

氏 名	ます い おさむ 増 井 修
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2504 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 病 理 系 専 攻
学位論文題目	RelA suppresses the Wnt/ β -catenin pathway without exerting <i>trans</i> -acting ability. (RelA による Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路の抑制に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 成 宮 周 教 授 野 田 亮 教 授 下 遠 野 邦 忠

論 文 内 容 の 要 旨

細胞内シグナル伝達経路は、環境の変化などに対して細胞が反応するまでの過程を媒介するシステムである。現在までに数多くの細胞内シグナル伝達経路の存在が明らかにされており、それらの中にはクロストークすることによって互いに機能を調節している例も知られている。本研究では、発生過程や発がんなどの生命現象に関与することが知られている二つの細胞内シグナル伝達経路、すなわち Wnt/ β -catenin 経路と NF- κ B 経路の両者の間においてシグナルのクロストークが存在することを新たに明らかにして、その分子機構の解析をおこなった。

HepG2 細胞株は β -catenin 遺伝子に変異を有しており、 β -catenin/Tcf 依存的なレポーター遺伝子の恒常的に高い発現を示した。また、HEK293 や Saos2 などの細胞株に β -catenin を強制発現させると、 β -catenin/Tcf 依存的なレポーター遺伝子の発現が亢進した。しかしながら、これらの細胞を TNF α で処理すると、このようなレポーターの発現が強く抑制されることが観察された。TNF α は NF- κ B シグナルを活性化することが知られており、また、TNF α による β -catenin/Tcf 依存的なレポーター遺伝子の発現抑制は、I κ B α を同時に発現させることによって解除されることから、TNF α による抑制には NF- κ B シグナルが重要な役割を果たしていると考えられた。そこで、NF- κ B 経路の種々の構成分子を強制発現させて同様の実験をおこなったところ、全て TNF α と同様に抑制的に作用することがわかった。中でも RelA (p65) が最も強い抑制効果を示した。

Wnt/ β -catenin 経路の下流標的遺伝子の一つとして *siamois* が報告されている。RelA はこの *siamois* のプロモーター領域からの β -catenin/Tcf 依存的な転写に対しても抑制的に作用したことから、RelA は細胞内の β -catenin/Tcf 経路の下流遺伝子に対しても抑制的に作用することが示唆された。

これらの結果から NF- κ B 経路が Wnt/ β -catenin 経路に対して抑制的にクロストークすることが明らかとなったが、Wnt/ β -catenin 経路から NF- κ B 経路への逆方向のクロストークは観察されなかった。このクロストークは RelA が β -catenin の持つ転写活性化能を強く抑制することにより生じていると考えられた。

この現象の詳細な分子機構を解明するために、本研究ではさらに以下のような実験をおこなった。Wnt/ β -catenin 経路において β -catenin が転写活性化因子として機能を発揮するためには、核内に移行して Tcf/LEF family タンパク質と共に標的 DNA に結合することが必要である。そこで、RelA がこれらのどの段階で作用しているのかを明らかにするためにゲルシフトアッセイをおこなった。その結果、RelA は β -catenin の核移行や β -catenin/Tcf/DNA 複合体の形成能に変化を与えないことがわかった。従って、RelA による抑制作用は β -catenin/Tcf 複合体が標的 DNA に結合した後の段階で生じている可能性が考えられた。

RelA は NF- κ B を構成する分子の一つで、その構造内に転写活性化領域を持っており、NF- κ B は DNA 上の κ B エlement に結合して下流遺伝子の転写の活性化を誘導する。そこで、 β -catenin/Tcf 依存的な転写の抑制に働く RelA 分子内の責任領域を明らかにするために、いくつかの RelA の変異体を作製して、それらの β -catenin/Tcf 依存的なレポーターへの

影響を調べた。その結果、少なくとも RelA の転写活性化領域はこの抑制には必要無いことがわかった。つまり Wnt/ β -catenin 経路の抑制は NF- κ B の活性化によって発現誘導される下流遺伝子による間接的な効果によって引き起こされるものではないことを意味すると考えられた。

以上の結果から、NF- κ B による Wnt/ β -catenin 経路の抑制には RelA が重要な役割を果たしているが、その転写活性化能は必要ではなく、転写活性化領域を除く他の領域が機能を発揮することが明らかになった。

本研究で示されたように、TNF α や RelA は培養細胞において Wnt/ β -catenin 経路を強力に抑制することから、生体内においても Wnt/ β -catenin 経路の機能（発生段階での体軸形成、細胞の増殖を促進する機能など）を調節する役割を担っている可能性が推測された。

論文審査の結果の要旨

Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路は大腸がんや肝がんなどにおいて高頻度に異常が生じていることが報告されており、このシグナルが恒常的に活性化する結果、細胞の悪性化が誘導されると考えられている。本研究の目的は、このシグナル伝達経路に影響を与える因子を探索することである。

このシグナル伝達経路が活性化しているモデル系として、 β -catenin 遺伝子変異細胞や、 β -catenin 遺伝子を強制発現させた培養細胞を用いた。この細胞に NF- κ B シグナル伝達経路を促進する処理をほどこすと β -catenin/Tcf 依存的な転写を抑制することを見出した。さらに、その作用点を解析した結果、NF- κ B シグナルの下流に位置する RelA (p65) が β -catenin/Tcf 複合体に対して機能的抑制をおよぼしていることがわかった。RelA は NF- κ B の主要な構成成分であり、転写活性化因子として機能している。したがって、この抑制は NF- κ B により転写が誘導される遺伝子群により生じている可能性が疑われたが、転写活性化能を失った RelA 変異体を用いた実験から、その可能性は否定された。また、RelA は Wnt/ β -catenin シグナルが恒常的に活性化した細胞の増殖を抑制した。

これらの結果から、NF- κ B (RelA) は Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路に対して抑制的にクロストークし、このシグナルに依存した細胞の増殖に影響を与える可能性が考えられた。

以上の研究から得られた知見は Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路の理解に貢献するだけでなく、このシグナルに依存したがん細胞の増殖制御に結びつくものと考えられる。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成14年2月25日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。