

|         |  |
|---------|--|
| 氏名      | 川口直  |
| (ふりがな)  | (かわぐちなお)   |
| 学位の種類   | 博士(医学)   |
| 学位授与番号  | 甲第 号   |
| 学位審査年月日 | 平成30年7月18日   |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当   |
| 学位論文題名  | Nogo-B (Reticulon-4B) functions as a negative regulator of the apoptotic pathway through the interaction with c-FLIP in colorectal cancer cells<br>(大腸癌における Nogo-B の c-FLIP を介したアポトーシス調節機構の解明) |
| 論文審査委員  | (主) 教授 樋口和秀<br>教授 岩本充彦<br>教授 高井真司  |

### 学位論文内容の要旨

#### 《目的》

大腸癌は世界的に増加傾向にあり、これまで様々な治療法が開発されてきたにも関わらず、依然先進国の癌関連死の原因では上位を占めている。したがって、新たな治療標的の検索は非常に重要である。

Nogo は主に小胞体に存在する膜貫通型タンパクであり、別名 Reticulon (RTN)-4 として知られている。サブタイプである Nogo-B/RTN-4B は様々な臓器で発現しており、創傷治療や線維化など多様な働きがあることが示されている。また、アポトーシスに関連する遺伝子であることが過去に報告されているが、癌における Nogo-B の機能は明らかになっていない部分が多い。本研究では、大腸癌における Nogo-B の発現とアポトーシスの関連について検討した。

## 《方 法》

ヒト大腸癌切除標本を用いて免疫染色法および Western Blot 法で Nogo-B の発現量を比較した。続いて、大腸癌細胞株 (DLD-1、SW480) において si-RNA (siR)-Nogo-B を導入することで Nogo-B 遺伝子のノックダウンを行い、MTT assay で cell viability を比較し、Western Blot 法でアポトーシス関連タンパク (cleaved caspase-3、-8、PARP) の発現量を比較した。加えて、Hoechst 染色を行いアポトーシスに特徴的な核の凝集や断片化の程度を比較した。更に、Nogo-B 遺伝子のノックダウン状況下で Nogo-B プラスミド DNA を導入することで cell viability やアポトーシス関連タンパクの発現量が回復するかを検討した。また、Death receptor activator である Fas Ligand (FasL) を併用し、その影響を解析した。最後に、caspase-8 の活性化を抑制することで外因性アポトーシスの制御に重要な因子となっている Cellular FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitor protein (c-FLIP) に着目し、大腸癌細胞株における免疫沈降法とヒト大腸癌切除標本における二重蛍光免疫染色法を行い、Nogo-B と c-FLIP との関連性について検討した。

## 《結 果》

ヒト大腸癌切除標本において、免疫染色法および Western Blot 法で、いずれも正常部と比較して腫瘍部での Nogo-B の過剰発現が認められた。また、大腸癌細胞株において Nogo-B 遺伝子をノックダウンすることで cell viability の低下を認め、アポトーシス関連タンパクの発現量の増加が認められた。Hoechst 染色では核の凝集や断片化の発現が siR-Nogo-B を導入した群で著明に増加していた。Nogo-B 遺伝子がノックダウンされた大腸癌細胞株に Nogo-B プラスミド DNA を導入することで cell viability の回復とアポトーシス関連タンパクの発現量の抑制が確認された。更に、siR-Nogo-B と FasL を併用すると cleaved caspase-8 の発現量が有意に増加しており、Nogo-B 発現の抑制が caspase-8 を介したアポトーシス経路を活性化させることが示唆された。一方、免疫沈降法では Nogo-B と c-FLIP が共沈降していることが確認でき、ヒト大腸癌切除標本における二重蛍光免疫染色法でも Nogo-B と c-FLIP の共局在が確認された。

## 《考 察》

本研究において、大腸癌では Nogo-B が過剰発現しており、大腸癌細胞株では Nogo-B 遺伝子をノックダウンすることで外因性アポトーシス経路を介した細胞死が惹起されることを明らかにした。

既報において、胃癌では Nogo-B の発現増加が予後不良因子となることや、肝細胞癌では Nogo-B が IL-6/STAT3 シグナリングを制御することで細胞増殖を促進させることが示されている。しかし、大腸癌との関係を報告したものはなく本研究が初めての報告となる。

Nogo-B は小胞体に存在し、過剰発現することで小胞体ストレスを介したアポトーシスが惹起されることが知られており、アポトーシスの誘発因子とされてきた。一方で、本研究において我々は Nogo-B が大腸癌においてアポトーシスの抑制因子として働くことを明らかにした。

アポトーシスには小胞体ストレスやミトコンドリアを介した内因性経路と、Death Receptor を介した外因性経路の 2 つの経路がある。大腸癌細胞株において Nogo-B 遺伝子をノックダウンすることで誘導されるアポトーシスの経路を調べたところ、内因性経路に関連するタンパクの発現には有意な差を認めず、外因性経路に関連する cleaved caspase-8 の上昇を認めたことから、外因性アポトーシスに起因するものと考えた。

