

## 論文内容の要旨

**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研究科 消化器外科学分野/統御機構診断病理学分野  
大学院生 堀田 正啓

Biochemical and Biophysical Research Communications  
2019年9月24日 web 掲載

## [背景]

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ンソイド 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。

## [方法]

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、各群から抽出されたたんぱく質を液体クロマトグラフィー＝質量分析法で分析したデータを用いて、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、mTORとULK1複合体に制御されている上流シグナルと、ATG5やATG12などのオートファジー蛋白がLC-3の隔離膜伸長を進め、細胞内分画を包みこみ、ライソゾームへ輸送する下流シグナルで構成されている。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。

#### [結果]

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)に我々は着目した。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 DR 5 の発現を制御していると考えられた。我々は、DR 5 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、DR 5 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、DR 5 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。

## [考察]

本研究では、大腸癌細胞株を用いて、**FXR** がオートファジー経路を阻害する部位を特定し、**DR5** の発現を増強させることがアポトーシスの誘導を促進することを明らかにした。バフィロマイシンを用いたオートファジーの検討では、**FXR** の活性化は、オートファゴソームとライソゾームとの融合より上流である隔離膜伸長段階でオートファジーを阻害することが考えられた。さらに、隔離膜伸長の早期に関わる **ATG5** との検討では、**GW4064** のオートファジー阻害作用が認められなくなることから、**FXR** の活性化は、隔離膜伸長の後期を阻害すると考えられた。以上より、**FXR** の活性化は、隔離膜閉鎖を阻害することが示唆された。このような **FXR** がオートファジーを阻害する特異性は、腫瘍選択的に細胞死を誘導する **DR5** の発現に大きな影響を及ぼし、結果的に、細胞死のシグナルを活性化させたと考えられた。従って、大腸癌において **FXR** を活性化させることで、腫瘍選択的に細胞死を誘導する可能性があり、**FXR** は大腸癌の治療標的分子になりうると考えられた。

## [結語・今後の展望]

**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った。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である。