

博士論文

転写因子 CCAR2 による核内受容体 LXR α の
細胞増殖抑制機構の解析

櫻橋(巷岡)彩子

転写因子 CCAR2 による核内受容体 LXR α の
細胞増殖抑制機構の解析

生殖・発達・加齢医学専攻

指導教員 藤井 知行 教授

櫻橋（巷岡）彩子

目次

要旨	4
1) 序文	5
2) 方法	11
1. 細胞培養及び試薬	11
2. 免疫沈降法 (結合実験及び competition assay)	11
3. プラスミド作成	15
4. 蛍光免疫染色	15
5. GST-pull down アッセイ	16
6. Short-interference RNA による内在性 CCAR2 のノックダウン	18
7. RNA 抽出及びリアルタイム定量 PCR	19
8. ルシフェラーゼアッセイ	21
9. 細胞カウント	23
10. 統計学的手法	24
3) 結果	25
1. 内在性 CCAR2 と LXR α との複合体形成についての解析	25
2. 内在性 CCAR2 と LXR α/β との共在についての解析	25
3. CCAR2 と LXR α/β の <i>in vitro</i> での直接的結合/結合領域についての解析	26
4. LXR α/β のリガンド依存的転写活性化能に対する CCAR2 の影響について	

の解析	27
5. LXR α / β AF2 のリガンド依存的転写活性化能に対する CCAR2 の影響につ いての解析	27
6. THP1 細胞株において、CCAR2 は LXR α の標的遺伝子 (ABCA1, ABCG1) の発現を抑制する。	28
7. CCAR2 は MCF7 乳癌細胞株において、細胞増殖を促進する	28
8. CCAR2 は MCF7 乳癌細胞株において、細胞増殖関連遺伝子 (CyclinD1, Skp2) の発現を促進する。	29
9. CCAR2 は SIRT1 の LXR α への転写促進作用に拮抗する。	30
10. CCAR2 は SIRT1 の LXR α との結合を阻害し,その作用に拮抗する	30
4) 考察	32
5) 結論	39
謝辞	40
略語	41
文献	43
図	47

要旨

乳癌は本邦で増加の一途を辿り、代謝面からの発症機序解明が進んでいる。

Liver X receptor (LXR) は酸化ステロールをリガンドとする核内受容体であり、全身のコレステロール代謝に関与する一方、乳癌等の細胞増殖抑制作用を併せ持つ。その制御機構は不明な点も多いが、近年脱アセチル化酵素 SIRT1 が LXR を脱アセチル化して正に制御する事が明らかとなった。Cell cycle and apoptosis regulator 2 (CCAR2)は SIRT1 に直接結合し SIRT1 を抑制、細胞増殖やエネルギー代謝などに関与する転写因子であり、種々の核内受容体と相互作用を持つ。代謝と細胞増殖に対する深い関連性から、CCAR2 と LXR との相互作用に着目し解析した。CCAR2 は SIRT1 の LXR への正の制御に拮抗、LXR のリガンド依存性転写活性化能の抑制を通じて乳癌の細胞増殖促進に働くという新規機能を明らかにした。

1) 序文

日本では、乳癌発生頻度は増加の一途を辿っている。本邦における女性の癌罹患率としては第一位、1980年と比較して現在罹患頻度は約3倍であり、今後もこの増加傾向は続くと考えられる。

乳癌発症のリスクファクターとして、乳癌家族歴やBRCA1変異等の遺伝的因子、初経及び閉経年齢、出産や授乳、ホルモン補充療法（HRT）などの内分泌環境因子等が指摘されている。近年、特に肥満や高コレステロール血症等、メタボリックシンドロームに関連した生活環境因子と乳癌の発症との関連性が注目されている。具体的な報告として、日本人における肥満と閉経情報別の乳癌の関連性につき8つのコホート研究を含む18万人以上のデータのプール解析を行った前向きコホート研究が挙げられる²。本報告によると閉経前、閉経後共にBMI高値で乳癌リスクは上昇する。

閉経後の肥満女性における乳癌の罹患率上昇は、エストロゲンの主な供給源が卵巣から脂肪組織に移るというエストロゲンメカニズムで説明可能である。しかしながら閉経前乳癌については、無排卵を伴う肥満女性でエストロゲンレベルは低値となる事が多く、このメカニズムでの説明は困難である。さらにHDLコレステロールが抗酸化及び抗炎症作用によって発癌に影響するという報告³、27ヒドロキシコレステロール（27HC）という、血中に豊富に存在するコレステロールの代謝産物が、乳癌の成長及び多臓器への転移を促進するといった報

告等々存在する⁴。こうした乳癌とコレステロールの深い関連性から、酸化ステロールをリガンドとし、細胞増殖抑制や抗炎症作用作用を併せ持つ核内受容体肝臓 X 受容体 (Liver X receptors; LXRs) に着目した。

LXRs はヒトに 48 種類存在する核内受容体 (Nuclear receptor, NR) の一種である。内因性リガンドである酸化ステロールが結合すると核内に移行し、DNA に結合して転写因子として作用する。NR の転写促進領域は 2 カ所存在し、一方はアミノ基末の A/B 領域に存在し、リガンド非依存的、恒常的に転写活性化能を示す activation function- 1 (AF-1) 領域である。もう一方はカルボキシル基末に存在し、リガンド結合部位を有するリガンド結合依存性転写活性化能を有する AF-2 領域である⁵。LXRs は同じ核内受容体の一種であるレチノイド X 受容体 (Retinoid X receptor, RXR) とヘテロダイマーを形成し、LXR 応答配列 (LXRE) に結合する。リガンドが結合することでコリプレッサーが解離し、コアクチベーターとの相互作用が起こり、下流に存在する標的遺伝子の転写を制御する⁶。LXRs には α/β のサブタイプが存在し、 α は肝臓、マクロファージ、小腸で多く発現し、 β は全身に普遍的に発現している。トランスポーターである ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) や ATP-binding cassette transporter G 1 (ABCG1) の発現を介して、マクロファージからのコレステロール逆輸送を助け、泡沫細胞の形成を防ぐことからアテローム性動脈硬化の治療標的としても期待されている。またコレステロールの胆汁酸異化や小腸での吸収抑制する機序を含め、

全身の脂質センサーとしての役割を担っている⁷。最近ではマクロファージにおいて、iNOS、IL-1 β 、IL-6、VEGF などの発現抑制を介して炎症反応の抑制に関与しているという報告⁸や、乳癌や前立腺癌等を始めとする、種々の癌及び正常細胞における細胞増殖抑制効果も報告されている⁹⁻¹²。LXR の婦人科領域における知見としては、LXR ノックアウトマウスに関する報告がある¹³。LXR ノックアウトマウスに過排卵誘発刺激を行うと、卵巢過剰刺激症候群に類似した症状が引き起こされることが知られており、その機序は LXR の抗炎症反応を介するとされる。先進国においては晩婚化が顕著であり、女性の加齢と共に妊孕能が低下することから、不妊女性に対する生殖補助医療の果たす役割は大きい。生殖補助医療における過排卵誘発刺激は、卵巢過剰刺激症候群 (OHSS) を惹起することがある。OHSS は重症化すると胸腹水貯留、血栓症、腎不全などを引き起こす重篤な合併症であり、特に多嚢胞性卵巢症候群 (PCOS: polycystic ovary syndrome) と呼ばれる排卵障害のある体質のある女性でリスクが高い。PCOS 女性は内分泌異常、代謝異常と関連もであるとされており、代謝及び抗炎症作用のクロストークに LXR が関与している可能性も示唆される。

