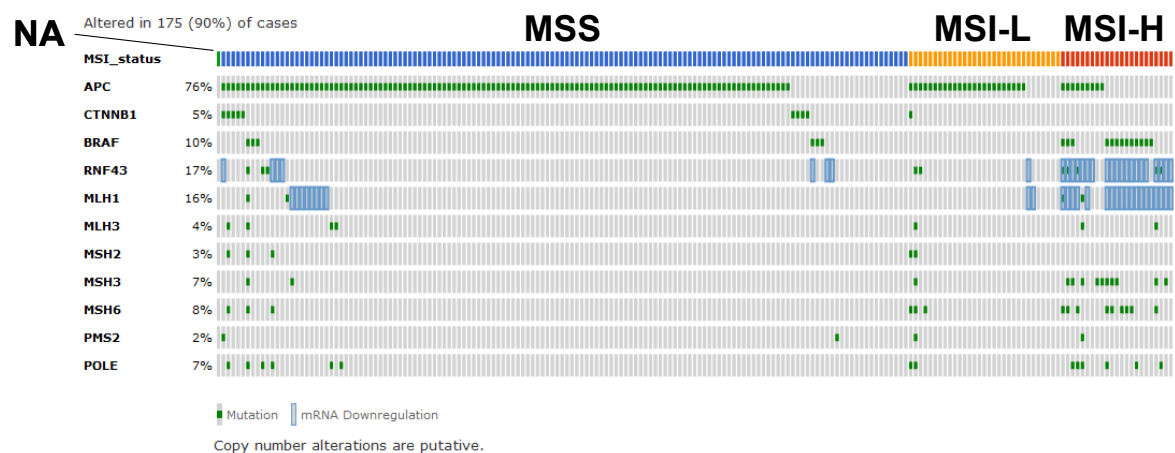


図 33. MSI status 別の遺伝子変化

RNF43 の遺伝子異常や発現異常は、EMT を介する癌の進展、あるいはがんのステムネス獲得に関与するのかもしれない。

今後の RNF43 の増強あるいは抑制によるさらなる機能解析により、canonical あるいは non-canonical Wnt 経路に関連した、詳細な発現調節ネッ

トワークが明らかになるものと思われる。また癌細胞における RNF43 の詳細な機能解析により、さまざまな癌に対する新たな診断法、治療法、予防法の開発が発展することが期待される。

第5章 結語

本研究において、*RNF43* の発現制御領域を同定し、*RNF43* 遺伝子が Tcf4/ β -catenin 複合体の直接的な標的であることを示した。また、RNF43 は EMT を抑制し、上皮細胞の維持を担っている可能性が示唆された。今後の RNF43 の増強あるいは抑制によるさらなる機能解析により、canonical あるいは non-canonical Wnt 経路に関連したネットワークの解明と、ひいては RNF43 の発現あるいは機能制御がヒト腫瘍の治療法や予防法の開発に役立つことが期待される。

略語一覽

AA	Amino Acid
AF17	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 6 (MLLT6)
ANOVA	Analysis Of Variance
APC	Adenomatous Polyposis Coli
AXIN2	Axis inhibition protein 2
BCA	Bicinchoninic Acid
bp	base pair (s)
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
Brg1	LysR family transcriptional regulator
C14orf132	Chromosome 14 open reading frame 132
CBP	cyclic adenosine mono-phosphate (cAMP)-Response Element Binding Protein (CREB) Binding Protein
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
cDNA	complementary Deoxyribonucleic Acid
CDS	Coding Sequence Definition
CLU	Clusterin
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
ChIP-seq	Chromatin Immunoprecipitation sequencing

CIMP	CpG Island Methylater Phenotype
COSMIC	Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
cRNA	complementary Ribonucleic Acid
CSRNP3	Cysteine-Serine-Rich Nuclear Protein 3
CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
CTP	Cytidine triphosphate
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAVID	The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DKK1	Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
Dox	Doxycycline
Dvl	Dishevelled, dsh homolog 1
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ENC1	Ectodermal-Neural Cortex 1 (with BTB domain)
ENCODE	The Encyclopedia of DNA Elements
EMT	Epithelial-to-Mesenchymal Transition
ERBB2	v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2

