



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Ninjurin1 increases p21 expression and induces cellular senescence in human hepatome cells  |
| Author(s)    | 外山, 隆   |
| Citation     | 大阪大学, 2005, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/45995">https://hdl.handle.net/11094/45995</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |  |
|---------------|--|
| 氏 名           | 外 山 隆 <sup>と やま たかし</sup>  |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)  |
| 学 位 記 番 号     | 第 19108 号  |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 17 年 2 月 16 日   |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当   |
| 学 位 論 文 名     | Ninjurin1 increases p21 expression and induces cellular senescence in human hepatome cells<br>(Ninjurin1 は肝癌細胞株において p21 の発現を亢進させ、セネセンスを誘導する) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 堀 正二<br><br>(副査)<br>教 授 長田 重一 教 授 門田 守人  |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔 目 的 〕

Ninjurin1 は第 2 解剖の荒木博士により 1996 年にクローニングされた新規の接着因子であり、神経傷害後の再生過程においてその発現が亢進し、接着因子として神経修復に関与していることが知られている (Neuron 1996)。Ninjurin1 はさまざまな上皮組織で発現しており、特に肝臓で強く発現しているが未だその役割は明らかでない。そこで今回、我々は肝臓における ninjurin1 の役割について検討した。

### 〔 方 法 〕

①ninjurin1 の強制発現がもたらす形質変換の解析：

ninjurin1 過剰発現細胞株を作成し検討した。具体的には、ninjurin1-cDNA を pcDNA3.1 プラスミドにクローニングした後、Huh-7 にトランスフェクションし、ninjurin1 を過剰発現する 4 つのクローンを獲得した。また細胞増殖への影響を解析するために、アポトーシスの有無を TUNEL 法にて、細胞周期の解析をフローサイトメーターにより行った。細胞周期関連因子として G1-S 期の代表的な細胞周期関連因子 (cyclinA、D、E、CDK2、CDK4、CDK6、p21、p27、Rb) を Western blot 法と kinase assay を用いて検討した。また cellular senescence 誘導の有無を検討するために、pH6.0 での  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性の有無と自家蛍光の増強を検討した。

②in vivo での ninjurin1 発現動態：

肝癌症例で癌部および非癌部での ninjurin1 発現を Westernblot 法にて解析した。

### 〔 成 績 〕

①Ninjurin1 過剰発現クローンのうち、Ninjurin1 の発現量の多かった 2 つのクローン Nin1、Nin2 を実験に供した。Nin1、Nin2 の細胞形態的特徴は、parent や mock に比較して細胞が大きくて平坦であり、細胞増殖の doubling time は mock 細胞株が 36 h であるのに対して、Nin1、Nin2 細胞では約 4 日と著明に遷延した。一方、アポトーシスは Nin1、Nin2 においては mock よりもむしろ低下した。また細胞周期の解析では、G0/1 期の割合の有意な増加と S 期の低下を認めた。これらのことより、増殖阻害はアポトーシスによるものではなく、むしろ細胞周期の G1-S での

停止が関与していると考えられた。

細胞周期関連因子の検討では、CDK2 のキナーゼ活性が低下し CDK 阻害剤である p21 蛋白が増加した。p21 は主に cyclin-CDK2 複合体に結合し、CDK2 のキナーゼ活性を低下させ Rb 蛋白のリン酸化を阻害して G1 arrest を誘導すると考えられており、ninjurin1 による細胞周期の G1/S 期での停止には p21 の上昇と CDK2 活性の低下が関与していると考えられた。

また Ninjurin1 過剰発現により認められた 3 つの特徴（大きく・平坦な細胞形態、細胞周期の G1/S 期での停止、p21 発現の亢進）は、細胞分裂の終末像と考えられている cellular senescence でみられる特徴と同様であった。β ガラクトシダーゼ陽性細胞は、mock 細胞においてほとんど認められなかったのに対して Nin1、Nin2 では 20% 強の細胞において認められた。また Nin1、Nin2 細胞では自家蛍光が増強していた。これらの 5 つの特徴を満たすことより、ninjurin1 過剰発現は細胞周期を停止させるだけでなく、cellular senescence を誘導することが明らかとなった。

②肝癌症例における検討では、ninjurin1 の発現は非癌部より癌部において亢進していた。In vivo においても ninjurin1 は発癌過程に関与している可能性が考えられた。

#### 〔 総 括 〕

Cellular senescence は細胞分裂の蓄積によりテロメア長の短縮を契機として引き起こされる細胞分裂の終末像として最初定義されたが、近年アポトーシスと同様に強力な癌抑制機構のひとつと考えられており、その破綻が細胞の無制御な増殖を引き起こし、癌化の一翼を担うと考えられている。今回の結果から、Ninjurin1 は肝細胞において cellular senescence を誘導するという、癌抑制機構への関与が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

ninjurin1 は 1996 年にクローニングされた新規接着因子であるが、神経修復に関与していること以外、他の臓器での役割は全くわかっていない。そこで本論文では肝臓における ninjurin1 の機能を ninjurin1 過剰発現細胞株を作成し解析するとともに肝疾患症例における ninjurin1 の発現を検討した。肝癌細胞株である Huh-7 は、ninjurin1 過剰発現により p21 の発現が亢進し、G1 期で細胞周期が停止し、増殖が著明に阻害され、セネセンスが誘導された。また正常肝、慢性肝炎、肝癌と疾患の進行と共に ninjurin1 の発現増加を認め、ninjurin1 は肝発癌過程に関与することが推測された。セネセンスは近年癌抑制機構の一つと考えられており、本論文は肝臓における ninjurin1 の機能を明らかにするだけでなく、セネセンスを誘導するという癌抑制機構への新しい洞察を与える研究で、極めて意義深く、学位授与に値すると思われる。