このように LXR の機能についての報告は数多く存在するものの、その制御メカニズムについては不明な点も多い。近年、Sir2 (Silent information regulator 2) のヒトの Ortholog である SIRT1 が LXR を正に制御していると報告された¹⁴。その機序は、SIRT1 が LXR のリガンド依存性転写活性化領域である AF-2 領域近傍

のリジン残基を脱アセチル化して、そのリジン残基を標的としてユビキチン化が進行する。そのユビキチンされたリジン残基を標的に LXR の分解がプロテアソーム機序により促進されることで、新たな LXR のリクルートメントが促進されるというものである。SIRT1 は寿命延長、抗老化に関与する一つの因子であり、カロリー制限によりその発現が上昇し、寿命が延長する¹⁵。SIRT1 は元来 NAD⁺ 依存性ヒストン脱アセチル化酵素であり、タンパク質中のアセチル化を受けたリジン残基からアセチル基を脱アセチル化することがその主な酵素活性である。低栄養状態など細胞内外のシグナルにより、細胞内の NAD/NADH 比が上昇することによって活性化が上昇する¹⁶。生体内の様々なタンパクと相互作用することにより、広範な生理機能を制御しており、p53、FOXOs (forkhead box O)¹⁷、PGC-1 α ¹⁸ 等の分子と相互作用し、細胞周期・細胞老化・アポトーシス・代謝等に関与している¹⁹。SIRT1 の主要な制御因子の 1 つとして、Cell cycle and apoptosis regulator 2 (CCAR2)があり、CCAR2 は SIRT1 に直接結合することで、その脱アセチル化活性を抑制する^{20,21}。

CCAR2 は Deleted in breast cancer 1 (DBC1) / KIAA1867 とも同意の転写因子である。染色体 8p21 領域にコードされ、その従来名 Deleted in breast cancer 1 (DBC1) の通り乳癌において欠失している領域から同定された。アポトーシス、細胞増殖²²、二本鎖 DNA 修復²³ 等に関与するといった、その生物学的機能が徐々に明らかになってきている。SIRT1 の脱アセチル化活性は、カロリー制限下において

高まるが、その機序は SIRT1-CCAR2 結合が解離し、CCAR2 による抑制が解除されることによる。この事から両者の相互作用はメタボリックセンサーとして機能しているとも言及できる²⁹。さらに CCAR2 ノックアウトマウスの表現型は、高脂肪食負荷時における脂肪肝からの保護にあり、これは SIRT1 の活性が恒常的に高まっていたためと考えられている。CCAR2 の欠損により白色脂肪組織から褐色脂肪組織への変換が進行するという報告も存在する³⁰。

また、CCAR2 は Estrogen receptor α (ER α)^{24,25}、ER β ²⁶、Androgen receptor (AR)²⁷、Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I (COUP-TF1)²⁸ 等、様々な核内受容体と結合することが知られる。ER β との結合によりその転写活性を抑制し²⁶、AR との結合によりその転写活性を促進する²⁷COUP-TFI の転写活性化能の抑制に関しては、COUP-TFI と Nuclear receptor corepressor (NCoR) との結合の安定化に寄与している²⁸ 等、その結合及び制御様式は一様ではない。

CCAR2 の細胞増殖に関する生理的意義については現時点で未解明である。

CCAR2 は従来名 DBC1 (Deleted in breast cancer1) の通り、癌抑制遺伝子の候補として同定された²¹。しかしその後 CCAR2 の発現が亢進しているという報告が乳癌³¹、胃癌³²、大腸癌³³において相次ぎ、CCAR2 が腫瘍促進に働くか、腫瘍抑制に働くのかは未解決で、組織あるいは環境特異的である可能性が考えられる。CCAR2 や LXR の代謝及び細胞増殖における深い生理的意義を踏まえ、その相互作用と制御機構の解明を通じて、代謝面からの乳癌発症におけるメカニズム

の解明の一助となることを目的とし、本研究を施行した。

2) 方法

1. 細胞培養及び試薬

ヒト乳癌培養細胞株 MCF-7 細胞、ヒト胎児腎臓由来の培養細胞株 HEK293T、及びヒト肝細胞癌培養株 HepG2 は、American Type Culture Collection より入手した。ヒト単球系白血病培養株 THP-1 は小川誠二博士 (The University of Tokyo, Japan) より譲与して頂いた。HEK293T 細胞, HepG2 細胞の培養は 10% fetal bovine serum (FBS) を添加した Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) を用いて、THP-1 細胞の培養は、10%FBS 添加の RPMI 1640 を用いて 37°C、5% CO₂ の条件で行った。FBS、DMEM は Sigma Aldrich より購入した。LXR 選択的リガンド GW3965 を加える際には、溶媒 DMSO を用い、培養液中の GW3965 の最終濃度が $0.5-2.0 \times 10^{-6}$ M になるように調整した。GW3965 を加える際には、一般の培養液に pH センサーとして添加されている phenol red free の培養液を使用した。また培養液に添加して用いるウシ胎児血清にも微量のオキシステロールが含まれている可能性があるためこれらの物質を可及的に吸着・除去するチャコール処理血清を使用した。

2. 免疫沈降法

HepG2 細胞を用いて細胞内における CCAR2 と LXR α との複合体形成能を検

討した。HepG2 細胞を DMEM (10% FBS) にて 100 mm dish 上で培養し、細胞をスクレーパーで回収した。回収した細胞を TNE バッファー (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, protease inhibitor cocktail 添加) で溶解し、超音波破碎装置であるバイオラプター (コスモ・バイオ株式会社) を用いて 10 秒破碎、20 秒冷却を 10 回反復して細胞溶解液を調整し遠心処理を行った。上清に anti-CCAR2 抗体 2 μ g、(当研究室において作成された rabbit polyclonal 抗体 : CCAR2 の 201-699 amino acids を GST タンパクとして合成し、PreScission Proteinase で GST を切断したタンパクを抗原として、タカラバイオ株式会社に依頼して作成した。13 週齢ウサギで免疫し、抗血清を ProteinA カラムでアフィニティ精製し、SDS PAGE で純度検定をした後、ウエスタンブロット法により確認し、特異的なシグナルを認めたものを用いている。) コントロールとして preimmune IgG 抗体を加え 4°Cにおいて一晩インキュベートした。ここに Protein G Sepharose 4 Fast Flow ビーズ (GE healthcare) を加え、4°Cにおいて 1 時間インキュベートすることで免疫複合体を精製した。ビーズを軽く遠心して回収し、十分に洗浄した後に、ビーズ結合蛋白を 10% SDS-PAGE で泳動し、Immobilon-P (Millipore) にブロッティングした。ブロッティング後メンブレンを、10%スキムミルク入り TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) で 1 時間ブロッキング、一次抗体 anti- LXR α 抗体 (PP-K8607; PPMX) 入り TBS-T で 1 晩、二次抗体 (anti-rabbit IgG 抗体 : 1:3000、Cell Signaling) 入

り TBS-T に 1 時間浸透した。メンブレンは各々の段階で TBS-T で 3 回ずつ洗浄した。二次抗体に結合している horseradish peroxidase は ECL advance (GE healthcare) のマニュアルに従い化学発光され、ImageQuant LAS 4000 (GE healthcare) で検出した。逆免疫沈降では anti-LXR α 抗体 (PPMX) で免疫沈降して同様の方法で免疫複合体を精製し、anti-CCAR2 抗体にて複合体形成を確認した。同様に培養した HepG2 細胞を溶解し、それぞれ LXR α 抗体、CCAR2 抗体でイムノブロッティングし、LXR α 、CCAR2 それぞれの細胞内での発現を確認した。以上の実験を別個に 3 回繰り返し、画像処理ソフトである Image J を用いてバンド強度を定量化し有意差検定を行った。

