

信州大学審査学位論文

転移原因遺伝子 FABP5 の癌細胞特異的な
発現制御機構および機能の解析

2016年3月

生物・食料科学 専攻

川口 耕一郎

【目次】

略号	1
第1章 序論.....	2
1-1) 研究の背景.....	3
1-2) 脂肪酸結合タンパク質.....	4
1-3) 癌と代謝.....	5
1-4) 研究の目的.....	7
第1章の図表.....	8
第2章 材料・方法.....	11
2-1) 試薬.....	12
2-2) 細胞培養.....	12
2-3) RNA抽出、半定量RT-PCR法及び定量real-time PCR法.....	13
2-4) Western blot analysis.....	13
2-5) Small interference RNA (siRNA).....	13
2-6) バイサルファイトシーケンス及びCOBRA法.....	14
2-7) qAMP.....	14
2-8) 細胞増殖試験.....	15
2-9) 細胞周期の測定.....	15
2-10) アポトーシス試験.....	15
2-11) <i>In vitro</i> 細胞浸潤試験.....	16

2-12) コンストラクト作製.....	16
2-13) ルシフェラーゼアッセイ及び <i>in vitro</i> メチル化アッセイ	17
2-14) 部位特異的変異導入.....	17
2-15) クロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ)	18
2-16) ヒト組織サンプル.....	18
2-17) 統計解析.....	18
第2章の図表.....	19
第3章 癌細胞における FABP5 の発現及び機能解析	24
3-1) 緒言.....	25
3-2) 結果及び考察.....	26
大腸癌細胞株における FABP の発現.....	26
FABP5 の細胞増殖に与える影響.....	26
FABP5 の浸潤能への影響.....	27
FABP5 を介するシグナル伝達機構の解析.....	28
第3章の図表.....	32
第4章 癌細胞における FABP5 遺伝子の発現制御機構の解析	49
4-1) 緒言.....	50
4-2) 結果.....	51
前立腺癌細胞株における FABP の発現.....	51

FABP5 の発現制御に関わるプロモーター領域の決定	51
<i>FABP5</i> プロモーター領域の DAN メチル化解析 (前立腺癌)	52
FABP5 発現制御における DNA メチル化の重要性	52
FABP5 発現制御に関わる転写因子の同定	53
FABP5 発現制御における SP1 及び c-MYC の機能解析	54
ヒト組織サンプルにおける FABP5 の発現及び DNA メチル化解析	55
<i>FABP5</i> プロモーター領域の DAN メチル化解析 (大腸癌)	55
4-3) 考察	57
第 4 章の図表	63
総括	84
謝辞	86
参考文献	87

略号

Fatty Acid-Binding Protein: FABP

Specificity Protein 1 : SP1

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor : PPAR

Reverse Transcription : RT

Polymerase Chain Reaction : PCR

Quantitative real-time PCR : qPCR

Complementary DNA : cDNA

Messenger RNA : mRNA

Phosphate Buffered Saline : PBS

Tris Buffered Saline : TBS

Sodium Dodecyl Sulfate : SDS

5-aza-2-deoxycytidine : 5-aza-dC

Trichostatin A : TSA

Open Reading Frame : ORF

Bovine Serum Albumin : BSA

Horseradish Peroxidase : HRP

small interfering RNA : siRNA

Ribosomal RNA : rRNA

Chromatin immunoprecipitation : ChIP

Combined Bisulfite Restriction Analysis : COBRA

Quantitative Analysis of DNA Methylation using real-time PCR : qAMP

第 1 章

序 論

第1章 序論

1-1) 研究の背景

現在、日本における死因構造のトップ3位は癌、心疾患、脳血管疾患の生活習慣病であり、全体の2/3を占めている。その中でも、癌による死亡者数が最も多く、死因別割合全体の約30%を占めている。癌罹患率は男女ともに50歳代から、死亡率に関しては60歳代から増加し、高齢になるほど高くなっている [1]。従って、急激な高齢化社会を迎えている我が国では、癌患者数は必然的に増加していくことが予想される。

癌発症における遺伝的要素は比較的少なく、そのほとんどは食生活を含む生活環境などの後天的要素が複合的に絡み合っただけで発症すると考えられている。癌の中でも特に大腸癌・乳癌・前立腺癌などは、近年の食生活の欧米化（高カロリー・高脂肪食）に伴い罹患率・死亡率が上昇してきており [1]、これらの癌の発生と高脂肪食の摂取との関連が示唆されている [2]。

このような状況の中で、検診制度の普及による癌の早期発見や、従来の外科的治療法・化学療法・放射線療法に加え、免疫療法・血管新生阻害療法・遺伝子治療などの治療技術が向上したことから、早期の癌における治癒率は高くなってきていると言える。その一方で、進行期癌・再発癌の治療成績はあまり改善されておらず、「癌の転移」が癌による死亡率を高めている原因であると言える。従って、癌の病態解明と癌治療の進展のためには、有望な診断バイオマーカーの開発と共に、癌細胞の悪性化、即ち、転移能獲得機構の解明が必要不可欠である。

1-2) 脂肪酸結合タンパク質

脂肪酸結合タンパク質 (fatty acid-binding protein : FABP) は、脂質結合タンパク質 (lipid-binding proteins : LBP) スーパーファミリーのメンバーであり、これまでのところヒトでは10種類のアイソフォームが知られている [3]。FABPs は分子量約15 kDa の細胞内タンパク質で、それぞれ組織特異的に発現しており (Table 1-1)、結合するリガンドが異なっている。これらのアイソフォーム間のアミノ酸配列の相同性は22-73%であるが、N末端側にある2つの α -ヘリックスが形成するヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフと、10個の β シートが形成する β バレル構造から成る三次構造はファミリーの間で高度に保存されている (Figure 1-1)。 β バレル構造の内側に1分子 (FABP1 に関しては2分子) の疎水性リガンドを結合することから、細胞内における疎水性リガンドのトランスポーターとして機能していると考えられている [4-6]。さらに最近の研究から、遺伝子発現制御を介した細胞内脂質代謝に関与することや、細胞増殖や分化などの様々な生物学的役割を持つこともわかってきている [7, 8]。

また、FABPs と様々な疾患との関連も報告されている。FABP1 は、腎臓において近位尿細管に特異的に発現し、腎臓の再吸収機能を担う尿細管において、エネルギー及び脂質代謝に重要な働きをしていると考えられている。また、FABP1 は腎疾患進行過程に出現するタンパク尿や微小血流障害などのストレスに応答して誘導を受け尿中に排出されることから、腎疾患の予後診断マーカーとして有用である [9]。FABP3 は、心臓において遊離脂肪酸の細胞内輸送をつかさどり、心筋細胞へのエネルギー供給に重要な働きを担っている。心臓虚血による心臓細胞の傷害時に速やかに血中へ漏出するため、急性心筋梗塞の早期診断マーカーとして有用である [10-12]。FABP4 は代謝応答と炎症応答の結びつきに重要である。FABP4 欠損マウスは、インスリン抵抗性が改善し、動脈硬化が抑制されることから [13-15]、FABP4 特異的阻害薬が糖尿病や心血

管疾患といったメタボリックシンドロームの治療薬になりうると考えられている [16]。また、統合失調症患者と自閉症患者では FABP5 及び FABP7 の機能異常を引き起こす遺伝子変異があることが報告されている [17]。統合失調症患者の血液細胞では *FABP5* 遺伝子の発現量が低下していることから、FABP5 が統合失調症の診断において有力なバイオマーカーになる可能性がある。

1-3) 癌と代謝

癌研究の分野では、1980 年代以降、癌遺伝子・癌抑制遺伝子が次々と同定され、癌は様々な遺伝子の変異が蓄積することにより生じることがわかってきた。しかしながら、癌に関与する遺伝子の変異は予想よりはるかに多く、また、癌関連遺伝子の変異が主要なシグナル伝達経路に複雑に影響を及ぼしていることも判明してきた。そこで近年では、癌細胞内で起こっている事象を詳細に理解するためには、細胞内の代謝と関連付ける必要性があることが提唱されるようになってきた。

正常な分化した細胞は、生体内の「エネルギー通貨」である ATP の産生をミトコンドリアにおける酸化的リン酸化に依存している。一方、癌細胞は、酸素が十分にある好気条件下でも解糖系を利用して ATP を産生していることが知られている。この現象は、発見者の名前からワールブルグ効果(好氣的解糖)と呼ばれている (Figure 1-2) [18]。解糖系の ATP 産生速度は速いものの、ブドウ糖 1 分子当り 2 分子の ATP しか産生出来ず、ブドウ糖 1 分子当り 36 分子の ATP を産生する酸化的リン酸化と比較すると ATP 産生効率は非常に悪い。従って、様々な癌細胞で糖代謝の異常な亢進が多くみられる。癌の検査法の一つである陽電子放射断層撮影 (PET) は、フッ素の同位体などで標識したブドウ糖を体内に取り込ませ、この放射性薬剤が集まる部分を画像化することで癌の有無や位置を調べるというもので、正常細胞に比べて糖の取り込みが亢進し

ている癌細胞の代謝特性を利用した検査法である。癌細胞におけるワールブルグ効果の生理的意義に関しては、まだ不明な点が多く残っている。癌細胞は、その急速な増殖を支えるために、ATP 以外にも核酸、タンパク質を構成するアミノ酸、細胞膜の構成成分であるリン脂質や脂肪酸なども大量に必要となることから、ATP 以外の代謝性要求を満たすために一見非効率に見える様な代謝を利用しているのではないかとする説が現在のところ有力である。

また、癌細胞では糖代謝の亢進以外にも脂質代謝の異常もみられる。正常細胞が主にエネルギー源の一つとして外来性脂質を利用するのに対し、癌細胞では脂質の新規合成が盛んである [19]。脂肪酸合成のためのアセチル CoA を合成する ATP クエン酸リアーゼ (ACLY)、脂肪酸合成酵素 (FASN)、脂肪酸をアシル CoA に活性化するアシル CoA 合成酵素 (ACS) など脂質代謝酵素群の発現亢進により癌細胞の生存と増殖が促進されることがわかっている [20-22]。しかしながら、その分子機序に関しては現在のところまだよくわかっていない。

以上の様な糖代謝、脂質代謝の異常に加え、ペントースリン酸経路、グルタチオン生合成経路、グルタミン代謝などの経路が亢進していることも知られており [23-26]、正常細胞と癌細胞を区別する大きな特徴の一つとして、細胞内の代謝経路の制御破綻が挙げられる。

1-4) 研究の目的

今後も患者の増加が予想される癌であるが、今のところ有効な予防法は確立されていない。従って、治療戦略としては早期診断法の開発や転移の抑制が非常に重要となってくる。しかしながら、早期診断法の確立や癌細胞転移の詳細なメカニズムの解明は、社会的な要請が強いにも関わらず実現には至っていない。この様な現状において、様々な癌細胞において高発現しており、癌細胞の増殖や転移能との関連が示唆されている FABP5 は、有望な早期診断マーカー及び治療標的となることが期待される。

以上のことから、本研究では、大腸癌及び前立腺癌細胞を用いて、癌細胞の増殖における FABP5 の生理的機能を解析し、さらに、癌細胞特異的な発現制御機構を解析することを目的とした。

第1章の図表

Table 1-1. Family of fatty acid-binding proteins

Gene name	Common name	Tissue distribution	Chromosomal location
<i>FABP1</i>	Liver FABP	liver, intestine, kidney	2p11
<i>FABP2</i>	Intestinal FABP	intestine, stomach	4q28–q31
<i>FABP3</i>	Heart FABP	heart, mammary gland, etc.	1p33–p31
<i>FABP4</i>	Adipocyte FABP	adipocyte, macrophages	8q21
<i>FABP5</i>	Epidermal FABP	skin, brain, lens, macrophage	8q21.13
<i>FABP6</i>	Ileal FABP	ileum, ovary, adrenal gland	5q23–q35
<i>FABP7</i>	Brain FABP	brain, central nervous system	6q22–q23
<i>FABP8</i>	Myelin FABP	peripheral nervous system	8q21.3–q22.1
<i>FABP9</i>	Testis FABP	testis	8q21.13
<i>FABP12*</i>	—	testis, kidney, retina	8q21.13

* *FABP12* has recently been discovered. The gene has been identified, but published reports on the protein encoded by this gene are not yet available.

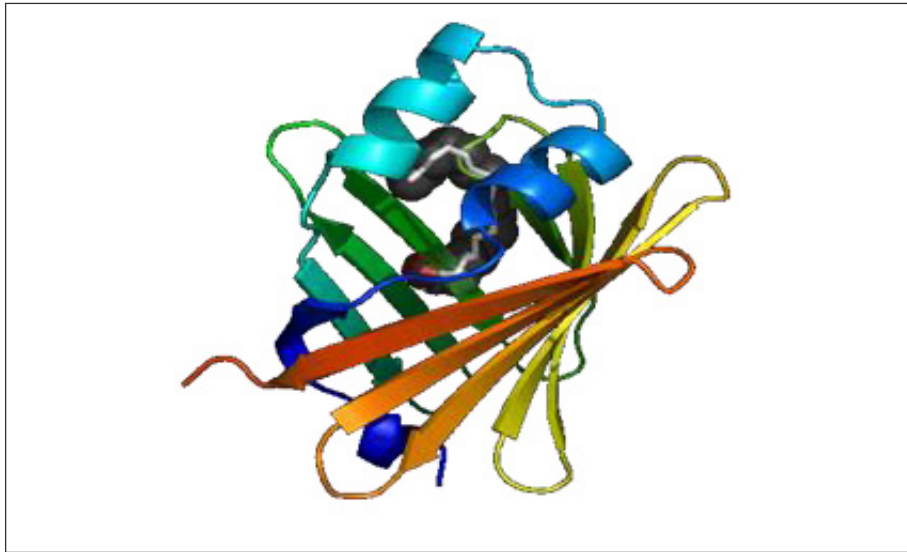
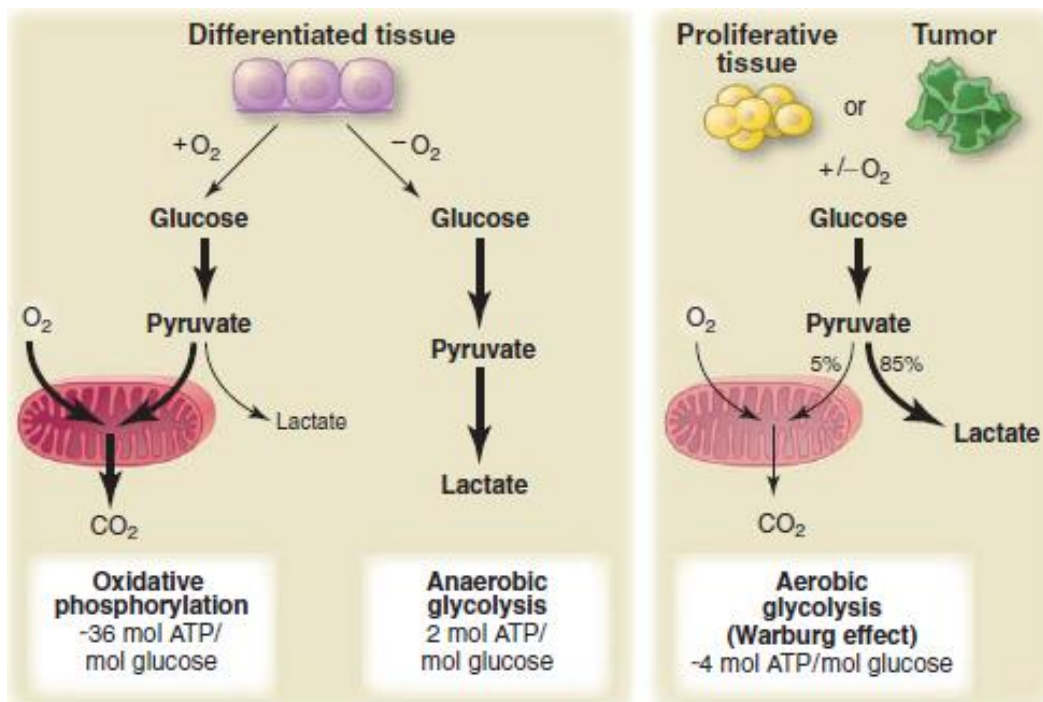


Figure 1-1. Crystal structure of ligand-bound FABP

The protein structure is similar for all the FABPs and shows the N-terminal helix-turn-helix motif and the β -barrel domain. Hydrophobic ligands-binding region is located in the interior of the β -barrel domain. Figure1-1 shows FABP5 with a bound palmitate molecule. The graphic was created using PyMOL.



[Science 324, 1029-1033 (2009)]

Figure 1-2. Schematic representation of the differences between oxidative phosphorylation, anaerobic glycolysis, and aerobic glycolysis (Warburg effect)

第 2 章

材料・方法

第2章 材料・方法

2-1) 試薬

5-Aza-2'-deoxycytidine と trichostatin A は和光純薬工業より購入した。GW0742 は SIGMA より購入した。Pull-down assay で使用した FG-beads は多摩川精機より購入した。Western blot analysis、蛍光免疫染色、フローサイトメトリー、免疫沈降法及び ChIP アッセイで使用した抗体に関しては、Table 2-1 に記載した。PCR に使用したプライマーは Integrated DNA Technologies 社で合成したもの購入した (Table 2-2)。

2-2) 細胞培養

PC-3, DU-145 及び LNCaP (ヒト前立腺癌細胞株) は RIKEN BioResource Center より、22Rv1 (ヒト前立腺癌細胞株) は American Type Culture Collection よりそれぞれ入手した。PNT2 (前立腺正常細胞由来細胞株) は Dr. O. Cussenot から供与されたものを使用した。HCT116, LoVo, DLD-1 (ヒト大腸癌細胞株) 及び CCD-18Co (ヒト正常大腸由来筋線維芽細胞) は American Type Culture Collection より、Caco-2 (ヒト大腸癌細胞株) は European Collection of Cell Cultures よりそれぞれ入手した。COS-7 は JCRB 生物資源バンクより入手した。前立腺正常及び前立腺癌細胞株は RPMI 1640 medium (Thermo Scientific)、大腸癌細胞株及び COS-7 は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Scientific)、CCD-18Co は Eagle's minimum essential medium (EMEM, SIGMA) に 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Scientific) 及び、antibiotic/antimycotic solution (Nacalai Tesque) を添加し、37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。

2-3) RNA 抽出、半定量 RT-PCR 法及び定量 real-time PCR 法

各細胞株及び組織より、TRI Reagent (Molecular Research Center) を用いて total RNA を抽出した。1 μ g の RNA から ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo) を用いて逆転写反応(① 37°C, 15 分間 ② 50°C, 5 分間 ③ 98°C, 5 分間)を行い、cDNA を合成した。半定量 RT-PCR には GoTaq Green Master Mix (Promega) を使用した。定量 real-time PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いて StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems) により行った。

2-4) Western blot analysis

各細胞株及びヒト組織より、RIPA buffer with protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque) を用いてタンパク質を抽出した。ブラッドフォード法によりタンパク質濃度を測定し、50 μ g/lane のタンパク質を SDS-PAGE にて電気泳動し、PVDF 膜 (ATTO) に転写した。5% skim milk in TBS-T にて室温・1 時間ブロッキングした後、一次抗体反応 (4°C・over night) を行った。一次抗体反応後、TBS-T buffer で PVDF 膜を洗浄 (15 分間×2) し、二次抗体反応 (室温・1 時間) を行った。TBS-T buffer で洗浄 (15 分間×2) 後、chemiluminescent substrate (Thermo Scientific) を用いて化学発光の検出を行った。検出には Image Quant LAS4000 Mini (GE Healthcare Life Sciences) を使用した。

2-5) Small interference RNA (siRNA)

Negative control siRNA 及び c-MYC, SP1 または *FABP5* 遺伝子特異的な siRNA (Integrated DNA Technologies) を最終濃度 10 nM となるようにトランスフェクションした。培養細胞へのトランスフェクションには Lipofectamine RNAiMAX (Life

Technologies) を使用した。トランスフェクション 72 時間後に total RNA を回収し、定量 real-time PCR により発現量を解析した。

2-6) バイサルファイトシーケンス及び COBRA 法

各細胞株及び組織より NucleoSpin Tissue (MACHEREY-NAGEL) を用いてゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト処理 [27] を行った。バイサルファイト処理した DNA を鋳型に、AmpliTaq Gold 360 DNA polymerase (Life Technologies) を用いて PCR を行った。PCR 産物を pGEM-T easy vector (Figure 2-1, Promega) に TA クローニング法で導入し、E. coli DH5 α (SciTrove) を形質転換した。それぞれのライゲーション反応産物から少なくとも 10 個以上のクローンを任意に選択し、DNA シーケンス解析を行った。バイサルファイト配列の解析には Quantification Tool for Methylation Analysis (QUMA) [28] を使用した。また、combined bisulfite restriction analysis (COBRA) による DNA メチル化解析では、バイサルファイト PCR 産物を Hha I で制限酵素処理した後、2% (w/v) アガロースゲルを用いて電気泳動し DNA 断片の泳動パターンを解析した。

2-7) qAMP

FABP5 プロモーター領域の DNA メチル化解析のため qAMP (quantitative analysis of DNA methylation using real-time PCR) 法を行った [29]。即ち、各細胞株及び組織より抽出したゲノム DNA をメチル化感受性の制限酵素である BstU I で処理した後、real-time PCR 法を用いて定量的に DNA メチル化の解析を行った。100% メチル化のコントロール及びスタンダード(5段階希釈列)として BamHI 及び EcoRI で制限酵素処理したゲノム DNA を用いた。また、DNA 量補正用の内部標準として *FABP5* 遺伝子の第 2

エクソン中にプライマーセットを設計した (Table 2-2)。

2-8) 細胞増殖試験

6-well プレートに 2×10^5 cells/well となるように細胞を播くと同時に siRNA (20 nM negative control siRNA もしくは標的遺伝子特異的 siRNA) を Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) を用いてトランスフェクションし、24, 48, 72 時間後にそれぞれ細胞計数盤 (血球計算盤) を用いて細胞数を測定した。

2-9) 細胞周期の測定

細胞を回収し ice-cold PBS で洗浄した後、70 % エタノールで固定した。続いて、propidium iodide stain solution (100 μ g/ml RNase A, 1 % Triton X-100, 40 mM sodium citrate and 50 μ g/ml propidium iodide) で核内の DNA を染色 (室温・1 時間・暗所下) した。FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) を用いて測定し、G0/G1 期・S 期・G2/M 期の割合を計測した。

2-10) アポトーシス試験

細胞を回収し BD Cytofix/Cytoperm Fixation and Permeabilization Solution を用いて細胞の固定及び膜透過処理を行った。細胞を洗浄した後、活性型 Caspase-3 抗体 (BD Pharmingen) と反応させた (室温・1 時間)。続いて、洗浄後 FITC-conjugated anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch) と反応させた (室温・30 分間・暗所下)。反応後細胞を PBS に懸濁し、FACSCalibur flow cytometer を用いて caspase-3 の活性化を測定した。データ解析には Cell Quest software を使用した。

2-11) *In vitro* 細胞浸潤試験

BD BioCoat マトリゲルインバージョンチャンバー (24-well plate, 8 μ m pore size; BD Biosciences) を用いて癌細胞の浸潤特性を評価した。即ち、 5×10^4 個の HCT-116 細胞を FBS 不含 DMEM 培地に懸濁し upper chamber に播いた。下部 well には 10 % FBS 含有 DMEM 培地を添加した。24 時間後、浸潤した細胞を Diff-Quik Stain Kit (Sysmex) を用いて固定・染色し顕微鏡で観察した。1 枚のメンブレンにつき無作為に選択した 5 ヶ所の視野 (200 倍) における浸潤細胞数を計測し、その平均値を算出した。

2-12) コンストラクト作製

FABP5 プロモーターの転写活性を測定するため、*FABP5* 遺伝子のプロモーター領域を pCpGL-basic ベクター (Figure 2-2, Dr. Michael Rehli より供与) [30] に組み込んだレポータープラスミドを作製した。*FABP5* 遺伝子のプロモーター領域は、PC-3 細胞より抽出したゲノム DNA を鋳型に PCR 法により増幅し、pCpGL-basic ベクターの Spe I / Nco I サイトに組み込んだ。FABP5 プロモーター 5' 領域の欠失変異体は、pCpGL-FABP5/-2000 を鋳型として欠失変異体用プライマー (Table 2-2) を用いた PCR による増幅後、pCpGL-basic ベクターに組み込むことで作製した。また、*FABP5* 遺伝子の第一イントロン部の転写活性への影響を調べるため、pCpGL-FABP5/-337~+1285 を作製した。まず、第一イントロンを含む約 2Kb の領域を PCR 法により増幅した後、Nhe I / BamH I による制限酵素処理を行い、FABP5 プロモーター-337~+1285 領域の DNA 断片を作製した。続いて、BamH I もしくは Nco I サイトを突出末端に持つ相補的なオリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、スプライシングアクセプター領域の DNA 断片を作製した [31]。FABP5 プロモーター-337~+1285 領域の DNA 断片及びスプライシングアクセプター領域の DNA 断片を pCpGL-basic ベクターの Spe I / Nco I サイトに組み

込むことで pCpGL-FABP5/-337~+1285 を作製した。FABP4、FABP5、c-MYC 及び SP1 の発現ベクターは、PCR 法によるタンパク質翻訳領域の増幅後、pCI-neo mammalian expression vector (Figure 2-3, Promega) または、pFLAG-CMV-5a vector (Figure 2-4, SIGMA) に組み込むことで作製した。全てのコンストラクトは DNA シークエンス解析により塩基配列の確認を行った。

2-13) ルシフェラーゼアッセイ及び *in vitro* メチル化アッセイ

PC-3 細胞を 24-well プレートに播種し、70-80% コンフルエント時にレポーターコンストラクト及び発現ベクターを Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を用いてトランスフェクションした。遺伝子導入効率の補正のため、内部標準として pGL 4.74 [hRluc/TK] vector (Promega) を共発現させた。トランスフェクションの 24 時間後、Dual-Luciferase Reporter Assay kit (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。測定には PowerScan HT microplate reader (BioTek) を使用した。*In vitro* メチル化アッセイでは、pCpGL-FABP5/-337~+1285 を CpG メチルトランスフェラーゼ (M. SssI, New England Biolabs) でメチル化した後、上述の通りルシフェラーゼアッセイを行った。

2-14) 部位特異的変異導入

pCpGL-FABP5/-337~+1285 を鋳型に KOD-Plus-Mutagenesis Kit (Toyobo) を使用して inverse PCR 法により部位特異的変異導入を行った。全てのコンストラクトは DNA シークエンス解析により塩基配列の確認を行った。

2-15) クロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ)

クロマチン免疫沈降法は ChIP-IT Express Enzymatic (Active Motif) を使用し、メーカーの手順書に従い行った。クロマチン免疫沈降で回収した DNA は、Gel/PCR Extraction kit (FastGene) を用いて精製・濃縮した後、定量 real-time PCR 法により解析した。定量 real-time PCR 法に際し使用したプライマーに関しては、Table 2-2 に記載した。

