

論文の内容の要旨

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

【背景】

大腸癌は世界で最も多い悪性腫瘍の一つであり、日本およびアメリカにおける悪性腫瘍による死亡原因の中で第3位を占めている。近年の分子生物学的研究の成果により、93%の大腸癌症例において、APC、 β -catenin などの Wnt 経路関連分子の変異が存在し、Wnt 経路の活性化がその発生、進行に深く関与していることが報告されている。

リングフィンガープロテイン 43 (RNF43) は、大腸癌および大腸腺腫で高発現している E3 ユビキチンリガーゼである。大腸癌細胞株へドミナントネガティブ TCF4 を導入することにより RNF43 の発現が低下することから、Wnt 経路の下流遺伝子であることが示唆されているが、詳細な発現調節メカニズムは解明されていない。また Yagyū らの報告で、RNF43 導入により細胞増殖の亢進が確認されており、癌の増殖との関連が示唆されている。最近の研究では、RNF43 により Wnt レセプターである Frizzled の internalization が誘導され、Wnt シグナルを抑制するとの報告がある。一方、膵嚢胞性腫瘍、粘液性卵巣癌、胆管癌などで *RNF43* 遺伝子に変異が発見されており、これらの癌に対しては抑制的に関与していることが示唆されている。このように、RNF43 のがんにおける役割はまだ十分に解明されていない。そこで本研究では、RNF43 の転写調節機構の解明と、その癌における機能を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

1. *CTNNB1* 遺伝子特異的な siRNA を大腸癌細胞株 HCT116 や SW480 に導入し、RNF43 発現量を測定した。
2. *RNF43* 遺伝子の 5'-flanking region、イントロン 1、イントロン 2 の一部を含むレポータープラスミドを作製し、Dual luciferase assay によりレポーター遺伝子の活性を測定した。
3. 大腸癌細胞株を用いて、抗 β -catenin 抗体あるいは抗 TCF4 抗体による ChIP アッセイを行った。
4. 3種類の *RNF43* 特異的 siRNA あるいはコントロール siRNA を WiDr 細胞に導入し、RNA を抽出して遺伝子発現マイクロアレイ解析を行った。
5. WiDr 細胞あるいは SW480 細胞に、tetracycline 誘導因子で制御される shRNA43 をレンチウイルスに組み込んで感染させた細胞 WiDr-shRNF43、SW480-shRNF43 を作製し、Doxycycline により RNF43 が抑制されることを確認した。
6. 細胞 WiDr-shRNF43、SW480-shRNF43 に Doxycycline 存在下で、E-cadherin、N-cadherin、

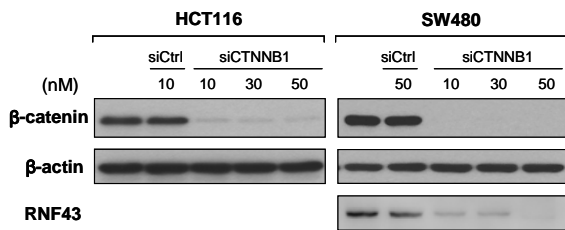
vimentin 抗体を用いた免疫染色を行った。

【結果】

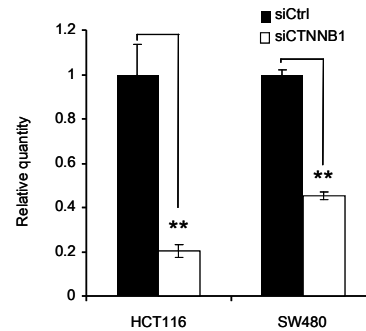
1. β -catenin による *RNF43* 遺伝子発現の調節領域の解明

ヒト大腸癌由来 HCT116 及び SW480 細胞に β -catenin 遺伝子特異的な siRNA で処理したところ、*RNF43* mRNA が HCT116 で約 80%、SW480 で約 56%減少した。この結果から *RNF43* が Canonical な Wnt 経路によって調節されていることが強く示唆された。