CCAR2 と SIRT1 の LXR α 結合に対する競合を確認するため、HEK293T 細胞を用いて過剰発現系にて競合的免疫沈降 (Competitive immunoprecipitation assay) を行った。まず 100mm dish に phenol red-free DMEM (5% チャコール処理 FBS) にて前培養し、発現ベクターFlag-LXR α 、Flag-SIRT1、Myc-CCAR2 をそれぞれ、
① Flag-LXR α 、Flag-SIRT1、pcDNA ②Flag-LXR α 、Flag-SIRT1、Myc-CCAR2 のようにトランスフェクションし、2 μ M GW3965 を培養液に添加した。トランスフェクションは Effectene (Qiagen) を用いて行った。各々トランスフェクションの 24 時間後、上記の方法にて細胞を回収、細胞溶解液を作成し、anti-SIRT1 抗体 (ab32441 ; Abcam) で免疫沈降し、Anti-LXR α 抗体でイムノブロットすることで両者の結合度合いを比較した。①、②それぞれの細胞溶解液を、LXR α 、

CCAR2 抗体でイムノブロットし、トランスフェクションの効率を確認した。

次に、CCAR2 特異的 siRNA を用いて内在性の CCAR2 をノックダウンさせた場合の、LXR α と SIRT1 の結合程度の変化を検討した。HEK293T 細胞を 100mm dish に、phenol red-free DMEM (5% チャコール処理 FBS) で前培養した後、内在性 CCAR2 を、CCAR2 特異的 small interfering RNA (siRNA) を用いてノックダウンした (①)。トランスフェクションは、Lipofectamine RNAiMAX (Lifetechnologies) を用いて行い、コントロールには All Star Negative siRNA (1027281: Qiagen) を使用 (②) し、siRNA の最終濃度はすべて 10 nM となるように調整した。siRNA トランスフェクションの 24 時間後、①、②それぞれの dish に発現ベクターFlag-LXR α 、Flag-SIRT1 をトランスフェクションし、同時に 2 μ M の GW3965 を添加、さらに 24 時間追加培養した後に回収した。細胞溶解液を作成し、anti-SIRT1 抗体 (Abcam) で免疫沈降し、Anti-LXR α 抗体でイムノブロットすることで両者の結合度合いを比較した。①、②それぞれの細胞溶解液を LXR α 、CCAR2 抗体でイムノブロットし、siRNA および発現ベクターのトランスフェクションの効率を確認した。細胞同様の実験を 3 回反復して行い、Image J にてバンド強度を定量化し、有意差検定を行った。

3. プラスミド作成

全長の CCAR2 (Clone ID 5496068)、SIRT1 (Clone ID 4518906) 発現ベクターは Thermo Fisher Scientific Open Biosystems より購入し、pcDNA-Myc ベクターおよび pcDNA-Flag ベクターに挿入して作成した。これらは全て全長をシーケンスして、変異が存在しないことを確認した。LXR α/β 発現ベクター及びルシフェラーゼレポーター (ABCG-LXRE-luc: ABCG1 プロモーター領域、制御領域とルシフェラーゼレポーター-遺伝子が結合したものは、Eckardt 博士 (Center for biosciences, Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden) より供与を受けた。GST LXR α/β AF-1/2 は、LXR α AF-1 領域 (アミノ酸 1~99)、AF-2 領域 (アミノ酸~205-447)、LXR β AF-1 領域 (アミノ酸 1~85)、AF-2 領域 (アミノ酸~219-461) を pGEX 4T-1 vector (GE healthcare) のマルチクローニングサイトにフレームがあうように組み込み構築したものを用いた。17m8 AdMLP Luc は既報のものを用いた²²。

4. 蛍光免疫染色

HepG2 細胞を用いて、CCAR2 と LXR α/β が核内において共在しているかどうか検討した。HepG2 細胞は 6-well ディッシュの 12 mm カバーガラス (BD BioCoat glass) の上で、DMEM (10% FBS) で培養した。細胞を PBS + 4% Paraformaldehyde で固定し、PBS + 0.2% Triton X-100 で浸透化した。PBS + 6% bovine serum albumin

を用いて blocking をおこなった後、HepG2 細胞は anti-LXR α 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 LXR β 抗体 (Abcam)、および anti-CCAR2 抗体 (先述) で反応させた。一次抗体を洗浄後、蛍光標識二次抗体として Alexa fluor 488 donkey anti-mouse IgG (Invitrogen) と Alexa fluor 555 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen)、核染色として Hoechst 33342 (Sigma Aldrich) を用いた。Hoechst 33342 を洗浄後、MountQuick (Daido Sangyo) を用いてガラスを固定し、共焦点顕微鏡 (Carl-Zeiss MicroImaging) を用いて細胞を観察した。

5. GST pull down アッセイ

GST-pull down アッセイにより LXR α/β と CCAR2 との直接的結合の有無、その結合部位を検討した。GST 融合タンパクカラムは以下のように調整した。GST LXR α/β AF-1、GST LXR α/β AF-2、GST のみのベクターを、大腸菌 BL 21 Codon Plus (Stratagene) に形質転換した。形質転換後の大腸菌は、37°C で震盪しながら LB 培地にて培養し、培養液の OD₆₀₀ が 0.4~0.5 に到達した直後に、Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside を最終濃度 0.1 mM になるように培地に加え、GST 融合タンパクとしてタンパク発現誘導を行い、IPTG 誘導後は培地を 30°C で 2 時間震盪培養した。タンパク発現誘導終了後は遠心にて大腸菌を集菌し、PBS+10% Glycerol、10 mM EDTA で大腸菌ペレットを溶解し、超音波にて大腸菌を機械的に破碎した。Triton X-100 を最終濃度 1% になるように加え、タンパ

クを 4°C で可溶化し、可溶化したタンパクを遠心にて回収した後、Glutathione-Sepharose 4B ビーズ (GE healthcare) に、可溶化画分に含まれる GST 融合タンパクを結合させた。ビーズは 4 回の洗浄後、少量を SDS-PAGE にかけて Coomassie Brilliant Blue 染色をすることにより、目的のタンパクの発現を確認した後、アフィニティーカラムとして使用した。以上のように大腸菌により発現され、ビーズに結合した GST 融合タンパクを、GST pull down assay に用いた。CCAR2 の全長とその分割された断片 {CCAR2 N 末端 (1~230 amino acid)、CCAR2 ΔN (230~923)} は TNT coupled transcription-translation system (Promega) を用いてマニュアルに従って、in vitro 転写翻訳にて [³⁵S] methionine (GE healthcare) 標識タンパクを作成した。GST 融合タンパクに GW3965 2 μM もしくは vehicle を添加した後 NET-N+ バッファー (50 mM Tris-HCl、pH 8.0、150 mM NaCl, 5mM ethylenediaminetetraacetic acid、protease inhibitor cocktail) の存在下で 30 分間インキュベートした後、[³⁵S] methionine 標識されたタンパク (CCAR2、CCAR2N、CCAR2 ΔN) と、4°C で 60 分間インキュベートした。ビーズを NET-N+ buffer で 6 回洗浄後、12.5% の SDS-PAGE で泳動した。バンドの解析は、ゲルをスラブゲルドライヤー (Bio-Rad) で乾燥後、OptiQuant Image Analyzer (Packard BioScience) にておこなった。ゲルは Coomassie Brilliant Blue で染色し、等量のタンパクが泳動されていることを確認した。