2-16) ヒト組織サンプル

正常前立腺組織 (中心及び辺縁領域, 49 歳, 男性) 及び前立腺腫瘍組織 (20% 正常組織を含む, グリーソンスコア ; 4+5=9, 47 歳, 男性) は iLSBio より購入した。前立腺及び大腸組織由来のゲノム DNA は OriGene Technologies より購入した。大腸癌及び正常組織 cDNA アレイ (TissueScan Cancer cDNA Array) は OriGene Technologies より購入した。

2-17) 統計解析

それぞれの実験は少なくとも 3 回行い、データは全て平均値±標準偏差 (S. D.) で表した。統計学的有意差の検定には Student t-test を用い、 P 値 < 0.05 の場合を統計学的に有意とした。

第2章の図表

Table 2-1. Antibodies used in this study

Target	Application	Supplier
FABP5	WB	Abcam
c-MYC	WB	Cell Signaling Technology
SP1	WB	Cell Signaling Technology
p21 ^{WAF/Cip1}	WB	Cell Signaling Technology
p53	WB	Cell Signaling Technology
p-p53 (Ser 15)	WB	Cell Signaling Technology
AKT	WB	Cell Signaling Technology
p-AKT (Ser 473)	WB	Cell Signaling Technology
DDX5	WB	Cell Signaling Technology
PGC-1 β	WB	Bethyl Laboratories
β -actin	WB	Santa Cruz Biotechnology
α -tubulin	WB	Santa Cruz Biotechnology
HRP conjugated anti-rabbit IgG	WB	Enzo life science
HRP conjugated anti-mouse IgG	WB	Enzo life science
acetyl-histone H3 (Lys 9)	ChIP	Cell Signaling Technology
dimethyl-histone H3 (Lys 9)	ChIP	Cell Signaling Technology
MECP2	ChIP	Active Motif
TBP	ChIP	Santa Cruz Biotechnology
rabbit normal IgG	ChIP	Santa Cruz Biotechnology
FABP5	IHC	[76]
anti-rabbit IgG-FITC	IHC	Santa Cruz Biotechnology
active Caspase-3	FC	BD Pharmingen
FITC-conjugated anti-rabbit IgG	FC	Jackson ImmunoResearch
Agarose conjugated anti-DDDDK-tag	IP	MBL

HRP; horseradish peroxidase, WB; Western blotting, ChIP; Chromatin immunoprecipitation

IHC; Immunohistochemistry, FC; Flow Cytometry, IP; immunoprecipitation

Table 2-2. Sequences of primers used in this study

	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<u>Semiquantitative RT-PCR</u>		
FABP1	GCAGAGCCAGGAAAAC TTTG	TCTCCCCTGTCATTGTCTCC
FABP2	TTGGAAGGTAGACCGGAGTG	AGGTCCCCCTGAGTTCAGTT
FABP3	AGCCTAGCCCAGCATCACTA	GTCCCATTCTTTTCGATGA
FABP4	TACTGGGCCAGGAATTTGAC	GTGGAAGTGACGCCTTTCAT
FABP5	AAGGAGCTAGGAGTGGGAAT	TCATGACACACTCCACCACT
FABP6	CTCATCCCTCTGCTCTCTGG	GTGCTGGGACCAAGTGAAGT
FABP7	GTGGGAAATGTGACCAAACC	CTTTGCCATCCCATTCTGT
FABP8	CAAGCTAGGCCAGGAATTTG	CCACGCCCTTCATTTTACAT
FABP9	TGATGGGAAAATGATGACCA	TCTCTTTGCCAAGCCATTTT
FABP12	GATGGGAAAATGGTGGTGGA	TTGATGATACTTTCTCGTATGTTCCG
β-actin	AGGTCATCACCATTGGCAAT	ACTCGTCATACTCCTGCTTG
<u>Quantitative real-time PCR</u>		
FABP5	GCTGATGGCAGAAAACTCAGA	CCTGATGCTGAACCAATGCA
MAGL	GCTGGACCTGCTGGTGTT	CCTGACGAAAACGTGGAAGT
HSL	GCTGCATAAGGGATGCTTCT	GAGATGGTCTGCAGGAATGG
ADRP	GACTCTTCCGTGCGTTCTTC	CTGAGCCCCTAGTCTGTGG
PDPK1	CAGGGGTGATGGACAAGACC	TCATCCGACTCCCCAAGACT
ACC α	GGTTTGTGGAAGTGGAAAGGA	CACTCCGCCAGATCCTTATT
FASN	CCCCTGATGAAGAAGGATCA	ACTCCACAGGTGGGAACAAG
IDH1	TTTTCCCTACGTGGAATTTGG	AGCATCCTTGGTGACTTGGT
c-MYC	CGTCTCCACACATCAGCACAA	TC TTGGCAGCAGGATAGTCCTT
SP1	GGCCTCCAGACCATT AACCT	GAGACCAAGCTGAGCTCCAT
18S rRNA	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT
GAPDH	CAGCCTCAAGATCATCAGCA	GGTGCTAAGCAGTTGGTGGT

Table 2-2 (continued). Sequences of primers used in this study

	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<u>Bisulfite PCR</u>		
-313/+105 promoter	GGTTAGGTTTTTAGGTGATTTTTT	TCAAAACCTTTACTATCCACCAAAC
+106/+400 intron 1	TGAATATATGAAGGAGTTAGGTGAGGTAT	AAAAACAAAATAAAATAAACCCAC
<u>qAMP</u>		
E-box3	ATCCCCTCCCATCTTCCCC	GTGCTGCGCGCTGCACCC
qAMP control	AATGGCCAAGCCAGATTGTA	GCCATCAGCTGTGGTTTCTT
<u>ChIP-qPCR</u>		
GC-box 2/3, 4	CTGGTTAGCACCTCCCAGC	CTATGCGGCCAATGGGAGG
TATA-box & GC-box 5	CCTCCCATTGGCCGCATAG	GTGGCAGCGTGTGTGAG
E-box 1	GAAGGAGCTAGGTGAGGCAC	GGACCTAGGGACAGACGACC
E-box 2	GTCGTCTGTCCCTAGGTCC	GAAGATGGGAGGGGATGGG
E-box 3,4	ATCCCCTCCCATCTTCCCC	CACGCTCCCTGCTCCTC
<u>Cloning</u>		
FABP5 /-2000 ~ +46	CTAGCTAGCGTAGAGCTTAAGGGGCAT	ATGCCATGGTGGGTGCGGG
FABP5 /-1223 ~ +46	AAGAAGTAGTAGTGTCTCGG	ATGCCATGGTGGGTGCGGG
FABP5 /-895 ~ +46	CTAGACTAGTACTTCCAACAGGCACCCG	ATGCCATGGTGGGTGCGGG
FABP5 /-567 ~ +46	CTAGCTAGCTCCCACACTATGGGCCAGGGA	ATGCCATGGTGGGTGCGGG
FABP5 /-404 ~ +46	CTAGCTAGCAGTCCGGCGAGGGCTAATC	ATGCCATGGTGGGTGCGGG
FABP5 /-337 ~ +46	CTAGCTAGCAAACGGAGGGGTGCAGGAGA	ATGCCATGGTGGGTGCGGG
FABP5 /-182 ~ +46	CTAGCTAGCTCGCGTACCTGGCAAGA	ATGCCATGGTGGGTGCGGG
FABP5 /-84 ~ +46	CTAGCTAGCTCCCATTGGCCGCATAGC	ATGCCATGGTGGGTGCGGG
FABP5 /-49 ~ +46	GGACTAGTGCCGTTATAAAGCAGCCGC	TGCAGGAATTCCTTTTAACTGC
FABP5 /-337 ~ +1285	CTAGCTAGCAAACGGAGGGGTGCAGGAGA	TGATTGTCTTGATGAAGAAC
FABP4 ORF	CGGAATTCACCATGTGTGATGCTTTTGTAGG	ATAAGAATGCGGCCGCTTATGCTCTCTCAT AAACTCT
FABP5 ORF	CGGAATTCACCATGGCCACAGTTCAGCA	CCGGATCCTTCTACTTTTTCATAGAT
SP1 ORF	CTAGCTAGCCACCATGAGCGACCAAGATC	CGGAATTCCTCAGAAGCCATTGCCA
c-MYC ORF	CGGAATTCACCATGCCCCCAACGTTAGCTT	ATAAGAATGCGGCCGCTTACGCACAAGAGT TCCGTA
<u>Mutagenesis*</u>		
GC-box 1 mut	actaGtGCCAGGCTCCAGGTGACCCCTCTG	TCTCCTGCACCCCTCCGTTT
GC-box 2/3 mut	aaGcttGGGGACCGGGCGAGGCCCGCTCCC	CCCGCCGGGCGCCCTTGGGCCTTC
GC-box 4 mut	agatCTCCCATTTGGCCGCATAGCGCCGCC	GCCTCGCCCGGTCCCCGC
GC-box 5 mut	ggtACCAGCGCGGGCCCGGTTATAAAG	CGCTATGCGGCCAATGGG
E-box/-301 mut	CtCGaGACCCCTCTGGCTTCTGGCCTTGCA	GAGGCTGGCCCCGCCTCTC
κB-site 1 mut	tCtAGaCCCTGCTTGCAGGAGGCGCCGAGA	CCGGCGCGCCACGCCTCA
κB-site 2 mut	tctagaCCCGCGGGCGGGCGGGGACCGG	CTGGCCTTCTCGGGGTGC
E-box 1 mut	gcTtGCGTGTGTGCGGTCTGTCTTCCC	TTGCAGGCGCTGCCAG
E-box 2 mut	atctCCAGATTCTGGGGCAGGAGATGCTC	CTGACGGGGACCTAGGGACA
E-box 3 mut	CtCGaGGCCGTTGGGTGCAGCGCGCAGCA	GTGGGAAGATGGGAGGGGA
E-box 4 mut	CtGCaGGCAGGCGGGCAGGAGCAGGGAGC	GTGCTGCGCGCTGCACCC

*The mutated nucleotides are shown in lowercase.

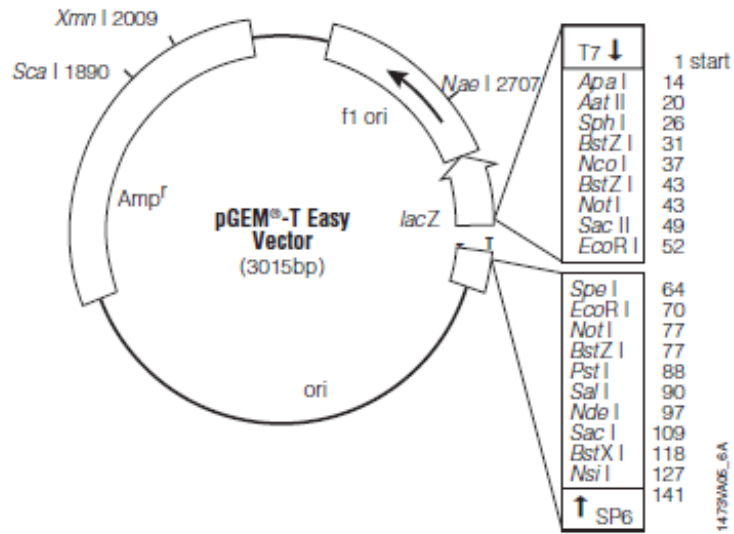


Figure 2-1. Vector map of pGEM-T Easy vector

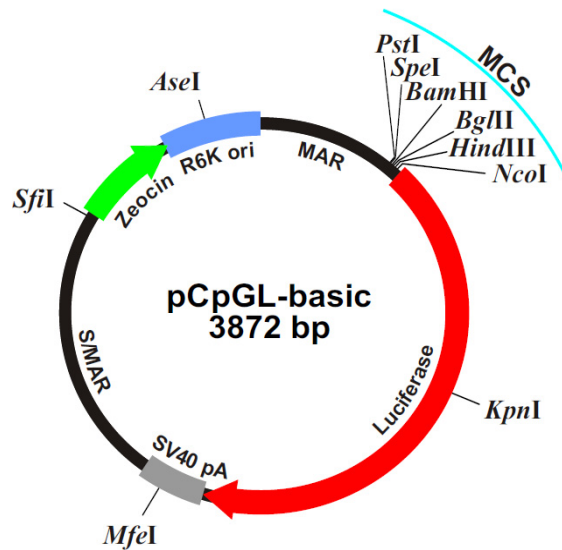
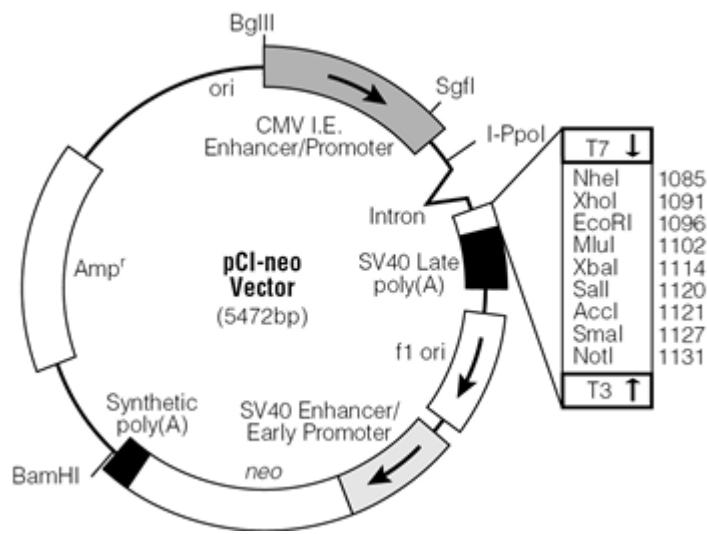


Figure 2-2. Vector map of pCpGL-basic vector

pCpGL-basic luciferase reporter vector completely lacks CpG dinucleotides and can be used to study the effect of promoter DNA methylation in transfection assays.



0914VA01_5A

Figure 2-3. Vector map of pCI-neo vector

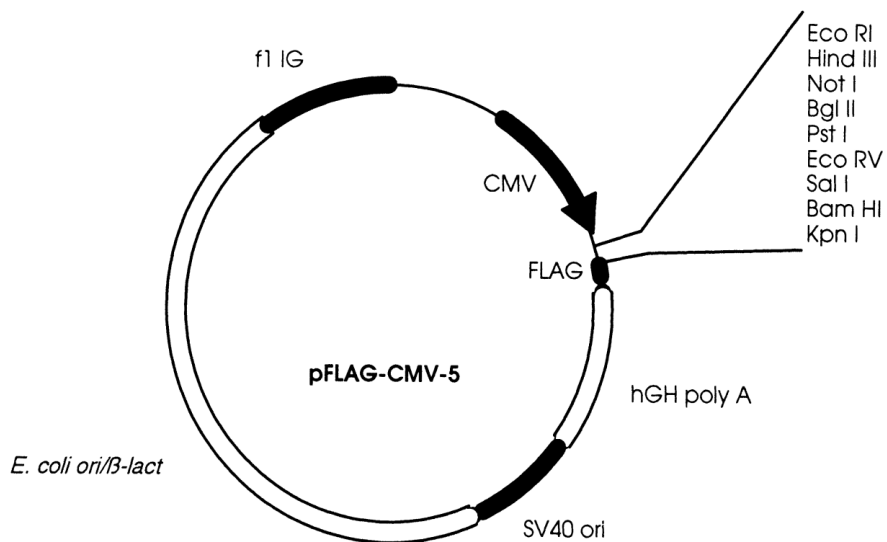


Figure 2-4. Vector map of pFLAG-CMV-5 vector

第 3 章

癌細胞における FABP5 の発現 及び機能解析

第3章 癌細胞における FABP5 の発現及び機能解析

3-1) 緒言

日本における大腸癌の罹患者数は、男女ともに胃癌について2位となっており、毎年新たに約10万人が発症している。女性に至っては癌による死亡原因の第1位であり [1]、世界的に見ても罹患者数の多い癌である [32]。大腸癌発症・悪性化の原因として、遺伝子の変異、エピゲノム修飾の変化、免疫機能の不具合、食事などの環境因子が考えられており [33, 34]、その臨床的重要性は増していると言える。しかしながら、大腸癌悪性化の詳細な分子機構に関してはまだよく分かっていないのが現状である。従って、大腸癌の悪性化に関わる遺伝子を同定し、癌の早期発見につながる有用なバイオマーカーの開発が必要不可欠である。

FABP5 は前立腺癌で高発現し、癌細胞の悪性化に深く関与していることが示されている [35-38]。最近の研究から、癌細胞の増殖を維持するためには代謝のリプログラミングが必要であると考えられている。実際に、癌細胞では新規の脂質合成が亢進していることがわかっており、脂肪酸の制限により癌細胞の増殖を制御することができるとの報告が多くされている [19-22]。脂肪酸は細胞膜の構成要素、エネルギー源、細胞内シグナル分子として必要不可欠であることから、その代謝に関わる FABPs は細胞増殖において重要な役割を果たしていると考えられる。さらに近年、様々な癌において FABP5 が高発現していることが報告されており [39-46]、FABP5 がこれらの癌の有用なバイオマーカー及び治療標的となることが期待できる。しかしながら、癌細胞の増殖における FABPs の詳細な生理的機能についてはほとんどわかっていない。従って、本研究では、FABP5 の生理的機能に焦点を当て、大腸癌細胞の増殖における FABP5 の影響を解析した。

3-2) 結果及び考察

大腸癌細胞株における FABP の発現

まずはじめに、大腸癌細胞株において発現している FABPs を半定量 RT-PCR 法で確認した。その結果、Caco-2 では先行研究にあるように FABP1 と FABP3 が発現していた [47]。また、全ての大腸癌細胞株において FABP6 の発現がみられた。大腸癌において FABP6 が高発現することが先行研究で報告されており [48, 49]、その結果と一致する。興味深いことに、全ての大腸癌細胞株において FABP5 の発現が顕著に上昇しており、その発現量は FABP6 よりも高いことから、FABP5 が大腸癌細胞において重要な機能を有していることが示唆された (Figure 3-1)。次に、細胞株間における FABP5 mRNA、タンパク質発現量の違いを定量 real-time PCR 法及び Western blot 法により解析した。その結果、大腸癌細胞株は正常細胞 CCD-18Co に比べて FABP5 発現量が顕著に上昇していることがわかった (Figure 3-2)。HCT116 は悪性度の高い大腸癌細胞であり、一方、Caco-2 は比較的悪性度の低い大腸癌細胞であることから [50, 51]、悪性度依存的に FABP5 が高発現していることが示唆された。また、ヒト大腸正常組織及び大腸癌組織における FABP5 の発現量を調べたところ、組織レベルでも大腸癌では FABP5 が高発現していることがわかった (Figure 3-3)。

FABP5 の細胞増殖に与える影響

大腸癌細胞における FABP5 の機能を解明するため、細胞増殖に与える FABP5 の影響を調べた。siRNA を用いて FABP5 をノックダウンした HCT116 (Figure 3-4) では有意に細胞増殖が抑制された (Figure 3-5)。さらに、細胞周期に与える影響を詳しく調べるため、フローサイトメーターを用いた細胞周期解析を行った。その結果、FABP5 ノック

クダウンにより G1/G0 期の細胞の割合が有意に増加し、S 期・G2/M 期の細胞数が減少していたことから、G1/G0 期において細胞周期の進行が停止 (G1 arrest) していることが示唆された (Figure 3-6)。細胞周期の重要な制御因子として、サイクリン依存性キナーゼの阻害因子である p21 がよく知られている [52]。そこで、FABP5 ノックダウンにより p21 の発現制御に関わる p53、c-MYC [53] 及び p21 の発現量に変化がみられるかどうかを検討した。その結果、活性化型 p53 タンパク質の指標である Ser15 リン酸化レベルの上昇、及び、p21 の発現を抑制している c-MYC の発現量低下がみられ、予想された通り p21 タンパク質の顕著な発現上昇がみられた (Figure 3-7)。また、FABP5 ノックダウンによりアポトーシスが誘導されるかどうかを検証するため、活性化型カスパーゼ 3 の発現量を指標としたアポトーシス試験を行った。その結果、FABP5 ノックダウンにより有意にアポトーシスが誘導されることがわかった (Figure 3-8)。従って、FABP5 発現抑制による大腸癌細胞の増殖抑制は、p21 を介した G1/G0 期における細胞周期の停止とアポトーシス亢進によるものであることが示唆された。これらの結果は、大腸癌の細胞増殖において FABP5 が重要な機能を果たしていることを示しており、FABP5 高発現と大腸癌細胞の増殖との関連を初めて示したことになる。

FABP5 の浸潤能への影響

次に、FABP5 が大腸癌細胞の浸潤能に与える影響を検証するため、*in vitro* 細胞浸潤試験を行った。その結果、FABP5 ノックダウンにより HCT116 細胞の浸潤能が有意に抑制された (Figure 3-9)。従って、FABP5 は大腸癌細胞の浸潤能を促進することが示唆されたが、その分子機構に関しては不明である。近年、脂肪酸合成の亢進にみられるような脂質代謝の変質により癌細胞の悪性化が起こると報告されている [54]。脂肪酸はトリグリセリドの形で細胞内の脂肪滴中に貯蔵されており、必要な時にエネルギー

一産生やセカンドメッセンジャーとして機能している。最近の研究から、遊離脂肪酸の放出に関与するモノアシルグリセロールリパーゼ (MAGL) が、癌細胞の遊走や浸潤におけるシグナル分子として働くプロスタグランジン E2 やリゾホスファチジン酸のような脂質産生を介して癌細胞の悪性化に関与することが示唆されている (Figure 3-10)。また、悪性度の高い癌で MAGL は高発現しており、脂肪酸代謝を制御し癌細胞の浸潤や生存を促進すると報告されている [55]。興味深いことに、FABP5 ノックダウンにより MAGL 発現量が有意に減少するとともに、MAGL の基質となるモノアシルグリセロール産生の律速酵素であるホルモン感受性リパーゼ (HSL) の発現量も顕著に減少していた (Figure 3-9)。FABP5 は脂肪酸の輸送に関与するタンパク質であり、大腸癌細胞の浸潤における MAGL 依存的なシグナル伝達経路との機能的な関連性を今後詳しく検証する必要がある。

FABP5 を介するシグナル伝達機構の解析

これまでに、FABP5 高発現による癌細胞の増殖促進機構のモデルとして、核内受容体 PPAR β/δ シグナル伝達経路の活性化によるものが報告されている [56-58]。即ち、FABP5 が PPAR β/δ にリガンドを受け渡し、細胞の増殖や生存に関わる PPAR β/δ 標的遺伝子群を活性化することで癌細胞の増殖促進を誘導するモデルである。しかしながら、このモデルが大腸癌細胞にも当てはまるのかどうかはわかっていない。従って、このシグナル伝達経路が大腸癌細胞においても機能しているのかを検証するため、PPAR β/δ のアゴニストである GW0720 を用いて、FABP5 が PPAR β/δ シグナル伝達経路に与える影響を調べた。即ち、HCT116 細胞の FABP5 発現量をノックダウンにより抑制し、GW0720 添加により PPAR β/δ 標的遺伝子の発現がどうなるかを検証した。その結果、PPAR β/δ の標的遺伝子である ADRP [59] の mRNA 発現量は FABP5 の発現量に関わ

らず上昇した (Figure 3-11)。一方、Caco-2 細胞に FABP5 を過剰発現させ、GW0720 添加により PPAR β/δ 標的遺伝子の発現がどうなるかを調べたところ、FABP5 過剰発現による PPAR β/δ シグナルの活性化はみられなかった (Figure 3-12)。これらの結果は、大腸癌細胞においては、FABP5 が PPAR β/δ リガンドの主要なトランスポーターとして機能していないことを示唆している。さらに、細胞の生存シグナルの活性化に繋がる AKT /protein kinase B のリン酸化に関与する PDK1 の発現誘導及び、AKT のリン酸化レベルの変化はみられなかった (Figure 3-13A)。この結果は、GW0720 により AKT のリン酸化レベルに変化はみられないという最近の研究結果と一致し [60-62]、FABP5 高発現を介する癌細胞の増殖機構には、PPAR β/δ シグナル伝達経路とは異なる新規のシグナル伝達経路が存在することを強く示唆している。実際、PPAR β/δ シグナル伝達経路は大腸癌細胞の増殖を促進せず、むしろ大腸癌の発生を抑制するという研究結果も報告されている [61-63]。Figure 3-11, 12 に示したように、GW0742 処理によっても FABP5 発現量に変化はみられなかったことから、大腸癌細胞において、*FABP5* 遺伝子は PPAR β/δ 非依存的な経路により発現制御されていることが示唆される。さらに、FABP5 ノックダウンにより、acetyl-CoA carboxylase α (ACC α) と isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) の mRNA 発現量が減少した (Figure 3-13B)。ACC α は脂肪酸合成の律速酵素であり、また、IDH1 は脂肪酸合成に必要な NADPH を供給する反応を触媒することから、FABP5 は大腸癌細胞において、脂質代謝に関わる遺伝子群の発現制御に関与することが示唆された。

通常、FABPs は細胞質に局在するが (Figure 3-14)、リガンド依存的に核に移行することが知られている (Figure 3-15) [64]。核に移行した FABPs は、PPAR 等の核内受容体にリガンドを受け渡し、その下流シグナルを活性化すると考えられている [7]。しかしながら、Figure 3-11, 12 に示したように、少なくとも大腸癌細胞において

FABP5 は PPAR β / δ シグナルの活性化には寄与していないことから、FABP5 を介するシグナル伝達経路には、これまでには知られていない新規経路が存在する可能性が示唆される。

そこで次に、FABP5 と特異的に相互作用するタンパク質を同定するため、タンパク質間相互作用解析を行った。即ち、FLAG 融合 FABP5 タンパク質を一過性で発現させたタンパク質抽出液を用いて免疫沈降を行い、その後 SDS - PAGE で分子量に従ってタンパク質を分離し、銀染色により FABP5 と特異的に相互作用するタンパク質を検出した (Figure 3-16A)。その結果、p68 RNA helicase (DEAD box polypeptide 5 : DDX5) 及び peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 β (PGC-1 β) が FABP5 と相互作用することが示唆された (Figures 3-16B, C)。DDX5 は、DEAD box RNA helicase ファミリーの一つであり、当初、ATP 依存的に RNA helicase 活性を持つタンパク質として見出され [65, 66]、様々な RNA プロセッシングの段階で機能することがわかっている。ノックアウトマウスを用いた研究などから、組織形成等の発生初期段階で重要な役割を果たすことが示唆されている [67]。それに加えて、近年では、RNA helicase 活性非依存的に様々な転写因子の共役因子として機能することが報告されている [68-72]。一方、PGC-1 β は、ミトコンドリア機能制御、脂肪酸 β 酸化、脂質合成・輸送の制御等の細胞内代謝に関わる遺伝子群の発現を、様々な核内受容体とともに制御する転写共役因子として知られている [73, 74]。また最近では、癌との関連も報告されている [75]。さらに、FG-beads を用いた pull-down assay を行ったところ、FABP5 は phosphofructokinase, platelet isoform (PFKP)、voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)、adenine nucleotide translocator (ANT) 及び tubulin とともに相互作用する可能性が示唆された (Figure 3-17)。

以上の結果から、FABP5 ノックダウンにより、ACC α ・IDH1 等の脂肪酸代謝関連遺伝子の mRNA 発現量が減少したこと (Figure 3-13B)、FABP5 は DDX5 及び PGC-1 β と相互作用すること (Figure 3-16C) を考慮すると、癌細胞において FABP5 は、PGC-1 β や DDX5 と転写複合体を形成し標的遺伝子の発現制御に関わる、脂肪酸代謝の重要な制御因子の一つである可能性が強く示唆された。脂肪酸は、癌細胞の増殖に際して成体膜の構成成分、エネルギー源またはシグナル伝達分子として必要不可欠であることから (Figure 3-18)、FABP5 は脂肪酸代謝制御を介して、癌細胞の増殖において重要な機能を果たしている可能性がある。現在、FABP5 依存的な癌細胞増殖の詳細な分子機構の解析を進めているところである。

第3章の図表



Figure 3-1. The expression profile of FABP subtypes in colorectal cancer (CRC) cells

Semi-quantitative analysis of the expression of FABP genes by RT-PCR in human CRC cell lines (HCT116, LoVo, DLD-1 and Caco-2) and normal colon fibroblast (CCD-18Co) cells. β -actin served as a loading control. The data shown are representative of three independent experiments.

