

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 13 年度 博士課程入学

氏 名 関谷 高史

指導教官 秋山 徹

論文題目 大腸癌発症初期段階における Wnt シグナル伝達経路活性化の意義

大腸癌は、正常腸管上皮細胞が複数のステップを経て、転移・浸潤能を有した悪性の大腸癌細胞へと変化することにより発症する。また、それらの各ステップは、大多数の大腸癌で見出される共通の遺伝子異常により生じることが明らかとなっている。それらの遺伝子異常は最近 15 年間で急速に解明され、大腸癌の発症は様々な原癌遺伝子の活性化および癌抑制遺伝子の不活性化により引き起こされることが明らかとなった。

癌抑制遺伝子 *APC* (Adenomatous polyposis coli) の失活は 80% 以上の大腸癌で確認され、大腸癌発症の最も初期段階で起こり、ポリープの発症を引き起こすことが明らかとなっている。*APC* は 2843 アミノ酸から成る巨大なタンパク質分子であり様々な機能を有しているが、癌抑制遺伝子としての最も重要な機能は、Wnt シグナル伝達経路の伝達因子である  $\beta$ -catenin の分解を促進することによる、Wnt シグナル伝達経路の抑制であることが近年明らかにされた。Wnt シグナル伝達経路はショウジョウバエや線虫に至るまで、種を越えて高度に保存されている経路で、リガンドである Wnt タンパク質が受容体 Fz に結合することにより活性化が引き起こされ、その結果  $\beta$ -catenin の安定化が起こる。最終的に、安定化を受けた LEF/TCF ファミリーの転写因子と結合し、標的遺伝子特異的な転写活性化を引き起こす。これら発現誘導を受けた標的遺伝子が、Wnt シグナルの生理機能を担っていると認識されている。興味深いことに、9 割以上の大腸癌では *APC* の失活型遺伝子変異や  $\beta$ -catenin の活性化型遺伝子変異により、Wnt リガンド非依存的な、シグナル伝達経路の恒常的な活性化が生じていることが明らかとなっている。

Wnt シグナル伝達経路の転写標的遺伝子の探索

以上の事実より、Wnt シグナル伝達経路は大多数の大腸癌細胞で恒常的な活性化を起こしていることが明らかとなっており、その結果、Wnt シグナル伝達経路の転写標的遺伝子も大腸癌細胞で発現の亢進を起こしている。したがって標的遺伝子の探索は国内外を問わず精力的に進められ、数々の候補遺伝子が単離されてきた。しかし、癌の発症に重要な転写標的遺伝子は一部が単離されたにすぎない。そこで本研究では癌化に重要な役割を果たす新たな標的遺伝子の探索を行った。

本研究では、Wnt シグナル伝達経路に活性化のみられる大腸癌細胞株に、Wnt シグナル伝達経路の抑制因子 ICAT を発現したときに発現の減少する遺伝子をマイクロアレイ法を用いて探索した。ICAT 発現による Wnt シグナル伝達経路の抑制は、大腸癌細胞に増殖抑制や細胞死を誘導することが先の研究で明らかとなっている<sup>1)</sup>ため、ICAT により発現抑制を受ける遺伝子群は、大腸癌の発症、および大腸癌の増殖や生存に重要である可能性が高いと考えられる。マイクロアレイ法による探索の結果、単離された遺伝子には、既に Wnt シグナル伝達経路の標的遺伝子として報告されている *c-MYC*, *AXIN2*, *BMP4*, および *BCL-X<sub>L</sub>* とともに、TGF- $\beta$ シグナル伝達経路の負の制御因子である *BAMBI* が含まれていた<sup>2)</sup>。TGF- $\beta$ シグナル伝達経路は、TGF- $\beta$ 受容体や、伝達因子 *SMAD2*, *SMAD4* の遺伝子変異等により、大腸癌の発症段階で高頻度に失活を起こしているため、*BAMBI* の発現誘導は興味深いと考えさらに解析を進めた。

#### Wnt シグナル伝達経路による BAMBI 発現の制御

*BAMBI* の発現が Wnt シグナル伝達経路により制御されることを確認するために、まず、大腸癌細胞に ICAT やドミナントネガティブ型 TCF を発現して Wnt シグナル伝達経路を抑制した時の *BAMBI* の発現変化を解析した。その結果、準定量的 RT-PCR およびウエスタンブロッティングにより、*BAMBI* の発現は大腸癌細胞で Wnt シグナル伝達経路を抑制することにより著明に減少することが明らかとなった。次に、Wnt シグナル伝達経路に活性化の見られない細胞で、経路を活性化した場合の *BAMBI* の発現変化を解析した。その結果、COS-1 細胞に安定化型  $\beta$ -catenin を発現させたときに、*BAMBI* の発現量は mRNA、およびタンパク質の両方で上昇することが確認された。さらに経時的に *BAMBI* の発現を解析したところ、*BAMBI* の mRNA 発現は  $\beta$ -catenin の発現に迅速に応答することが明らかとなった。

