

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 辻 真之介

癌抑制遺伝子 APC は家族性大腸癌の原因遺伝子であり、散发性の大腸癌においても 70% 以上で変異が見出されている。APC の変異は Wnt シグナルの亢進を引き起こすことで、大腸癌発症の初期段階に重要であることが知られている。APC は Rac1 及び Cdc42 特異的な GEF である Asef ファミリー (Asef と Asef2 : 以下 Asefs) と結合し、その GEF 活性を正に制御することで上皮細胞や血管内皮細胞の運動を制御している。また、大腸癌細胞では変異 APC が Asefs を恒常的に活性化し、異常な運動能を誘引していることが分かっている。しかし、実際の大腸癌の発症における Asefs の重要性に関しては不明であった。そこで本研究の第 1 章では APC の変異による腸管での腫瘍形成における Asefs 生理的意義を明らかにすることを目的として解析を行った。

APC に変異を持つ大腸癌のモデルマウス ($Apc^{Min/+}$) と $Asef^{+/+}Asef2^{-/-}$ マウスをかけあわせることで、Asefs の欠損した $Apc^{Min/+}$ マウスを作製した。その結果、Asefs の欠損によって $Apc^{Min/+}$ マウスの腸管で発生する腫瘍の数が顕著に減少したことから、APC の変異による腫瘍形成に Asefs が重要な機能を担っていることが明らかとなった。

次に腫瘍形成において Asefs が担っている機能を分子レベルで明らかにするため、大腸癌細胞を用いた *in vitro* の解析を行った結果、Asefs は変異 APC によって活性化されることで JNK シグナルを活性化し、癌の浸潤・転移に関わる MMP-9 の発現を誘導することを見出した。さらに、Asefs による MMP-9 の発現亢進が大腸癌細胞の浸潤を促進することが明らかとなった。そこで、腸管での腫瘍形成における MMP-9 の生理的重要性を検証するため、 $Apc^{Min/+}$ マウスに MMP-9 阻害剤を腹腔投与した結果、腫瘍形成の抑制が確認された。また、Asefs を欠損させた $Apc^{Min/+}$ マウスの腫瘍では血管新生が抑制されていることを見出した。以上の結果より、MMP-9 の発現や腫瘍血管新生における Asefs の機能は APC の変異による腫瘍形成メカニズムの一端を担っていると考えられた。

第 1 章では APC の変異による腫瘍形成における Asefs の機能解析を行ったが、近年大腸癌の発症には LGR5 陽性の腸管幹細胞における APC の変異が必要であることが明らかとなってきた。LGR5 は大腸癌で発現が亢進している 7 回膜貫通型タンパク質であることが知られていたが、リガンドや下流のシグナルは未知であった。LGR5 を shRNA により安定的に発現抑制した大腸癌細胞株を樹立したところ、腫瘍形成の顕著な低下が観察された。したがって LGR5 は腫瘍形成の起源となる腸管幹細胞のマーカーとしてだけでなく、機能的にも大腸癌細胞の腫瘍形成能に関与していると考えられた。そこで第 2 章では siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングにより、LGR5 の上流で大腸癌細胞の腫瘍形成能に関与する因子を探索し、その機能解析を行った。

スクリーニングの結果より、LGR5 の転写を直接制御する転写因子 GATA6 を同定した。

GATA6は腸管幹細胞においても発現が確認されたことから、大腸癌細胞だけでなく正常な幹細胞においてもLGR5の発現を制御している可能性が考えられた。また、GATA6の発現はLGR5と同様に大腸癌で上昇しており、その発現を抑制することで大腸癌細胞の腫瘍形成能は低下した。上述した結果は、GATA6によるLGR5の発現上昇が大腸癌細胞の腫瘍形成能に深く関わっていることを示している。さらに、microRNAによるGATA6の発現調節の可能性についても明らかにした。

以上に示した本研究では、癌抑制遺伝子APCの変異による腫瘍発生における新たな分子メカニズムをin vivoおよびin vitroにおける解析を行うことで明らかにし、また腸管幹細胞のマーカールとして知られていたLGR5が大腸癌細胞の腫瘍形成に機能的に関与していることを示し、さらにその上流における発現調節のメカニズムの一端を明らかにすることができた。また、本研究によって得られた知見は、AsefsやmicroRNA、またLGR5といった分子が大腸癌に対する抗癌剤の新たな標的因子になりうる可能性を示している点において、臨床的にも重要な研究成果だといえる。なお、本論文は川崎善博、室谷研、古川史織、秋山徹との共同研究であるが、いずれも論文提出者が主体となって分析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。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の単位論文として価値あるものと認めた。