

氏名 (本籍)	山崎健路 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	乙第 1430 号
学位授与日付	平成 20 年 3 月 19 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Synergistic effects of RXR $\alpha$ and PPAR $\gamma$ ligands to inhibit growth in human colon cancer cells - phosphorylated RXR $\alpha$ is a critical target for colon cancer management -
審査委員	(主査) 教授 森脇久隆 (副査) 教授 吉田和弘 教授 高見剛

## 論文内容の要旨

### 【背景・目的】

近年、核内受容体 family の一つであり、ブドウ糖や脂質の代謝を調節することで生体内の energy homeostasis に深く関与している peroxisome proliferators activator receptor (PPAR) の注目すべき作用として、抗腫瘍効果が報告されている。特に、PPAR isoform の一つである PPAR $\gamma$  は、大腸発癌抑制および大腸癌細胞増殖抑制の重要な標的分子の一つと考えられている。PPAR は、同じく核内受容体 family の一員であり retinoid を ligand とする retinoid X receptor- $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) と、それぞれの ligand 刺激下において heterodimer を形成し、DNA 上の応答配列である peroxisome proliferators-responsive element (PPRE) に結合することで、その下流に位置する遺伝子の発現を調節する。これらの標的遺伝子は、分化・増殖・死 (apoptosis) といった細胞の基本的活動を制御しているため、PPAR $\gamma$  および RXR $\alpha$  の発現・機能異常は、正常な細胞機能からの逸脱、すなわち細胞の異型化・不死化に密接に関与するものと考えられている。

実際我々は、RXR $\alpha$  が Ras/MAPK/Erk 系により特定のアミノ酸残基で恒常的なリン酸化修飾を受けることで、正常な転写活性機能を喪失するとともにユビキチン/プロテアソームによる分解から逃れ、その結果として細胞内に異常蓄積したリン酸化 RXR $\alpha$  が、正常 RXR $\alpha$  の働きを dominant negative に阻害することが、肝発癌の主要なメカニズムの一つである可能性を報告してきた。

また同時に、RXR $\alpha$  の異常修飾 (リン酸化) を解除することで、肝癌細胞の retinoid への感受性を回復し、retinoid による腫瘍細胞の増殖抑制効果が有意に増強されることも明らかにしてきたが、これらの結果は、ある種の癌が核内受容体の機能異常に起因する「核内受容体病」として捉えられる可能性と、核内受容体の機能異常を target とする新たな治療法の有効性を示唆するものであると考えられた。

そこで今回我々は、まだ明らかにされていないヒト大腸癌細胞および組織における RXR $\alpha$  のリン酸化状態について検討するとともに、retinoid および PPAR $\gamma$  ligand の併用処理による相乗的な大腸癌細胞の増殖抑制効果について検討した。

### 【方法】

まず始めに、ヒト大腸癌細胞株 7 種 (Caco2, Colo201, HT29, Colo320, DLD-1, HCT-116, SW837) およびヒト正常大腸上皮細胞株 FHC と、ヒト大腸癌手術標本の癌部および非癌部における RXR $\alpha$  蛋白のリン酸化状態を、Western Blot 法を用いて比較検討した。

次に、PD98059 (PD; MEK inhibitor) による前処置、あるいは T82A/S260A (非リン酸化型 RXR $\alpha$  mutant) の transfection にて Caco2 細胞の RXR $\alpha$  のリン酸化を阻害した後、9-cis retinoic acid (9-cis RA; RXR $\alpha$  ligand) および ciglitazone (cig; PPAR $\gamma$  ligand) で同細胞をそれぞれ単独または

併用処理し、リン酸化 RXR $\alpha$  蛋白、COX-2 蛋白および mRNA、c-Jun 蛋白および mRNA の発現の変化について検討した。

また同様に RXR $\alpha$  のリン酸化を阻害した Caco2 細胞を、9-cis RA および cig でそれぞれ単独または併用処理し、これらの薬剤が PPRE および AP-1 の転写活性に及ぼす影響を luciferase reported assay を用いて、また細胞増殖、apoptosis 誘導に及ぼす影響を、それぞれ trypan blue 法および TUNEL 法を用いて比較検討した。

### 【結果】

検討したヒト大腸癌細胞 7 種すべてにおいてリン酸化 RXR $\alpha$  の発現を認めたが、ヒト正常大腸上皮細胞株 FHC では、同蛋白の発現は認められなかった。また、手術標本のヒト大腸癌部および非癌部のリン酸化 RXR $\alpha$  の発現を比較検討したところ、8 検体中 6 検体 (75%) で癌部においてリン酸化 RXR $\alpha$  の過剰発現が認められた。次に、リン酸化 RXR $\alpha$  を強発現していた Caco2 細胞を、9-cis RA および cig でそれぞれ単独または併用処理したところ、PD の存在下でリン酸化 RXR $\alpha$  の発現は有意に低下した。また、COX-2 および c-Jun の発現に関しても、PD の存在下、あるいは T82A/S260A が transfect された条件下で、9-cis RA あるいは cig 単独処理で低下傾向を認めたが、特に両剤が併用されることで相乗的に発現は阻害された。9-cis RA および cig の併用処理による相乗効果は、PPRE promoter 活性の上昇、AP-1 promoter 活性の低下、細胞増殖の抑制、apoptosis の誘導においても認められた。

### 【考察・結論】

RXR $\alpha$  は PPAR $\gamma$  のみならず、ビタミン D 受容体、甲状腺ホルモン受容体といった多彩な核内受容体と heterodimer を形成し、様々な遺伝子の発現を制御するため、核内受容体ネットワークにおいて「master regulator」としての役割を果たしているものと考えられている。我々は今回の実験で、大腸癌細胞株およびヒト大腸癌組織において、リン酸化 RXR $\alpha$  が過剰発現していることを初めて明らかにした。また、RXR $\alpha$  の異常リン酸化を阻害することによって、それぞれの ligand 存在下で RXR $\alpha$ /PPAR $\gamma$  の転写活性 (PPRE) を回復し、c-Jun や AP-1、COX-2 といった標的遺伝子の発現を制御して、大腸癌細胞に apoptosis の誘導や細胞増殖の抑制効果を発揮できることが明らかになった。

今回の実験結果は、核内受容体蛋白 RXR $\alpha$  のリン酸化修飾に伴う機能不全が大腸発癌に深く関与している可能性、すなわち、今まで報告されていた肝癌のみならず、大腸癌も核内受容体の蛋白レベルでの修飾 (リン酸化) に伴う機能異常に起因する「核内受容体病」の一つとして捉えられる可能性を示唆するものである。また今回の我々の発見は、retinoid および PPAR $\gamma$  ligand の併用療法に、RXR $\alpha$  の機能不全・リン酸化修飾の解除を目的とした薬剤を併用することで、更なる相乗的な腫瘍細胞の増殖抑制効果が期待できることを提示したものであり、今後、新たな大腸発癌予防法あるいは治療法の可能性を切り開いていく上で、非常に意義深い研究結果であると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 山崎健路は、ヒト大腸癌切除標本を用い、核内受容体 RXR $\alpha$  がリン酸化されていることを初めて見出した。また in vitro の系で、リン酸化の解除が RXR $\alpha$  リガンド/PPAR $\gamma$  リガンドの併用による大腸癌細胞増殖抑制、アポトーシス誘導につながることを明らかにした。これらの知見は臨床腫瘍学、消化器病学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

---

[主論文公表誌]

Synergistic effects of RXR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  ligands to inhibit growth in human colon cancer cells - phosphorylated RXR $\alpha$  is a critical target for colon cancer management -

Gut 56, 1557-1563 (2007).