

論文内容の要旨

論文題目 大腸癌細胞における新規遺伝子の発現と
アポトーシス感受性に関する検討

指導教員 名川 弘一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

腫瘍外科学専攻

氏名 小西 毅

背景と目的

hRFI は、アポトーシス制御蛋白 hTID-1 を bait として用いた two-hybrid yeast screening 法により単離された新規遺伝子である。hRFI は C 末側に、強力な抗アポトーシス蛋白である XIAP と相同性の高い Ring Finger domain を有する。さらに、230-233 アミノ酸基に caspase-3 の特異的認識切断配列を有する。これらの構造的特徴から、hRFI はアポトーシス制御に関連した機能を持つことが示唆される。実際に、hRFI を一過性に過剰発現させた Hela 細胞において、tumor necrosis factor- α (TNF- α) 処理による細胞死が抑制されることが示されている。しかし、hRFI の発現が細胞のアポトーシスや caspase 活性に及ぼす影響はこれまで直接検討されておらず、その細胞死抑制の機序やアポトーシス抑制作用の有無は未だ不明である。

hRFI の発現は、大腸癌の発生机序の主要な経路と考えられている adenoma-carcinoma sequence において、正常粘膜から腺腫、癌に進展するに伴い、徐々に増加することが示されている。アポトーシス抑制形質の獲得が癌の発生メカニズムにおいて重要な要素の一つであることを考え合わせると、hRFI はアポトーシス抑制機能を介して、大腸癌の発生、進展に重要な役割を担っている可能性が示唆される。そこで本研究では、hRFI が大腸癌細胞におけるアポトーシス感受性に与える影響について、検討を行った。

方法・結果

1) hRFI が大腸癌細胞における外因性アポトーシス経路に与える影響

まず hRFI が外因性アポトーシス経路に与える影響を検討した。大腸癌細胞株 8 種類における hRFI 蛋白の発現を Western blotting により検討したところ、hRFI 蛋白はすべての大腸癌細胞株において発現していたが、その発現量は細胞ごとにさまざまであった。これらの大腸癌細胞株の中で比較的 hRFI の発現量が少なく、かつ文献的に TNF- α によるアポトーシスへの感受性が高いことが知られている HCT116 を用いて、hRFI を過剰発現した安定細胞株(HCT116/hRFI)と、LacZ を用いたコントロール安定細胞株(HCT116/LacZ) を作製した。MTS assay による細胞増殖の測定、フローサイトメトリーによる細胞周期の測定では、2つの細胞株における差は認めなかった。次に、TNF- α と CHX によりアポトーシスを誘導し、nuclear staining assay によるアポトーシスの形態学的観察、および AnnexinV-FITC と PI による染色後、フローサイトメトリーによるアポトーシス率の解析を行った。この結果、HCT116/hRFI では HCT116/LacZ に比べて有意にアポトーシスが減少していた。さらに、TRAIL を用いた実験でも、同様に HCT116/hRFI においてアポトーシスは抑制されていた。次に、TNF- α と CHX を用いてアポトーシスを誘導し、各細胞における caspase-3、-8、-9 活性を測定したところ、HCT116/hRFI では HCT116/LacZ に比べて caspase-3、-8、-9 活性のすべてが抑制されていた。最後に、アポトーシス感受性の差異が安定株作製過程で偶然生じた clonal effect である可能性を否定するため、hRFI に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドを用いて HCT116/hRFI における hRFI の過剰発現を再抑制し、hRFI によるアポトーシス抑制効果が消失するか検討を行った。この結果、hRFI をアンチセンスした細胞ではコントロールに比べて有意にアポトーシスが増加し、アポトーシス感受性が回復した。

2) hRFI が大腸癌細胞における内因性アポトーシス経路に与える影響

次に、大腸癌の治療において広く使用されている 5-fluorouracil (5-FU)を用いて、hRFI が内因性アポトーシス経路に与える影響とその機序を検討した。hRFI 発現レベルの異なる 2 種類の hRFI 過剰発現安定株(HCT116/RFI-high、HCT116/RFI-low)と、1 種類のコントロール(HCT116/LacZ)を作製した。5-FU を用いてアポトーシスを誘導し、1)と同様にアポトーシス率の解析を行ったところ、hRFI 発現量の多い細胞ほど有意にアポトーシスが減少していた。48 時間の 5-FU 処理に対する IC₅₀ 値を計算したところ、HCT116/RFI-high、HCT116/RFI-low の IC₅₀ 値は、HCT116/LacZ の各々約 4 倍、2.5 倍であった。次に、hRFI が内因性アポトーシス経路に与える影響を検討するため、5-FU 処理前後の細胞質分画抽出液を採取し、ミトコンドリアから細胞質へのチトクロームC放出量を Western blotting により測定した。この結果、hRFI 発現量が多い細

