

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 _____ 関谷 高史

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。

本発表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。まず、本発表では、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。探索の結果、単離された遺伝子には、Wnt シグナル伝達経路の既知の標的遺伝子である *c-MYC*, *AXIN2*, *BMP4*, および *BCL-X_L* とともに、TGF-β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。TGF-βシグナル伝達経路は、TGF-β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。

次に、*BAMBI* の発現が、mRNA, タンパク質共に Wnt シグナルを活性化させたときに上昇すること、Wnt シグナルを抑制したときに減少することを確認したことを明らかとした。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 β -catenin の発現に迅速に応答することを明らかとした。

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 力所、イントロン 1 に 5 力所の 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 β -Catenin 発現に対する応答を解析したところ、イントロン 1 が β -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 β -Catenin 発現に対し全く応答を示さなかった。次に、イントロン 1 の LEF/TCF 結合配列に点変異を加え同様の実験を行ったところ、Wnt シグナルに対する応答は半分程度まで減少したが、いまだ無視できない活性を検出した。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した。

次に、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 β -catenin により上昇しているかどうかを解析した。その結果、*BAMBI* の mRNA 量やタンパク質量正常組織と比較して癌組織で発現が上昇していることを確認した。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。

BAMBI が TGF- β シグナル伝達経路の抑制因子として機能すること、TGF- β 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- β 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た。TGF- β 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- β 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- β 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。

本発表では、Wnt シグナル伝達経路の活性化により安定化を受けた β -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- β 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- β 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られ、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。