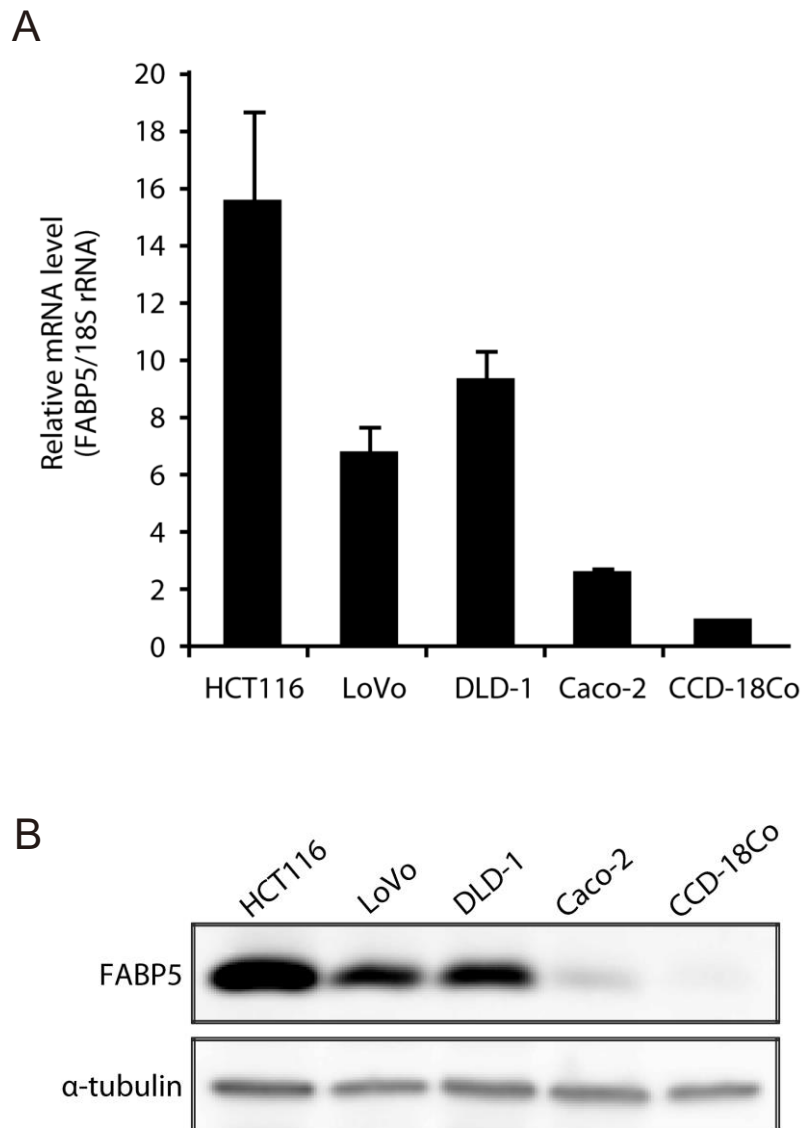


Figure 3-2. FABP5 expression in CRC cells

(A) Relative expression levels of FABP5 mRNA in normal and cancer cells were analyzed by Q-PCR. The results shown are the means \pm S.D. of three independent experiments. (B) Western blot analysis of FABP5 protein levels in HCT116, LoVo, DLD-1, Caco-2 and CCD-18Co cells. Whole cell lysates were prepared and subjected to Western blotting. The data shown are representative of three independent experiments.

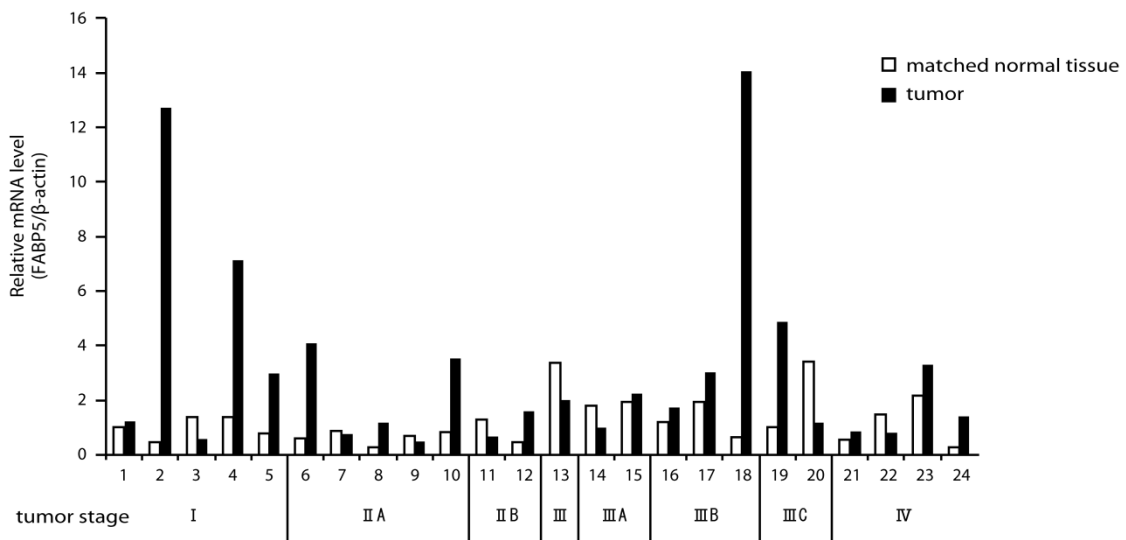


Figure 3-3. FABP5 is upregulated in human colorectal tumors

Analysis of TissueScan Disease tissue qPCR array consisting of cDNA derived from samples of denoted stages of colorectal tumors and matched normal colorectal tissue. FABP5 expression was normalized to β -actin and calibrated to the mean mRNA level in normal tissue (sample 1).

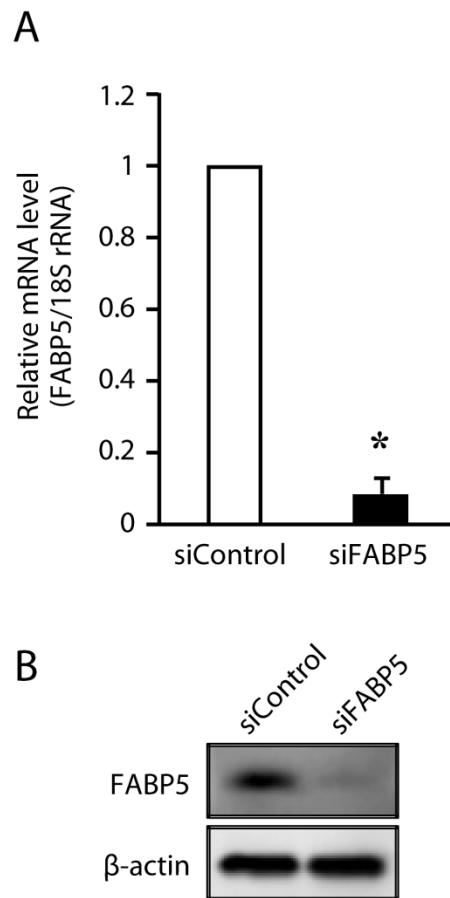


Figure 3-4. Knockdown of FABP5 in HCT116 cells

HCT116 cells were transfected with siRNA against FABP5 or negative control. After 72 hours, the expression level of FABP5 mRNA (**A**) and protein (**B**) were evaluated by quantitative real-time PCR and Western blotting respectively. Result shown is the mean \pm SD of four independent experiments (**A**), and one representative data of three independent experiments is shown (**B**). Asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$).

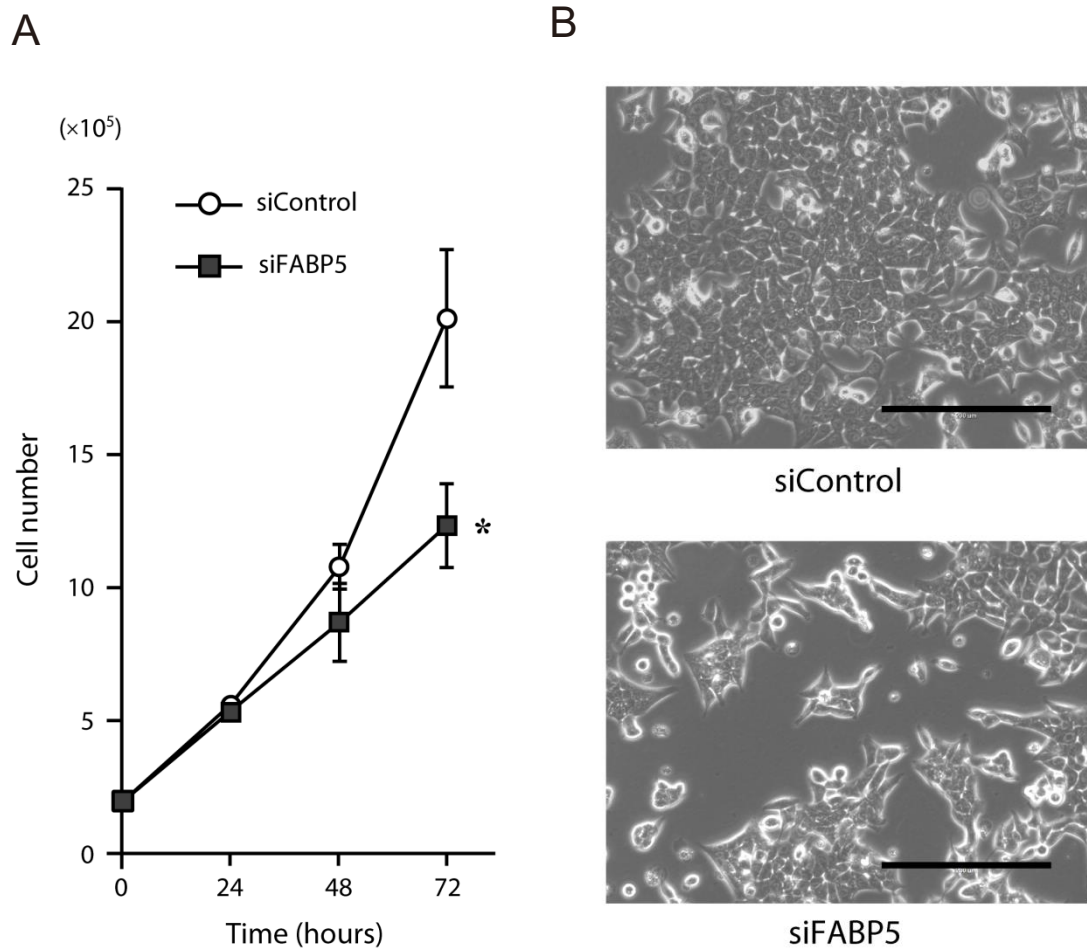


Figure 3-5. Effect of FABP5 on the cell proliferation in CRC cells

(A) Cell proliferation assay. HCT116 cells were seeded on 6-well culture plates and transfected with FABP5 or negative control siRNA. Cell numbers were counted at the indicated times. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. Asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$).

(B) A representative image of siControl cells (upper panel) and siFABP5 cells (lower panel) at 72 hours after transfection are shown. Scale bar, 200 μ m.

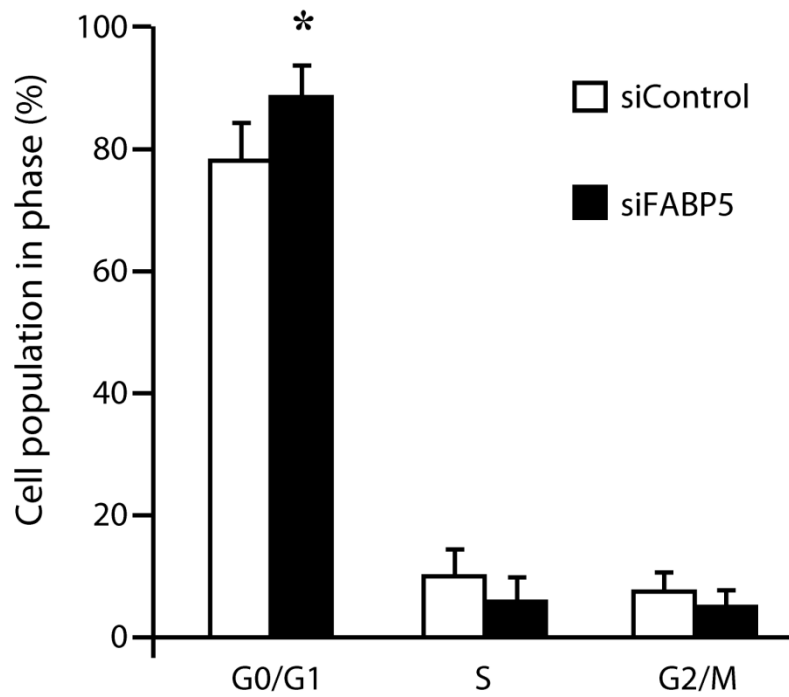


Figure 3-6. Effect of FABP5 on the cell cycle of HCT116 cells

Cell cycle analysis of HCT116 cells after FABP5 knockdown. Cell cycle distributions were measured by flow cytometry using a FACSCalibur flow cytometer and analyzed by Cell Quest software. The phase fractions (%) are shown in the graph. Data shown represents the mean \pm SD of three independent experiments.

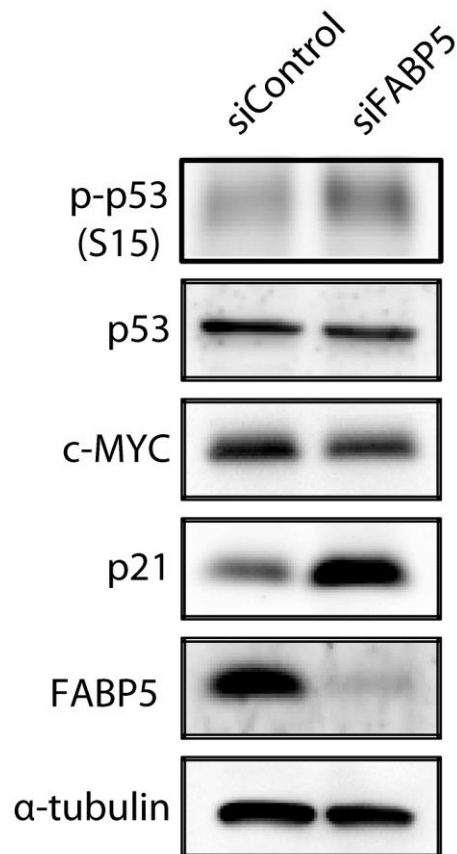


Figure 3-7. Effect of FABP5 knockdown on the induction of p21 CDK inhibitor

FABP5 siRNA increased p21 level. Lysates from HCT116 cells were analyzed by Western blotting using specific antibodies to FABP5, p21, c-MYC, p53 and phospho-p53 (Ser15). α -tubulin was used as a loading control. The Western blot data shown are representative of three independent experiments.

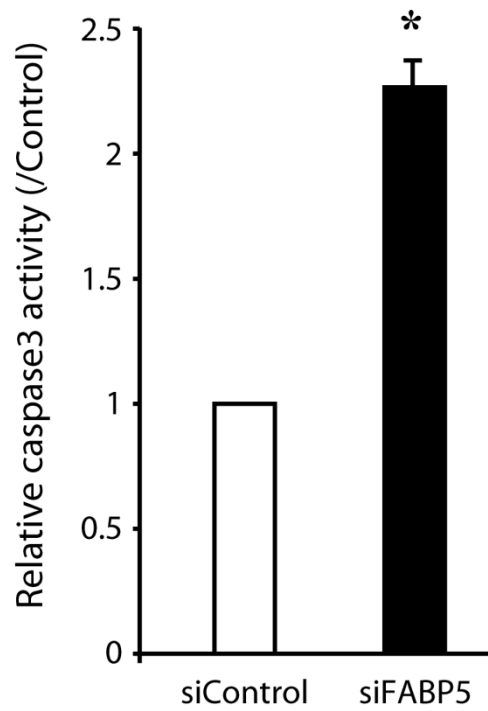
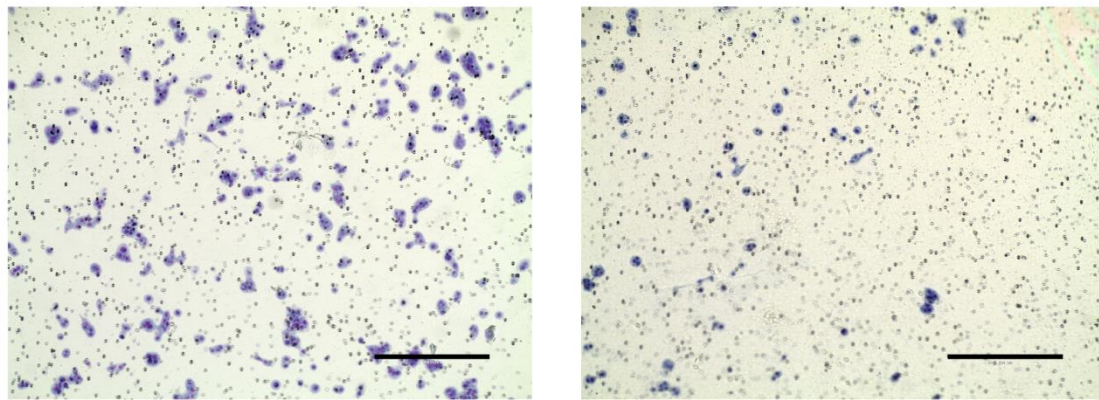


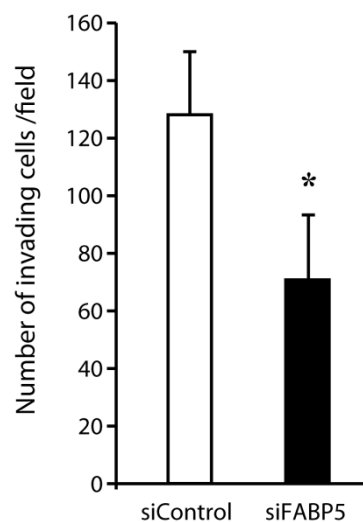
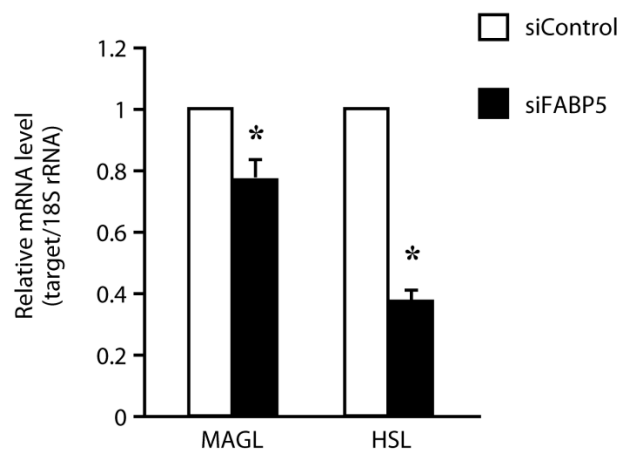
Figure 3-8. Effect of FABP5 knockdown on apoptotic cell death

Assay for caspase-3 activities after transfection with FABP5 or negative control siRNA were performed. The values represented are the rate of induction of apoptosis compared to the control (siControl). *, significantly different from siControl, $P < 0.05$

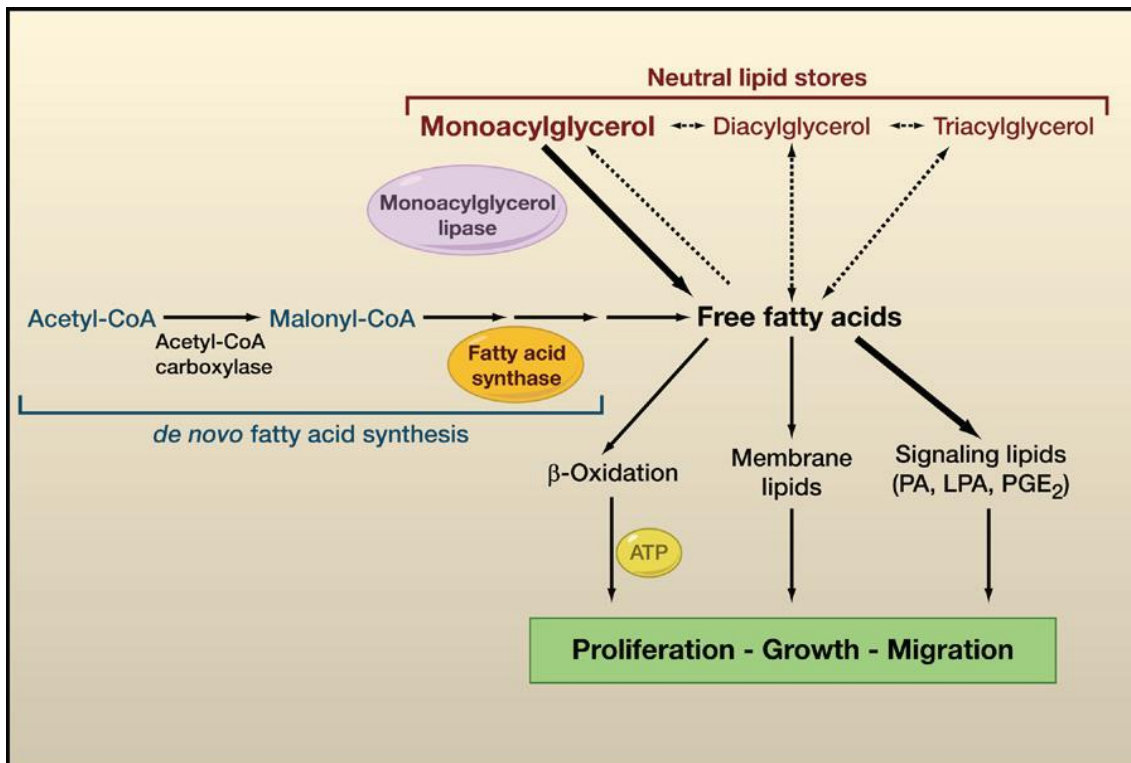
A

siControl

siFABP5

B**C****Figure 3-9. Effect of FABP5 on the invasion ability in CRC cells**

FABP5 knockdown decreases the invasion of HCT116 colon cancer cells. Cells were induced to invade through Matrigel-coated membranes. The invasive cells were fixed, stained and counted. Representative images of three independent experiments are shown in (A). Scale bar, 400 μ m. The numbers of invasive cells are shown (B). The data shown are the means \pm S.D. of three independent experiments. (C) HCT116 cells were transfected with siRNA against FABP5 or negative control siRNA. 72 hours after transfection, MAGL and HSL mRNA levels were determined by Q-PCR. *, significantly different from siControl, $P < 0.05$.



[Cell 140, 28-30 (2010)]

Figure 3-10. Free fatty acids and tumorigenesis

FABP5 knockdown decreases the invasion of HCT116 colon cancer cells. Cells were induced to invade through Matrigel-coated membranes

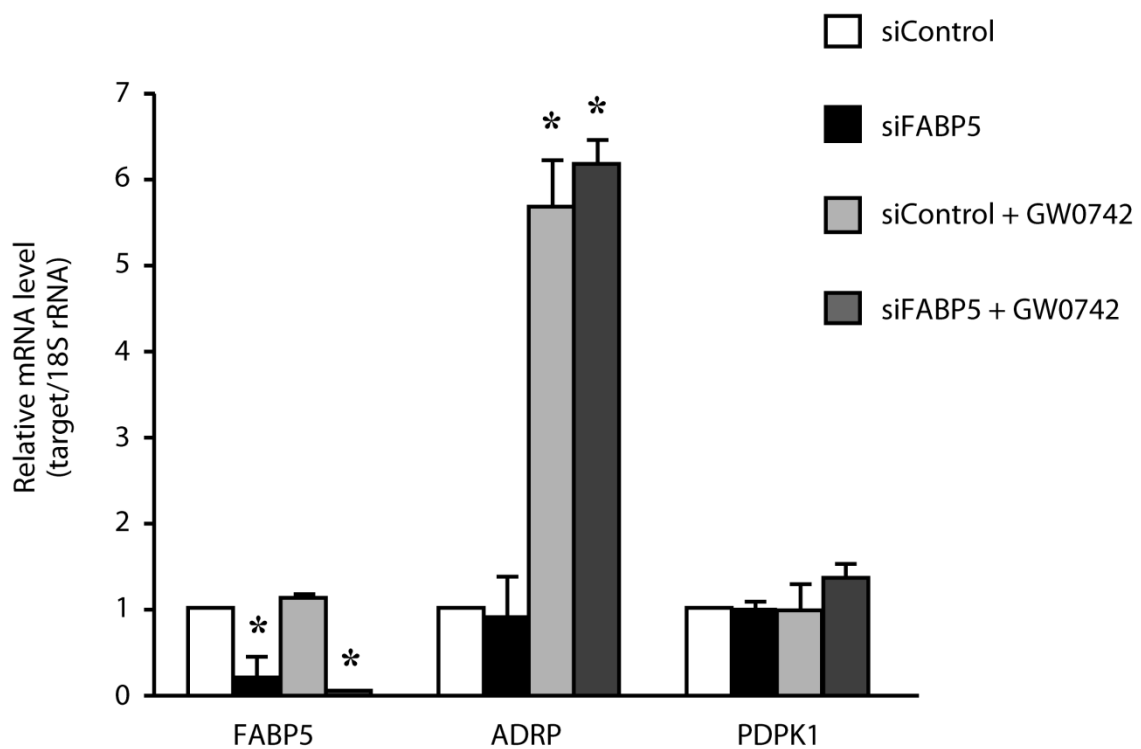


Figure 3-11. FABP5-PPAR β/δ signaling is not major pathway in CRC cells

HCT116 cells were transfected with siRNA against FABP5 or negative control. 48 hours after transfection, cells were treated with GW0742 (1 μ M, 24hours). FABP5, ADRP and PDPK1 mRNA level were determined by quantitative real-time PCR. Results shown are the mean \pm SD of three independent experiments. significantly different from nontreated siControl, $P < 0.05$.