Western Blotting



qRT-PCR

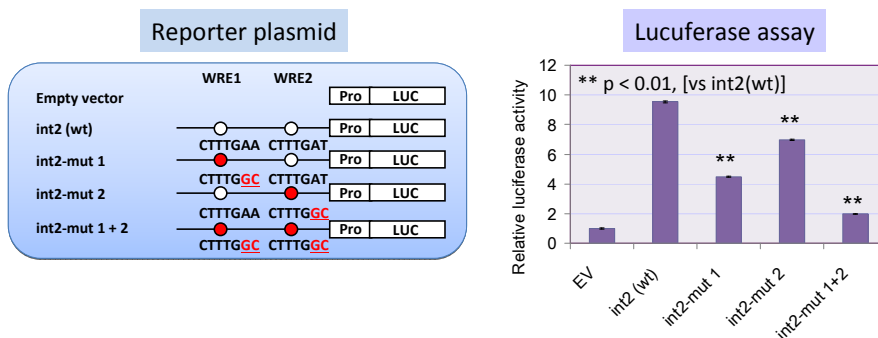


次に *RNF43* の転写調節領域を同定するために、5'-flanking region、およびイントロン 1 を含むレポータープラスミドを用いた Dual luciferase assay を行ったところ、これらの領域に含まれる転写調節領域は β -catenin により制御されていないことが判明した。次に、ENCODE データベースを利用して TCF4 結合領域および転写調節領域を検索したところ、イントロン 2 内に 2 つの TCF4 結合転写調節候補領域を発見した。そこでこの 2 領域を別々に含むレポータープラスミドを作製して、レポーター活性を測定したところ、いずれも β -catenin ノックダウンにより活性が有意に減少することが示された。これらのことから、この 2 領域が、canonical Wnt 経路による *RNF43* の転写制御に係わる可能性が示唆された。

2. TCF4/ β -catenin の結合領域の同定

上記 2 候補領域に、それぞれ 1 つずつの TCF/LEF 結合モチーフ (WRE1、WRE2) が存在していた。そこで WRE1 または WRE2 のみ、あるいは両方のモチーフに変異を導入した 3 種類の変異型レポータープラスミドを作製し、レポーター活性を比較したところ、野生型の配列を持つプラスミドに比べ、いずれの変異型配列を持つプラスミドの活性は低下した。また両方に変異をもつプラスミドの活性は更に低下した。これらの結果は、これら WRE1、WRE2 が *RNF43* の発現調節に関与していることを意味している。

次に TCF4 あるいは β -catenin に対する抗体を用いて ChIP アッセイを行ったところ、いずれの抗体でも WRE1、WRE2 を含む 2 領域の有意な濃縮が認められた。これらの結果から、イントロン 2 に存在する WRE1、WRE2 を含む領域に TCF4 及び β -catenin が結合し、*RNF43* の転写が調節されていることが明らかとなった。



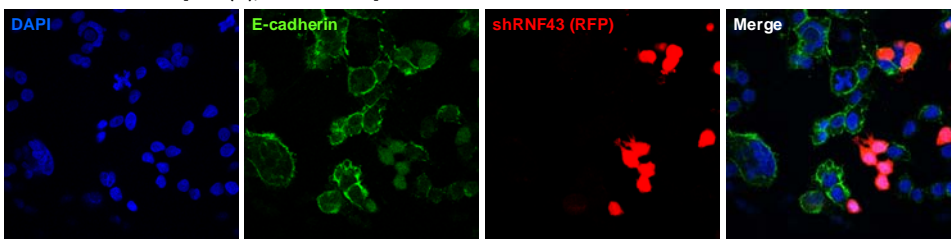
3. RNF43 が調節する遺伝子群の同定とがん細胞における RNF43 の機能解析