EV	Empty Vector
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FLVCR2	Feline Leukemia Virus subgroup C Cellular Receptor family, member 2
FNBP1	Formin Binding Protein 1
FZD1	Frizzled family receptor 1
FZD3	Frizzled family receptor 3
GEO	Gene Expression Omnibus
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 beta
H3K4	Histone H3 Lysine 4
H3K4me1	Histone H3 Lysine 4 mono-methylation
H3K4me3	Histone H3 Lysine 4 tri-methylation
H3K27	Histone H3 Lysine 27
H3K27ac	Histone H3 Lysine 27 acetylation
HAP95	A Kinase (PRKA) Anchor Protein 8-Like (AKAP8L)
HMG	High Mobility Group
HMLE	Human Mammary Epithelial Cell
HRP	Horseradish peroxidase

IgG	Immunoglobulin G
IPMN	Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LEF	Lymphoid Enhancer-binding Factor
LGR5	Leucine rich repeat containing G protein-coupled Receptor 5
LRP5/6	Low density lipoprotein receptor-Related Protein 5/6
LRP6	Low density lipoprotein receptor-Related Protein 6
MAF	Minor Allele Frequency
MAP	Mitogen-Activated Protein
MAPK10	Mitogen-Activated Protein Kinase 10
MBT	Mucinous Borderline Tumour
MCN	Mucinous Cystic Noeplasm
MLH1	mutL homolog 1
MLH3	mutL homolog 3
MLL	Myeloid/Lymphoid or mixed-lineage Leukemia
MMP-7	Matrix Metallopeptidase 7 (matrilysin, uterine)
MOC	Mucinous Ovarian Carcinoma
MSH2	mutS homolog 2
MSH3	mutS homolog 3
MSH6	mutS homolog 6

MSigDB	The Molecular Signature Database
MT1-MMP	Matrix Metalloproteinase 14 (membrane-inserted) (MMP14)
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NEDL1	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 (HECW1)
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Disease
NIH	National Institute of Health
NONO	non-POU domain containing, octamer-binding
NOVA1	Neuro-Oncological Ventral Antigen 1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCDH7	Protocadherin 7
PCP	Planar Cell Polarity
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
PMS2	PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (<i>S. cerevisiae</i>)
Pol II	RNA Polymerase II
POLE	polymerase (DNA directed), epsilon, catalytic subunit
PPAR- δ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta
PRICKLE2	Prickle homolog 2
PSF	splicing factor proline/glutamine-rich (SFPQ)

Rac	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
RhoA	Ras homolog family member A
RNA	Ribonucleic Acid
RNF43	Ring Finger Protein 43
RT-PCR	Reverse Transcribed Polymerase Chain Reaction
SACO	Serial Analysis of Chromatin Occupancy
SCA	Serous Cystadenoma
SCIN	Scinderin
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SECTM1	Secreted and Transmembrane 1
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results Program
SEPP1	Selenoprotein P, Plasma, 1
SFRP4	Secreted Frizzled-Related Protein 4
SGCE	Sarcoglycan, Epsilon
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
SMAD4	SMAD family member 4
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
SNTB1	Syntrophin, Beta 1

SPN	Solid Pseudopapillary Neoplasm
SYDH	Stanford University / YaleUniversity / University of South California / Harvard University
TCF4	Transcription Factor 7-Like2 (T-Cell Factor 4)
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TBS	Tris Buffered Saline
TD	Transmitted light Differential interference contrast images
TIP60	K(lysine) acetyltransferase 5
TP53	Tumor Protein p53
TRE	Tetracycline Response Element
tRFP	turbo Red Fluorescent Protein
TRRAP	Transformation/transcription domain-associated protein
TSS	Transcription Start Site
UCSC	University of California, Santa Cruz
uPAR	urokinase-type plasminogen activator receptor
UTR	Untranslated Region
UW	University of Washington
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A
Wnt3a	Wingless-related MMTV integration site family, member 3A
WRE	Wnt Responsive Element