6. *short-interference RNA (siRNA)* による内在性 *CCAR2* のノックダウン

ヒト単球系培養株 THP-1、ヒト乳癌培養細胞株 MCF-7 細胞の内在性 *CCAR2* を *CCAR2* 特異的 siRNA (KIAA1967-HSS1267711、KIAA1967-HSS184064) を用いてノックダウンした。siRNA は Invitrogen 社に合成を依頼した。Sense 側配列は各々以下の通りである。

CCAR2 siRNA #1

5'-CAGCGGGUCUUCACUGGUA-3'

5'-UACCAGUGAAGACCCGCUG-3'

CCAR2 siRNA #2

5'-AAACGGAGCCUACUGAACA -3'

5'-UGUUCAGUAGGCUCCGUUU-3'

コントロール siRNA には All Stars Negative Control siRNA (Qiagen) を用いた。

MCF 7 細胞へのトランスフェクションは Lipofectamine RNAimax

(Lifetechnologies) を用いてマニュアルに記載されたリバーストランスフェクション法にて行った。THP1 細胞へのトランスフェクションは、不死化センダイウイルスを用いた GenomONE-SI (Ishikawa Sangyo Kaisha Ltd.) を使用し、マニュアルに沿って行った。siRNA の最終濃度はすべて 10 nM となるように調整した。

トランスフェクション後、24 時間で GW3965 0.5 μ M / 2 μ M もしくは vehicle を添加し、さらに 24 時間培養を継続した後、回収した。内在性 *CCAR2* のノックダ

ウンは2種類の siRNA を用いて行い、同様の実験を3回反復した。CCAR2 がノックダウンされていることはウエスタンブロットおよび定量的 RT-PCR 法にて確認した。

7. RNA 抽出及びリアルタイム定量的 RT-PCR

回収した MCF7、THP 1 各細胞からの総 RNA の抽出は QIAGEN RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用い、OD₂₆₀、OD₂₈₀ を測定することにより濃度および純度を測定しながら抽出した。抽出した RNA を ReverTra Ace (TOYOBO) を用いて 42°C 5 分で逆転写反応をおこない、cDNA を精製した。それぞれの遺伝子の相対的遺伝子発現レベルを、Roche Light Cycler System (Roche Applied Science) で SYBR Green I master solution を使用して定量的 RT-PCR を行って測定した。PCR のサイクル数は予備実験を繰り返し、各試料すべての PCR による増幅がプラトーとなるサイクル数とした。伸長反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し検量線を作成して定量を行った。mRNA 量の補正は、house keeping gene として各試料の GAPDH 量を測定することによって行った。用いたプライマーは以下の通りである。

ABCA1

Forward : 5'- GCACTFAGGAAGATGCTGAAA -3'

Reverse : 5'- AGTTCCTGGAAGGTCTTGTTAC -3'

ABCG1

Forward : 5'- CGGAGCCCAAGTCGGTGTG -3'

Reverse : 5'- TTTCAGATGTCCATTCAGCAGGTC -3'

CyclinA2

Forward : 5'- CCTGCAAAGTCAAAGTTGA -3'

Reverse : 5'- AAAGGCAGCTCCAGCAATAA -3'

CyclinD1

Forward : 5'- CTGGCCATGAACTACCTGGA -3'

Reverse : 5'- GTCACACTTGATCACTCTGG -3'

Skp2

Forward : 5'- CCCACGGAAACGGCTGAAGA-3'

Reverse : 5'- CGCTAGGCGATACCACCTCTTACAA -3'

CCAR2

Forward : 5'- CAAACATCCCACACACTTCAC -3'

Reverse : 5'- GACCTGGATCCGGCTTGGATG -3'

GAPDH

Forward : 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'

Reverse : 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'

解析には Light Cycler 2.0 : DX400 および Light Cycler FastStart DNA Master SYBR

Green I (Roche Applied Science) を使用した。

8. ルシフェラーゼアッセイ

LXR α/β のリガンド依存性転写活性化能に対する CCAR2 の作用を検討するため、ルシフェラーゼアッセイをおこなった。293T 細胞を用いて phenol red-free DMEM (5% チャコール処理 FBS) にて前培養し、トランスフェクションの前日 12 well dish に 1×10^5 cells / well の濃度で plating した。発現ベクター及びルシフェラーゼレポーター遺伝子を Effectene (Qiagen) にてトランスフェクションした。その内容は以下の通りで、すべてトリPLICATEで行っている。

A) ABCG1 LXRE-Luc (LXR α)

Lane 1~4: (GW3965 なし)

1. pcDNA3、
2. pcDNA3+Flag LXR α 、
3. pcDNA3+Flag LXR α +CCAR2
4. pcDNA3+Flag LXR α +CCAR2 Δ N

Lane 5~8: (2×10^{-6} M の GW3965 を培地中に添加)

5. pcDNA3、
6. pcDNA3+Flag LXR α 、
7. pcDNA3+Flag LXR α +CCAR2
8. pcDNA3+Flag LXR α +CCAR2 Δ N

B) ABCG1 LXRE-Luc (LXR β)

Lane 1~4: (GW3965 なし)

1. pcDNA3、
2. pcDNA3+Flag LXR β 、
3. pcDNA3+Flag LXR β +CCAR2
4. pcDNA3+Flag LXR β +CCAR2 Δ N

Lane 5~8: (2×10^{-6} M の GW3965 を培地中に添加)

5. pcDNA3、 6. pcDNA3+Flag LXR β 、 7. pcDNA3+Flag LXR β +CCAR2

8. pcDNA3+Flag LXR β +CCAR2 Δ N

C) 17m8 AdMLP Luc (LXR α)

Lane 1~2: (GW3965 なし)

1. pM、 2. pM+pMLXR α AF2

Lane 3~4: (2×10^{-6} M の GW3965 を培地中に添加)

3. pMLXR α AF2+ CCAR2、 4 pMLXR α AF2 + CCAR2 Δ N

D) 17m8 AdMLP Luc (LXR β)

Lane 1~2: (GW3965 なし)

1. pM、 2. pM+ pM LXR α AF2

Lane 3~4: (2×10^{-6} M の GW3965 を培地中に添加)

3. pMLXR β AF2 + CCAR2、 4. pMLXR β AF2 + CCAR2 Δ N

E) ABCG1-LXRE-Luc (LXR α SIRT1 CCAR2)

Lane 1~7: (GW3965 なし)

1 pcDNA3、 2 pcDNA3+Flag LXR α 、 3 pcDNA3+Flag LXR α +CCAR2

4 pcDNA3 + Flag LXR α +CCAR2x2、 5 pcDNA3+Flag LXR α +SIRT1

6 pcDNA3+Flag LXR α +SIRT1+CCAR2x3 、 7 pcDNA3+Flag LXR α
+SIRT1+CCAR2x6

Lane 8~14: (2×10^{-6} M の GW3965 を培地中に添加)