*, significantly different from non-treated siControl

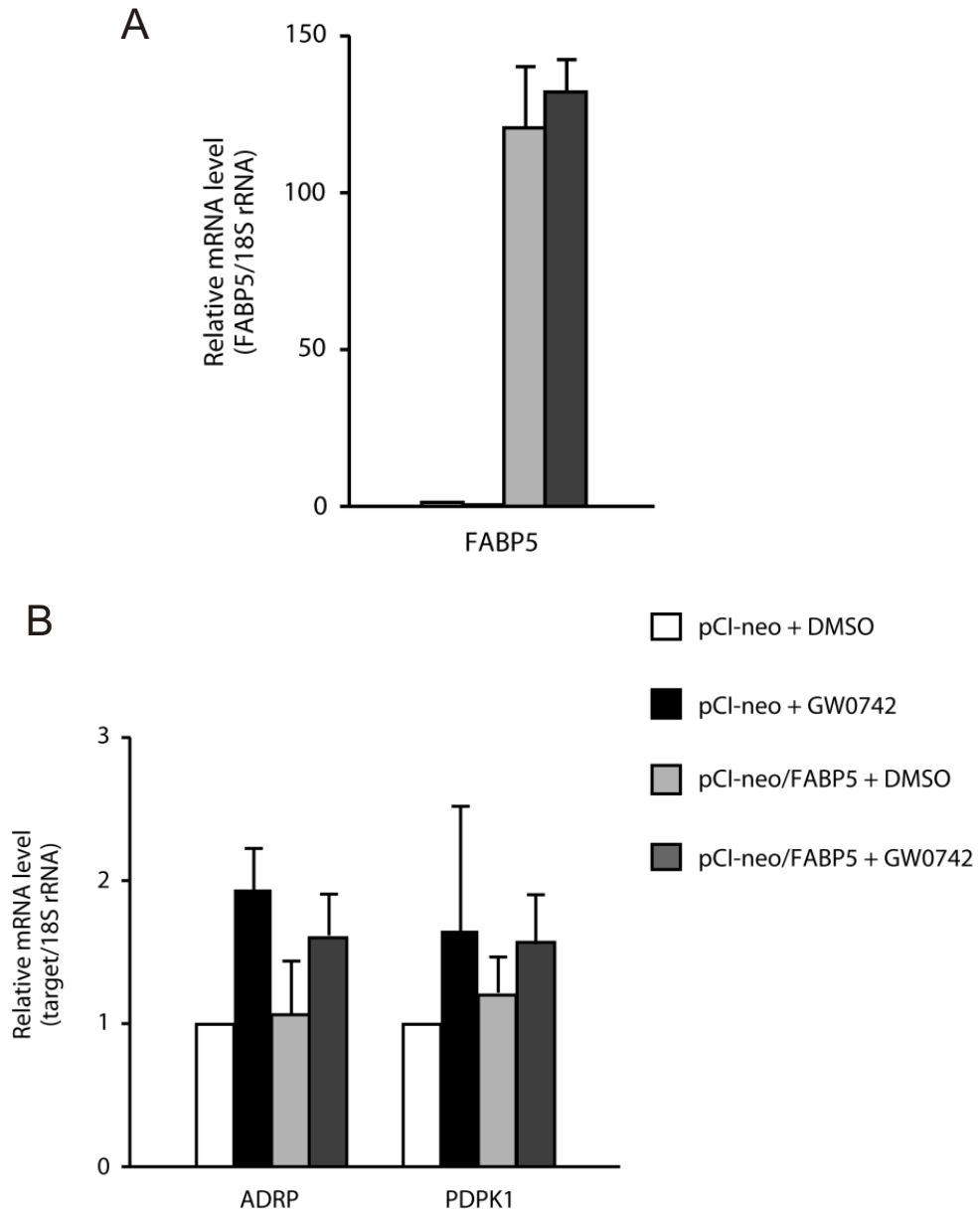


Figure 3-12. FABP5-PPAR β/δ signaling is not major pathway in CRC cells

Caco-2 cells were transfected with pCI-neo/FABP5 expression vector or control vector. 48 hours after transfection, cells were treated with GW0742 (1 μ M, 24hours). FABP5 (A), ADRP and PDPK1 (B) mRNA level were determined by quantitative real-time PCR. Results shown are the mean \pm SD of three independent experiments.

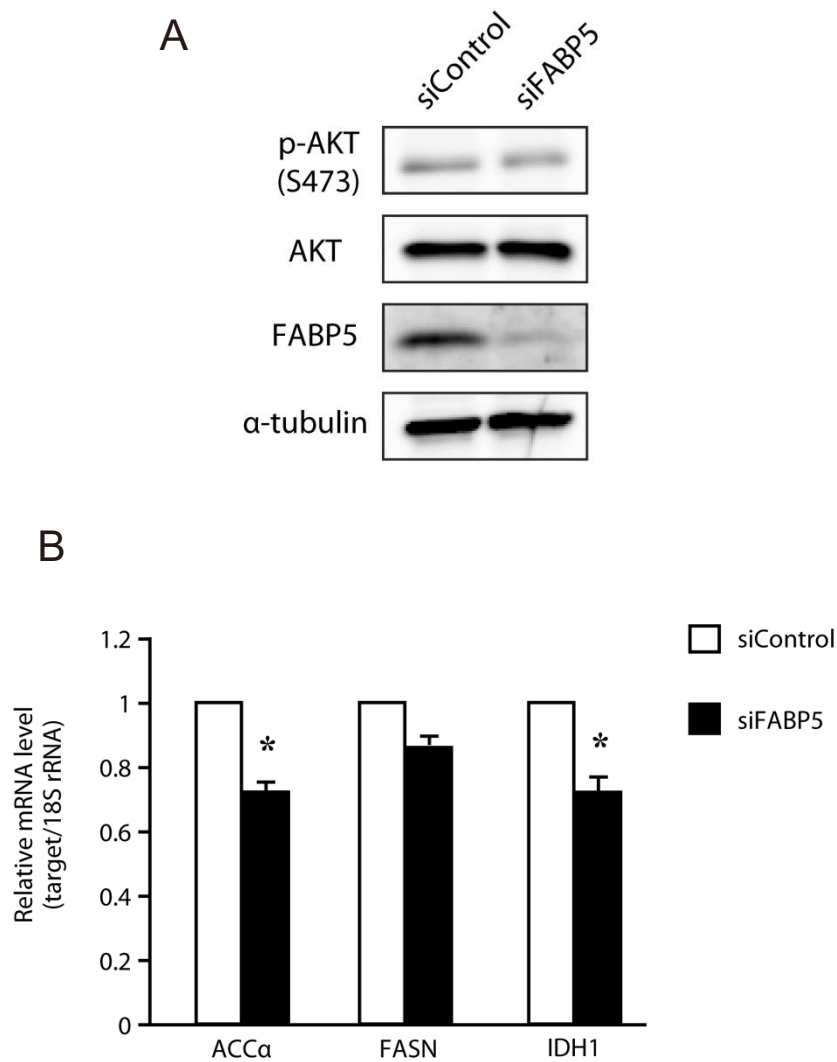


Figure 3-13. High-level FABP5 promotes CRC cell growth via functional association with a novel signaling pathway other than PPAR β/δ signaling

(A) Western blot analyses using specific antibodies to FABP5, AKT and phospho-AKT (Ser473). α -tubulin was used as a loading control. The Western blot data shown are representative of three independent experiments. (B) ACC α , FASN and IDH1 mRNA levels were determined by Q-PCR. The results shown are the means \pm S.D. of three independent experiments. *, significantly different from siControl, $P < 0.05$.

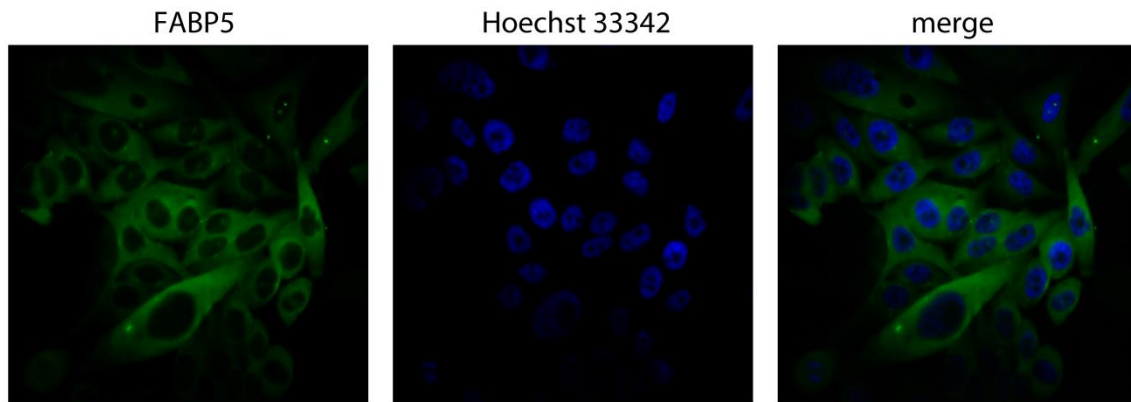


Figure 3-14. Intracellular localization of endogenous FABP5

Endogenous FABP5 protein was exclusively localized in cytoplasm in PC-3M cells (left panel, green fluorescence). The nuclei were counter-stained by Hoechst 33342 stain (middle panel, blue fluorescence). The merged image is seen in right panel.

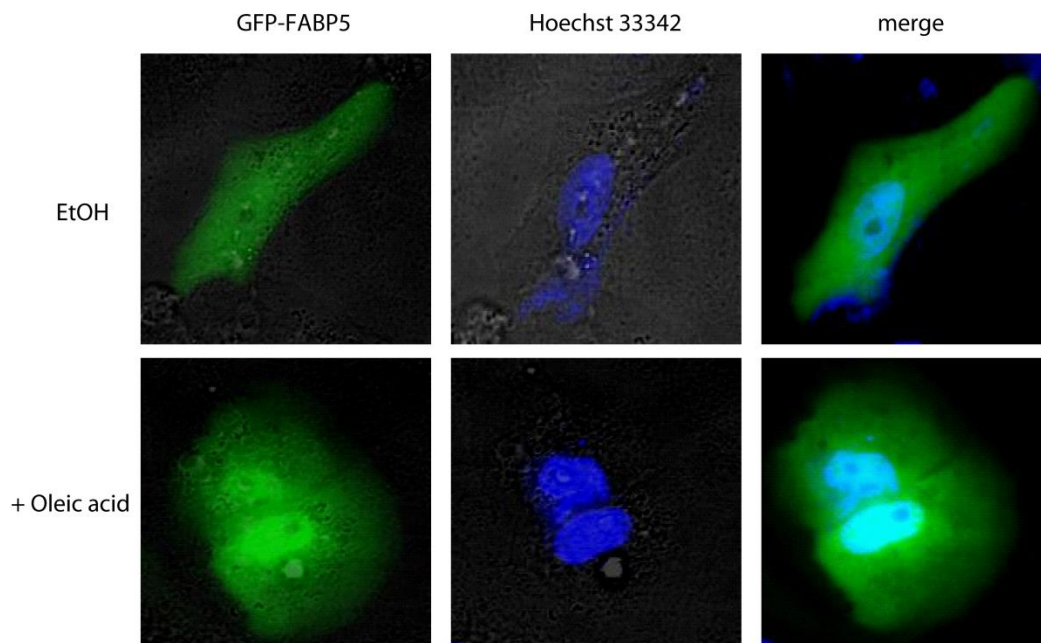


Figure 3-15. Ligand-dependent nuclear Localization of FABP5

GFP-tagged FABP5 protein was expressed in COS-7 cells. GFP-tagged FABP5 protein diffusely localized throughout the cells in the absence of ligands (oleic acids), and translocated into nucleus in the presence of oleic acids.

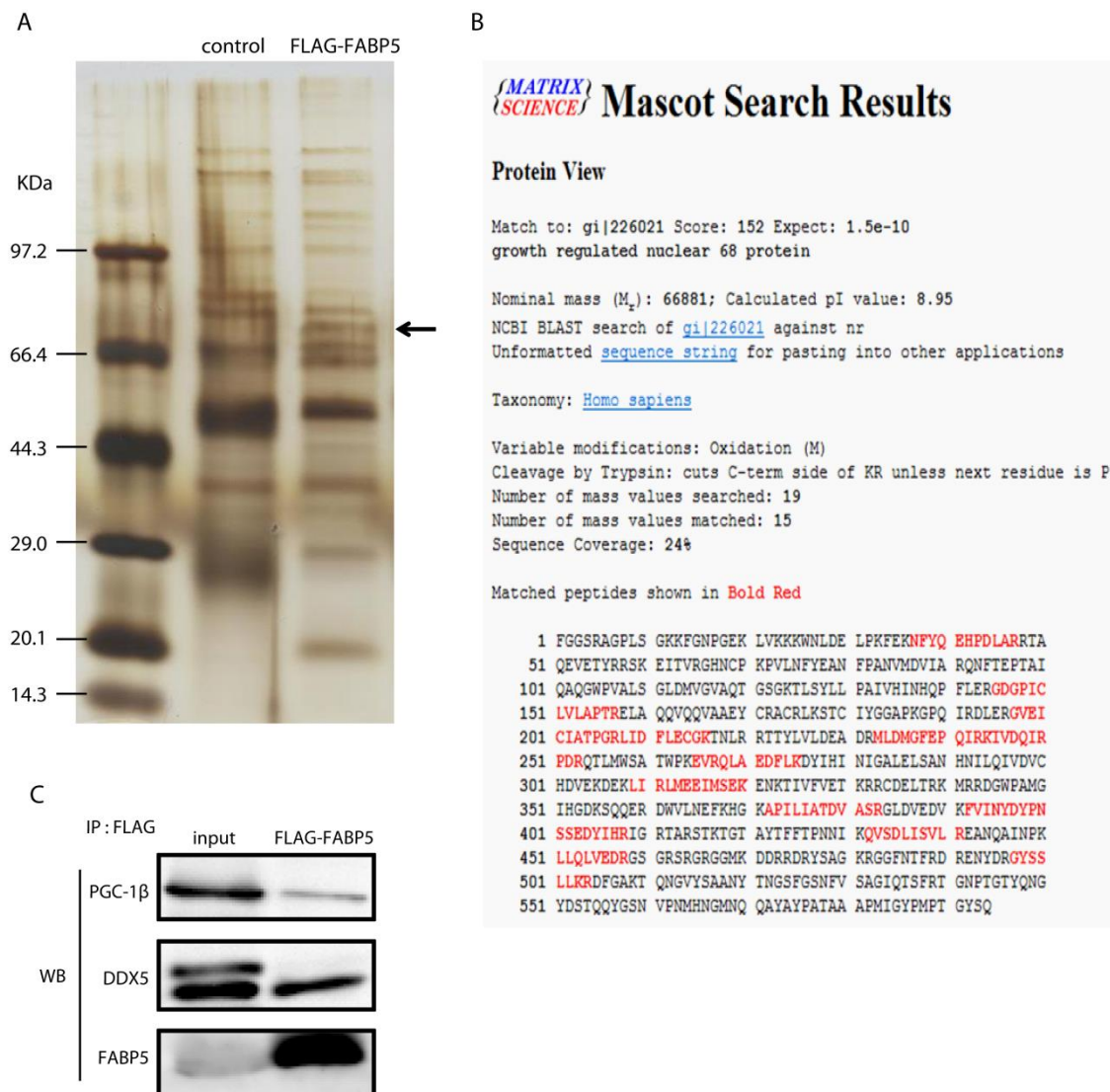


Figure 3-16. Identification of FABP5 Interacting Proteins

(A) Silver stain analysis. Immunoprecipitates of control IgG (left) and FLAG-FABP5 (right) were examined by silver stain analysis. The arrow indicates the approximate position (about 70 kDa) of potent protein interacted with FABP5. (B) Result of Mascot search. Mass spectrometry analysis revealed that 70 kDa band was p68 RNA helicase (DEAD box polypeptide 5:DDX5) (C) Co-immunoprecipitation analyses. Input (left, 10% lysate) and anti-FLAG immunoprecipitates (right, IP:FLAG) from HEK293T cells transfected with empty vector or FLAG-FABP5 were analysed by Western blotting.

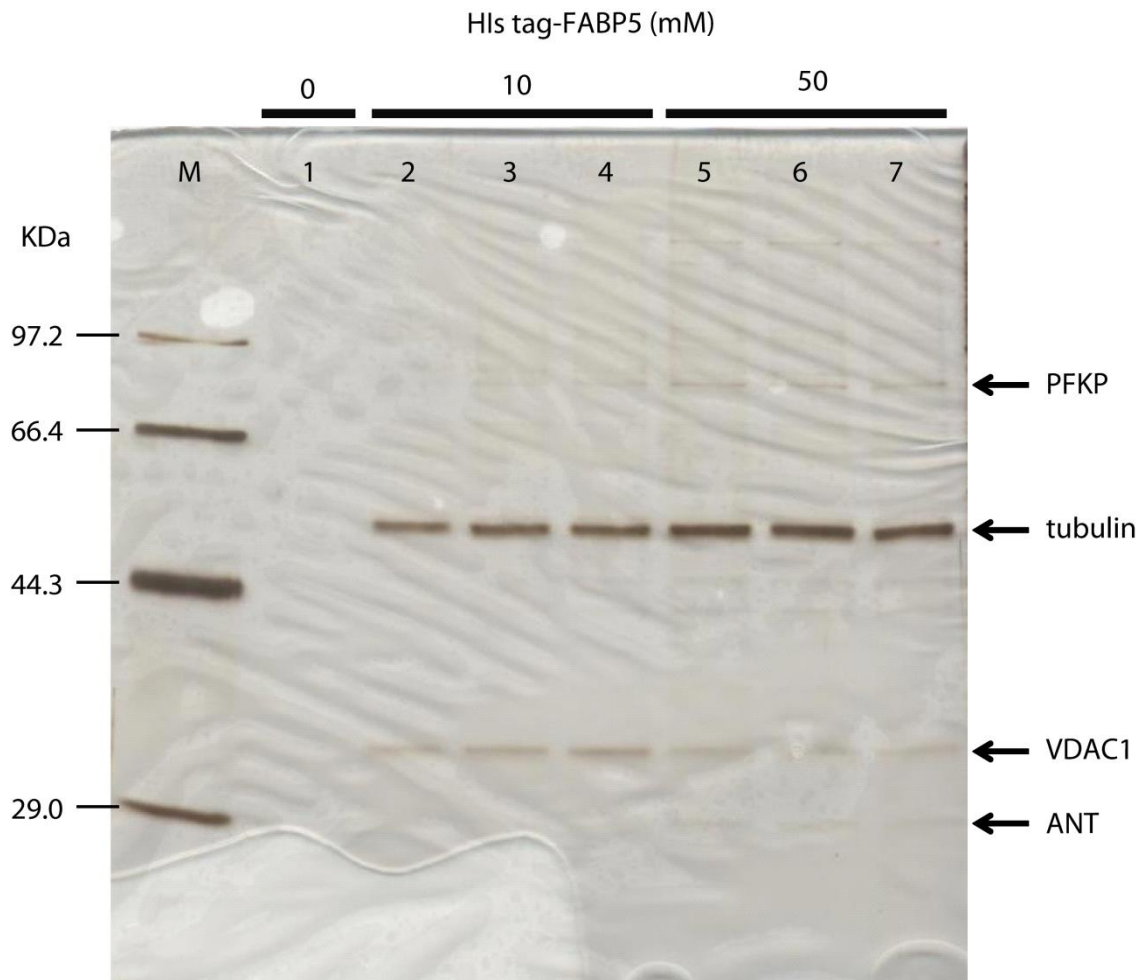
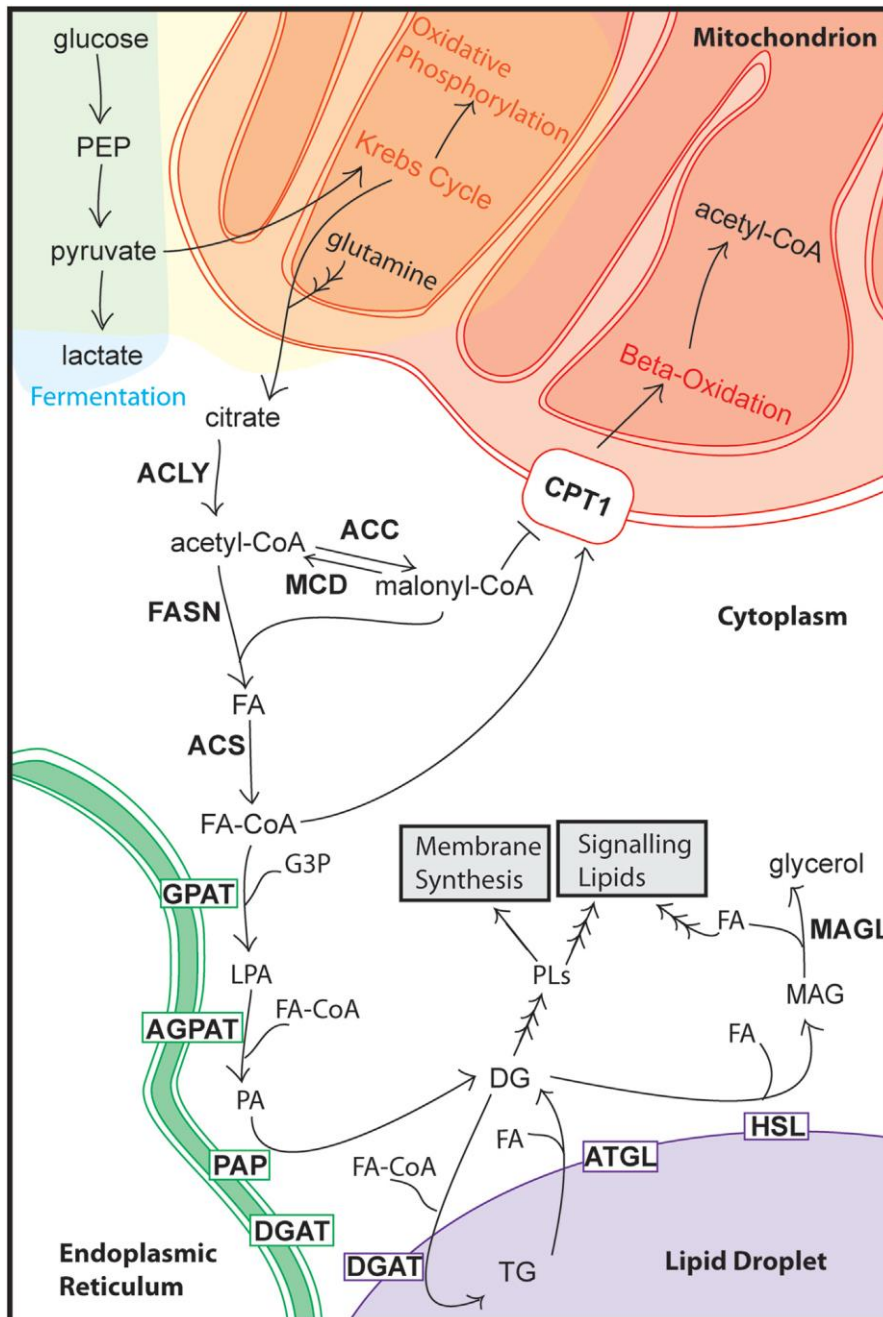


Figure 3-17. Identification of FABP5 Interacting Proteins

Pull-down assays of FABP5. Beads that bound His tag-FABP5 were incubated with whole cell protein extracts of DU-145 cells. The remaining proteins on the beads were liberated by boiling the beads. Fractions collected were analyzed by SDS-PAGE followed by silver staining. M; molecular weight marker, lane 1; control beads, lane 2-4; His tag FABP5 fixed beads (10mM), lane 5-7; His tag FABP5 fixed beads (50mM).