次に、アポトーシスにおける Nogo-B の役割を明らかにするために、Nogo-B のノックダウンと Death receptor activator である FasL を併用してアポトーシスを誘発した結果 cleaved caspase-8 の著明な上昇が認められた。ここで、caspase-8 活性の抑制因子である c-FLIP に着目し確認したところ、Nogo-B 遺伝子をノックダウンすることで c-FLIP の発現が低下していた。つまり、Nogo-B の発現を低下させることで caspase-8 活性の抑制因子である c-FLIP の発現が低下し、外因性アポトーシスが惹起される機序が考えられた。更に、免疫沈降法と二重蛍光免疫染色法で Nogo-B と c-FLIP の関連性が確認され、Nogo-B が c-FLIP を介したアポトーシスに関わっていることが示された。

c-FLIP は、癌細胞株において caspase-8 の活性を抑制することにより抗アポトーシスとして作用し、かつ大腸癌含め消化管癌でその発現が増加していることが多数報告されてい

る。また、c-FLIP は Nogo-B と同じく小胞体に存在する遺伝子であり、c-FLIP の発現を低下させた細胞では Nogo-B の発現が低下するという報告もある。これらの結果は、Nogo-B と c-FLIP が強く関連している遺伝子であるという我々の結果を強く裏付けるものであると言える。

更に、我々のグループが注目している癌遺伝子である PTBP1 (polypyrimidine tract-binding protein1)が、大腸癌細胞株において exon3 の splicing silencer としての働きを有し、Nogo-B の発現を増加させるという現象を確認している。これは、Nogo-B が大腸癌において癌遺伝子としての働きがあることを示唆する大変興味深い結果であり、現在 Nogo-B と PTBP1 との関係について追究しているところである。

#### 《結 論》

本研究において Nogo-B は、大腸癌における c-FLIP を介したアポトーシスを制御する癌遺伝子としての働きを有していることが示された。今後さらにその機序を解明することにより、大腸癌の治療戦略の一つとなりうると考えられた。

## 論文審査結果の要旨

Nogo は主に小胞体に存在する膜貫通型タンパクであり、別名 Reticulon (RTN)-4 として知られている。サブタイプである Nogo-B/RTN-4B は様々な臓器で発現しており、創傷治癒や線維化など多様な働きがあることが示されている。また、肝細胞癌においては IL-6/STAT3 シグナリングを制御することで発癌との関連が報告されているが、大腸癌との関連を報告したものはなく、本研究がはじめての報告となる。

申請者は本研究で、はじめにヒト大腸癌切除標本において正常部と比較して腫瘍部で Nogo-B の発現が増加しており、大腸癌において Nogo-B が重要な役割を担っている可能性を示した。続いて、大腸癌細胞株において si-RNA (siR) -Nogo-B を導入することにより Nogo-B 遺伝子をノックダウンし、cell viability の低下とアポトーシス関連タンパクの発現が増加していることを示した。加えて、Hoechst 染色において、アポトーシスに特徴的な核の凝集や断片化が siR-Nogo-B 導入群で著明に増加していることを確認した。更に、Nogo-B 遺伝子のノックダウン状況下で Nogo-B プラスミド DNA を導入し、cell viability の改善とアポトーシス関連タンパクの発現が抑制されることを確認した。

大腸癌細胞株において Nogo-B 遺伝子をノックダウンすることで誘導されるアポトーシスの経路を調べたところ、内因性経路に関連するタンパクの発現には有意な差を認められず、外因性経路に関連する cleaved caspase-8 の上昇を認めたことから、本研究でのアポトーシスは外因性経路によるものと考えられた。また、Nogo-B ノックダウン大腸癌細胞株に Death receptor activator である Fas Ligand (FasL) を投与したところ、cell viability の著明な低下とアポトーシス関連タンパクの発現の増強が確認された。外因性アポトーシスに関わる機序として、caspase-8 の活性抑制因子である c-FLIP に着目したところ、大腸癌細胞株において siR-Nogo-B を導入し Nogo-B 遺伝子をノックダウンすることで、c-FLIP の発現の低下が確認された。更には、免疫沈降法と二重蛍光免疫染色法で Nogo-B と c-FLIP の関連性が示された。

申請者は本研究において、Nogo-B は大腸癌における c-FLIP を介したアポトーシスを制御する癌遺伝子としての働きを有していることを示した。今後さらにその機序を解明する

ことにより、大腸癌の治療戦略の一つとなりうる可能性があり、本研究は大変有意義なものである。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

（主論文公表誌）

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease

2018 Apr 21. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.04.018. <オンライン掲載>