

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	松 村 富 穂
論文審査担当者	主 査 瀧 伸 介 副 査 樋 口 京 一・竹 下 敏 一
<p style="text-align: center;">論 文 題 目</p> <p style="text-align: center;">Fascin1 suppresses RIG-I-like receptor signaling and interferon-β production by associating with IκB kinase ϵ (IKKϵ) in colon cancer</p> <p style="text-align: center;">(RIG-I 経路を介した fascin1 による IFN-β 抑制制御)</p>	
<p>(論文の内容の要旨)</p> <p>fascin1 は癌細胞の遊走や浸潤に関与するアクチン束化タンパク質である。fascin1 の発現はがん患者の予後や生存と関連しており、fascin1 の阻害により転移が抑制されるという報告もあるため、癌治療の標的分子として期待されている。一方、最近 fascin1 がウイルス依存性免疫細胞応答においても役割を果たすことが報告された。アクチン細胞骨格の再編成により RIG-I の局在が変化し、IFN-β の産生を誘導するという報告が癌細胞でなされていることと合わせて、ウイルス依存性の RIG-I シグナル伝達に対する fascin1 の役割をヒト結腸癌細胞株 DLD-1 細胞で検討した。</p> <p>DLD-1 細胞にレトロウイルスで形質導入された shRNA を用いて fascin1 の発現を欠損させ、ウイルス感染を擬する二重鎖 RNA、即ち poly(I : C) が惹起する反応に関し、細胞遊走・浸潤アッセイ、real-time PCR、ウエスタンブロッティング、フローサイトメトリー、ルシフェラーゼアッセイ及び共免疫沈降法を用いて対照細胞との間で比較検討を行った。</p> <p>まず、fascin1 欠損の影響は細胞増殖には見られなかったが、欠損による糸状仮足の形成の抑制、細胞遊走及び浸潤能の低下が認められた。</p> <p>次にウイルス RNA 感染実験として 2 つの受容体、TLR3 と RIG-I 様受容体に焦点を当てた。Poly(I : C) の細胞外投与では IFN-β mRNA の産生に fascin1 の有無による差が無かったことから、TLR3 経路には fascin1 の関与が無いことが示唆された。一方、poly(I : C) を細胞内に導入すると、fascin1 欠損 DLD-1 細胞では RIG-1、MDA5、IFN-β、IP-10、IRF-7 の誘導が有意に増強された。また、fascin1 欠損細胞に fascin1 を再発現させるレスキュー実験を行ったところ、IFN-β の増強が打ち消されたことから、fascin1 は RIG-I シグナル経路における IFN-β の産生を制御していることが示唆された。</p> <p>そこで、IFN-β の転写因子として知られる NF-κB と IRF-3 に注目したところ、NF-κB に関しては fascin1 の関与は見られなかったものの、IRF-3 においては、リン酸化及び二量体化の亢進が fascin1 欠損細胞で認められた。</p> <p>以上のことから、poly(I : C) 導入における fascin1 の標的分子は、受容体である RIG-I から転写因子である IRF-3 の間にあると考え、ヒト胎児腎細胞株である HEK293T 細胞を用いて標的分子の探索を行った。ルシフェラーゼアッセイにて、fascin1 との共発現により RIG-I 経路の下流に存在する 5 個の分子の IFN-β 転写活性を調べたところ、濃度依存的に活性が抑制された RIG-I、IPS-1、TBK-1 及び IKK ϵ に対し、IRF-3 では抑制が認められなかった。そこで、fascin1 の標的分子は TBK-1、IKK ϵ または IRF-3 の中にあると考え、更に共免疫沈降を行った所、fascin1 は IKK ϵ と会合することが明らかとなった。IKK ϵ の会合ドメインはキナーゼドメインであった。</p> <p>次に、RIG-I シグナル伝達に対する fascin1 欠損の抗癌作用を調べた。細胞増殖に関しては、fascin1 の欠損のみでは変化が起こらなかったが、poly(I : C) 導入により fascin1 欠損 DLD-1 細胞での顕著な抑制が生じ、これは細胞死の増大と一致していた。細胞遊走および浸潤は、fascin1 欠損のみによっても抑制されたが、poly(I : C) 導入によってより強い抑制が引き起こされた。siRNA を用いて RIG-I を欠損させると、poly(I : C) 導入による細胞遊走及び浸潤能の低下は認められなくなった。これらの結果は、fascin1 と IKK ϵ との会合が、RIG-I シグナル伝達を介した癌細胞の増殖、遊走および浸潤を亢進することを示唆</p>	

している。

最後に、IFN- β はオートクラインまたはパラクラインにより IFN- β 自身の産生を制御していることが知られていることから、IFN- β シグナル経路における fascin1 の関与を DLD-1 細胞で検討した。IFN- β 刺激に対し、STAT1 の Tyr-701 ではなく、Ser-727 のリン酸化が fascin1 欠損細胞で顕著に増強されたが、STAT1 に対する fascin1 /IKK ϵ 会合の役割解明には更なる研究が必要となる。

以上の結果から、fascin1 は細胞遊走や浸潤の制御のみならず RIG-I シグナル経路の下流にある IKK ϵ と相互作用をすることで IFN- β の産生を抑制していることが明らかとなり fascin1 の免疫制御システムへの関与が明らかとなった。