[Cell Metab 18, 153-161 (2013)]

Figure 3-18. Overview of cellular fatty acid metabolism

第4章

癌細胞における *FABP5* 遺伝子の 発現制御機構の解析

第4章 癌細胞における *FABP5* 遺伝子の発現制御機構の解析

4-1) 緒言

我々はこれまでに、FABPファミリー分子の一つであるFABP5が前立腺癌で高発現し、癌細胞の悪性化に深く関与していることを明らかにしている [35-38]。しかしながら、正常前立腺細胞では発現していないFABP5が、癌細胞で特異的に発現するようになるメカニズムに関しては不明であった。

DNAのメチル化は一般的に、CpG配列のシトシン残基に起こる。メチル化されたCpG配列が多く存在する領域はCpGアイランドと呼ばれ、様々な遺伝子のプロモーター領域に存在することが知られている [77]。さらに、CpGアイランドのメチル化は、発生や分化に関与する遺伝子のエピジェネティックな発現制御にとって重要な役割を果たしていることが報告されている [78-80]。従って、DNAメチル化は厳密に制御されており、その破綻により癌等の疾病が引き起こされることが示唆されている [81]。例えば、癌細胞ではゲノム全体としてDNAのメチル化レベルが低下し、ゲノムが不安定化することや、癌抑制遺伝子のプロモーター領域にあるCpGアイランドが高メチル化された結果、癌抑制遺伝子の発現が抑制されていることが知られている [82]。

FABP5 遺伝子の構造に着目すると、そのプロモーター領域には典型的なCpGアイランドが存在する。さらに、DNAメチル化状態を網羅的に解析したDNAメチル化アレイ解析の結果から、前立腺正常細胞と癌細胞ではDNAメチル化状態が大幅に異なっていることがわかっている。従って、*FABP5* 遺伝子の発現制御機構には、プロモーター領域にあるCpGアイランドのDNAメチル化状態が重要な役割を果たしているのではないかと仮説を立て、癌細胞特異的な*FABP5* 遺伝子のエピゲノム制御機構の解析を行った。

4-2) 結果

前立腺癌細胞株における FABP の発現

まずはじめに、前立腺正常細胞由来細胞株 (PNT2) と前立腺癌細胞株 (PC-3, DU-145, 22Rv1 及び LNCaP) における FABP ファミリーの発現量を半定量 RT-PCR 法により解析した。その結果、LNCaP, PNT2 では FABP ファミリーの発現はみられず、PC-3, DU-145 及び 22Rv1 では FABP5 が高発現していた (Figure 4-1)。次に、FABP5 mRNA 及びタンパク質の発現をそれぞれ定量 real-time PCR 法及び Western blot 法により解析したところ、LNCaP, PNT2 と比較して PC-3, DU-145 及び 22Rv1 では FABP5 の顕著な高発現がみられた (Figure 4-2)。

FABP5 の発現制御に関わるプロモーター領域の決定

次に、FABP5 の発現制御に重要なプロモーター領域を同定するため、pCpGL ルシフェラーゼベクター [30] を用いたレポーターアッセイを行った。FABP5 の転写開始点上流 2kb の領域をクローニングしたコンストラクトを鋳型として 5' 領域の欠失変異体を作製し、転写活性化能を解析した結果、FABP5 の発現に不可欠なプロモーター領域は転写開始点上流 -337~-49b の領域であることがわかった (Figure 4-3)。さらに、1st イントロンが FABP5 の発現に与える影響を調べるため、転写開始点上流 -337~下流 +1285b 領域をクローニングしたレポーターコンストラクトを用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、転写開始点上流 -337b 領域のみの時と比べて顕著な転写活性の上昇がみられた (Figure 4-3)。このことから、*FABP5* 遺伝子の 1st イントロン内またはその近傍は、FABP5 発現制御にとって重要な領域であることが示唆された。

***FABP5*プロモーター領域の DNA メチル化解析 (前立腺癌)**

CpG island searcher [83] による検索から、*FABP5* 遺伝子のプロモーター領域には CpG アイランドが存在することがわかった (Figure 4-4A)。そこで次に、*FABP5* プロモーター領域の DNA メチル化状態をバイサルファイトシーケンス法により解析した。その結果、PC-3, DU-145 及び 22Rv1 では *FABP5* プロモーター領域はメチル化されていなかった。一方、LNCaP, PNT2 では転写開始点上流-70~-30b 領域及び 1st イントロンが高度にメチル化されていることがわかった (Figure 4-4B)。さらに、COBRA 法及び qAMP 法により DNA メチル化状態を解析したところ、バイサルファイトシーケンス法で解析したのと同様に、*FABP5* プロモーター領域は LNCaP, PNT2 では高メチル化状態で、PC-3, DU-145 及び 22Rv1 では低メチル化状態であることが確認された (Figure 4-4C, D)。これらの結果から、悪性度の高い前立腺癌細胞と低悪性度の前立腺癌及び正常前立腺細胞とでは CpG アイランドの DNA メチル化状態が大きく異なっていることが示唆された。

FABP5 発現制御における DNA メチル化の重要性

悪性度の高い前立腺癌細胞株 (PC-3, DU-145 及び 22Rv1) における *FABP5* プロモーター領域の DNA 低メチル化と *FABP5* 高発現の逆相関関係が示唆されることから、DNA メチル化を介した *FABP5* 遺伝子の発現抑制機構を詳細に解析した。メチル化 DNA 結合タンパク質 (MeCP2) 及び TATA-box 結合タンパク質 (TBP) 抗体を用いた ChIP アッセイを行ったところ、PNT2 でのみ MeCP2 の結合がみられた一方で、基本転写因子である TBP の結合は PC-3 でのみみられた (Figure 4-5A)。これらの結果は、DNA メチル化状態が基底レベルの *FABP5* 発現に重要であることを強く示唆している。また、PC-3 と PNT2 におけるヒストン修飾の状態を ChIP アッセイで同様に解析したところ、PC-3 では活

性型クロマチンの指標となる H3K9ac (ヒストン H3、9 番目リジンのアセチル化) のレベルが高く、PNT2 では抑制型クロマチンの指標となる H3K9me2 (ヒストン H3、9 番目リジンのジメチル化) のレベルが高いことがわかった (Figure 4-5B)。さらに、DNA メチル化阻害剤 (5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-dC) 及びヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (trichostatin A, TSA) を用いて、FABP5 発現制御における DNA メチル化とクロマチン化学修飾の影響を検証した。PNT2 に 5-aza-dC、TSA を単独もしくは共添加し、FABP5 mRNA 発現量の変化を定量 real-time PCR 法により解析したところ、5-aza-dC 添加により FABP5 mRNA 発現量の上昇がみられた。5-aza-dC、TSA 共添加によりさらに顕著な FABP5 mRNA 発現量の上昇がみられた一方で、TSA 単独の添加では FABP5 mRNA 発現量に有意な変化はみられなかった (Figure 4-6)。以上の結果から、DNA のメチル化阻害及びヒストン脱アセチル化の両方が FABP5 プロモーターの活性化には必要であることが示唆された。

FABP5 発現制御に関わる転写因子の同定

次に、FABP5 の発現制御に関与する可能性のある転写因子を調べるため、Web-base の転写因子結合領域予測プログラム TFSEARCH 及び MAPPER [84] を用いて FABP5 プロモーター領域の塩基配列を解析したところ、いくつかの転写因子結合領域が存在することが予想された (Figure 4-7)。これらの転写因子結合領域が前立腺癌細胞において生理的に機能しているかどうかを明らかにするため、これらの領域を塩基置換した変異体レポーターコンストラクトを作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、GC-box2/3, 4, 5 及び E-box2, 3 に変異を入れた場合に FABP5 の転写活性が 60 ~ 80% 低下したことから、これらの転写因子結合領域が FABP5 の発現制御に重要であることがわかった (Figure 4-8)。

FABP5 発現制御における SP1 及び c-MYC の機能解析

SP1 と c-MYC は、GC-box と E-box にそれぞれ結合する転写因子としてよく知られている。そこで、SP1 と c-MYC が FABP5 の発現制御に関与するかどうかを検証するため以下の実験を行った。PC-3 において SP1 と c-MYC の発現を特異的 siRNA を用いてノックダウンし、FABP5 mRNA 発現量への影響を検証した。まず、内因性の SP1 と c-MYC 発現量を調べたところ、SP1 と c-MYC ともに PNT2 と比べて PC-3 で高発現していた (Figure 4-9A~D)。次に、SP1 及び c-MYC に対する抗体を用いて ChIP アッセイを行ったところ、SP1 と c-MYC は PC-3 においてより多く FABP5 プロモーター領域に結合していることがわかった (Figure 4-9E, F)。次に、PC-3 において SP1 と c-MYC の発現を特異的 siRNA を用いてノックダウンし、FABP5 mRNA 発現量への影響を検証した。その結果、SP1 と c-MYC の発現抑制により、FABP5 mRNA 発現量は有意に低下した (Figure 4-9G, H)。次に、SP1 及び c-MYC 依存的な FABP5 の発現に FABP5 プロモーター領域の DNA メチル化状態が影響するかどうかを検証するため、PNT2 及び PC-3 に SP1 及び c-MYC を高発現させたところ、PNT2 に両転写因子を高発現させても FABP5 の発現量に有意な変化はみられなかった。一方、PC-3 に両転写因子を高発現させると、FABP5 mRNA 発現量が顕著に上昇した (Figure 4-9I)。さらに、FABP5 プロモーターの DNA メチル化が転写活性に与える影響を調べるため、*in vitro* メチル化アッセイを行った。メチル化されていないレポーターコンストラクトを用いた場合、SP1 及び c-MYC の高発現により FABP5 の転写活性は上昇するのに対し、メチル化されたプロモーターを持つレポーターコンストラクトでは転写活性の上昇はみられなかった (Figure 4-9J)。また、SP1, c-MYC 及び FABP5 の前立腺癌細胞における生理的機能を検証するため、細胞増殖試験を行った。その結果、SP1, c-MYC または FABP5 の発現抑制により前立腺癌細胞の増殖が顕著に抑制された (Figure 4-10)。一方、PNT2 に FABP5 を過剰発現させると、細胞

増殖が有意に促進した。しかしながら、FABP ファミリー分子の一つである FABP4 の過剰発現では細胞増殖の促進はみられなかった (Figure 4-11)。これらの結果から、SP1 及び c-MYC が FABP5 発現制御に関与しており、SP1 及び c-MYC 依存的な FABP5 の転写活性化と前立腺癌細胞の増殖には *FABP5* プロモーター領域の DNA メチル状態が重要であることが強く示唆された。

ヒト組織サンプルにおける FABP5 の発現及び DNA メチル化解析

前立腺組織を用いた免疫組織化学的な解析から、組織レベルにおいても FABP5 の高発現を確認している [36]。さらに、遺伝子発現データベース (Oncomine cancer microarray database <<http://www.oncomine.org/>>) を利用して前立腺正常細胞と前立腺癌細胞における FABP5 発現量を比較したところ、異なる二つのデータセット [85, 86] において前立腺癌細胞における有意な FABP5 高発現がみられた (Figure 4-12)。これらの先行研究の結果と同様に、前立腺腫瘍組織では mRNA 及びタンパク質レベルで FABP5 が高発現していた (Figure 4-13)。細胞株レベルで観察された DNA メチル化状態の変化が組織レベルでもみられるかどうかを検証するため、前立腺正常組織及び腫瘍組織由来のゲノム DNA を用いて qAMP 法及び COBRA 法により DNA メチル化状態を解析した。その結果、組織検体においても、腫瘍組織では正常組織と比べて *FABP5* プロモーター領域が低メチル化状態であることがわかった (Figure 4-14)。

FABP5 プロモーター領域の DNA メチル化解析 (大腸癌)

前立腺癌細胞では悪性度依存的な *FABP5* プロモーター領域の DNA 脱メチル化により FABP5 の発現が制御されていることがわかった。そこで、FABP5 の高発現がみられる大腸癌細胞でも同じ機構により FABP5 の発現が制御されているのかを検証するため、大

腸癌細胞株を用いて *FABP5* プロモーター領域の DNA メチル化状態をバイサルファイトシーケンス法により解析した。その結果、悪性度の高い HCT116 では、*FABP5* プロモーター領域はほぼ脱メチル化されていた。一方、比較的悪性度の低い Caco-2 では、転写開始点上流 -70~-30b 領域が高度にメチル化されていることがわかった (Figure 4-15)。

4-3) 考察

前立腺癌細胞での高発現と、悪性化において重要な機能を果たしていることがわかっているものの、発癌過程における *FABP5* の発現制御機構に関してはほとんどわかっていなかった。本研究では、前立腺癌細胞における *FABP5* 遺伝子の構造的特徴に焦点を当て解析を行った。*FABP5* 遺伝子は同じ FABP ファミリー分子である *FABP4*, *FABP8*, *FABP9*, *FABP12* と同じ染色体上の領域 (8q21.13) に存在している。しかしながら、前立腺癌細胞では、*FABP5* のみが特異的に高発現していた (Figure 4-1)。*FABP5* 遺伝子のプロモーター領域には典型的な CpG アイランドが存在し (Figure 4-4A)、特に TATA-box 周辺及び第一イントロンの DNA メチル化状態が、癌細胞と正常細胞で大きく異なっていることが明らかとなり、この差異が *FABP5* 遺伝子の発現制御にとって重要であることが示唆された。前立腺癌研究において、PC-3、LNCaP はそれぞれ高悪性度、低悪性度の細胞株、DU-145 及び 22Rv1 は中程度の悪性度を持つ細胞株として扱われている [87-89]。DNA メチル化及び遺伝子発現解析の結果から、*FABP5* 遺伝子のプロモーター領域は悪性度依存的に DNA 脱メチル化され、発現が上昇することが示唆された。さらに、組織サンプルを用いた解析でも、免疫組織化学的解析により得られた結果 [36] と同様に、腫瘍組織において *FABP5* は高発現しており、プロモーター領域は脱メチル化されていることが明らかとなった (Figure 4-14)。悪性度依存的に *FABP5* 遺伝子のプロモーター領域が DNA 脱メチル化される傾向は大腸癌細胞株でもみられたことから (Figure 4-15)、癌細胞悪性化の過程で *FABP5* 遺伝子プロモーター領域を特異的に DNA 脱メチル化する機構が存在することが強く示唆された。

我々の DAN メチル化アレイによる網羅的な解析から、前立腺癌細胞と正常細胞では DNA メチル化のプロファイルが大きく異なり、また、いくつかの癌関連遺伝子が、*FABP5*

と同様の発現制御を受けていることも示唆された (data not shown)。そこで、*FABP5* のプロモーター領域が脱メチル化される機構を明らかにするため、DNA メチル化レベルの制御に関わる酵素群の mRNA 発現量を解析した。DNA メチル化の制御に関わる重要なタンパク質としては、DNA 脱メチル化に関わる酵素である ten-eleven translocations (TET) タンパク質ファミリー [90] 及び、DNA メチル基転移酵素である DNA methyl transferases (DNMTs) がある。癌細胞と正常細胞間でこれらの酵素の発現量を調べたところ、TET タンパク質ファミリーの発現量に有意な差はみられなかった。一方で、DNA メチル基転移酵素の一つである DNMT3B の発現量が前立腺癌細胞で減少していた (Figure 4-16)。従って、何かしらの制御因子がこれらの酵素の発現量と酵素活性を制御している可能性が示唆された。哺乳類では3つの DNA メチル基転移酵素が知られ、DNMT3A 及び DNMT3B はゲノム DNA に新たなメチル基を導入する新規メチル化に、DNMT1 は既に確立されたメチル化パターンを DNA 複製に伴って維持する維持メチル化において機能することが知られている。ただし、DNMT3A/3B を欠損させた ES 細胞の実験結果から、DNMT3A 及び DNMT3B は DNA メチル化の維持にも必要不可欠であることがわかっている [91, 92]。また、最近の研究から、DNMT3B は DNA メチル化を介して特異的に癌原遺伝子の発現を抑制しているが、発癌もしくは癌のステージが進行する段階で DNMT3B の発現量が減少する結果、癌原遺伝子の発現が亢進し癌が悪性化することが示唆されている [93]。従って、今後は、新規のエピゲノム制御因子を探索し、さらに、それらの因子によるエピジェネティックな変化が発癌過程においてどのような生理的意義を持つのかを解析する必要がある。

MeCP2 はメチル化された CpG 配列に隣接する A/T に富む配列がある場合に、特に高い結合親和性を示すことが知られており [94]、*FABP5* 遺伝子の TATA-box 上流の CpG

配列が MeCP2 の結合領域であることが考えられた。この考えと一致して、PNT2 では MeCP2 が *FABP5* 遺伝子の TATA-box 周辺に結合していることがわかった (Figure 4-5A)。さらに、MeCP2 はヒストン脱アセチル化酵素 HDACs などと相互作用し、抑制型クロマチンを形成することが知られている [95]。実際、PNT2 では、*FABP5* 遺伝子プロモーター周辺は抑制型クロマチンが形成されていた (Figure 4-5B)。以上のことから、PNT2 では TATA-box 周辺がメチル化されることにより MeCP2 が結合し、基本転写因子 TBP の TATA-box への結合を阻害すること。さらに、抑制型クロマチンが形成されることにより *FABP5* 遺伝子の発現が抑制されていると考えられた。一方、PC-3 では、TATA-box 周辺はメチル化されておらず、TBP が結合し *FABP5* 遺伝子の転写が ON の状態になっていると考えられた。

本研究ではさらに、転写因子 SP1 と c-MYC が前立腺癌における *FABP5* の高発現に寄与していることを明らかにした。興味深いことに、PNT2 と PC-3 において SP1 mRNA 発現量に有意な差はみられなかった一方で、タンパク質レベルでは PC-3 の方が有意に発現量が高かった (Figure 4-9A, B)。これは SP1 の発現がタンパク質の翻訳レベルで制御されていることを示唆しており、実際、我々の実験結果から、SP1 を標的とする miR-22 [96, 97] の発現量が PNT2 では PC-3 よりも高いことがわかっている (Figure 4-17)。c-MYC の発現量に関しては、mRNA・タンパク質ともに PC-3 の方が有意に発現量が高かった (Figure 4-9C, D)。注目すべきなのは、SP1 及び c-MYC による *FABP5* の高発現は、DNA メチル化状態に依存している点である。これは、*FABP5* 遺伝子のプロモーター領域がメチル化されている PNT2 に両転写因子を高発現させても *FABP5* の発現が誘導されなかったことや、*in vitro* メチル化アッセイの結果からも明らかである (Figure 4-9G, H)。重要なことに、SP1, c-MYC または *FABP5* の発現抑制により前立腺

癌細胞の増殖が顕著に抑制される (Figure 4-10)。また、FABP5 をノックダウンした PC-3M 細胞をヌードマウスに移植しても癌細胞の転移が起こらず [35]、反対に、正常細胞もしくは低悪性度の癌細胞に FABP5 を過剰発現させると悪性形質を示すようになることから (Figure 4-11) [37, 98]、FABP5 が癌細胞の悪性化において重要な機能を果たしていることが強く示唆される。

SP1 はハウスキーピング遺伝子の発現制御に関与することが知られている転写因子である [99]。近年、前立腺癌を含めた様々な癌で SP1 が高発現していることが報告されている [100, 101]。しかしながら、癌細胞における SP1 の機能は複雑で、癌遺伝子を活性化することや、逆に抑制することが報告されており [102, 103]、まだ詳細な機能はわかっていない。SP1 は GC-box と呼ばれる DNA 配列に結合し、ハウスキーピング遺伝子の発現制御に関与することや、発生過程において、GC-box に結合することにより特定の遺伝子のプロモーター領域がメチル化されないように DNA を保護していると考えられている [104]。従って、ハウスキーピング遺伝子がエピジェネティックに抑制されることから保護するのに重要な機能を果たしている [78]。一方で、SP1 結合領域がメチル化されると標的遺伝子の発現は抑制されることになる。今回の研究では、*FABP5* 遺伝子のプロモーター領域にある GC-box は、PNT2 ではほとんどメチル化されていた。一方で、PC-3 ではそのメチル化は外れており、SP1 の高発現が直接的に FABP5 高発現に寄与していると考えられた。

c-MYC は癌遺伝子としてよく知られており、細胞増殖、分化、代謝、アポトーシス、幹細胞の維持等に関与することが報告されている [105, 106]。c-MYC は Max とヘテロ 2 量体を形成し、E-box と呼ばれる CACGTG 配列や、その類似配列に結合する [107]。さらに、発癌過程において重要な役割を果たし、様々な癌で高発現していることもわかっている。特に、*MYC* 遺伝子の含まれる 8 番染色体の領域 (8q24) は、前立腺癌で

増幅していることが報告されており [108]、実際、PC-3 でも c-MYC は高発現していた (Figure 4-9C, D)。これらの結果は、c-MYC の高発現が前立腺癌の発癌過程で重要な役割を果たしていることを示唆している。今回の研究からは、E-box を含む CpG アイランドが脱メチル化されることによる c-MYC 依存的な FABP5 高発現の分子機構が明らかになった。先行研究では、c-MYC が FABP5 の発現を誘導することや [107]、前立腺癌で高発現している EpCAM [109] が、c-MYC の発現誘導を介して FABP5 の発現を上昇させることが報告されていた [110, 111]。しかしながら、c-MYC 依存的な FABP5 発現誘導に関する詳細な機構については全く不明であった。従って、今回の研究は、c-MYC 高発現を介した *FABP5* 遺伝子の発現制御メカニズムを分子レベルで明らかにした最初の報告である。さらに、脂肪酸代謝の変化は癌細胞の特徴の一つである [112]。特に、前立腺癌細胞における脂質代謝の亢進は良く知られており、増殖を支えるためのエネルギー産生の主要経路として脂肪酸の β 酸化を利用していることがわかっている [113-115]。FABP5 は脂肪酸トランスポーター、または重要な制御因子として脂肪酸代謝に深く関与することから、前立腺癌細胞の脂質代謝の変化において重要な機能を果たしていることが示唆される。実際、FABP5 のノックダウンにより脂肪酸代謝関連の遺伝子群の発現が減少することから、c-MYC は FABP5 の発現誘導を介して脂肪酸代謝の制御に関与することが示唆された。c-MYC はグルコース代謝及びグルタミン代謝を亢進することで癌細胞における代謝の変化を制御していることを考えると [116, 117]、今回の我々の発見は、前立腺癌の発癌過程における c-MYC を介する代謝リプログラミングに新たな知見を提供したと言える。

以上より、前立腺癌細胞においては、悪性度依存的なプロモーター領域の DNA 脱メチル化と、転写因子 SP1 及び c-MYC の高発現により *FABP5* 遺伝子の発現が制御されて

いることが明らかとなった。*FABP5*プロモーター領域のDNA脱メチル化は、DNMT3Bの発現低下によるものであることが部分的には説明できるものの、*FABP5*遺伝子が選択的に脱メチル化される遺伝子特異性と発現制御機構を十分に理解するためには、更なる実験が必要である。

第4章の図表

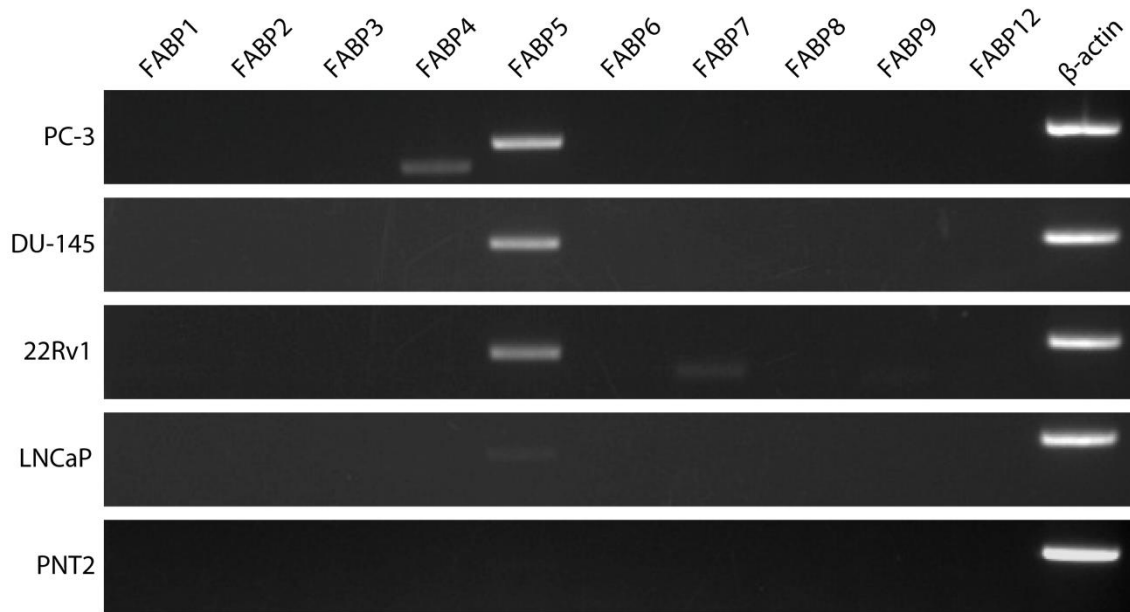


Figure 4-1. FABP5 is specifically overexpressed in human prostate cancer cells

Semi-quantitative RT-PCR analysis of FABP5 expression in human prostate cancer cell lines (PC-3, DU-145, 22Rv1, and LNCaP) and a benign prostate cell line (PNT2). β -actin served as the endogenous control. The data shown are representative of three independent experiments.

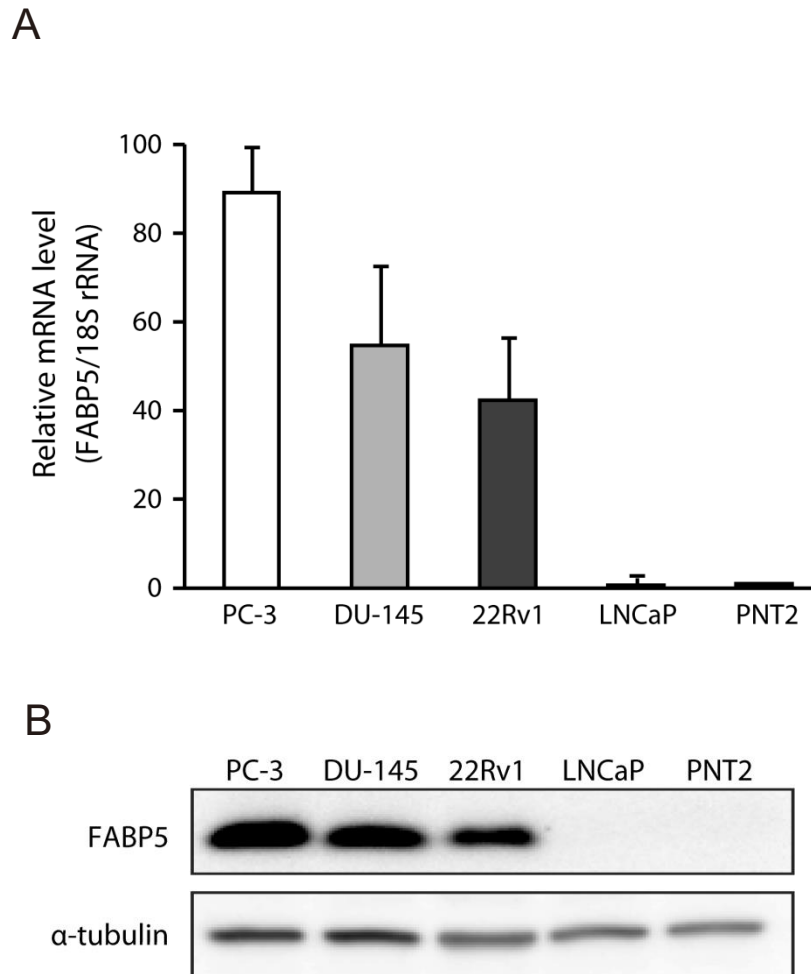


Figure 4-2. FABP5 expression in human prostate cancer cells

(A) Relative levels of FABP5 mRNA in prostate cancer and benign prostate cell lines were measured by quantitative real-time PCR. Results shown are means \pm S.D. of three independent experiments. (B) Western blot analysis of FABP5 protein levels in prostate cancer and benign prostate cell lines. Total cellular protein was subjected to SDS-PAGE, and Western blotting was performed using an anti-FABP5 antibody. α -tubulin was used as the endogenous control. The data shown are representative of three independent experiments.

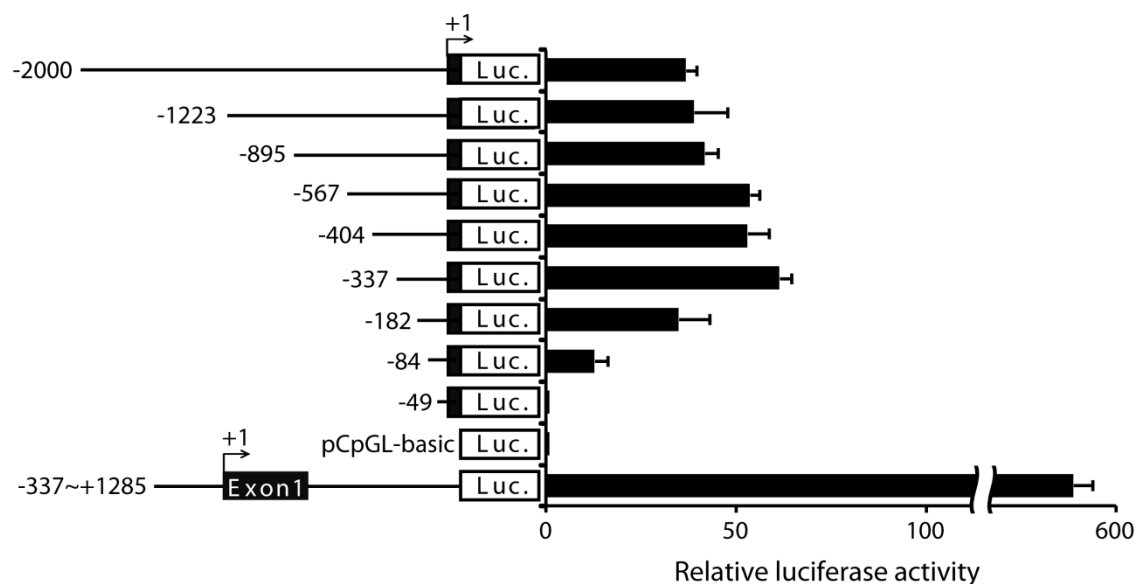


Figure 4-3. Transcriptional activity of the 5'-flanking region and intron 1 of FABP5 gene

Deletion analysis of the FABP5 promoter. Reporter plasmids containing the 5'-flanking region of the FABP5 gene with serial deletions (pCpGL-FABP5/-2000, -1223, -895, -567, -404, -337, -182, -84, -49, -337~+1285, and pCpGL-basic) were transfected into PC-3 cells. The hRluc/TK vector was used as an internal control for transfection efficiency. Luciferase activities were measured 24 h after transfection and normalized to the renilla reporter activities. Promoter activities are expressed relative to the activity of the pCpGL-basic vector. Results shown are the mean \pm SD of three independent experiments.

