

京都大学	博士（医学）	氏名	坂本二郎
論文題目	<p>Nardilysin controls intestinal tumorigenesis through HDAC1/p53-dependent transcriptional regulation  (ナルディライジンはHDAC1/p53依存性の転写調節により腸管の発癌を制御する)</p>		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>大腸癌は、主に遺伝子の多段階変異によって発癌や進行が引き起こされるとされてきたが、近年エピジェネティックな変化も関与することが分かってきた。ナルディライジン（Nardilysin、以下 NRDC と略）は M16 ファミリーに属するメタロエンドペプチダーゼで、細胞表面では膜タンパク質の細胞外ドメイン切断を活性化し、核内では様々な遺伝子の転写を制御する。</p> <p>ヒトの大腸癌切除標本において、NRDC は正常上皮と比較して癌部に多く発現していた。大腸癌モデルマウス(Apc<sup>Min</sup>マウス)において、全身で NRDC を欠損させるとポリープ形成は著明に抑制された。次に腸管上皮特異的 NRDC 欠損マウス(Apc<sup>Min</sup>, Villin-cre, Nrdc<sup>fl/fl</sup>マウス)を作製したところ、全身欠損マウスと同様にポリープ形成は抑制され、腸管上皮細胞の NRDC がポリープ形成に重要であることが分かった。次に腸管上皮特異的 NRDC 過剰発現マウス(Apc<sup>Min</sup>, Villin-Nrdc マウス)を作製したところ、対照マウスと比較してポリープはより多く形成された。Apc<sup>Min</sup>, Villin-Nrdc マウスを対照マウスと比較すると、腸管上皮の細胞増殖マーカー Ki67 に差はなかったが、アポトーシスマーカー cleaved caspase 3 陽性細胞が少なく、NRDC がアポトーシス制御にかかわることが示唆された。そこで腸管からタンパク質を抽出し検討したところ、Apc<sup>Min</sup>, Villin-cre, Nrdc<sup>fl/fl</sup>マウスにおいて p53 およびアポトーシスマーカー発現が上昇し、Apc<sup>Min</sup>, Villin-Nrdc マウスでは低下していた。さらに p53 が野生型である大腸がん細胞 HCT116 で NRDC をノックダウンしたところ、抗がん剤で誘導されるアポトーシスが有意に増加し、p53 とその標的遺伝子の発現が上昇した。NRDC のノックダウンによるアポトーシスの増加は、p53 の同時ノックダウンにより消失したことから、p53 依存性であることが示唆された。</p> <p>次に NRDC のノックダウンで p53 発現が増加する機序を検討した。p53 はリジン残基がユビキチン化すると分解され、アセチル化すると安定化する。p53 のユビキチン化酵素である MDM2 が増加しているにもかかわらず p53 が増加していたことから、p53 のアセチル化を検討したところ、NRDC ノックダウン細胞で p53 のアセチル化が亢進していた。NRDC ノックダウンによる p53 アセチル化増強が脱アセチル化酵素 HDAC1 の阻害で消失したことから、NRDC が HDAC1 を介して p53 のアセチル化を制御していることが示唆された。免疫沈降法や in situ proximity ligation assay を用いて NRDC と HDAC1 の結合を示し、クロマチン免疫沈降法を用いて両者が p53 標的遺伝子のプロモーター領域で共局在することを示した。さらに NRDC をノックダウンすることで、HDAC1 のプロモーター領域への集積が減少することを示した。</p> <p>以上から、NRDC は大腸がん細胞において HDAC1 によるアセチル化調節を介して p53 の安定化を制御し、アポトーシスを調節することで腫瘍増殖を制御していることが明らかになった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

メタロペプチダーゼ、ナルディライジン(NRDC)の大腸癌の発癌における役割を検討した。ヒトの大腸癌切除標本において、NRDC は正常上皮と比較して癌部に多く発現していた。APC<sup>min</sup>大腸癌モデルマウスにおいて、全身で NRDC を欠損させると腫瘍形成は著明に抑制され、腸管上皮特異的 NRDC 欠損マウスでも同様に抑制されたが、腸管上皮特異的 NRDC 過剰発現マウスでは腫瘍形成が増強した。腸管からタンパク質を抽出し検討したところ、NRDC 欠損マウスにおいて p53 およびアポトーシスマーカー発現が上昇し、NRDC 過剰発現マウスでは低下した。大腸癌細胞株にて NRDC をノックダウンするとアポトーシスが有意に増加し、p53 とその標的遺伝子の発現が上昇した。NRDC ノックダウン細胞では p53 のアセチル化が亢進し、脱アセチル化酵素 HDAC1 の阻害でアセチル化亢進が消失した。NRDC と HDAC1 が p53 標的遺伝子のプロモーター領域で共局在することを示し、更に NRDC のノックダウンで HDAC1 のプロモーター領域への集積が減少することを示した。NRDC は大腸癌細胞において HDAC1 によるアセチル化調節を介して p53 の安定化を制御し、アポトーシスを調節することで腫瘍増殖を制御していることが明らかになった。

以上の研究は大腸癌進展における NRDC の役割の解明に貢献し、大腸癌進展の病態機構解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 30 年 11 月 19 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降