胞ほどチトクロームC放出が抑制されていた。さらにチトクロームC放出よりも下流の反応である caspase-9、caspase-3 の活性を測定したところ、hRFI 発現量の多い細胞ほど caspase-9、caspase-3 の活性が抑制されていた。hRFI によるアポトーシス抑制作用の機序を解明するため、各細胞株における IAP ファミリー、bcl-2 ファミリーの発現を Western blotting により比較したところ、hRFI の過剰発現細胞株では Bcl-2 と Bcl-xL 蛋白の発現が特異的に増加していた。また、real-time PCR analysis の結果、Bcl-2、Bcl-xL の発現増加は mRNA レベルにおいても認められた。一方、他の bcl-2 ファミリー蛋白 (Bax、Bak、Bad、Bid、Mcl-1) および IAP ファミリー蛋白 (XIAP、cIAP-1、cIAP-2、Survivin) の発現には変化を認めなかった。そこで、hRFI の過剰発現による Bcl-2、Bcl-xL の特異的発現増加の機序を解明するため、各細胞株の核分画抽出液を採取し、Bcl-2、Bcl-xL の転写調節因子である NF- κ B ファミリーの DNA 結合活性を測定したところ、hRFI の発現増加に伴い、p50 と RelA (p65) の結合活性が亢進していた。さらに、NF- κ B 活性の亢進が hRFI 過剰発現株におけるアポトーシス抑制作用の鍵であるのか解明するため、各細胞株を NF- κ B 阻害剤 Bay11-7085 で処理した後、5-FU に対するアポトーシス感受性を比較したところ、hRFI 過剰発現株における 5-FU に対するアポトーシス抵抗性は消失し、細胞株間の差は認めなくなった。また、Bcl-2、Bcl-xL の mRNA 発現量の変化を real-time PCR analysis を用いて検討したところ、5-FU 処理によって各細胞株の Bcl-2、Bcl-xL の mRNA 発現量は増加し、その発現量は 5-FU 処理後も hRFI 発現量とともに亢進していたが、Bay11-7085 の添加によって、hRFI 過剰発現株における Bcl-2、Bcl-xL の mRNA 発現の亢進は消失し、細胞株間における差は認めなくなった。これらの結果から、hRFI によるアポトーシス抑制作用、および Bcl-2、Bcl-xL の mRNA 発現の亢進は、NF- κ B 活性に依存していることが示された。最後に、大腸癌の治療において临床上使用される頻度の高いシスプラチン (CDDP)、イリノテカン (CPT-11) を用いてアポトーシスを誘導し、同様にアポトーシス率および caspase-3 活性を検討したところ、hRFI 過剰発現細胞では、アポトーシス、caspase-3 活性とも抑制されていた。

考察

本研究では、大腸癌細胞 HCT116 に hRFI を過剰発現させた結果、TNF- α によるアポトーシスが抑制され、かつこのアポトーシス抑制には caspase-3、-8、-9 活性の抑制が伴っていた。さらに、TRAIL によるアポトーシスも抑制されたことから、hRFI 過剰発現によるアポトーシス抑制作用は TNF- α に特異的なものではなく、death receptor の刺激による外因性アポトーシス経路全般におけるものであることが示唆された。最後に、過剰発現した hRFI のアンチセンスにより、アポトーシス感受性が回復されたことから、hRFI 過剰発現株におけるアポトーシス抑制は clonal effect によるものではなく、真に hRFI のアポトーシス抑制効果によるものであることが確認された。本研究は、hRFI

のアポトーシス抑制作用を大腸癌細胞において示した初めての研究である。大腸癌の adenoma-carcinoma sequence における段階的な hRFI 蛋白発現の増加を考え合わせると、hRFI はアポトーシス抑制作用を介して大腸癌の発生に重要な役割を担っていることが示唆される。したがって、hRFI は大腸癌発生予防における遺伝子治療の新しい標的、あるいは、大腸癌高危険群患者のスクリーニング検査の新しいマーカーとして、応用される可能性がある。

大腸癌細胞において 5-FU は、主に内因性アポトーシス経路によりアポトーシスを誘導することが知られている。内因性アポトーシス経路では、ミトコンドリアから細胞質へのチトクロームC放出に続いて caspase-9 の活性化がおこり、さらに caspase-3 の活性化へと反応が進んでいく。本研究では、hRFI の過剰発現により、5-FU で処理された大腸癌細胞におけるこれらすべての段階が抑制されていることが示された。したがって、hRFI は大腸癌細胞における内因性経路アポトーシスを抑制すると考えられる。一方、hRFI の過剰発現細胞では Bcl-2 と Bcl-xL の発現が特異的に亢進しており、これらの発現の亢進は 5-FU で処理された後も維持されていた。Bcl-2 と Bcl-xL は内因性アポトーシス経路の重要な抑制分子として知られており、さまざまな抗癌剤に対する感受性を決定する。これらを踏まえて本研究の結果を解釈すると、hRFI 過剰発現細胞におけるミトコンドリア経路アポトーシスの抑制を介した 5-FU 耐性の誘導機序として、Bcl-2、Bcl-xL の発現亢進が関与していると推測される。

転写因子 NF- κ B は、大腸癌細胞において 5-FU を含むさまざまな抗癌剤に対するアポトーシス耐性を誘導し、特に Bcl-2、Bcl-xL の転写制御において重要な役割を果たしていることが知られている。本研究の結果、hRFI 過剰発現細胞では p50 と RelA (p65) の活性が特異的に亢進していることが示された。さらに、NF- κ B 阻害剤によって、hRFI 過剰発現細胞におけるアポトーシス抑制や Bcl-2、Bcl-xL の発現亢進は消失した。これらの結果から、hRFI は NF- κ B 活性の制御分子であり、また、NF- κ B の活性化が、hRFI による内因性アポトーシス経路の抑制や Bcl-2、Bcl-xL の発現誘導の主要な機序であることが示唆された。

最後に、本研究の結果、hRFI の過剰発現は 5-FU だけではなく、CPT-11、CDDP に対する多剤アポトーシス感受性を抑制することが示された。大腸癌組織や大腸癌細胞株における hRFI の広汎な発現を考え合わせると、hRFI は大腸癌における多剤抗癌剤感受性を決定する可能性があり、化学療法感受性の新規マーカー、あるいは遺伝子治療の新規標的として応用される可能性がある。