The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Construction of a novel DNA decoy that inhibits the oncogenic β-catenin/T-cell factor pathway
Author(s)	関, 洋介
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47452
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【50】

氏　　名	関（せき）　洋（よう）介（すけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２０６５２　号
学位授与年月日	平成 18 年 9 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学　位　論　文　名	Construction of a novel DNA decoy that inhibits the oncogenic β-catenin/T-cell factor pathway （β-catenin/TCF 発癌シグナル伝達経路を抑制する新規 DNA decoy の作製）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　門田　守人 （副査） 教　授　吉川　秀樹　　教　授　野口眞三郎

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

大腸癌をはじめとするヒトの消化器癌では、β-catenin/TCF シグナル伝達経路の異常活性化が高率に起きている。近年、c-myc、cyclin D1、MMP7、MT1-MMP など癌の発生・進展に重要な役割を果たすと考えられていた遺伝子のプロモーターが転写因子 TCF/LEF（以下 TCF）の標的であることが次々と報告され、β-catenin/TCF シグナル伝達経路の活性化が、これら癌関連遺伝子を誘導する共通のメカニズムとなっていることが明らかになってきた。

デコイ（おとり）型核酸医薬は、転写因子の標的プロモーターへの結合を競合的に阻害し、標的遺伝子の発現抑制に働く。我々は、TCF が標的とする結合塩基配列に注目し、おとりの二本鎖 DNA（TCF decoy）を作成することによりβ-catenin/TCF シグナル伝達経路を阻害し、下流遺伝子の発現誘導を一挙に遮断できる可能性があると考えた。本研究では、まず HEK293 細胞（非腫瘍細胞）にβ-catenin 遺伝子を導入しβ-catenin/TCF シグナル活性化モデルを構築し、これを効果的に抑制する二本鎖 DNA（TCF decoy）を設計した。ついでこれが腫瘍細胞の内因性β-catenin/TCF 活性を競合阻害できるか否かを検討した。

〔　方法ならびに成績　〕

Ⅰ．β-catenin/TCF 活性亢進モデルの作成

HEK293 細胞に、β-catenin cDNA を導入しβ-catenin/TCF 活性化モデルを作成した。免疫染色によりβ-catenin 導入後に細胞質、核にβ-catenin が蓄積すること確認した。Reporter assay により TCF 反応性 reporter 活性、並びに下流遺伝子（cyclin D1、c-myc、MMP7）のプロモーター活性の増加を認め、RT-PCR 法により下流遺伝子群の mRNA の発現亢進を確認した。

Ⅱ. TCF-decoy の設計

下流遺伝子 cyclin D1 および c-myc の promotor 領域内にある TCF binding element 配列情報をもとに、長さの異なる double strand TCF decoy（6、9、12、14、18mer）を作成し、HEK293 モデル細胞にリポフェクション法により導入した。その結果、14mer と 18mer の TCF decoy がコントロール ds DNA と比べて TCF 活性を抑制したが、

このうち double strand hybrid が安定な 18mer を採用した。

Ⅲ. 遺伝子導入効率についての検討

目的細胞への遺伝子導入効率と細胞内の局在をみるために、FITC で標識した TCF decoy を、HEK293 モデル細胞ならびに大腸癌細胞株 HCT116 に導入し、経時的に共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、いずれの細胞においても、導入後 6 時間目に、ほぼ全ての細胞の核内に強い蛍光色素の集積を認めた。また TCF decoy は導入後 72-96 時間の間細胞内に留まっていた。

Ⅳ. 腫瘍細胞での効果

⑴ 腫瘍細胞として通常の HEK293 の約 16 倍の TCF 活性を示す大腸癌細胞株 HCT116 を用いた。

⑵ Mobility shift assay により TCF decoy は HCT116 より抽出した β-catenin/TCF を含む核蛋白と TCF 結合塩基プローベとの結合を競合的に阻害することを確認した。

⑶ HCT116 に 0.1 μM の TCF decoy 作用させると、下流遺伝子 cyclin D1、c-myc、MMP7 のプロモーター活性は対象コントロールを作用させた場合と比較して有意に低下した。

⑷ RT-PCR による mRNA レベルの検討では、TCF decoy を導入した HCT116 では、標的遺伝子群の発現抑制を認めた。

WST-1 アッセイにより、細胞増殖抑制効果を検討した。HCT116 において、TCF decoy（50 nM）はコントロールと比較して、有意な細胞増殖抑制効果を示した。一方、β-catenin を強制発現させない通常の HEK293 では、細胞増殖抑制効果を認めなかった。

〔 総　　括 〕

我々が設計した TCF decoy は腫瘍細胞においても β-catenin/TCF 複合体の転写活性を競合的に阻害し、複数の下流標的遺伝子の転写因子活性を同時に抑制することが示された。また非癌細胞には影響を与えず癌細胞の増殖のみを抑制した。以上のことから、本治療は消化器癌に対する、有効かつ毒性の少ない新しい分子標的治療戦略となる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

大腸癌をはじめとするヒトの癌では、しばしば β-catenin の蓄積が起きており、TCF（T-cell factor）転写因子の異常活性化を通じて各種の癌関連遺伝子（cyclin D1、c-myc、MMP7 など）の転写亢進を引き起こす。本研究では、転写因子 TCF の下流遺伝子プロモーターへの結合を競合阻害する合成オリゴヌクレオチド（DNA デコイ）を作成し、癌で活性化されている β-catenin/TCF シグナル経路を遮断することを目的とした。先ず β-catenin cDNA を非癌細胞 HEK293 に遺伝子導入した β-catenin/TCF 活性化モデルを作成し、TCF binding element の配列から想定される複数の DNA 候補から TCF 転写活性を効率よく阻害する 18mer の特異配列を選別した。この DNA デコイは、大腸癌細胞の核に取り込まれ、下流癌関連遺伝子の転写を効率よく抑制した。また大腸癌細胞の増殖を有意に抑制したが、非癌細胞 HEK293 の増殖には影響を与えなかった。

本研究では、β-catenin/TCF 発癌シグナル伝達経路を抑制する DNA decoy を初めて作製し、消化器癌に対する有効かつ毒性の少ない新しい分子標的治療戦略の可能性を示唆するものであり、学位の授与に値すると考えられる。