

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

Farnesoid X receptor induces cell death and sensitizes to TRAIL-induced inhibition of growth in colorectal cancer cells through the up-regulation of death receptor 5

ファーネソイド X 受容体は、大腸癌細胞のアポトーシスを誘導するだけでなく、
デスレセプター5 の発現誘導を介した TRAIL 感受性の亢進により
大腸癌細胞の増殖を抑制する

日本医科大学大学院医学研究科 消化器外科学分野
大学院生 堀田 正啓

Biochemical and Biophysical Research Communications

2019 年 9 月 24 日 web 掲載

核内受容体は、リガンドと結合することで強い生理作用を発揮することから、創薬の標的分子として注目されている。胆汁酸をリガンドとする核内受容体型転写調節因子であるファーネソイド X 受容体(FXR)の活性化は、種々の癌腫で細胞の腫瘍の増殖を抑制することが報告されている。しかしながら、その詳細な分子メカニズムは明らかではない。FXR が大腸癌の治療標的分子になり得るかを検索する為、大腸癌細胞株を用いて、FXR の機能解析を試みた。

大腸癌細胞株(HCT116、DLD1、SW480)を培養し、GW4064(FXR の選択的アゴニスト)で 24~72 時間処理した群と DMSO(コントロール)で処理した群を作成した。各群で、細胞増殖アッセイ、mRNA 発現解析、蛋白発現解析を行った。

プロテオミクスは、各群の蛋白発現の変動評価や細胞内の分子シグナルに与えた影響を種々のソフトウェアで解析することで行った。

オートファジー経路は、上流シグナルの ULK1 複合体を阻害する 3-MA と下流シグナルであるライソゾームとの融合と分解を抑制するバフィロマイシン A1、さらにはオートファジー誘導剤であるラパマイシンを用いて、FXR のオートファジー阻害作用をウェスタンブロット法で分析した。さらに、隔離膜伸長の初期で重要な働きをする ATG5 の遺伝子発現を抑制することで、FXR がオートファジーの下流シグナルの阻害する部位をより詳細に分析した。

最後に、FXR の活性化が、TRAIL との併用処理で大腸癌細胞能の増殖に与える影響を評価した。

GW4064 の処理によって、コントロールと比較して①大腸癌細胞株の増殖を有意に抑制し、②アネキシン V 陽性の細胞を有意に増加させ、③HCT116 細胞の FXR の mRNA 発現とたんぱく発現を有意に増加させた。以上より、FXR は、GW4064 で活性化し、アポトーシスを誘導することで、大腸癌細胞の増殖を抑制することを確認した。

プロテオミクスより抽出された 3 つの細胞株に共通して最も発現が上昇したたんぱく質である Death Receptor 5(DR5)に着目した。DR5 は、細胞膜に位置する受容体であり、外因系経路と内因系経路の 2 種類の下流シグナル経路がある。GW4064 の処理によって、いずれの細胞株でも外因系経路の活性化を認めた。以上より、FXR は、DR5 の発現を増加させ、DR5 の下流シグナル経路である外因系経路を活性化させることを明らかにした。

続いて、上記で FXR の活性化が DR5 の発現を誘導した分子メカニズムを明らかにした。DR5 は、FXR の標的遺伝子ではなく、FXR は、間接的に DR5 の発現を制御していると考えられた。DR5 の発現とオートファジーとの関係に着目し、FXR のオートファジー阻害機構を分析した。GW4064 処理によって、オートファジー関連蛋白である LC3 と p62 の蓄積を認めたことより、FXR の活性化はオートファジーを阻害することが示唆された。また、バフィロマイシンのオートファジー阻害作用は、GW4064 の作用を減弱させた。さらに、3-MA と ATG5 の遺伝子発現抑制によるオートファジー阻害作用は、GW4064 のオートファジー阻害作用を抑制した。以上の結果より、FXR が、隔離膜伸長の後期でオートファジーを部分的に阻害することが、DR5 の発現を著しく上昇させるという新しい知見が得られた。

最後に、DR5 のアゴニストである TRAIL と GW4064 の共投与が、協調して大腸癌細胞の増殖を抑制することを明らかにした。

二次審査においては、オートファジーとアポトーシスの関係について、FXR の他の癌腫における有用性について、DR5 の発現メカニズムについて等の質問があったが、何れの質問に対しても簡潔明瞭的確に回答された。今後は、FXR の活性化が隔離膜伸長から閉鎖の段階を阻害する分子メカニズムを解析していく予定との事である。

よって本研究は、FXR の働きは、オートファジーを抑制し、DR5 の発現増強とその下流シグナルを活性化することであることを証明した重要な研究であることが確認された。以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。