

論文審査の結果の要旨

氏名 高橋 則彦

本論文は2つのテーマから構成されており、第1節ではリングフィンガープロテイン43 (RNF43) の発現調節機構について、第2節ではその機能について述べられている。

序文では、大腸癌の背景と臨床上的の問題点、大腸癌の発生機序と Wnt 経路の関連性、RNF43 に関する最近の知見について紹介している。RNF43 は大腸癌及び大腸腺腫で高発現していることが知られており、Wnt 経路の活性化により発現亢進することがわかっている。しかし、RNF43 の発現調節機構については不明であり、その詳細な解析が新たな知見となること述べている。また、RNF43 の機能については、細胞膜上の Wnt レセプターの分解を促進するネガティブ・フィードバック・レギュレーターであることが報告されているが、いくつかの核タンパク質との結合も報告されており、これまで知られていない機能を持つ可能性があると言及している。そこで RNF43 の発現調節機構と機能の解明を目的として研究が行われている。

第1節において、論文提出者はまず RNF43 プロモーター領域を介した β -catenin による転写調節機能についての検討を行っている。大腸癌細胞株において Wnt 経路のメディエーターである β -catenin をノックダウンすることにより、RNF43 の発現が減少することを示し、canonical Wnt 経路の下流であることを確認している。続いて、プロモーター配列を挿入したリポータープラスミドを用いて β -catenin による転写制御の有無を確認したが、プロモーター領域では制御されていないことが判明した。このことから、他の候補領域を選び出すため、ENCODE プロジェクトによる ChIP-seq データを参照し、TCF4 結合領域、RNA ポリメラーゼ II 結合領域、及びヒストン修飾パターンからイントロン2内の領域に絞り込んでいる。さらに候補領域内に TCF/LEF 結合モチーフ配列が2つ存在することを見出している。変異導入によりエンハンサー活性が減少することから、それらのモチーフ配列が重要であることを明らかにした。さらに、ChIP アッセイにより各モチーフ配列を含む2領域に TCF4 及び β -catenin が結合することを示した。以上のことから、RNF43 が canonical Wnt 経路の直接の標的であり、イントロン2内の2領域が発現調節に重要であることを明らかにしている。

第2節では、RNF43 の大腸癌における機能を解析するため、RNF43 をノックダウンした大腸癌細胞の遺伝子発現変動をマイクロアレイで解析している。Comprehensive functional analysis tool である GSEA 及び DAVID を用いて変動遺伝子群を解析し、それらが EMT と関連があることを導きだしている。テトラサイクリン誘導型 shRNF43 発

現大腸癌細胞株を作製し、RNF43 枯渇条件下での E-cadherin の減少、vimentin 及び N-cadherin の増加を蛍光免疫細胞染色法にて確認している。また、RNF43 ノックダウンによる変動遺伝子と大腸癌臨床検体の遺伝子発現データを用いて、*RNF43* と発現量が相関する遺伝子を抽出し、E-cadherin の発現抑制因子である *ZEB2* 遺伝子の発現量が逆相関することを明らかにした。このことから RNF43 は *ZEB2* の発現を抑制することにより、E-cadherin 発現を維持し、上皮細胞の性質を保っている可能性があると考えられている。

これらの結果は、Wnt 経路を介した EMT 制御の新たな機構の解明に大きく寄与するものであると考えられる。

なお、本論文の第一節は、山口 貴世志、池上 恒雄、藤井 智明、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。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上 1612 字