

審査の結果の要旨

氏名 小西 毅

本研究はヒト大腸癌細胞のアポトーシス制御において重要な役割を演じていると考えられる新規遺伝子 **hRFI** の機能を明らかにするため、ヒト大腸癌細胞株を用いた実験系で **hRFI** の発現が外因性アポトーシス経路および内因性アポトーシス経路に及ぼす影響の解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 8種類の大腸癌細胞株における **hRFI** 蛋白の発現を **Western blotting** により解析し、**hRFI** が全ての大腸癌細胞株において様々なレベルで発現していること、および、それらのうち **HCT116** 細胞では比較的発現が少ないことが示された。
2. **HCT116** に **hRFI** を **transfection** し強制過剰発現させた安定細胞株1つと、コントロールとして同様に **LacZ** を **transfection** させた安定細胞株1つを作製したところ、**hRFI** の過剰発現によって通常培養条件下における細胞増殖や細胞周期は影響を受けなかった。しかし、**TNF- $\alpha$**  および **TRAIL** により外因性アポトーシスを誘導したところ、いずれの薬剤を用いた場合も **hRFI** 過剰発現細胞株では外因性アポトーシスが抑制されることが示された。さらに、**hRFI** 過剰発現細胞株におけるアポトーシス抑制は、**caspase-8**、**-9**、**-3** の活性化の抑制を伴っていることが示された。これらの結果が安定細胞株作製の過程で生じうる **clonal effect** ではなく、真に **hRFI** のアポトーシス抑制作用によるものであることを検証するため、**hRFI** に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて **hRFI** 過剰発現細胞株における **hRFI** の発現を再抑制し、**TNF- $\alpha$**  に対するアポトーシス感受性を検討したところ、**hRFI** の再抑制に伴って **TNF- $\alpha$**  に対するアポトーシス感受性が再び回復することが示された。
3. **HCT116** に **hRFI** を異なるレベルで強制発現させた **hRFI** 過剰発現安定細胞株2つと、コントロールとして同様に **LacZ** を **transfection** させた安定細胞株1つを作製し、**5-FU** を用いてアポトーシスを誘導したところ、**hRFI** の過剰発現レベルに伴って、**5-FU** によるアポトーシスが抑制されることが示された。さらに各細胞の **5-FU** に対する **IC50** 値を測定したところ、**hRFI** の発現に伴ってアポトーシスだけではなく実際に临床上問題となる **5-FU** の細胞増殖抑制効果を低減させることが示された。また、**hRFI** 過剰発現細胞では、**5-FU** による内因性アポトーシス経路の誘導過程であるミトコンド

リアからのチトクロームC放出、caspase-9、-3の活性化がすべて抑制されていた。

4. hRFIによる内因性アポトーシス経路の抑制の機序を解明するため、IAP family、Bcl-2 familyに属するアポトーシス制御蛋白の各細胞株における発現をWestern blottingを用いて解析したところ、hRFIの過剰発現に伴ってBcl-2、Bcl-xL蛋白の発現が特異的に増加していることが示された。さらにReal-time PCRを用いた解析によって、Bcl-2、Bcl-xLの発現増加が蛋白レベルだけでなくmRNAレベルでも誘導されていることが示された。
5. hRFI発現によるBcl-2、Bcl-xLの発現増加の機序を解明するために、各細胞株の核抽出物におけるNF- $\kappa$ Bファミリー各ポリペプチドのDNA結合活性を測定したところ、hRFIの過剰発現に伴ってp50、RelA (p65)の特異的活性化が誘導されていることが示された。さらに、NF- $\kappa$ B阻害剤Bay11-7085を用いてNF- $\kappa$ B活性を阻害した条件下で各細胞株に5-FUを用いてアポトーシスを誘導したところ、hRFI過剰発現株におけるアポトーシス抵抗性は消失したことから、hRFIによるアポトーシス抑制作用はNF- $\kappa$ B活性に依存することが示された。さらに、同様にNF- $\kappa$ B活性を阻害した条件下で各細胞株におけるBcl-2、Bcl-xLのmRNA発現量をreal-time PCR analysisにより検討したところ、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たことから、hRFIによるBcl-2、Bcl-xLの発現亢進はNF- $\kappa$ B活性に依存することが示された。
6. CDDP、CPT-11を用いてアポトーシスを誘導したところ、hRFI過剰発現株ではcaspase-3活性およびアポトーシスが抑制されていることが示された。

以上、本論文はヒト大腸癌細胞HCT116において、hRFI遺伝子が外因性アポトーシス経路の誘導を抑制すること、hRFI遺伝子がNF- $\kappa$ B活性の亢進を介してBcl-2、Bcl-xLの発現を亢進し5-FUによる内因性アポトーシス経路の誘導を抑制すること、hRFI遺伝子によるアポトーシス抑制作用は5-FU特異的ではなく多剤抗がん剤に対するものであることを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、新規遺伝子hRFIの大腸癌におけるアポトーシス制御作用の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。