

氏名(本籍・生年月日) 川口 耕一郎(愛知県 昭和54年9月28日)
学位の種類 博士(農学)
学位記番号 甲 第62号
学位授与の日付 平成28年3月20日
学位授与の要件 信州大学学位規程 第5条第1項該当
学位論文題目 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
論文審査委員 主査 教授 藤井博 教授 真壁秀文
教授 中村宗一郎 教授 福田正樹
教授 大町鉄雄(弘前大学)

論文内容の要旨

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なっている(全体の約30%)。癌による高い死亡率は癌細胞の悪性化、即ち、転移能獲得に起因している。従って、癌の病態解明のためには癌細胞の転移能獲得機構の解明が必要不可欠である。

脂肪酸結合タンパク質(FABP)は、脂肪酸などの脂溶性リガンドのトランスポーターとして機能し、脂質代謝の恒常性維持に関与している。また、リガンド依存性転写因子である核内受容体等との相互作用により、シグナル伝達・転写制御においても重要な機能を果たしていると考えられている。近年、FABPファミリーのサブタイプの一つであるFABP5が、様々な癌で高発現していることが網羅的プロテオーム解析等により報告されている。しかしながら、癌細胞におけるFABP5の機能や、癌細胞で特異的に高発現するようになる発現制御機構に関してはまだよくわかっていない。以上の背景から、本研究では、FABP5を介する癌細胞における転移シグナルネットワークの発現及び機能解析のため、以下の二つの課題に取り組んだ。

1. 癌細胞におけるFABP5の発現及び機能解析

大腸癌細胞におけるFABP5の機能を明らかにするため以下の実験を行った。まずはじめに、大腸癌細胞株において発現しているFABPファミリー分子を半定量RT-PCR法で確認した。その結果、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、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。次に、HCT116細胞のFABP5をノックダウンし、細胞増殖・浸潤能に与える影響を検証した。その結果、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期における細胞周期の停止とアポトーシスの亢進によるものであることが示唆された。また、浸潤能も有意に抑制された。これらの結果は、大腸癌の細胞増殖・浸潤能獲得にお

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悪性化との関連を初めて示したことになる。さらに、FABP5を介するシグナル伝達及び発現制御機構に関して、先行研究で報告されているPPAR β/δ シグナル伝達経路とは異なる新規の経路が存在することが示唆された。

2. 癌細胞におけるFABP5遺伝子のエピジェネティック制御機構の解析

FABP5は、ヒト悪性前立腺癌細胞で高いレベル発現し、転移能獲得において極めて重要な機能を果たしていることが示されている。しかしながら、FABP5の癌細胞特異的発現機構については不明である。従って、前立腺癌細胞におけるFABP5遺伝子の発現制御機構を解明するため、詳細なプロモーター解析を行った。

まず、FABP5遺伝子の発現に必要なプロモーター領域を絞り込むためdeletion assay及びmutation assayを行った結果、転写開始点上流300bpから1stエクソン及び1stイントロンの一部を含む転写開始点下流300bpの領域にあるGC-boxとE-boxが転写活性に重要であることがわかった。この領域はCpG islandに位置することから、ヒト前立腺癌細胞株(PC-3)と正常前立腺細胞株(PNT2)を用いてバイサルファイトシーケンス法等によるDNAメチル化解析を行った。その結果、2種の細胞株間で、コアプロモーターであるTATA-box周辺及び1stイントロン部のDNAメチル化に顕著な差がみられた。即ち、PNT2と比較してPC-3ではFABP5遺伝子のTATA-box周辺及び1stイントロン部のDNA脱メチル化が亢進していることがわかった。さらに、ChIP assay、*in vitro* methylation assayやDNA脱メチル化剤である5-aza-dCを用いた実験結果より、FABP5遺伝子の高発現にはエピジェネティックな制御機構(DNAメチル化)の関与が強く示唆された。また、前立腺癌細胞におけるFABP5遺伝子の発現制御に関与する転写因子として、SP1とc-MYCを同定した。

以上の様に、癌細胞の悪性化に関わる遺伝子の一つであるFABP5がDNAのメチル化を介したエピゲノム修飾の変化により発現制御されていることが示された。網羅的なDNAメチル化アレイ解析の結果から、正常前立腺細胞と前立腺癌細胞ではDNAメチル化プロファイルが大幅に異なっており、FABP5以外にもエピゲノム修飾の変化により発現制御される癌関連遺伝子があることがわかっていることから、癌細胞特異的なDNA脱メチル化に関わるエピゲノム制御因子の存在が示唆された。