ZEB1	Zinc finger E-box Binding homeobox 1
ZEB2	Zinc finger E-box Binding homeobox 2
ZFPM2	Zinc Finger Protein, FOG family member 2
ZNRF3	Zinc and Ring Finger 3

謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教官である、東京大学医科学研究所 古川洋一教授には、丁寧かつ熱心なご指導を賜りました。ここに感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、東京大学医科学研究所 池上恒夫 准教授には、多くの的確なご助言を賜りました。ここに感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、東京大学医科学研究所 山口貴世志助教には、多くのご助言とご協力を賜りました。ここに感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、順天堂大学医学部 藤井智明 博士研究員には多くのご助言、討議をしていただきました。ここに感謝の意を表します。

実験の実施に際しては、東京大学医科学研究所 畠山晴良 学術支援員には、多くのご協力をいただきました。ここに感謝の意を表します。

東京大学医科学研究所 臨床ゲノム腫瘍学分野の皆様には、日々の活発な議論や実験遂行に際して多くのご協力をさせていただきました。ここに感謝の意を表します。

最後に、研究生活を送るにあたり、支援し続けていただいた家族に心から感謝します。

参考文献

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2013) Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 63: 11-30.
- 2 The Cancer Genome Atlas Network (2012) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487: 330-337.
- 3 Nelson WJ, Nusse R (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303: 1483-1487.
- 4 Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, et al. (1996) Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272: 1023-1026.
- 5 Polakis P (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14: 1837-1851.
- 6 Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, et al. (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382: 638-642.
- 7 Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, et al. (1996) XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86: 391-399.
- 8 Kinzler KW, Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170.

- 9 Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, et al. (2012)
Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes
identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*
44: 694-698.
- 10 Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, et al. (2001)
Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define
distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 120:
1763-1773.
- 11 Mosimann C, Hausmann G, Basler K (2009) Beta-catenin hits chromatin:
regulation of Wnt target gene activation. *Nature Reviews Molecular Cell
Biology* 10: 276-286.
- 12 He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, et al. (1998)
Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281:
1509-1512.
- 13 Tetsu O, McCormick F (1999) β -catenin regulates expression of cyclin D1
in colon carcinoma cells. *Nature* 398: 422-426.
- 14 Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T (1999) β -catenin
regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human
colorectal cancer. *Am J Pathol* 155: 1033-1038.

- 15 Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, et al. (1999) The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* 18: 2883-2891.
- 16 Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, et al. (1999) Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1603-1608.
- 17 van der Heyden MA, Rook MB, Hermans MM, Rijksen G, Boonstra J, et al. (1998) Identification of connexin43 as a functional target for Wnt signalling. *J Cell Sci* 111 (Pt 12): 1741-1749.
- 18 Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, et al. (1999) Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* 154: 515-523.
- 19 He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW (1999) PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 99: 335-345.
- 20 Lin YM, Ono K, Satoh S, Ishiguro H, Fujita M, et al. (2001) Identification of AF17 as a downstream gene of the beta-catenin/T-cell factor pathway and its involvement in colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 61: 6345-6349.
- 21 Fujita M, Furukawa Y, Tsunoda T, Tanaka T, Ogawa M, et al. (2001)

Up-regulation of the ectodermal-neural cortex 1 (ENC1) gene, a downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex, in colorectal carcinomas. *Cancer Res* 61: 7722-7726.

22 Hlubek F, Jung A, Kotzor N, Kirchner T, Brabletz T (2001) Expression of the invasion factor laminin gamma2 in colorectal carcinomas is regulated by beta-catenin. *Cancer Res* 61: 8089-8093.

23 Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, et al. (2001) Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res* 12: 469-476.

24 Takahashi M, Tsunoda T, Seiki M, Nakamura Y, Furukawa Y (2002) Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene* 21: 5861-5867.

25 Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, et al. (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449: 1003-1007.

26 Sugiura T, Yamaguchi A, Miyamoto K (2008) A cancer-associated RING finger protein, RNF43, is a ubiquitin ligase that interacts with a nuclear protein, HAP95. *Exp Cell Res* 314: 1519-1528.