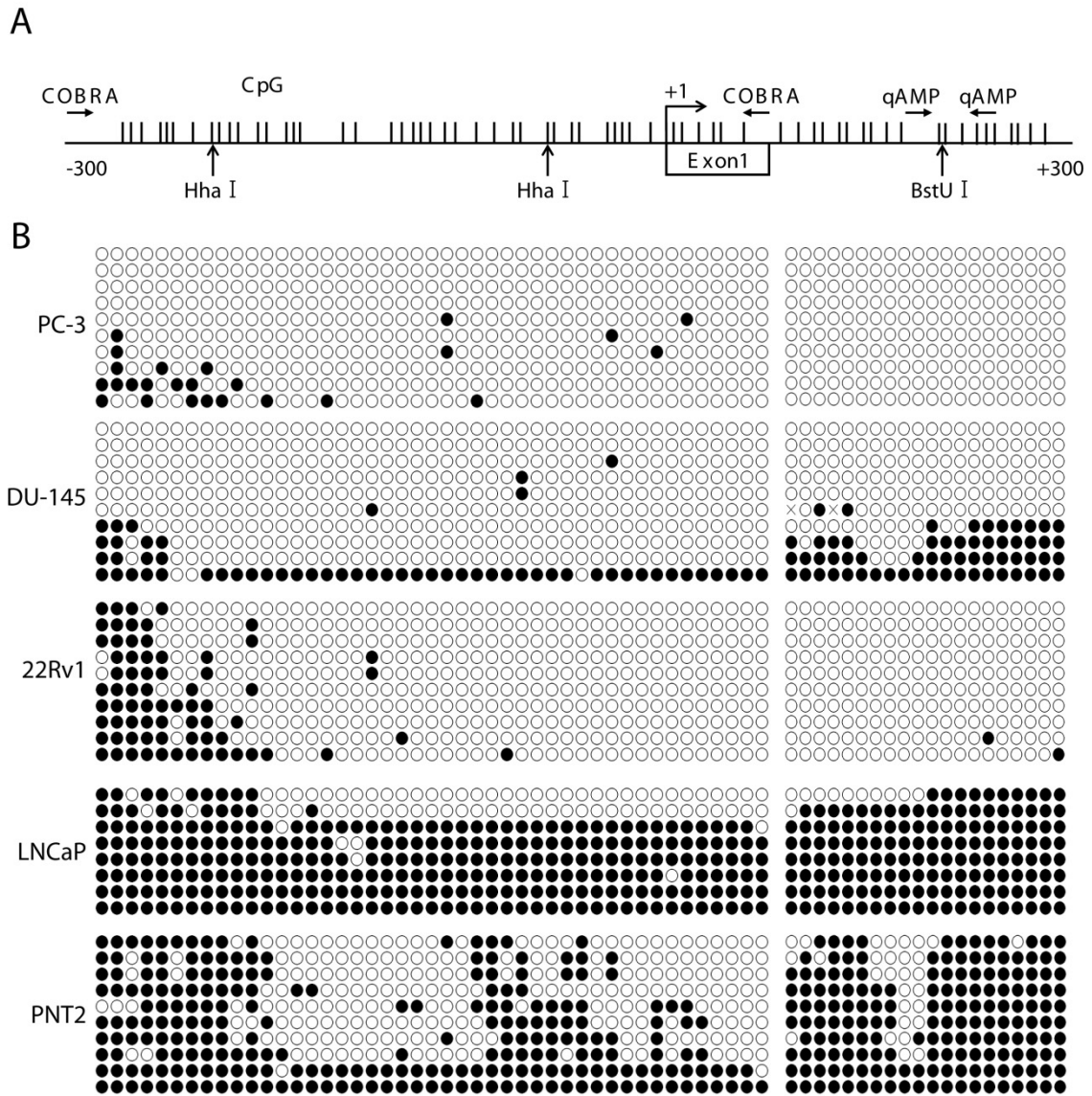


Figure 4-4. The DNA methylation status of the CpG island in the FABP5 promoter region

(A) Schematic representation of CpG loci in the FABP5 promoter region. CpG dinucleotide positions are indicated by vertical bars. Positions of PCR primers for COBRA and qAMP are indicated by horizontal arrows, and HhaI and BstUI sites are indicated by vertical arrows.

(B) Bisulfite sequencing analysis of the FABP5 promoter in prostate cancer and benign prostate cell lines. Closed circles represent methylated CpG sites, and open circles represent unmethylated CpG sites.

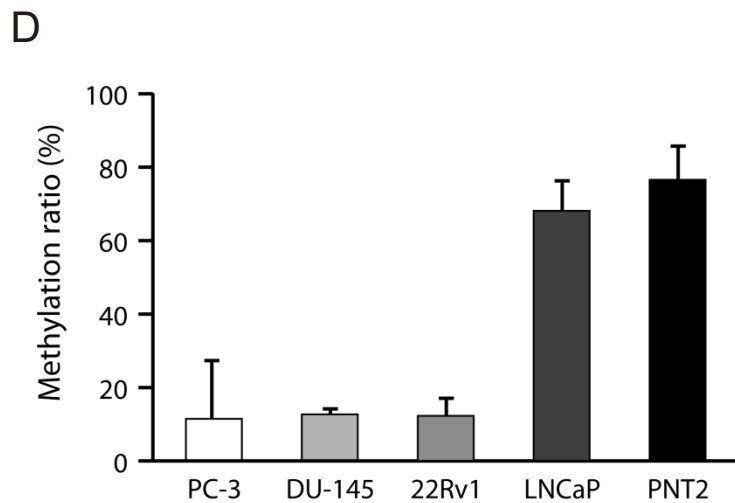
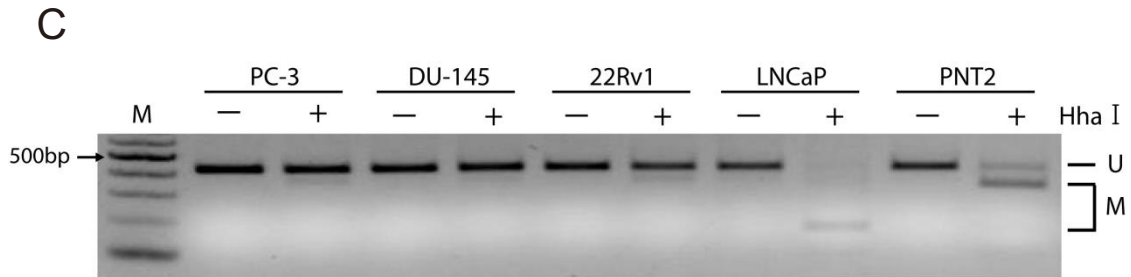


Figure 4-4 (continued). The DNA methylation status of the CpG island in the FABP5 promoter region

(C) Comparison of digestion patterns in prostate cancer and benign prostate cell lines by combined bisulfite restriction analysis (COBRA). Undigested (–) and HhaI-digested (+) bisulfite-PCR products were resolved in 2% (w/v) agarose gel together with a 100 bp ladder. M represents methylated, and U represents unmethylated. The data shown are representative of three independent experiments. (D) Calculation of percent methylation of the FABP5 promoter (first intron region) by quantitative analysis of DNA methylation using qAMP. Results shown are means ± S.D. of three independent experiments.

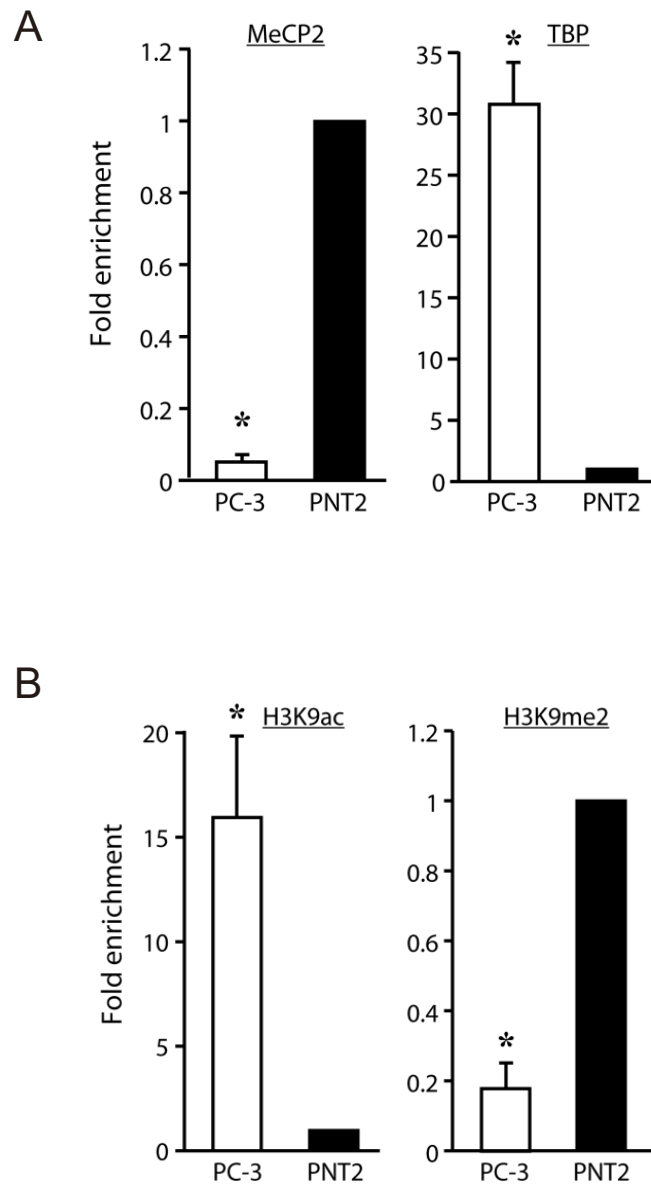


Figure 4-5. Effects of DNA methylation on transcription factors binding and histone modification

(A) ChIP-qPCR analysis of transcription factors binding to the *FABP5* promoter. ChIP was performed with antibodies against TBP or MeCP2, followed by quantification by real-time PCR of ChIP. The values of PNT2 sample are set at 1.

(B) PC-3 and PNT2 cells were examined for histone modifications by ChIP-qPCR. ChIP assay of the acetylation and dimethylation of histone H3K9 on the *FABP5* promoter were performed. The enrichment values are shown as the fold difference relative to PNT2 cells. Results shown are the mean \pm SD of three independent experiments.

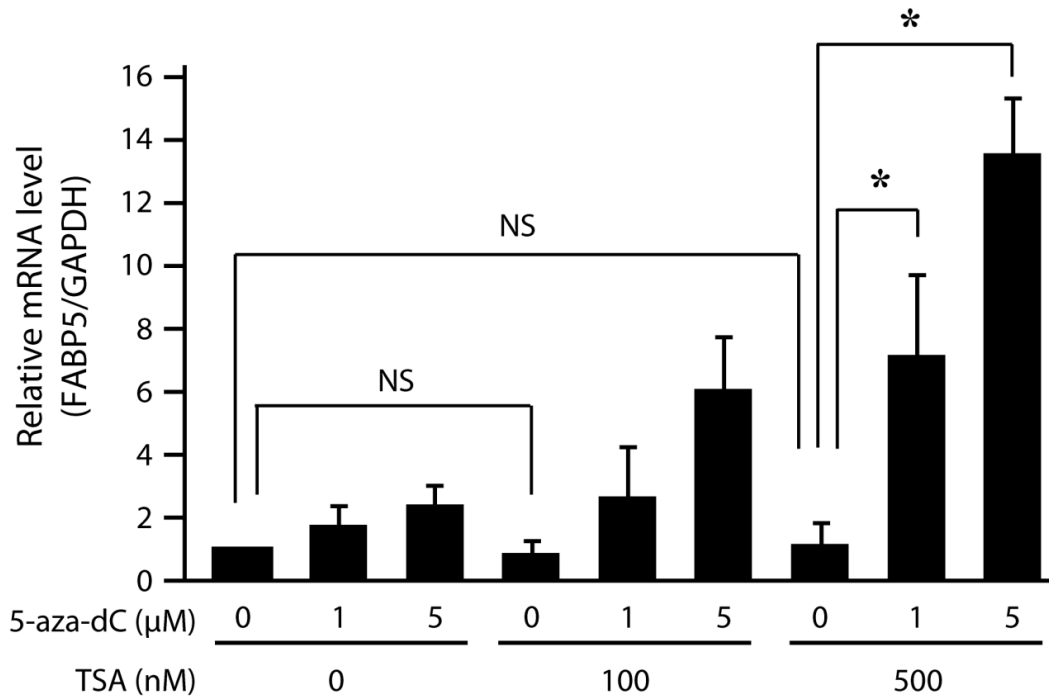


Figure 4-6. DNA methylation status plays a key role in regulating FABP5 expression.

Relative expression levels of FABP5 mRNA in 5-aza-dC and/or TSA-treated PNT2 cells. Expression levels of FABP5 mRNA were determined by quantitative real-time PCR and normalized against the corresponding levels of GAPDH. NS stands for not statistically significant. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$).

```

-340  GTCAAACGGAGGGGTGCAGGAGAGGGCGGGGCCAGGCCTCAGGTTGACCCCTCTGGCTTCTGGCTTCTGGCTGCAGAGGCCGCCGAAACGTGCAGGCGCCGGCGTC
          GC-box1          E-box/-301
-240  CATGAGGCGTGGGGCGCCCGGGCGAGTCCCTGCTTGCAGGAGGCCCGGAGAGGCCGTGCGGTACCCTGGCAAGAGGAGCTGGTTAGCACCTCCCGACC
          kB site1
-140  CCGAGAAGGCCAGGGGGCGCCCGGCAGGGCGGGCGGGGACCGGGCGAGGCCCGCTCCATTGGCCGATAGCGCCGCCAGCGGGCGCCGTTATA
          kB site2          GC-box2/3          +1          GC-box4          GC-box5          TATA-box
-40   AAGCAGCCCGCCGGCGCCGGTGCCTCACAGCACGCTGCCACGGCCAGCGAGACCCTCTCTGCACGCCAGCCCGCCGCCACCCACCATGGCCACAGTTCA
+61   GCAGCTGGAAGGAAGATGGCGCCTGGTGGACAGCAAAGGCTTGTATGAATACATGAAGGAGCTAGGTGAGGCACCCGGCCTGGCAGCGCTGCAACGTGG
          E-box1
+161  CGTGTGTGCGGTCTGTCTGTCCCTAGGTCCCGCTCAGCGTCCAGATTCTGGGGCAGGAGATGCTCGGCGGCCTACCCCATCCCTCCCATCTTCCCA
          E-box2
+261  CCACGGCGCCGTTGGGTGCAGCGCGCGCAGCACACCGCGGGCAGGCGGCGAGGAGCAGGGAGCGTGCAGCCTCTTGCCCGCCCGGGCGCAAGATT
          E-box3          E-box4
+361  CGGAGGTGGTCCACCCCGTGGTCCACCTACCTCTGCTTCTTCCCTTGCGCCAAACGGCAGCCCTTCCGCATTGCTTCTGTCTTTAGCGCGCGCACCC
+461  GTCACCTCACGCTGCACTTCTTTCGACCCCTCCAGGGCGACCTGTATTTCCCTTTTTTCCCCCTTACTCATCCTTCCCTTCTGCCACCACTTCTGTC
+561  TCTCCCATTTACCCCATCGTGGCAGCACCCACTCCCTTTCCCTCCCTGTGCGATCTTTTGTCCCTGTGGCGCGCAGGTCACCCCTCCGTTTTTCTCATG
+661  GGGACGCGGTGCTGGCGCGCAGTTTCCCGCAGAAATCCTGTGGAGGGGTCTGAGTGGCGCTACAGCTTCAGCTTGCACTTCTCTGTGACCCCGTCTCCC
+761  CCAGGTCCTCTGCTCGCCCTTACCAGTTGAGCCGAACCTTTGGATTGGTACCCCATGGAACACAGGGCCCGAGAAGCGTGGCGCTGGCGGTGCCGA
+861  CCTGCTGCTGGCACTGCCGGCGGGGCGCGCAGTGGCGGGTGGCCTGTGGGAGGAGCGCAATGAGGCCTGGGGGTGGCCGTGTGTTGCCATCCTGGC
+961  CTTGCCACTTGAGGGTGAGGGAAGGAGGAGGAGTGGGCTTTGCTGGAAAACCGTAAACAGAAACTGCCTGGCCCTCCTGCGGCTAACTGCATGCAAGATG
+1061 GGTGTGGCCCTGCAGAAAGGCAGATGACTTCTTGAAGCGTTCAGGGGAGAATGAATCTCAGTAGTAAGATTCACTTCTCACTCAAACAGTGCTTCATTA
+1161 TAAATTAAGTCTCTTTCTATGCCAGTGACAGATTGCATGCTGATTGAGACACTGGATAAATTGCAAAACAAAATGGACCTTTGTACAGGCCACTAGGA
+1261 AGTGAGATGGAGTTAGCATAGCATGGATCCTCTCTGGAAGGGAGCTTCCAGCCCTAAGGGATGGCTGGGATTTATGAGGGTGTTCAGAGCCGGTATCC

```

Figure 4-7. Location of predicted transcription binding sites of the *FABP5* gene promoter

Nucleotide sequence of the *FABP5* promoter region, including exon 1 and part of intron 1.

Locations of predicted transcription factor-binding sites are underlined. The shaded region indicates exon 1, and the initiation codon of the *FABP5* gene is boxed. The arrow indicates the transcription start site (TSS, +1). Numbers indicate nucleotide positions relative to the TSS.

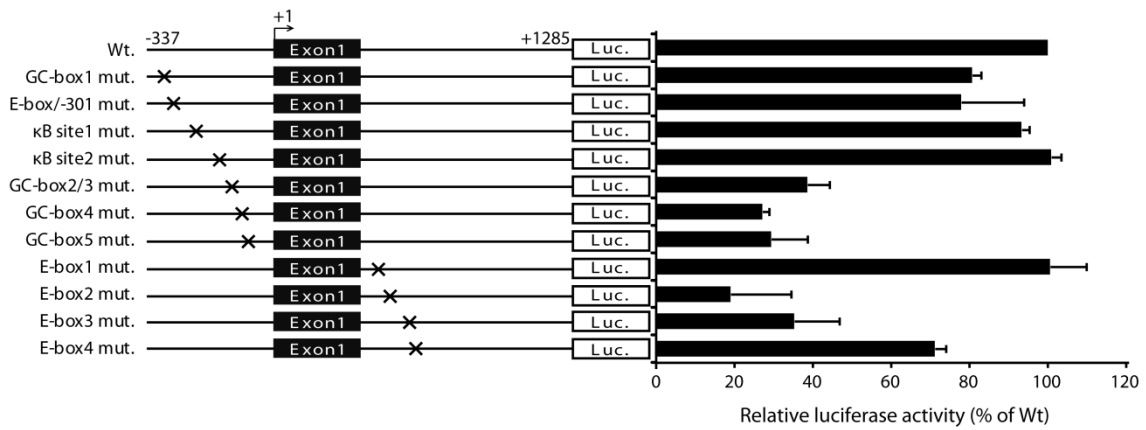


Figure 4-8. Characterization of transcription factors binding to the FABP5 promoter

Site-directed mutagenesis was performed using the pCpGL-FABP5/-337~+1285 construct as a template. Wild-type (Wt.) or mutated plasmid was co-transfected with hRluc/TK into PC-3 cells. Luciferase activities were measured and normalized against the corresponding Renilla luciferase reporter activities. Crosses indicate mutation sites. The values are expressed as the percentage of the wild-type promoter activity. Results shown are means \pm S.D. of three independent experiments.

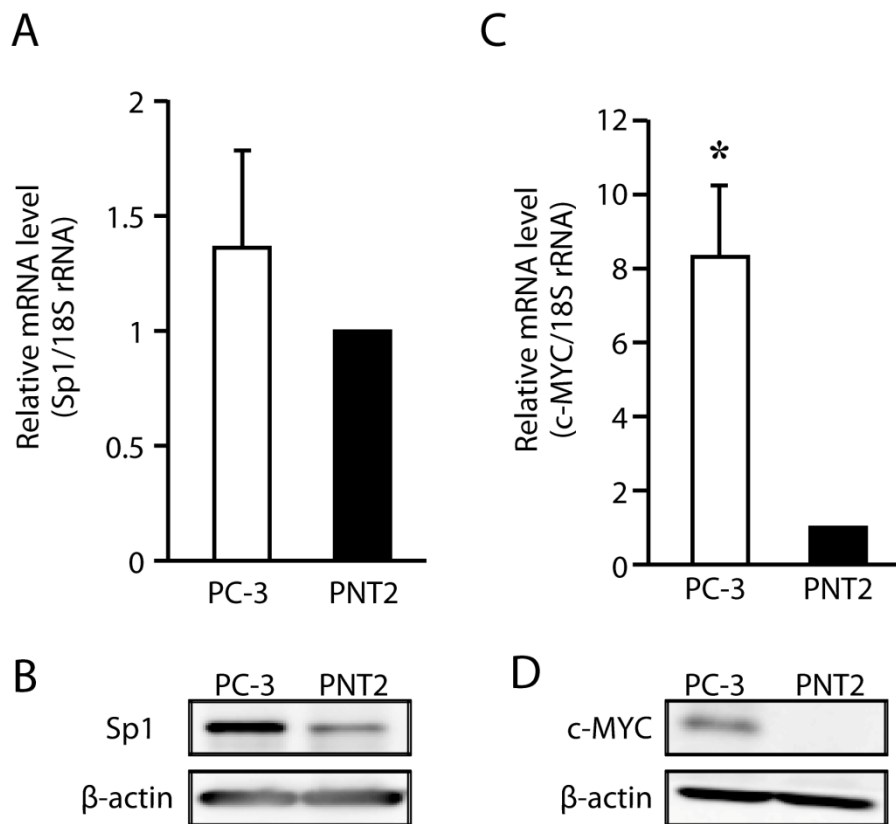


Figure 4-9. Sp1 and c-MYC are involved in transcriptional regulation of FABP5 gene in prostate cancer

Relative mRNA and protein levels of SP1 (A, B) or c-MYC (C, D) in PNT2 and PC-3 cells. mRNA levels were determined by quantitative real-time PCR. Lysates from the indicated cell lines were analyzed by Western blot using specific antibodies against SP1 or c-MYC. β -actin was used as a loading control. Western blot data are representative of 2–3 independent experiments with similar results.

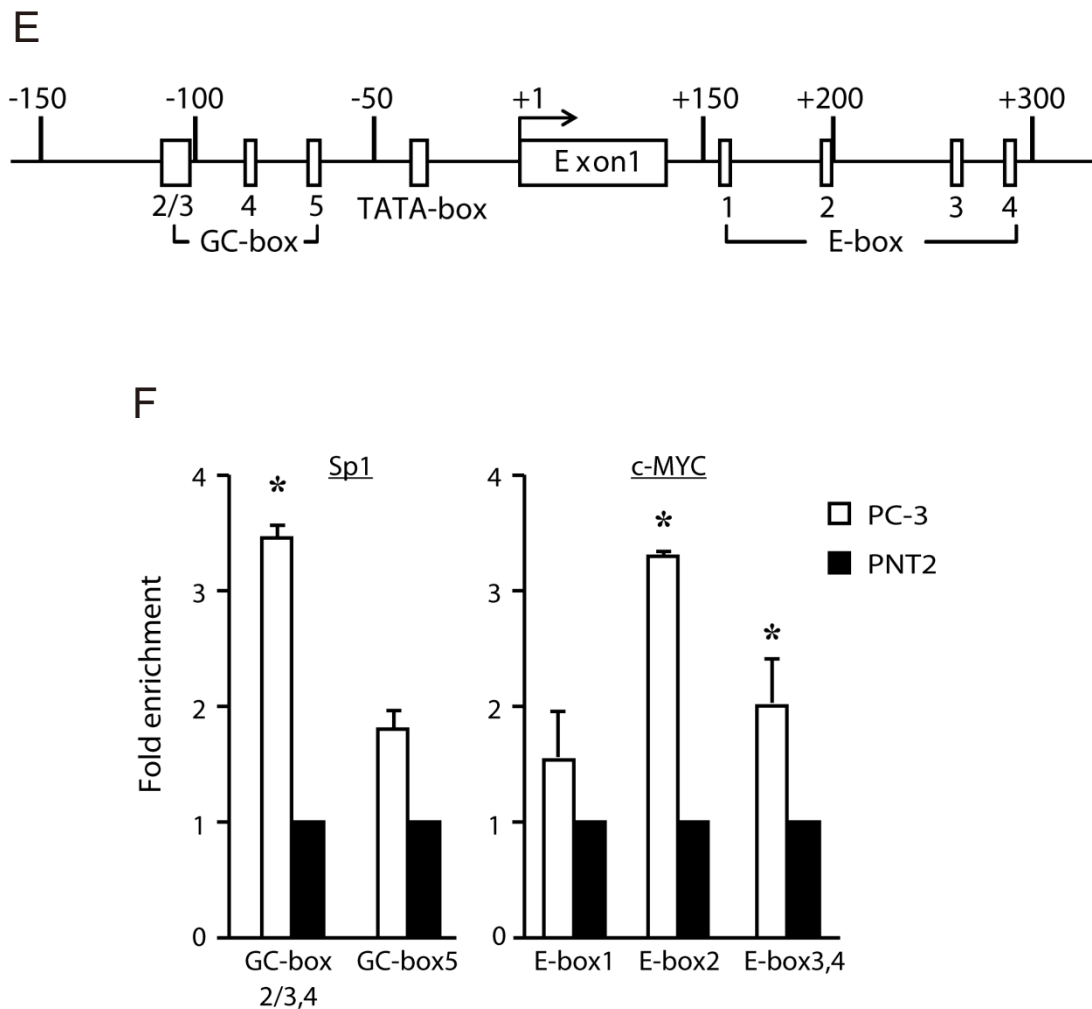


Figure 4-9 (continued). Sp1 and c-MYC are involved in transcriptional regulation of FABP5 gene in prostate cancer

(E) Schematic representation of the FABP5 promoter region. GC-boxes, E-boxes, and TATA-box are indicated as white rectangles. **(F)** ChIP-qPCR analysis to evaluate binding of SP1 and c-MYC proteins to the FABP5 promoter. The indicated SP1 or c-MYC binding sites were amplified using ChIP-qPCR primers (Table 2-2) and quantitated by real-time PCR. Results are expressed as fold enrichment relative to the value from PNT2 cells. Data are expressed as the means \pm S.D. of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$).