### ヒト *BAMBI* 遺伝子上の Wnt シグナル伝達経路応答部位の同定

次に、ヒト *BAMBI* 遺伝子上のどの部位が Wnt シグナル伝達経路に応答するかを解析した。ヒト *BAMBI* 遺伝子の塩基配列を解析した結果、転写開始点上流 3.4 kb 以内に 3 カ所、イントロン 1 に 5 カ所の LEF/TCF 結合コンセンサス配列が確認された。転写開始点上流部位およびイントロン 1 部位をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポーターコンストラクトを作製し、COS-1 細胞で  $\beta$ -Catenin 発現に対する応答を解析したところ、イントロン 1 が  $\beta$ -Catenin 発現に対し著明な応答を示すことが確認された。一方、転写開始点上流域は  $\beta$ -Catenin 発現に対し全く応答を示さなかった。次に、Int1-luc の 5 カ所の結合コンセンサス配列全てに 3 塩基置換により変異を導入したところ、応答は 4 割程度減少したが、まだ応答は確認された。さらに、エキソン 1 の直後に 4 カ所、密に存在する、結合コンセンサス配列と 1 塩基異なる配列に着目し、その全てに変異を導入したところ、半分程度まで応答は減少したが、まだ応答は確認された。これらの結果より、*BAMBI* 遺伝子はイントロン 1 で Wnt シグナルに応答することが確認されたが、この応答の一部は LEF/TCF 以外の他の転写因子を介して制御される可能性も示された。

### *BAMBI* は Wnt シグナル伝達経路に活性化の見られる癌で発現亢進を起している

これまでの実験から、*BAMBI* が  $\beta$ -catenin により転写活性化を受けていることが明らかとなった。そこで、実際に *BAMBI* の mRNA やタンパク質の量が、大腸癌で、安定化された  $\beta$ -catenin により上昇しているかどうかを解析した。まず、*BAMBI* の mRNA の発現を大腸癌組織と、周囲の正常大腸組織との間で比較した。18 検体分の大腸癌組織、および同一患者の癌組織周囲の正常大腸粘膜について準定量的 RT-PCR 法を行ったところ、*BAMBI* の mRNA 量は、18 検体中 13 検体で、正常組織と比較して癌組織で発現が上昇していることが確認された。興味深いことに、Wnt シグナル伝達経路の活性化のマーカーである *AXIN2* で正常組織と癌組織の間で差の見られなかった検体、もしくは癌組織で発現の低下が確認された検体では、同じく *BAMBI* でも発現に差は見られないか、もしくは癌組織で発現の低下が確認された。

次に、大腸癌組織と周囲の正常大腸組織での *BAMBI* タンパク質の発現を免

疫組織化学染色法により比較した。その結果、正常組織と比較して癌組織から、より強い蛍光が検出された。また、癌組織に着目すると、周囲の結合組織と比較して、癌化した上皮組織でより強い発現が確認された。

#### BAMBI は TGF- $\beta$ が誘導する増殖抑制を阻害する

BAMBI が TGF- $\beta$ シグナル伝達経路の抑制因子として機能すること、TGF- $\beta$ シグナル伝達経路は大腸上皮において癌抑制シグナル伝達経路として機能することから、BAMBI は TGF- $\beta$ シグナルが引き起こす増殖抑制およびアポトーシス誘導作用を抑制することにより細胞の癌化を促進している可能性があると考えられる。TGF- $\beta$ は、多くの培養細胞の増殖を抑制することが確認されており、本実験で用いた前立腺癌細胞株 DU145 も、培地中に TGF- $\beta$ を加えることにより増殖抑制を受ける。しかし、BAMBI を発現してコロニーアッセイを行った結果、DU145 細胞は BAMBI の発現により TGF- $\beta$ が誘導する増殖抑制に抵抗性を獲得することが明らかとなった。

#### まとめ

本研究では、Wnt シグナル伝達経路の活性化により安定化を受けた $\beta$ -catenin が BAMBI の発現を誘導することを確認した。さらに、BAMBI は Wnt シグナル伝達経路に活性化の見られる大腸癌や肝癌で発現が亢進していること、TGF- $\beta$ が誘導する増殖抑制作用を打ち消す働きを持つことが本研究で明らかとなった。Wnt シグナル伝達経路および TGF- $\beta$ シグナル伝達経路はそれぞれ大腸癌の発症において重要な役割を担っている経路であり、共に発生過程や成体の恒常性の維持においても必須の役割を果たしている。よって本研究はこれらの生命現象を解明する新しい手掛かりを与えるものであると考えることができる。さらに、BAMBI のモノクローナル抗体を作製することにより大腸癌の診断や治療等の応用面での効果も期待でき、今後の展開に期待がもたれる。

1) Sekiya T., Nakamura T., Kazuki Y., Oshimura M., Kohu K., Tago K., Ohwada S., Akiyama T. (2002) Overexpression of Icat induces G2 arrest and cell death in tumor cell mutants for adenomatous polyposis coli,  $\beta$ -catenin, or Axin. *Cancer Res.* 62: 3322-3326

2) Sekiya T., Adachi S., Kohu K., Yamada T., Higuchi O., Furukawa Y., Nakamura Y., Nakamura T., Tashiro K., Kuhara S., Ohwada S., Akiyama T. (2004) Identification of BAMBI, an inhibitor of TGF- $\beta$  signaling, as a target of the  $\beta$ -catenin pathway in colorectal tumor cells. *J. Biol. Chem.* in press