- 27 Hao H-X, Xie Y, Zhang Y, Charlat O, Oster E, et al. (2012) ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* 485: 195-200.
- 28 Jiang X, Hao HX, Gowney JD, Woolfenden S, Bottiglio C, et al. (2013) Inactivating mutations of *RNF43* confer Wnt dependency in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 12649-12654.
- 29 Koo B-K, Spit M, Jordens I, Low TY, Stange DE, et al. (2012) Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* 488: 665-669.
- 30 Wu J, Jiao Y, Dal Molin M, Maitra A, de Wilde RF, et al. (2011) Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 21188-21193.
- 31 Furukawa T, Kuboki Y, Tanji E, Yoshida S, Hatori T, et al. (2011) Whole-exome sequencing uncovers frequent GNAS mutations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Sci Rep* 1: 161.
- 32 Ong CK, Subimerb C, Pairojkul C, Wongkham S, Cutcutache I, et al. (2012) Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Nat Genet* 44: 690-693.

- 33 Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, Dinh HH, Drummond JA, et al. (2012) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487: 330-337.
- 34 Ryland GL, Hunter SM, Doyle MA, Rowley SM, Christie M, et al. (2012) RNF43 is a tumour suppressor gene mutated in mucinous tumours of the ovary. *J Pathol* 229:469-476.
- 35 Yagyu R, Furukawa Y, Lin YM, Shimokawa T, Yamamura T, et al. (2004) A novel oncoprotein RNF43 functions in an autocrine manner in colorectal cancer. *Int J Oncol* 25: 1343-1348.
- 36 Lin YM, Furukawa Y, Tsunoda T, Yue CT, Yang KC, et al. (2002) Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas. *Oncogene* 21: 4120-4128.
- 37 van der Flier LG, Sabates-Bellver J, Oving I, Haegbarth A, De Palo M, et al. (2007) The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology* 132: 628-632.
- 38 van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, et al. (2002) The β -Catenin/TCF-4 Complex Imposes a Crypt Progenitor Phenotype on Colorectal Cancer Cells. *Cell* 111: 241-250.
- 39 <http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/annotate.jsp>

- 40 Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, et al.
(2003) PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34: 267-73.
- 41 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, et al.
(2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15545-15550.
- 42 Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protocols* 4: 44-57.
- 43 Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37: 1-13.
- 44 Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunseven L, et al.
(2001) The two-hundred E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 7: 1267-1278.
- 45 Hatzis P, van der Flier LG, van Driel MA, Guryev V, Nielsen F, et al.
(2008) Genome-wide pattern of TCF7L2/TCF4 chromatin occupancy in colorectal cancer cells. *Mol Cell Biol* 28: 2732-2744.

- 46 Yochum GS (2011) Multiple Wnt/beta-Catenin Responsive Enhancers Align with the MYC Promoter through Long-Range Chromatin Loops. *Plos One* 6: e18966.
- 47 Yochum GS, McWeeney S, Rajaraman V, Cleland R, Peters S, et al. (2007) Serial analysis of chromatin occupancy identifies beta-catenin target genes in colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3324-3329.
- 48 Bottomly D, Kyler SL, McWeeney SK, Yochum GS (2010) Identification of beta-catenin binding regions in colon cancer cells using ChIP-Seq. *Nucleic Acids Res* 38: 5735-5745.
- 49 Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, et al. (2002) Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol* 22: 1172-1183.
- 50 Leung JY, Kolligs FT, Wu R, Zhai Y, Kuick R, et al. (2002) Activation of AXIN2 expression by beta-catenin-T cell factor. A feedback repressor pathway regulating Wnt signaling. *J Biol Chem* 277: 21657-21665.
- 51 Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, et al. (2002) Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* 22: 1184-1193.
- 52 Niida A, Hiroko T, Kasai M, Furukawa Y, Nakamura Y, et al. (2004) DKK1,

a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* 23: 8520-8526.

53 González-Sancho JM, Aguilera O, García JM, Pendás-Franco N, Peña C, et al. (2005) The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* 24: 1098-1103.

54 Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, et al. (2004) Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 36: 417-422.

55 Miyamoto K, Sakurai H, Sugiura T (2008) Proteomic identification of a PSF/p54nrb heterodimer as RNF43 oncoprotein-interacting proteins. *Proteomics* 8: 2907–2910.