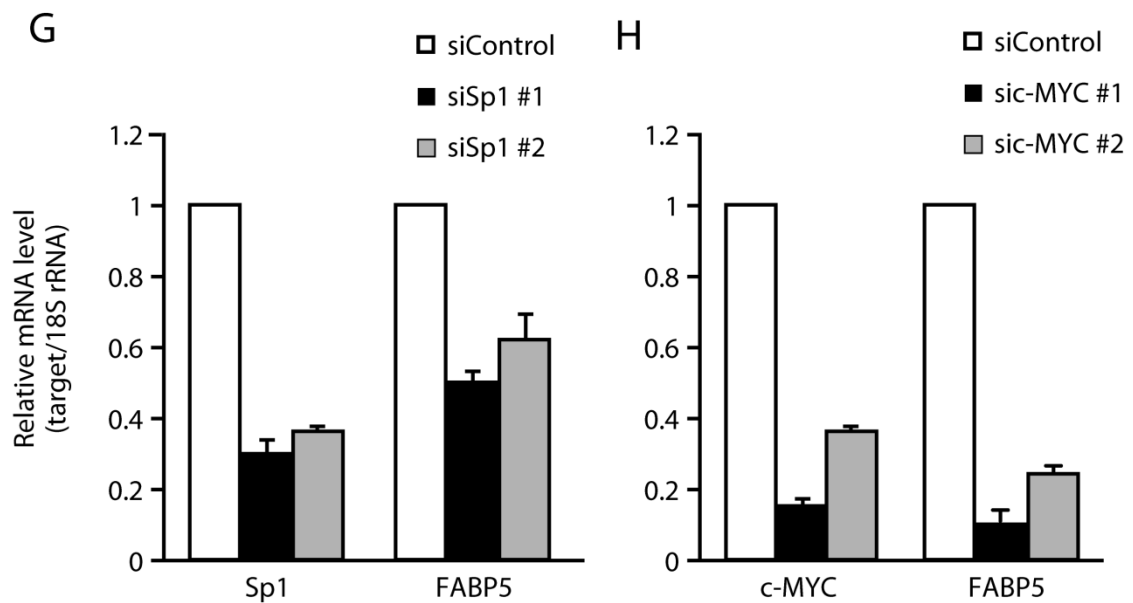


Figure 4-9 (continued). Sp1 and c-MYC are involved in transcriptional regulation of FABP5 gene in prostate cancer

PC-3 cells were transfected with siRNA against SP1 (**G**) or c-MYC (**H**). After 72 hours, the expression levels of SP1, c-MYC, and FABP5 mRNA were evaluated by quantitative real-time PCR.

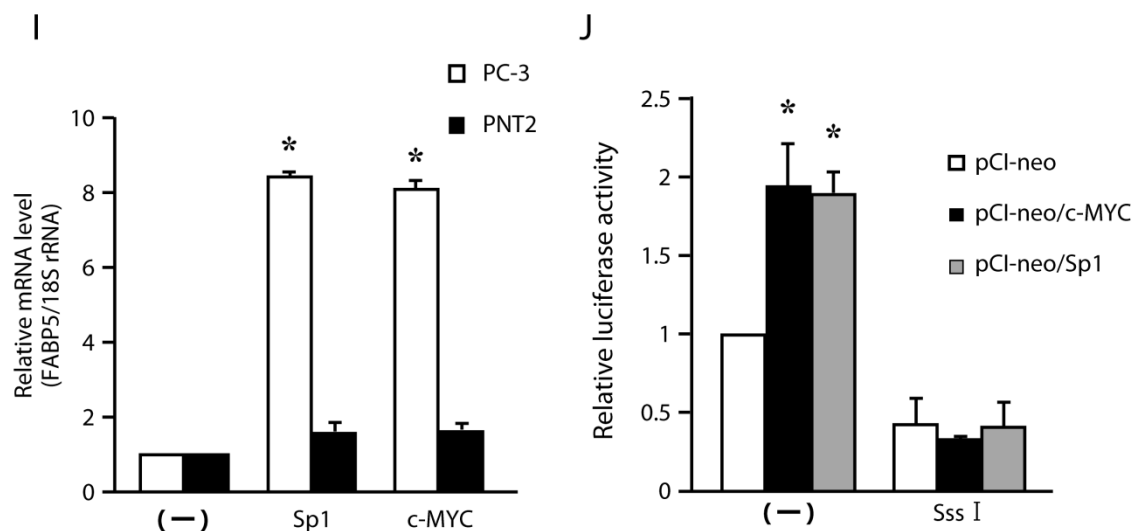


Figure 4-9 (continued). Sp1 and c-MYC are involved in transcriptional regulation of FABP5 gene in prostate cancer

(I) The effect of overexpression of SP1 or c-MYC in PNT2 and PC-3 cells. PNT2 and PC-3 cells were transfected with pCI-neo/SP1 or c-MYC expression vector. After 48 hours, the expression levels of FABP5 mRNA were evaluated by quantitative real-time PCR. **(J)** The effect of DNA methylation on the transcriptional activity of the FABP5 promoter. The SssI-methylated or unmethylated constructs were transfected into PC-3 cells. Luciferase activities were measured and normalized against the corresponding Renilla luciferase reporter activities. The value of mock unmethylated reporter is defined at 1. The results shown are means \pm S.D. of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$).

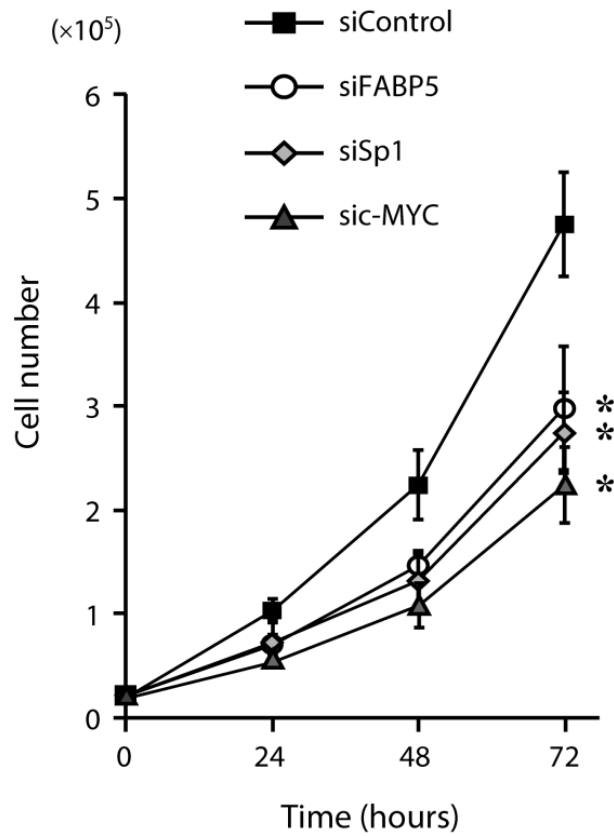


Figure 4-10. FABP5 plays a key role in prostate cancer progression

Cell proliferation assay. PC-3 cells were transfected with siRNA against FABP5, c-MYC, or SP1 or a negative control siRNA, and cells were counted at the indicated times. Data are expressed as means \pm S.D. of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$).

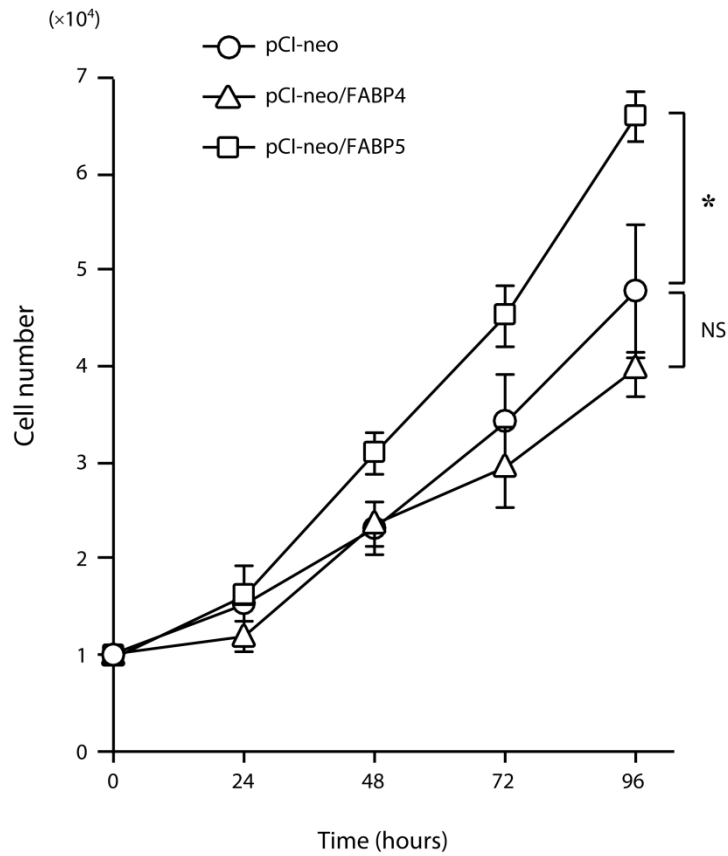


Figure 4-11. FABP5 plays a key role in prostate cancer progression

Cell proliferation assay. PNT2 cells were transfected with pCI-neo/FABP4 or FABP5 expression vector, and cells were counted at the indicated times. Data are expressed as means \pm S.D. of three independent experiments. NS stands for not statistically significant. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$).

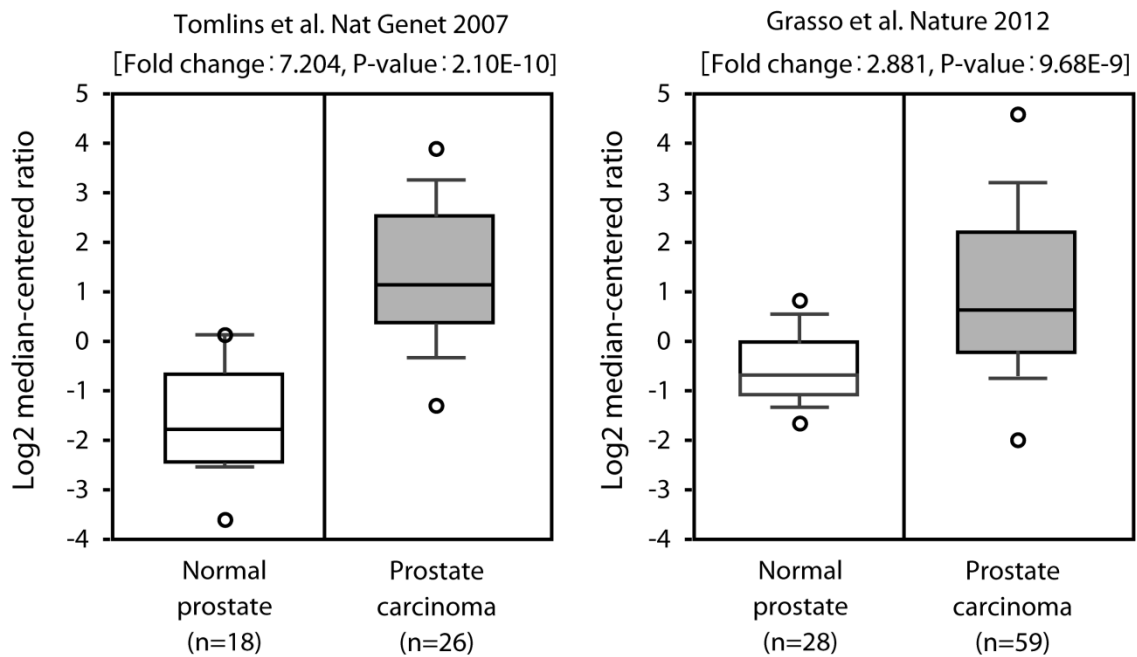


Figure 4-12. Oncomine box plots of *FABP5* expression levels between human normal and prostate cancer tissues

Analysis of *FABP5* expression in normal prostate and prostate carcinoma. Box plots of data from the two independent Oncomine data sets (left panel: Tomlins et al. [85], right panel: Grasso et al. [86]). Median values are shown as horizontal bars. The upper and lower part of the box show the 75th percentile and the 25th percentile, respectively. The upper and lower part of the bar show the 90th percentile and the 10th percentile, respectively. The points show outlier values.

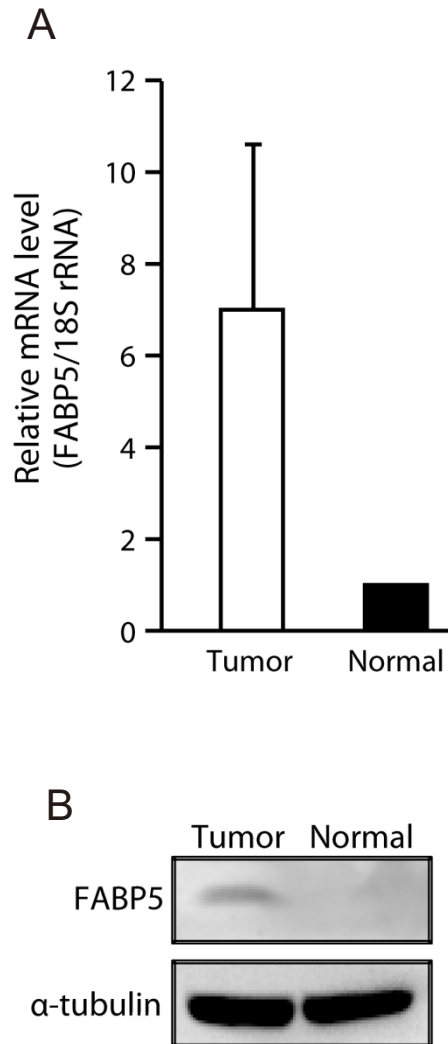


Figure 4-13. FABP5 expression in human prostatic tissue samples

(A) Quantitative real-time PCR analysis of the relative levels of FABP5 mRNA in normal human prostate tissue and human prostate tumor tissue (Gleason score = 9) using 18S rRNA as an internal control. (B) Western blot analysis of the relative levels of FABP5 protein expressed in the normal prostate and in prostate tumor tissue. α -tubulin was used as a loading control. The data shown are representative of three independent experiments.

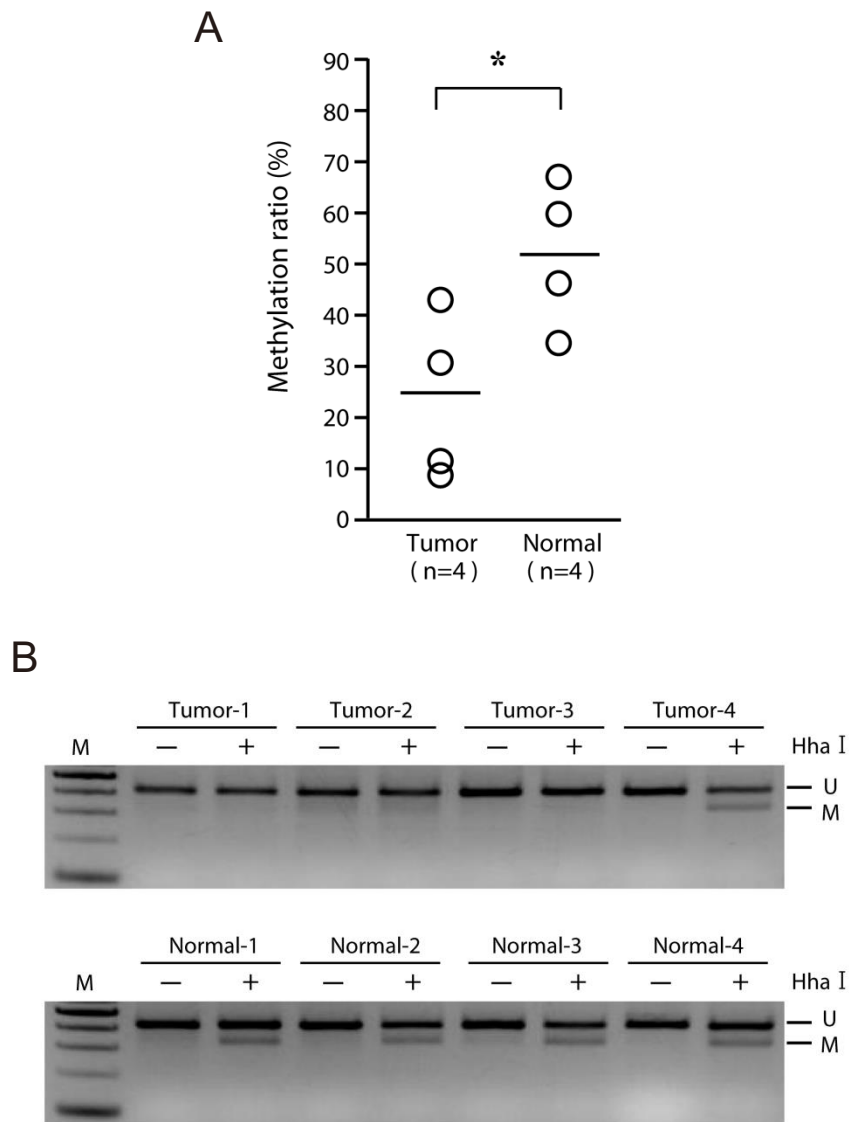


Figure 4-14. DNA methylation status of the *FABP5* gene in human prostatic tissue samples

DNA methylation status of *FABP5* gene in human prostate tissue samples. Genomic DNA extracted from normal prostate ($n = 4$) and prostate tumor tissue ($n = 4$) were assayed by the qAMP method and COBRA. Results of qAMP are presented as a dot plot, and the horizontal bars show the mean (A). Representative agarose gel images of COBRA are shown (B). Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$).

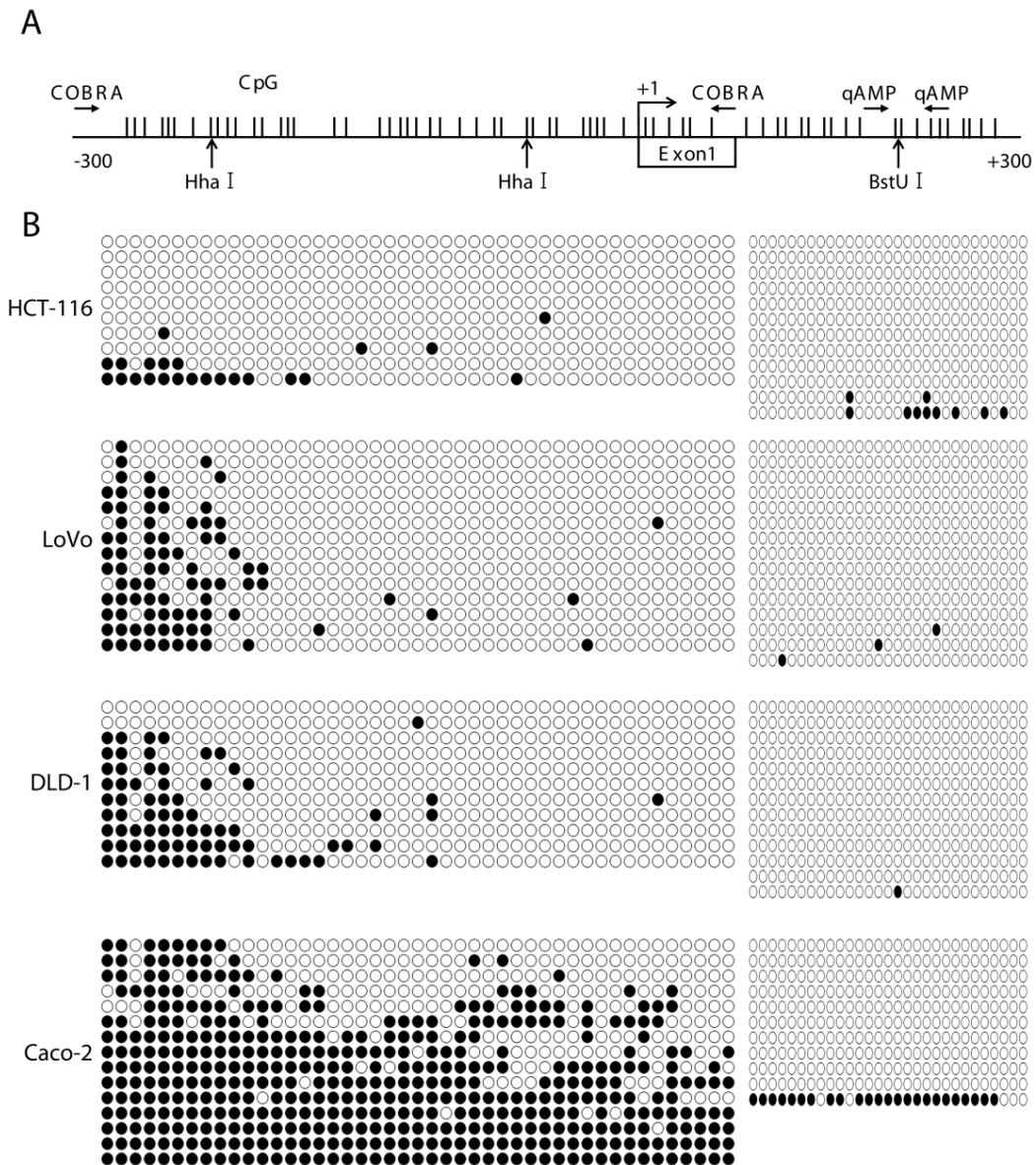


Figure 4-15. The DNA methylation status of the CpG island in the FABP5 promoter region

(A) Schematic representation of CpG loci in the FABP5 promoter region. CpG dinucleotide positions are indicated by vertical bars. Positions of PCR primers for COBRA and qAMP are indicated by horizontal arrows, and HhaI and BstUI sites are indicated by vertical arrows.

(B) Bisulfite sequencing analysis of the FABP5 promoter in colorectal cancer cell lines. Closed circles represent methylated CpG sites, and open circles represent unmethylated CpG sites.

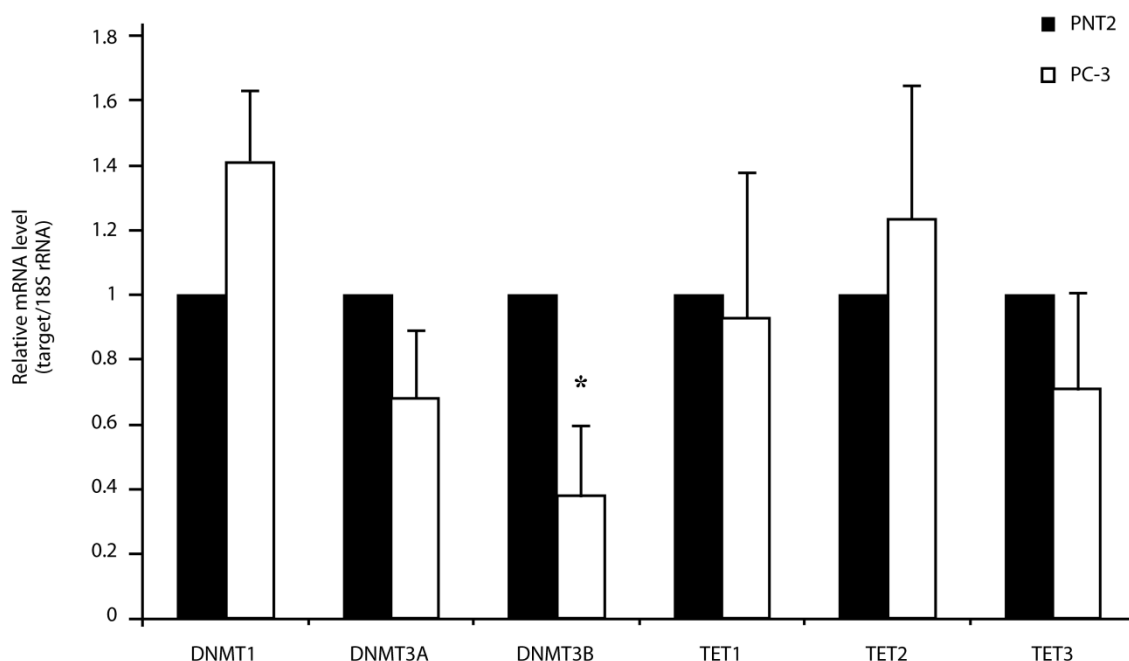


Figure 4-16. Relative mRNA levels of DNMTs and TETs enzymes in prostate cancer cells

Relative mRNA levels of DNA methyl transferases (DNMT1, 3A and 3B) and ten-eleven translocations family enzymes (TET1, 2, and 3) in PNT2 and PC-3 cells. mRNA levels were determined by quantitative real-time PCR and normalized against the corresponding levels of 18S rRNA. miR-22 expression pattern in PC-3, DU-145 and PNT2 cells. Mature microRNAs were measured by qPCR and were normalized to RNU6B. The results shown are means \pm S.D. of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$).

Table 4-1 (related to Figure 4-16). Sequences of primers used in this study

	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<u>Quantitative real-time PCR</u>		
DNMT1	G TTCAGCAAAAACCAATCTATG	C ATTAACACCACCTTCAAGAG
DNMT3A	A CCAGCATTTTCCTGTCTTCAT	T TCAGTGCACCATAAGATGTCC
DNMT3B	C AAGTCGAACTCGATCAAACAG	T CATGACAACAGGGAAAAGTTG
TET1	T CTGTTGTTGTGCCTCTGGA	T CTGACTTGGGGCCATTTAC
TET2	C CATCTTGCAGATGTGTAGAGC	T CTGTCCAAACCTTTCTTCCA
TET3	G AGAGAAGGGGAAAGCCATC	T AGCTTCTCCTCCAGCGTGT
18S rRNA	C GGCTACCACATCCAAGGAA	G CTGGAATTACCGCGGCT

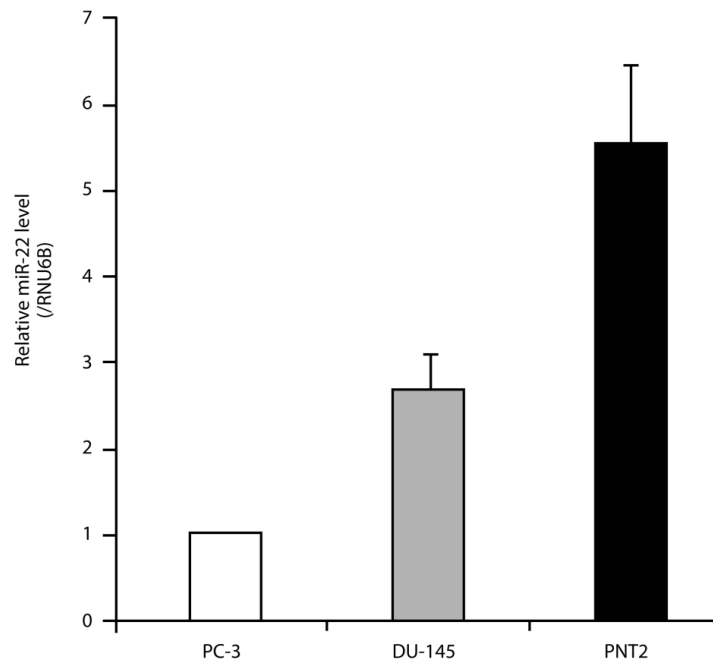


Figure 4-17. Relative miR-22 levels in prostate cancer cells

miR-22 expression pattern in PC-3, DU-145 and PNT2 cells. Mature microRNAs were measured by qPCR and were normalized to RNU6B. The results shown are means \pm S.D. of three independent experiments.