8 pcDNA3、9 pcDNA3+Flag LXR α 、10 pcDNA3+Flag LXR α +CCAR2

11 pcDNA3+FlagLXR α +CCAR2x3、12 pcDNA3+FlagLXR α +SIRT1

13 pcDNA3+FlagLXR α +SIRT1+CCAR2x 、 14 pcDNA3+Flag LXR α
+SIRT1+CCAR2x6

A) B) E)全ての well にルシフェラーゼレポーター遺伝子 ABCG-LXRE-luc250 ng

C) D) 全ての well にルシフェラーゼレポーター遺伝子 17m8 AdMLP Luc 250 ng

添加

A)~E) 全ての well に internal control として phRL CMV Luc を 1 ng 共にトランス
フェクションしている。

発現ベクター (pcDNA3、pcDNA3 Flag LXR α / β 、pM LXR α / β AF-2、SIRT1) は
0.1 μ g をトランスフェクションした。CCAR2 は E)で 0.3 μ g/0.6 μ g と容量を変え
てトランスフェクションした。トランスフェクションと同時に GW3965 2 μ M も
しくは vehicle を添加し、トランスフェクションの 24 時間回収。Dual Luciferase
Reporter System (Promega) のマニュアルに従い Firefly luciferase 活性を測定、ト
ランスフェクション効率の影響を是正するため Renilla luciferase 活性も同時に測
定した。活性測定は、3 点採取した実験を、別個に最低 3 回繰り返したものの平
均と標準誤差を用いた。LXR β についても同様である。

9. 細胞カウント (トリパンブルー色素排除試験)

CCAR2 の LXR_s に対する転写活性抑制作用が、細胞増殖に与える影響を検討するため、乳癌細胞株 MCF7 (1×10^5 /well) を用いて検討した。内在性 CCAR2 を siRNA でノックダウンした上で、GW3965 2 μ M もしくは vehicle を加えて 2 日間培養を継続した。24 時間後、48 時間後の生存細胞数を、それぞれトリパンブルーで染色下に自動セルカウンターにてカウントした。

10. 統計学的手法

多群間の比較に対しては、統計プログラムとして StatView Version 5 for Windows を使用。One-way ANOVA の後に、Bonferroni/Dunnett *post hoc* test を用い、2 群間の比較に関しては、Mann-Whitney U-test を用いた。P 値は 0.05 以下を有意差ありとし、データには最低限 3 回の実験結果の平均値及び標準誤差値で記載した。

3) 結果

1. 内在性 **CCAR2** と **LXR α** との複合体形成についての解析

LXR α と CCAR2 との複合体形成を検討するため、肝細胞癌細胞株 HepG2 の細胞抽出液を用いて免疫沈降を行った。anti-CCAR2 抗体（方法参照 2 μ g）またはコントロールとしてイムノグロブリン IgG で免疫沈降を行い、anti-LXR α 抗体によってウエスタンブロットを行ったところ、両者が HepG2 細胞内で複合体を形成していることが示された (Fig 5A) 反対に anti-LXR α 抗体 (2 μ g) で免疫複合体を形成し、anti-CCAR2 抗体でウエスタンブロットを行うことで（逆免疫沈降法）両者の複合体形成を確認した (Fig 5B)。いずれも 3 回の実験結果を画像解析ソフト ImageJ で解析し、CCAR2 抗体（もしくは-LXR α 抗体）にて免疫沈降したレーンとコントロールとのバンド強度の平均値・標準誤差を算出し、有意差を確認した。

2. 内在性 **CCAR2** と **LXR α/β** との共存についての解析

HepG2 細胞を用いた蛍光免疫染色法を施行した。anti-LXR α 抗体 (Sigma-Aldrich)、anti-LXR β 抗体 (Abcam) および anti-CCAR2 抗体（先述）を over night で反応させ、蛍光標識二次抗体として Alexa fluor 488 donkey anti-mouse IgG (Invitrogen) と Alexa fluor 555 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen)、核染色として Hoechst 33342

(Sigma Aldrich) を行い、共焦点顕微鏡 (Carl-Zeiss Micro Imaging) を用いて細胞を観察した。HepG2 細胞の核内 (Hoechst 33342 により青染) で CCAR2 と LXR α/β が共在することが示された (Fig. 6)。LXR s 特異的リガンド投与により、その局在に変化は認めなかった。

3. CCAR2 と LXR α/β の *in vitro* での直接的結合及びその結合領域についての解析

CCAR2 と LXR α/β の直接結合の有無、及びその結合部位を同定するため、GST プルダウンアッセイを行った。Glutathione-Sepharose 4B (GE healthcare) ビーズに結合した GST-LXR α AF-1/AF-2 および GST-LXR β AF1/AF-2 タンパクに、GW3975 2 μ M または vehicle を添加したのち、*in vitro* 翻訳によって [35 S] methionine 標識された全長 CCAR2 (1-923 amino acids) とともにインキュベートした。GST ビーズに結合するタンパクを 10% SDS-PAGE で泳動し、 [35 S] methionine 標識された結合タンパクをイメージアナライザーにて解析した。LXR α/β はともにリガンド依存性転写活性化領域である AF-2 領域において CCAR2 と結合しており、特異的リガンドである GW3965 の存在によりその結合程度に有為差は認めなかった (Fig. 7A) 全長の CCAR2 の代わりに CCAR2 N 末端 (1~230 amino acid)、CCAR2 Δ N (230~923) 断片と GST-LXR α AF-1/AF-2 および GST-LXR β AF1/AF-2 タンパクをインキュベートし、解析を施行した。

CCAR2 は N 末端を介して、LXR α/β AF-2 領域と結合していることが判明した (Fig. 7B)

4. LXR α/β のリガンド依存的転写活性化能に対する CCAR2 の影響についての解析

293T 細胞に、LXR α/β , CCAR2, CCAR2 Δ N 発現ベクター、ルシフェラーゼレポーター遺伝子 ABCG1-LXRE-luc, phRL CMV Luc をリポフェクション法にてトランスフェクションし、CCAR2 が LXR α/β のリガンド依存的転写活性化能に与える影響について検討した。トランスフェクションはトリPLICATEで行い、それぞれ 3 回繰り返して有意差を検討した。CCAR2 は LXR α/β のリガンド依存的転写活性化能を有意に抑制した。しかしながらその結合部位である N 末端を欠いたコンストラクトである CCAR2 Δ N の過剰発現においては、その抑制効果は認めなかった (Fig. 8 A-B)

5. LXR α/β AF2 のリガンド依存的転写活性化能に対する CCAR2 の影響についての解析

LXR α/β の DNA 結合領域の代わりに酵母の GAL4 配列を融合させたコンストラクト LXR α/β AF-2、とそれに応答するレポーター遺伝子 (17m8 AdMLP Luc) を用いて、LXR α/β AF2 領域に限定した CCAR2 の転写活性抑制化能を検討した。LXR α/β AF2 はリガンド依存的転写活性化能を示し、CCAR2 の過剰発現により

その転写活性化能が抑制された。(Fig 8. C-D)

6. LXR α/β の標的遺伝子 (ABCA1, ABCG1) に対する CCAR2 の影響に対する解析

CCAR2 の LXR α/β に対するリガンド依存的転写活性化能の抑制が、内在性遺伝子発現において合致するかを、THP1 細胞を用いた定量的 RT-PCR 法にて検討した。内在性 CCAR2 を SiRNA でノックダウンした 24 時間後、特異的リガンド GW39652 $\mu\text{M}/5\mu\text{M}$ または vehicle を加え、さらに 24 時間培養を継続し回収した。逆転写反応の後、ABCA1, ABCG1 の相対的 cDNA 濃度を定量的 RT-PCR 法にて測定した。結果 CCAR2 のノックダウンにより ABCA1、ABCG1 の mRNA は GW3965 の用量依存性に有意な上昇がみられ (Fig. 9 A-B) 内在性遺伝子発現においても CCAR2 の LXR に対するリガンド依存的転写活性化能の抑制効果が示唆された。