56 Shinada K, Tsukiyama T, Sho T, Fumihiko Okumura F, Asaka M (2011) RNF43 interacts with NEDL1 and regulates p53-mediated transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 404: 143-147.

57 Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA (2012) The CancerCell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483: 603-607.

58 Sanchez-Tillo E, Liu Y, de Barrios O, Siles L, Fanlo L, et al. (2012)

- EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cell Mol Life Sci* 69: 3429-3456.
- 59 Kahlert C, Lahes S, Radhakrishnan P, Dutta S, Mogler C, et al. (2011) Overexpression of ZEB2 at the invasion front of colorectal cancer is an independent prognostic marker and regulates tumor invasion in vitro. *Clin Cancer Res* 17: 7654-7663.
- 60 Sanchez-Tillo E, de Barrios O, Siles L, Cuatrecasas M, Castells A, et al. (2011) β -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 19204-19209.
- 61 Shirakihara T, Saitoh M, Miyazono K. (2007) Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by dEF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF- β . *Mol. Biol. Cell* 18: 3533-3544.
- 62 Cano A, Nieto MA. (2008) Non-coding RNAs take centre stage in epithelial-to-mesenchymal transition. *Trends Cell Biol* 18: 357-359.
- 63 Ishida-Takagishi M, Enomoto A, Asai N, Ushida K, Watanabe T, et al. (2012) The Dishevelled-associating protein Daple controls the non-canonical Wnt/Rac pathway and cell motility. *Nat Commun* 3: 859.
- 64 Nakaya Y, Suowati EW, Wu Y, Sheng G (2008) RhoA and microtubule

- dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation. *Nat Cell Biol* 10: 765-775.
- 65 Xing C, Zhou W, Ding S, Xie H, Zhang W, et al. (2012) Reversing effect of ring finger protein 43 inhibition on malignant phenotypes of human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther* 12: 94-103.
- 66 <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000108375/tissue>. Accessed 7 December 2013.
- 67 Seshagiri S, Stawiski EW, Durinck S, Modrusan Z, Storm EE, et al. (2012) Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. *Nature* 488: 660-664.
- 68 Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, et al. (2008) Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457: 608-611.
- 69 Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE, van den Born M, van Es JH, et al. (2012) Lineage Tracing Reveals Lgr5⁺ Stem Cell Activity in Mouse Intestinal Adenomas. *Science* 337: 730-735.
- 70 Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, et al. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* 133: 704–715.
- 71 Hunter SM, Gorringer KL, Christie M, Rowley SM, Bowtell DD, et al.

- (2012) Pre-invasive ovarian mucinous tumors are characterized by *CDKN2A* and *RAS* pathway aberrations. Clin Cancer Res 18: 5267-5277.
- 72 McAlpine JN, Wiegand KC, Vang R, Ronnett BM, Adamiak A, et al. (2009) HER2 overexpression and amplification is present in a subset of ovarian mucinous carcinomas and can be targeted with trastuzumab therapy. BMC Cancer 9: 433.
- 73 Matthaei H, Schlick RD, Hruban RH, Maitra A (2011) Cystic precursors to invasive pancreatic cancer. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 8: 141-150.
- 74 Zebisch M, Xu Y, Krastev C, McDonald BT, Chen M, et al. (2013) Structural and molecular basis of ZNRF3/RNF43 transmembrane ubiquitin ligase inhibition by the Wnt agonist R-spondin. Nat commun 4: 2787.
- 75 Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, et al. (2006) Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. Oncogene 25: 4116-4121.
- 76 Ogino S, Nosyo K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, et al. (2009) CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. Gut 58: 90-96.
- 77 Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, et al., (2009) Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. Nat Rev

Cancer 9: 489-499.

78 Barault L, Charon-Barra C, Jooste V, de la Vega MF, Martin L, et al.

(2008) Hypermethylator Phenotype in Sporadic Colon Cancer: Study on a Population-Based Series of 582 Cases. *Cancer Res* 68: 8541-8546.

79 Popat S, Hubner R, Houlston RS. (2005) Systematic Review of

Microsatellite Instability and Colorectal Cancer Prognosis. *J Clin Oncol* 23: 609-618.