RNF43 の発現変化により転写制御される遺伝子群を同定するために、遺伝子発現解析を行った。野生型 RNF43 を高発現している WiDr 細胞に、異なる 3 種類の RNF43 特異的 siRNA (siRNF43) を導入し、遺伝子発現マイクロアレイによるプロファイル解析を行った。Control siRNA 処理に対して、siRNF43 処理により発現変動する遺伝子群を抽出した。これらの遺伝子のオントロジー解析を行ったところ、がんと上皮間葉移行 (EMT) の二つのオントロジーが選ばれた。さらにこれらの遺伝子群の中から、Gene Expression Omnibus (GEO) データベースの中で、大腸癌臨床検体において RNF43 発現量と相関関係の見られる遺伝子を抽出したところ、E-cadherin の発現抑制因子である ZEB2 が含まれていた。以上の結果は RNF43 と EMT との関連を示唆していた。

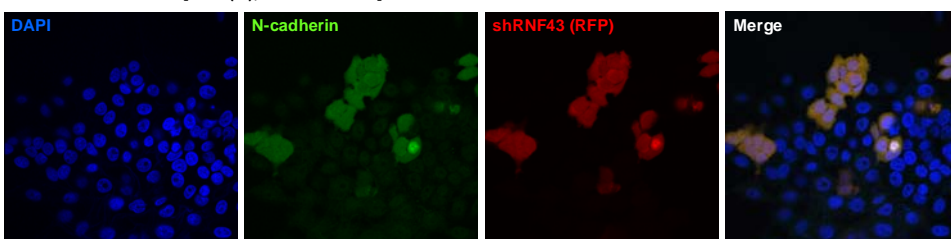
そこでテトラサイクリン誘導型 shRNF43 発現大腸癌株を作製し、RNF43 ノックダウンによる EMT マーカー (E-cadherin、N-cadherin、vimentin) の発現変動を細胞免疫染色により確認した。その結果、shRNF43 誘導細胞では上皮系マーカー E-cadherin が発現減少し、逆に間葉系マーカー N-cadherin および vimentin は発現上昇していた。これらの結果は、RNF43 が EMT を抑制していることを示唆した。

- Immunocytochemistry -

SW480-shRNF43 [Dox(+), E-cadherin]



SW480-shRNF43 [Dox(+), N-cadherin]



【まとめと考察】

今回の結果から、RNF43 が canonical Wnt 経路により直接的に発現制御されていること、その調節にはイントロン 2 の WRE1、WRE2 が関与することが示された。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。

近年の報告から、RNF43 は Wnt 経路をネガティブに制御すると考えられている。我々の研究結果は、RNF43 が canonical Wnt 経路の直接の下流遺伝子であることを示しており、ネガティブ・フィードバックとして機能していることを示唆している。また Wnt 経路により発現亢進された 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。ZEB2 は大腸癌を含む多くの癌での亢進が確認されている。大腸癌においては浸潤先端部における発現が亢進しており、その発現と予後との関連が報告されている。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。RNF43 の発現亢進が、どのようなメカニズムで ZEB2 を抑制するのか、また ZEB1 の発現も制御しているのかどうかは、今後の検討課題である。RNF43 は Frizzled の internalization を誘導し、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。しかし我々のマイクロアレイの結果では、RNF43 のノックダウンにより AXIN2 や c-Myc など canonical 経路の遺伝子発現が亢進していないことから、canonical 経路の関与は否定的である。RNF43 は Frizzled の internalization を促進することから、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や RhoA による EMT 制御などに関係するとの報告もある。したがって 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 を制御しているのかもしれないと考えている。また、RNF43 は腸上皮幹細胞と考えられている LGR5 陽性細胞において共発現しており、機能的ホモログである ZNRF3 とともにダブルノックアウトしたマウスでは腸上皮細胞の増殖亢進と腺腫の形成が確認されている。ステムセルの恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられている。

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かもしれない。さらなる解析によって、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。