7. MCF7 細胞の細胞増殖に関する CCAR2 の影響に対する解析

CCAR2 の LXR に対する転写活性抑制化能が、乳癌細胞株 MCF7 細胞の細胞増殖において与える影響を検討した。MCF7 (1×10^5 /well) において内在性 CCAR2 を siRNA (Lipofectamin RNA imax) にてノックダウンし、特異的リガンド GW3965 2 μM または vehicle を加えて 2 日間培養を継続した。24 時間後、48 時間後の生存細胞数を、それぞれトリパンブルー染色をしてカウントした。実験

はトリプリケートで行い、3回繰り返して有意差検定を行った。LXR 特異的リガンドの有無に関わらず、CCAR2 のノックダウン群では、コントロール群と比較して細胞増殖は有意に抑制された (Fig. 10)。

8. 細胞増殖関連遺伝子 (CyclinD1, Skp2) に関する CCAR2 の影響に対する解析

LXR は、G1/S 停止を引き起こすことで細胞増殖を抑制するという種々の報告がある³⁴。細胞周期を押し進める cyclinD1 (G1/S の移行に促進的な役割を果たす) や Skp2 (細胞周期のブレーキ役である CDK インヒビターを分解することで細胞周期を促進する働きを有する) は LXR のターゲット遺伝子でもあることが知られており、これらの遺伝子の発現抑制は、G1 arrest を引き起こす⁵。

そこで、細胞周期関連遺伝子 CyclinD1、Skp2 に対する CCAR2 の作用を、乳癌細胞株 MCF7 細胞株を用いて siRNA にて内在性 CCAR2 をノックダウンすることで検討した。Cyclin D1 の発現は、LXR 特異的リガンド GW3965 10 μ M の投与下において CCAR2 ノックダウンにより有意に抑制された。Skp 2 の発現は GW3965 5 μ M 投与下及びリガンド無し何れにおいても、CCAR2 のノックダウンによって有意に抑制された。(Fig. 11 A-B)。

9. **SIRT1** による **LXR α** 制御への **CCAR2** の影響に対する解析

CCAR2 が SIRT1 に直接結合し、その脱アセチル化活性を抑制するという既報を元とし^{11,12,15}、LXR α 、SIRT1、CCAR2 の過剰発現下で LXR α の転写活性に与える影響をルシフェラーゼアッセイにて検討した。293T 細胞に、LXR α 、SIRT1、CCAR2 (3 倍量、6 倍量) 発現ベクター、ルシフェラーゼレポーター遺伝子 ABCG1-LXRE-luc、phRL CMV Luc をリポフェクション法でトランスフェクション後、24 時間で回収し、SIRT1、CCAR2 が LXR α のリガンド依存的転写活性化能に与える影響について検討した。トランスフェクションはトリPLICATEで行い、それぞれ 3 回同様の実験を繰り返して有意差を検討した。SIRT1 の過剰発現では、有意ではないものの弱いリガンド依存性転写活性化能への促進作用を認めた。CCAR2 を過剰発現させると、LXR α のリガンド依存性転写活性化能に対する抑制作用を認め、その作用は SIRT1 の存在下でより顕著であった。(Fig. 12 A)。

10. **SIRT1** の **LXR α** との結合に関する **CCAR2** の影響に対する解析

CCAR2 の LXR α に対するリガンド依存性転写活性化能への抑制メカニズムを解明するため、CCAR2 の過剰発現の有無による、SIRT1-LXR α 間の結合状態変化を、競合免疫沈降 (Competitive immunoprecipitation assay) にて検討した。

HEK293T 細胞に発現ベクターFlag-LXR α 、Flag-SIRT1、Myc-CCAR2 をそれぞれ、
① Flag-LXR α 、Flag-SIRT1、 pcDNA ②Flag-LXR α 、Flag-SIRT1、 Myc-CCAR2
のようにトランスフェクションし、2 μ M GW3965 を培養液に添加した。各々ト
ランスフェクションの 24 時間後、細胞を回収、細胞溶解液を作成し、anti-SIRT1
抗体 (Abcam) で免疫沈降し、Anti-LXR α 抗体でイムノブロットすることで両
者の結合度合いを比較した。CCAR2 の過剰発現下では、SIRT1 と LXR α の結合
状態は減弱した。反対に CCAR2 を siRNA にてノックダウンにて、SIRT1 と LXR α
の結合は増強した。これらの結果より CCAR2 は LXR α に結合し、SIRT1 と LXR α
の結合を競合的に減弱させることで、その抑制作用の一部を発揮していると示
唆された (Fig. 13 A-B)。

4) 考察

CCAR2 は元々 Deleted in breast cancer (DBC1) と呼ばれた転写因子で、染色体 8p21 領域にコードされる。従来名の通り元々乳癌において欠失している領域から同定され、アポトーシス、細胞増殖¹⁶、二本鎖 DNA 修復¹⁷ 等、徐々にその生物学的機能が明らかになっている。

CCAR2 の主機能の 1 つとして、NAD⁺ 依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 への直接結合、及びその脱アセチル化作用の阻害が挙げられる^{20,21}。SIRT1 は生体内の様々なタンパクと相互作用する事で広範な生理機能を持ち、寿命延長、抗老化遺伝子として注目を浴びている。SIRT1 の脱アセチル化活性は、カロリー制限下において高まるが、その機序は SIRT1-CCAR2 結合の解離、及び CCAR2 による SIRT1 抑制作用の解除にある。この事から両者の相互作用はメタボリックセンサーとして機能しているとも言及できる

CCAR2 は ER α ²⁴、ER β ²⁶、COUP-TFI²³、AR²⁷ 等々、様々な核内受容体と相互作用することが知られており、CCAR2 の制御機構は様々多岐に渡っている。

CCAR2 が腫瘍促進に働くか、腫瘍抑制に働くのかは未解明で、組織あるいは環境特異的である可能性が考えられる。CCAR2 の細胞増殖作用及び代謝への深い関与と核内受容体との相互作用の報告、CCAR2 による SIRT1 の制御、及び SIRT1

による LXR に対する正に制御の報告を元に、CCAR2 と LXR s との相互作用とその制御機構、細胞増殖に対する関与の検証を目的に研究を施行した。

まず両者の結合に関しては LXR α と CCAR2は細胞内で複合体を形成することが示された (Fig 5 A-B)。CCAR2 は N 末端を介して LXR α/β のリガンド依存性転写活性化領域 (AF-2 領域) に直接結合し (Fig. 7 A)、LXR の持つリガンド依存性転写活性化能を抑制することが明らかになった (Fig. 8 A-D)。

一般的に核内受容体はリガンドと結合し、その標的遺伝子上流にある受容体応答配列 (LXR s では LXRE) に結合して転写を制御する。その転写制御には転写共役因子が必要であり、複合体として機能する。転写共役因子群には転写を活性化するコアクチベーターと転写を抑制するコリプレッサーがあり、リガンドが核内受容体に結合する事でコリプレッサーが解離し、コアクチベーターが結合、核内受容体の標的遺伝子の転写が促進されるとされる。Nuclear receptor corepressor (N-CoR)、silencing mediator of retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor (SMRT) などのコリプレッサーは、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) と複合体を形成してヒストンを脱アセチル化し、クロマチンの構造を凝集させることで転写を抑制すると考えられている。一方で近年報告された HDAC Class IIIに属する SIRT1 の LXR に対する脱アセチル化は、転写抑制を引き起こさず、脱アセチル化に引き続くユビキチン化、それに伴う受容体の分解及び新しい受容体のリクルートメントによる正の制御である。SIRT1 による LXR s に対する脱

