

## [課程－ 2 ]

## 審査の結果の要旨

氏名 中田 亮

本研究は、Wnt シグナルを活性化する幹細胞増殖因子 R-spondin の代替低分子化合物を同定することで、再生医療薬の新規シーズ探索を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1.  $\beta$ -galactosidase 断片コンプリメンテーション法を用いて、上皮系幹細胞において Wnt シグナルを膜レベルで増強する機構 R-spondin - LGR4/6 - ZNRF3/RNF43 系の構成分子 ; LGR4/6 と ZNRF3/RNF43 の会合をモニターするアッセイシステムを構築した。このシステムを利用して、東京大学薬学部創薬機構が保有する低分子化合物コアライブラリ 1 万種類をスクリーニングし、LGR4/6 と ZNRF3/RNF43 の会合を増強する物質 (T-710065) を発見した。全 20 万種ライブラリ中に存在する類似化合物の活性を調べ、さらに強い活性を示す化合物 (T-710066) を発見し、その作用が R-spondin3 非依存的であることを示した。
2. 定量的 PCR 法による遺伝子発現定量で、HEK293T 細胞には LGR4 と ZNRF3 が発現していることを示し、この細胞に Wnt/ $\beta$ -catenin reporter plasmid を一過性に発現させると、R-spondin3 による Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを定量評価できることが分かった。このアッセイシステムにおいて R-spondin3 増強物質 T-710066 は Wnt3a 依存的に Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを活性化させることを示した。
3. ZNRF3 decoy を一過性に発現させた HEK293T 細胞アッセイシステムおよび、CRISPR/CAS9 系で ZNRF3 を knockout した HEK293T 細胞アッセイシステムを用いて 2 種類の機能欠失実験を行い、そのどちらでも R-spondin3 増強物質 T-710066 による Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化が消失することを示した。

以上、本研究は  $\beta$ -galactosidase 断片コンプリメンテーション法を用いたアッセイシステムを構築し、低分子化合物ライブラリをスクリーニングすることで、Wnt シグナルを活性化する幹細胞増殖因子 R-spondin3 の代替低分子化合物を同定した。今後、取得した化合物あるいはその誘導体は LGR4/6-ZNRF3/RNF43 系が発現している消化管組織や血管組織領域における再生医療などの発展に貢献する可能性が大きく、学位の授与に値するものと考えられた。