総括

本研究では、DNA メチル化解析により、転移原因遺伝子である FABP5 が、癌細胞特異的な DNA 脱メチル化機構により発現制御されていることを明らかにした。さらに、癌細胞における FABP5 の機能解析により、過剰発現した FABP5 は、細胞周期、アポトーシス、脂質代謝に関わる遺伝子群の発現制御を介して癌細胞の増殖や悪性化に寄与していることを明らかにした。前述したように、本研究で示した大腸癌や前立腺癌だけでなく、乳癌などその他の多くの癌で FABP5 は高発現していることが示されている [39-45]。従って、今後はこれらの癌においても、*FABP5* プロモーター領域の DNA 脱メチル化及び FABP5 依存的な癌促進の分子機構を明らかにする必要がある。

興味深いことに、網羅的な DNA メチル化アレイ解析の結果から、癌の悪性化に関わる遺伝子群が *FABP5* 遺伝子と同様の機構により発現制御されていることが示唆されている。このことは、癌細胞にとって有利に働くように遺伝子群の発現をコントロールする何らかの制御因子が存在する可能性を示唆している。その制御因子は、癌細胞自身が持つものなのか、環境因子中に存在するものなのか現在のところ不明であるが、癌の悪性化において極めて重要なキーファクターであると考えられる。エピゲノム修飾の変化により *FABP5* を含めた癌の悪性化に関わる遺伝子群が発現制御されているということは、エピゲノム制御因子を介した癌悪性化の分子基盤を詳細に解明することで、癌の予防や治療法の開発へと応用できることを意味している。従って本研究は、癌という病態を理解し、これを克服していく上で重要な知見を提供するものであると考えている。

謝辞

本研究を行うにあたり、指導教官である信州大学先鋭領域融合研究群 バイオメディカル研究所・代謝ゲノミクス部門 藤井 博 教授から終始丁寧かつ熱心な御指導を賜りました。ここに感謝の意を表します。

また、論文の作成及び審査におきまして多大なる御助力と適切な御指導を賜りました、信州大学農学部 食品化学研究室 中村 宗一郎 教授、応用きのこ学研究室 福田 正樹 教授、機能分子化学研究室 真壁 秀文 教授 に深く感謝致します。

信州大学農学部 食料生産科学科 動物発生遺伝学研究室 鏡味 裕 教授、応用生命科学科 光制御化学研究室 小嶋 政信 教授、生物有機化学研究室 伊原 正喜 助教、近未来農林総合科学教育研究センター ゲノム進化学研究室 鈴木 俊介 助教 には研究の遂行にあたり貴重な御助言を頂くとともに、実験機材を快く提供して頂きました。諸先生方の多大なる御支援を頂きましたことに心より御礼申し上げます。

食品生化学研究室の皆様には、日頃の研究活動において多くの示唆と助言を頂き、また、実験の際には惜しみない協力をして頂きました。充実した研究生活を送ることができたのも、ひとえに食品生化学研究室の皆様の御支援・御協力あつてのことと厚く御礼申し上げます。

最後に、長い間、常に温かい目で見守り、心の拠り所となって私を支えてくれた家族に心より感謝致します。本当にありがとうございました。

参考文献

1. 国立がんセンター 最新がん統計
<http://ganjoho.jp/public/statistics/pub/statistics01.html>
2. Hebert, J. R., Hurley, T. G., Olendzki, B. C., Teas, J., Ma, Y., and Hampl, J. S. (1998) Nutritional and socioeconomic factors in relation to prostate cancer mortality: a cross-national study. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 1637-1647
3. Smathers, R. L., and Petersen, D. R. (2011) The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. *Hum. Genomics* **5**, 170-191
4. Zimmerman, A. W., and Veerkamp, J. H. (2002) New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1096-1116
5. Storch, J., and Thumser, A. E. (2000) The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**, 28-44
6. Coe, N. R., and Bernlohr, D. A. (1998) Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1391**, 287-306
7. Storch, J., and Corsico, B. (2008) The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu. Rev. Nutr.* **28**, 73-95
8. Storch, J., and Thumser, A. E. (2010) Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family. *J. Biol. Chem.* **285**, 32679-32683
9. Kamijo, A., Sugaya, T., Hikawa, A., Okada, M., Okumura, F., Yamanouchi, M., Honda, A., Okabe, M., Fujino, T., Hirata, Y., Omata, M., Kaneko, R., Fujii, H., Fukamizu, A., and Kimura, K. (2004) Urinary excretion of fatty acid-binding protein reflects stress overload on the proximal tubules. *Am. J. Pathol.* **165**, 1243-1255
10. Ohkaru, Y., Asayama, K., Ishii, H., Nishimura, S., Sunahara, N., Tanaka, T., and

- Kawamura, K. (1995) Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of human heart type fatty acid-binding protein in plasma and urine by using two different monoclonal antibodies specific for human heart fatty acid-binding protein. *J. Immunol. Methods* **178**, 99-111
11. Glatz, J. F., Kleine, A. H., van Nieuwenhoven, F. A., Hermens, W. T., van Dieijen-Visser, M. P., and van der Vusse, G. J. (1994) Fatty-acid-binding protein as a plasma marker for the estimation of myocardial infarct size in humans. *Br. Heart J.* **71**, 135-140
 12. Hastrup, B., Gill, S., Kristensen, S. R., Jørgensen, P. J., Glatz, J. F., Haghfelt, T., and Hørdler, M. (2000) Biochemical markers of ischaemia for the early identification of acute myocardial infarction without ST segment elevation. *Cardiology* **94**, 254-261
 13. Furuhashi, M., and Hotamisligil, G. S. (2008) Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 489-503
 14. Furuhashi, M., Ishimura, S., Ota, H., and Miura, T. (2011) Lipid chaperones and metabolic inflammation. *Int J Inflam* **2011**, 642612.
 15. Furuhashi, M., Fucho, R., Görgün, C. Z., Tuncman, G., Cao, H., and Hotamisligil, G. S. (2008) Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 2640-2650
 16. Furuhashi, M., Tuncman, G., Görgün, C. Z., Makowski, L., Atsumi, G., Vaillancourt, E., Kono, K., Babaev, V. R., Fazio, S., Linton, M. F., Sulsky, R., Robl, J. A., Parker, R. A., and Hotamisligil, G. S. (2007) Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* **447**, 959-965

17. Shimamoto, C., Ohnishi, T., Maekawa, M., Watanabe, A., Ohba, H., Arai, R., Iwayama, Y., Hisano, Y., Toyota, T., Toyoshima, M., Suzuki, K., Shirayama, Y., Nakamura, K., Mori, N., Owada, Y., Kobayashi, T., and Yoshikawa, T. (2015) Functional characterization of FABP3, 5 and 7 gene variants identified in schizophrenia and autism spectrum disorder and mouse behavioral studies. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 2409.
18. Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309-314
19. Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C., and Farese, R. V. (2013) Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab* **18**, 153-161
20. Zaidi, N., Swinnen, J. V., and Smans, K. (2012) ATP-citrate lyase: a key player in cancer metabolism. *Cancer Res.* **72**, 3709-3714
21. Kuhajda, F. P. (2006) Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res.* **66**, 5977-5980
22. Mashima, T., Sato, S., Okabe, S., Miyata, S., Matsuura, M., Sugimoto, Y., Tsuruo, T., and Seimiya, H. (2009) Acyl-CoA synthetase as a cancer survival factor: its inhibition enhances the efficacy of etoposide. *Cancer Sci.* **100**, 1556-1562
23. Locasale, J. W., Grassian, A. R., Melman, T., Lyssiotis, C. A., Mattaini, K. R., Bass, A. J., Heffron, G., Metallo, C. M., Muranen, T., Sharfi, H., Sasaki, A. T., Anastasiou, D., Mullarky, E., Vokes, N. I., Sasaki, M., Beroukhi, R., Stephanopoulos, G., Ligon, A. H., Meyerson, M., Richardson, A. L., Chin, L., Wagner, G., Asara, J. M., Brugge, J. S., Cantley, L. C., and Vander Heiden, M. G. (2011) Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat. Genet.* **43**, 869-874
24. Mitsuishi, Y., Taguchi, K., Kawatani, Y., Shibata, T., Nukiwa, T., Aburatani, H.,

- Yamamoto, M., and Motohashi, H. (2012) Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* **22**, 66-79
25. Metallo, C. M., Gameiro, P. A., Bell, E. L., Mattaini, K. R., Yang, J., Hiller, K., Jewell, C. M., Johnson, Z. R., Irvine, D. J., Guarente, L., Kelleher, J. K., Vander Heiden, M. G., Iliopoulos, O., and Stephanopoulos, G. (2012) Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* **481**, 380-384
26. Mullen, A. R., Wheaton, W. W., Jin, E. S., Chen, P. H., Sullivan, L. B., Cheng, T., Yang, Y., Linehan, W. M., Chandel, N. S., and DeBerardinis, R. J. (2012) Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* **481**, 385-388
27. Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L., and Paul, C. L. (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 1827-1831
28. Kumaki, Y., Oda, M., and Okano, M. (2008) QUMA: quantification tool for methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* **36**, W170-W175
29. Oakes, C. C., La Salle, S., Robaire, B., and Trasler, J. M. (2006) Evaluation of a quantitative DNA methylation analysis technique using methylation-sensitive/dependent restriction enzymes and real-time PCR. *Epigenetics* **1**, 146-152
30. Klug, M., and Rehli, M. (2006) Functional analysis of promoter CpG methylation using a CpG-free luciferase reporter vector. *Epigenetics* **1**, 127-130
31. Asakawa, S., Tsunematsu, K., Takayanagi, A., Sasaki, T., Shimizu, A., Shintani, A.,

- Kawasaki, K., Mungall, A. J., Beck, S., Minoshima, S., and Shimizu, N. (2001) The genomic structure and promoter region of the human parkin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 863-868
32. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **61**, 69-90
33. Markowitz, S. D., and Bertagnolli, M. M. (2009) Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2449-2460
34. Fearon, E. R. (2011) Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* **6**, 479-507
35. Morgan, E. A., Forootan, S. S., Adamson, J., Foster, C. S., Fujii, H., Igarashi, M., Beesley, C., Smith, P. H., and Ke, Y. (2008) Expression of cutaneous fatty acid-binding protein (C-FABP) in prostate cancer: potential prognostic marker and target for tumorigenicity-suppression. *Int. J. Oncol.* **32**, 767-775
36. Adamson, J., Morgan, E. A., Beesley, C., Mei, Y., Foster, C. S., Fujii, H., Rudland, P. S., Smith, P. H., and Ke, Y. (2003) High-level expression of cutaneous fatty acid-binding protein in prostatic carcinomas and its effect on tumorigenicity. *Oncogene* **22**, 2739-2749
37. Jing, C., Beesley, C., Foster, C. S., Chen, H., Rudland, P. S., West, D. C., Fujii, H., Smith, P. H., and Ke, Y. (2001) Human cutaneous fatty acid-binding protein induces metastasis by up-regulating the expression of vascular endothelial growth factor gene in rat Rama 37 model cells. *Cancer Res.* **61**, 4357-4364
38. Jing, C., Beesley, C., Foster, C. S., Rudland, P. S., Fujii, H., Ono, T., Chen, H., Smith, P. H., and Ke, Y. (2000) Identification of the messenger RNA for human cutaneous

- fatty acid-binding protein as a metastasis inducer. *Cancer Res.* **60**, 2390-2398
39. Fang, L. Y., Wong, T. Y., Chiang, W. F., and Chen, Y. L. (2010) Fatty-acid-binding protein 5 promotes cell proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* **39**, 342-348
 40. Jeong, C. Y., Hah, Y. S., Cho, B. I., Lee, S. M., Joo, Y. T., Jung, E. J., Jeong, S. H., Lee, Y. J., Choi, S. K., Ha, W. S., Park, S. T., and Hong, S. C. (2012) Fatty acid-binding protein 5 promotes cell proliferation and invasion in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncol. Rep.* **28**, 1283-1292
 41. Sinha, P., Hütter, G., Köttgen, E., Dietel, M., Schadendorf, D., and Lage, H. (1999) Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3-sigma (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas. *Electrophoresis* **20**, 2952-2960
 42. Chen, R., Feng, C., and Xu, Y. (2011) Cyclin-dependent kinase-associated protein Cks2 is associated with bladder cancer progression. *J. Int. Med. Res.* **39**, 533-540
 43. Liu, R. Z., Graham, K., Glubrecht, D. D., Germain, D. R., Mackey, J. R., and Godbout, R. (2011) Association of FABP5 expression with poor survival in triple-negative breast cancer: implication for retinoic acid therapy. *Am. J. Pathol.* **178**, 997-1008
 44. Powell, C. A., Nasser, M. W., Zhao, H., Wochna, J. C., Zhang, X., Shapiro, C., Shilo, K., and Ganju, R. K. (2015) Fatty acid binding protein 5 promotes metastatic potential of triple negative breast cancer cells through enhancing epidermal growth factor receptor stability. *Oncotarget* **6**, 6373-6385
 45. Fujii, K., Kondo, T., Yokoo, H., Yamada, T., Iwatsuki, K., and Hirohashi, S. (2005)

- Proteomic study of human hepatocellular carcinoma using two-dimensional difference gel electrophoresis with saturation cysteine dye. *Proteomics* **5**, 1411-1422
46. Koshiyama, A., Ichibangase, T., and Imai, K. (2013) Comprehensive fluorogenic derivatization-liquid chromatography/tandem mass spectrometry proteomic analysis of colorectal cancer cell to identify biomarker candidate. *Biomed. Chromatogr.* **27**, 440-450
 47. Kanda, T., Foucand, L., Nakamura, Y., Niot, I., Besnard, P., Fujita, M., Sakai, Y., Hatakeyama, K., Ono, T., and Fujii, H. (1998) Regulation of expression of human intestinal bile acid-binding protein in Caco-2 cells. *Biochem. J.* **330**, 261-265
 48. Ohmachi, T., Inoue, H., Mimori, K., Tanaka, F., Sasaki, A., Kanda, T., Fujii, H., Yanaga, K., and Mori, M. (2006) Fatty acid binding protein 6 is overexpressed in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 5090-5095
 49. Fang, C., Dean, J., and Smith, J. W. (2007) A novel variant of ileal bile acid binding protein is up-regulated through nuclear factor-kappaB activation in colorectal adenocarcinoma. *Cancer Res.* **67**, 9039-9046
 50. Zirvi, K. A., Najjar, T. A., and Slomiany, B. L. (1993) Sensitivity of human colon tumor metastases to anticancer drugs in athymic (nude) mice. *Cancer Lett.* **72**, 39-44
 51. Hamada, K., Monnai, M., Kawai, K., Nishime, C., Kito, C., Miyazaki, N., Ohnishi, Y., Nakamura, M., and Suemizu, H. (2008) Liver metastasis models of colon cancer for evaluation of drug efficacy using NOD/Shi-scid IL2R γ manull (NOG) mice. *Int. J. Oncol.* **32**, 153-159
 52. Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501-1512

53. Seoane, J., Le, H. V., and Massagué, J. (2002) Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* **419**, 729-734
54. Schulze, A., and Harris, A. L. (2012) How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* **491**, 364-373
55. Nomura, D. K., Long, J. Z., Niessen, S., Hoover, H. S., Ng, S. W., and Cravatt, B. F. (2010) Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. *Cell* **140**, 49-61
56. Kannan-Thulasiraman, P., Seachrist, D. D., Mahabeleshwar, G. H., Jain, M. K., and Noy, N. (2010) Fatty acid-binding protein 5 and PPAR β/δ are critical mediators of epidermal growth factor receptor-induced carcinoma cell growth. *J. Biol. Chem.* **285**, 19106-19115
57. Morgan, E., Kannan-Thulasiraman, P., and Noy, N. (2010) Involvement of Fatty Acid Binding Protein 5 and PPAR β/δ in Prostate Cancer Cell Growth. *PPAR Res* 2010, 234629
58. Levi, L., Lobo, G., Doud, M. K., von Lintig, J., Seachrist, D., Tochtrop, G. P., and Noy, N. (2013) Genetic ablation of the fatty acid-binding protein FABP5 suppresses HER2-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* **73**, 4770-4780
59. Targett-Adams, P., McElwee, M. J., Ehrenborg, E., Gustafsson, M. C., Palmer, C. N., and McLauchlan, J. (2005) A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1728**, 95-104
60. Borland, M. G., Khozoie, C., Albrecht, P. P., Zhu, B., Lee, C., Lahoti, T. S., Gonzalez,

- F. J., and Peters, J. M. (2011) Stable over-expression of PPAR β/δ and PPAR γ to examine receptor signaling in human HaCaT keratinocytes. *Cell. Signal.* **23**, 2039-2050
61. Marin, H. E., Peraza, M. A., Billin, A. N., Willson, T. M., Ward, J. M., Kennett, M. J., Gonzalez, F. J., and Peters, J. M. (2006) Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta inhibits colon carcinogenesis. *Cancer Res.* **66**, 4394-4401
62. Hollingshead, H. E., Killins, R. L., Borland, M. G., Girroir, E. E., Billin, A. N., Willson, T. M., Sharma, A. K., Amin, S., Gonzalez, F. J., and Peters, J. M. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ (PPAR β/δ) ligands do not potentiate growth of human cancer cell lines. *Carcinogenesis* **28**, 2641-2649
63. Yang, L., Zhou, J., Ma, Q., Wang, C., Chen, K., Meng, W., Yu, Y., Zhou, Z., and Sun, X. (2013) Knockdown of PPAR δ gene promotes the growth of colon cancer and reduces the sensitivity to bevacizumab in nude mice model. *PLoS One* **8**, e60715.
64. Sessler, R. J., and Noy, N. (2005) A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II. *Mol. Cell* **18**, 343-353
65. Lane, D. P., and Hoeffler, W. K. (1980) SV40 large T shares an antigenic determinant with a cellular protein of molecular weight 68,000. *Nature* **288**, 167-170
66. Iggo, R. D., and Lane, D. P. (1989) Nuclear protein p68 is an RNA-dependent ATPase. *EMBO J.* **8**, 1827-1831
67. Stevenson, R. J., Hamilton, S. J., MacCallum, D. E., Hall, P. A., and Fuller-Pace, F. V. (1998) Expression of the 'dead box' RNA helicase p68 is developmentally and growth regulated and correlates with organ differentiation/maturation in the fetus. *J. Pathol.*

184, 351-359

68. Métivier, R., Penot, G., Hübner, M. R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon, F. (2003) Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* **115**, 751-763
69. Bates, G. J., Nicol, S. M., Wilson, B. J., Jacobs, A. M., Bourdon, J. C., Wardrop, J., Gregory, D. J., Lane, D. P., Perkins, N. D., and Fuller-Pace, F. V. (2005) The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. *EMBO J.* **24**, 543-553
70. Caretti, G., Schiltz, R. L., Dilworth, F. J., Di Padova, M., Zhao, P., Ogryzko, V., Fuller-Pace, F. V., Hoffman, E. P., Tapscott, S. J., and Sartorelli, V. (2006) The RNA helicases p68/p72 and the noncoding RNA SRA are coregulators of MyoD and skeletal muscle differentiation. *Dev. Cell* **11**, 547-560
71. Shin, S., Rossow, K. L., Grande, J. P., and Janknecht, R. (2007) Involvement of RNA helicases p68 and p72 in colon cancer. *Cancer Res.* **67**, 7572-7578
72. Clark, E. L., Coulson, A., Dalglish, C., Rajan, P., Nicol, S. M., Fleming, S., Heer, R., Gaughan, L., Leung, H. Y., Elliott, D. J., Fuller-Pace, F. V., and Robson, C. N. (2008) The RNA helicase p68 is a novel androgen receptor coactivator involved in splicing and is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* **68**, 7938-7946
73. Villena, J. A. (2015) New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *FEBS J.* **282**, 647-672
74. Scarpulla, R. C. (2011) Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1269-1278
75. Deblois, G., St-Pierre, J., and Giguère, V. (2013) The PGC-1/ERR signaling axis in

- cancer. *Oncogene* **32**, 3483-3490
76. Watanabe, R., Fujii, H., Yamamoto, A., Hashimoto, T., Kameda, K., Ito, M., and Ono, T. (1997) Immunohistochemical distribution of cutaneous fatty acid-binding protein in human skin. *J. Dermatol. Sci.* **16**, 17-22
 77. Blattler, A., and Farnham, P. J. (2013) Cross-talk between site-specific transcription factors and DNA methylation states. *J. Biol. Chem.* **288**, 34287-34294
 78. Deaton, A. M., and Bird, A. (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* **25**, 1010-1022
 79. Jones, P. A. (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 484-492
 80. Smith, Z. D., and Meissner, A. (2013) DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 204-220
 81. Moss, T. J., and Wallrath, L. L. (2007) Connections between epigenetic gene silencing and human disease. *Mutat. Res.* **618**, 163-174
 82. Daniel, F. I., Cherubini, K., Yurgel, L. S., de Figueiredo, M. A., and Salum, F. G. (2011) The role of epigenetic transcription repression and DNA methyltransferases in cancer. *Cancer* **117**, 677-687
 83. Takai, D., and Jones, P. A. (2003) The CpG island searcher: a new WWW resource. In *Silico Biol.* **3**, 235-240
 84. Marinescu, V. D., Kohane, I. S., and Riva, A. (2005) MAPPER: a search engine for the computational identification of putative transcription factor binding sites in multiple genomes. *BMC Bioinformatics* **6**, 79.
 85. Tomlins, S. A., Mehra, R., Rhodes, D. R., Cao, X., Wang, L., Dhanasekaran, S. M.,

- Kalyana-Sundaram, S., Wei, J. T., Rubin, M. A., Pienta, K. J., Shah, R. B., and Chinnaiyan, A. M. (2007) Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat. Genet.* **39**, 41-51
86. Grasso, C. S., Wu, Y. M., Robinson, D. R., Cao, X., Dhanasekaran, S. M., Khan, A. P., Quist, M. J., Jing, X., Lonigro, R. J., Brenner, J. C., Asangani, I. A., Ateeq, B., Chun, S. Y., Siddiqui, J., Sam, L., Anstett, M., Mehra, R., Prensner, J. R., Palanisamy, N., Ryslik, G. A., Vandin, F., Raphael, B. J., Kunju, L. P., Rhodes, D. R., Pienta, K. J., Chinnaiyan, A. M., and Tomlins, S. A. (2012) The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* **487**, 239-243
87. Aalinkeel, R., Nair, M. P., Sufirin, G., Mahajan, S. D., Chadha, K. C., Chawda, R. P., and Schwartz, S. A. (2004) Gene expression of angiogenic factors correlates with metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer Res.* **64**, 5311-5321
88. Nemeth, J. A., Harb, J. F., Barroso, U., He, Z., Grignon, D. J., and Cher, M. L. (1999) Severe combined immunodeficient-hu model of human prostate cancer metastasis to human bone. *Cancer Res.* **59**, 1987-1993
89. Kovar, J. L., Johnson, M. A., Volcheck, W. M., Chen, J., and Simpson, M. A. (2006) Hyaluronidase expression induces prostate tumor metastasis in an orthotopic mouse model. *Am. J. Pathol.* **169**, 1415-1426
90. Kohli, R. M., and Zhang, Y. (2013) TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* **502**, 472-479
91. Liang, G., Chan, M. F., Tomigahara, Y., Tsai, Y. C., Gonzales, F. A., Li, E., Laird, P. W., and Jones, P. A. (2002) Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 480-491

92. Chen, T., Ueda, Y., Dodge, J. E., Wang, Z., and Li, E. (2003) Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5594-5605
93. Fernandez, A. F., Huidobro, C., and Fraga, M. F. (2012) De novo DNA methyltransferases: oncogenes, tumor suppressors, or both?. *Trends Genet.* **28**, 474-479
94. Klose, R. J., Sarraf, S. A., Schmiedeberg, L., McDermott, S. M., Stancheva, I., and Bird, A. P. (2005) DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG. *Mol. Cell* **19**, 667-678
95. Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myöhänen, S., Herman, J. G., and Baylin, S. B. (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat. Genet.* **21**, 103-107
96. Guo, M. M., Hu, L. H., Wang, Y. Q., Chen, P., Huang, J. G., Lu, N., He, J. H., and Liao, C. G. (2013) miR-22 is down-regulated in gastric cancer, and its overexpression inhibits cell migration and invasion via targeting transcription factor Sp1. *Med. Oncol.* **30**, 542.
97. Xu, D., Takeshita, F., Hino, Y., Fukunaga, S., Kudo, Y., Tamaki, A., Matsunaga, J., Takahashi, R. U., Takata, T., Shimamoto, A., Ochiya, T., and Tahara, H. (2011) miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. *J. Cell Biol.* **193**, 409-424
98. Bao, Z., Malki, M. I., Forootan, S. S., Adamson, J., Forootan, F. S., Chen, D., Foster, C. S., Rudland, P. S., and Ke, Y. (2013) A novel cutaneous Fatty Acid-binding protein-related signaling pathway leading to malignant progression in prostate cancer

- cells. *Genes Cancer* **4**, 297-314
99. Black, A. R., Black, J. D., and Azizkhan-Clifford, J. (2001) Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J. Cell. Physiol.* **188**, 143-160
 100. Safe, S., and Abdelrahim, M. (2005) Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur. J. Cancer* **41**, 2438-2448
 101. Beishline, K., and Azizkhan-Clifford, J. (2015) Sp1 and the 'hallmarks of cancer'. *FEBS J.* **282**, 224-258
 102. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70
 103. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674
 104. Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A., and Cedar, H. (1994) Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* **371**, 435-438
 105. Dang, C. V., O'Donnell, K. A., Zeller, K. I., Nguyen, T., Osthus, R. C., and Li, F. (2006) The c-Myc target gene network. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 253-264
 106. Knoepfler, P. S. (2008) Why myc? An unexpected ingredient in the stem cell cocktail. *Cell Stem Cell* **2**, 18-21
 107. Coller, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N., and Golub, T. R. (2000) Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3260-3265
 108. Gurel, B., Iwata, T., Koh, C. M., Jenkins, R. B., Lan, F., Van Dang, C., Hicks, J. L.,

- Morgan, J., Cornish, T. C., Sutcliffe, S., Isaacs, W. B., Luo, J., and De Marzo, A. M. (2008) Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis. *Mod. Pathol.* **21**, 1156-1167
109. Massoner, P., Thomm, T., Mack, B., Untergasser, G., Martowicz, A., Bobowski, K., Klocker, H., Gires, O., and Puhr, M. (2014) EpCAM is overexpressed in local and metastatic prostate cancer, suppressed by chemotherapy and modulated by MET-associated miRNA-200c/205. *Br. J. Cancer* **111**, 955-964
110. Münz, M., Kieu, C., Mack, B., Schmitt, B., Zeidler, R., and Gires, O. (2004) The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene* **23**, 5748-5758
111. Münz, M., Zeidler, R., and Gires, O. (2005) The tumour-associated antigen EpCAM upregulates the fatty acid binding protein E-FABP. *Cancer Lett.* **225**, 151-157
112. Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C., and Farese, R. V. (2013) Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab* **18**, 153-161
113. Liu, Y. (2006) Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **9**, 230-234
114. Wu, X., Daniels, G., Lee, P., and Monaco, M. E. (2014) Lipid metabolism in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol* **2**, 111-120
115. Zadra, G., Photopoulos, C., and Loda, M. (2013) The fat side of prostate cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 1518-1532
116. Dang, C. V., Le, A., and Gao, P. (2009) MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin. Cancer Res.* **15**, 6479-6483
117. Dang, C. V. (2012) MYC on the path to cancer. *Cell* **149**, 22-35