アセチル化はリガンド結合及び転写開始の後に起こり、毎回の転写終了後のプロモーター領域の清掃が次周期の転写開始に必要なプロセスなのではないかと考察されている⁸。

本研究において CCAR2 は LXR α の AF2 領域に結合し (Fig. 7A) リガンド依存性転写活性化能を抑制することが明らかとなったが (Fig. 8 A-D) ,両者の結合状態はリガンドの結合によりほとんど変化が見られなかった。CCAR2 が SIRT1 に直接結合することで、SIRT1 の脱アセチル化能を抑制することは広く知られた事実である。これらの結果及び事実から、CCAR2 の LXR α に対する転写抑制作用は、SIRT1 の正の制御に拮抗しているのではないかと仮定した。SIRT の過剰発現下で、有意ではないものの弱い転写活性化促進作用を認め、CCAR2 を共に過剰発現させると、LXR α のリガンド依存性転写活性能は有意に抑制された。LXR α に対する抑制作用は SIRT1 の存在下でより顕著であった。

CCAR2 は LZ (leucine zipper) ドメインを介して SIRT1 に直接結合し、SIRT1 の脱アセチル化活性に必要な触媒領域 (catalytic domain) をブロックするとされている¹¹。CCAR2 によるこの抑制作用が、SIRT1 と LXR α の結合状態に拮抗していると仮定し、CCAR2 の過剰発現下及びノックダウンによる SIRT-LXR α の結合状態の変化を検討した。CCAR2 の過剰発現により両者の結合状態は減弱し、また逆に CCAR2 をノックダウンすることで増強した (Fig. 13 A-B) 。CCAR2 は LXR α/β への結合部位は、AF2 領域が主であり、SIRT1 の LXR α への結合部位

も AF2 領域に近接した loop region であることから⁸、その近接した結合部位に対する競合の可能性が示唆される。

CCAR2 の他の核内レセプターとの相互作用は、例外はあるものの CCAR2 の N 末端を介することが多い。本研究にて、CCAR2 は LXR α / β いずれに対しても、その N 末端を介して結合していることが明らかになった (Fig. 7 B)。また両者の結合部位である N 末端を欠くと転写抑制作用が発揮できないことが示された (Fig. 8 A-B)。CCAR2 は SIRT1 と LXR α との結合を阻害することでその活性を抑制する作用以外にも、LXR α に対するその他の機序による抑制作用がある可能性も示唆される。

またヒト単球系細胞株 THP1 において内在性 CCAR2 を siRNA でノックダウンすると LXR s の標的遺伝子であり、コレステロール逆輸送に関与するトランスポーター遺伝子 ABCA1、ABCG1 の発現が有意に上昇した。このことから CCAR2 の LXR s に対する転写活性抑制能が、内在性遺伝子発現においても合致することを確認した (Fig. 9 A-B)。

LXR s はもともとその遺伝子制御により、過剰なコレステロールを体内から排除する方向に働く。具体的には腸管からのコレステロール吸収の抑制、マクロファージからのコレステロール逆輸送の促進、胆汁酸合成及び排出の促進等々報告されており、LXR アゴニスト投与により動脈硬化が抑制される。その逆に LXR ノックアウトマウスでは HDL コレステロールは低下し、動脈硬化が進行する²。

また前述のようにカロリー制限下では、SIRT1-CCAR2 間の結合が離れ、CCAR2 による抑制が解除されることで、SIRT1 の活性が高まる等¹⁹、SIRT1 や CCAR2 による LXR への制御は、代謝環境の影響を強く受けることが示唆される。

LXRs は乳癌や前立腺癌等を始めとし、種々の癌及び正常細胞においての細胞増殖抑制作用を持つと報告される³⁻⁷。報告されている機序として、LXR はエストロゲンの代謝酵素であるエストロゲンスルフトランスフェラーゼの発現の促進を介しエストロゲンレベルの低下させる事で、乳癌や子宮体癌の増殖を抑制するというヌードマウスモデルを使った報告⁶、ABCA1、ABCG1 などのトランスポーター遺伝子の発現を促し、細胞からコレステロールを流出させることでアポトーシスが亢進するといった乳癌細胞株 MCF7 を用いた報告等である⁵。種々の乳癌細胞株における増殖抑制作用を検討した報告においては、LXR は ER α 陽性細胞に対して顕著な増殖抑制効果を有する。さらに LXR 特異的リガンド投与により細胞周期関連遺伝子である Skp2 (細胞周期のブレーキ役である CDK インヒビターを分解することで細胞周期を押し進める)、CyclinA2、CyclinD1 (G1/S の移行に促進的な役割を果たし、細胞周期を押し進める)といった遺伝子発現がリガンドの用量依存性に抑制され、G1 arrest を引き起こしていると考えられた⁵。この減少は、ER α 陽性細胞ほど顕著ではないが、傾向として陰性細胞にも認められた。

本研究においても LXRs の特異的リガンド投与により、有意差はないものの乳

癌細胞株 MCF7 の増殖が抑制される傾向が見られた。LXR 特異的リガンドの有無に関わらず、CCAR2 のノックダウン群により、コントロール群と比較して細胞増殖は有意に抑制された。(Fig. 10)。また細胞周期関連遺伝子 Cyclin D1 の発現は、LXR 特異的リガンド GW3965 10 μ M の投与下において CCAR2 ノックダウンにより有意に抑制された。同じく細胞周期関連遺伝子 Skp 2 の発現は GW3965 5 μ M 投与下及びリガンド無し何れにおいても、CCAR2 のノックダウンによって有意に抑制された。(Fig. 11 A-B)。

数々の In vivo および in vitro での実験により、CCAR2 は造腫瘍的機能と抗腫瘍的の両者が報告されている。もともと DBC1 (Deleted in breast cancer) という名の通り、腫瘍抑制遺伝子の候補として同定されたものの、CCAR2 の発現の異常が腫瘍促進に働くか抑制に働くか、現時点では定説はない。それはおそらく CCAR2 のもつ細胞分化やアポトーシスに関連する複雑で多彩な作用のためと示唆される。これまで我々のグループからも細胞増殖促進に働く報告^{10,16}、細胞増殖抑制に働く報告¹³をしてきた。本研究で明らかになった CCAR2 と LXR α との複合体形成、CCAR2 の LXR α に対する転写活性抑制化は、ホルモン非依存的な細胞増殖に関与する可能性を考える。しかしながら CCAR2 が乳癌の予防及び治療の標的と成りうるためには、LXR α 、CCAR2 の複合体形成の詳細なメカニズム、及び正常細胞における両者の役割のさらなる解明、In vivo での研究が必要であろう。

日本人において、閉経前・閉経後共に BMI が高いと乳癌リスクが高くなるという疫学データが近年発表された²。閉経前乳癌においては、閉経後乳癌のように脂肪組織が主なエストロゲン供給源になるというエストロゲンメカニズムでの説明が困難である。また高コレステロール血症の女性において乳癌罹患リスクが高まるというデータもある³。メタボリック環境と細胞増殖に関して何らかのクロストークがあると考えられるが、カロリー摂取の少ない、BMI の低い女性においては、CCAR2 の SIRT1 に対する抑制が解除されて、LXR による細胞増殖抑制作用、及び LDL コレステロール低下作用が発揮されている可能性がある。高コレステロール血症及び肥満と乳癌進展の関連について、CCAR2 及び SIRT1 による LXR の制御が、その機序の一端を担っている可能性を考える。

5) 結論

本研究において、CCAR2はLXRと細胞内で複合体を形成、直接結合してLXRの有するリガンド依存性転写活性化能を抑制した。その機序の一部は、SIRT1のLXRに対する正の制御に対しての拮抗作用（競合的結合阻害）によるものである。さらにCCAR2はLXRの持つ細胞増殖抑制作用に拮抗して、乳癌の細胞増殖に対し促進的に働くという新規機能を明らかにした。

謝辞

稿を終えるに当たり、この研究に関して実験上適切な助言を与えて頂いた、
東京大学医学部産科婦人科学教室教授 藤井知行 先生、教授大須賀 穰先生、
同准教授 平池 修先生、川名 敬先生、織田 克利先生、そして共同研究者
の先生方に深く感謝いたします。

略語

HRT ; Hormone replacement therapy

BMI; Body mass index

BRCA1; Breast cancer susceptibility gene 1

27HC; 27 hydroxycholesterol

LXRs; Liver X receptors

NR; Nuclear receptor

AF-1; Activation function- 1

RXR; Retinoid X receptor

LXRE; LXR response element

ABCA1; ATP-binding cassette transporter A1

ABCG1; ATP-binding cassette transporter G 1

VEGF; Vascular endothelial growth factor

OHSS ; Ovarian hyperstimulation syndrome

PCOS: polycystic ovary syndrome)

SIRT1; Silent mating type information regulation 2 homolog 1

Sir2; Silent information regulator 2

NAD; Nicotinamide adenine dinucleotide

FOXOs ; Forkhead box O

PGC-1 α ; Peroxisome proliferatoractivated receptor γ coactivator-1

CCAR2; Cell cycle and apoptosis regulator 2

DBC1; Deleted in breast cancer 1

ER; Estrogen receptor

AR; Androgen receptor

COUP-TF1; Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor1 (COUP-TF1)

NF- κ B; nuclear factor-kappa B

NCoR; Nuclear receptor corepressor

FBS; Fetal bovine serum

DMEM; Dulbecco's modified Eagle medium

SDS-PAGE; Sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis

CDK; Cyclin dependent kinase

文献

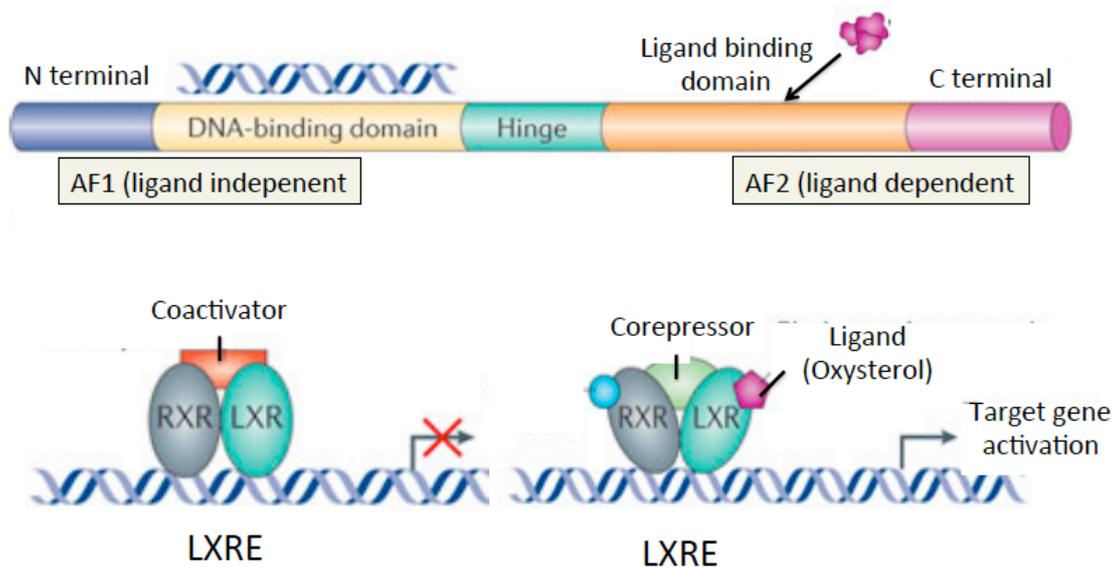
1. 厚生労働省ホームページ. <http://www.mhlw.go.jp/>
2. Wada, K.Nagata, C.Tamakoshi, A.Matsuo, K.Oze, I.Wakai, K.Tsuji, I.Sugawara, Y.Mizoue, T.Tanaka, K.Iwasaki, M.Inoue, M.Tsugane, S.Sasazuki, S.. Body mass index and breast cancer risk in Japan: a pooled analysis of eight population-based cohort studies. *Ann Oncol* **25**, 519-524 (2014).
3. Furberg, A.S., Veierod, M.B., Wilsgaard, T., Bernstein, L. & Thune, I. Serum high-density lipoprotein cholesterol, metabolic profile, and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **96**, 1152-1160 (2004).
4. Wu, Q.Ishikawa, T.Sirianni, R. Tang, H.McDonald, J. G.Yuhanna, I. S.Thompson, B.Girard, L.Mineo, C.Brekken, R. A.Umetani, M.Euhus, D. M.Xie, Y.Shaul, P. W.. 27-Hydroxycholesterol promotes cell-autonomous, ER-positive breast cancer growth. *Cell Rep* **5**, 637-645 (2013).
5. Jakobsson, T., Treuter, E., Gustafsson, J.A. & Steffensen, K.R. Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends Pharmacol Sci* **33**, 394-404 (2012).
6. Repa J, Wu, Q.Ishikawa, T.Sirianni, R.Tang, H.McDonald, J. G.Yuhanna, I. S.Thompson, B.Girard, L.Mineo, C.Brekken, R. A.Umetani, M.Euhus, D. M.Xie, Y.Shaul, P. W. et al. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* **289**, 1524-1529 (2000).
7. Repa, J, Berge, K. E.Pomajzl, C.Richardson, J. A.Hobbs, H.Mangelsdorf, D. J. Wu, Q.Shaul, P. W. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* **277**, 18793-18800 (2002).
8. Joseph, S.B., Castrillo, A., Laffitte, B.A., Mangelsdorf, D.J. & Tontonoz, P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* **9**, 213-219 (2003).
9. Wente, W., Brenner, M.B., Zitzer, H., Gromada, J. & Efanov, A.M. Activation of liver X receptors and retinoid X receptors induces growth arrest and apoptosis in insulin-secreting cells. *Endocrinology* **148**, 1843-1849 (2007).
10. Vedin, L. Lewandowski, S.A., Parini, P., Gustafsson, J.A. & Steffensen, K.R. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* **30**, 575-579 (2009).

11. Gong, H.Guo, P.Zhai, Y.Zhou, J.Uppal, H.Jarzynka, M. J.Song, W. C. Cheng, S. Y.Xie, W. *et al.* Estrogen deprivation and inhibition of breast cancer growth in vivo through activation of the orphan nuclear receptor liver X receptor. *Mol Endocrinol* **21**, 1781-1790 (2007).
12. Chuu, C.P. & Lin, H.P. Antiproliferative effect of LXR agonists T0901317 and 22(R)-hydroxycholesterol on multiple human cancer cell lines. *Anticancer Res* **30**, 3643-3648 (2010).
13. Mouzat, K.Volat, F.Baron, S.Alves, G.Pommier, A. J.Volle, D. H.Marceau, G.DeHaze, A.Dechelotte, P.Duggavathi, R.Caira, F.Lobaccaro, J. M. I. Absence of nuclear receptors for oxysterols liver X receptor induces ovarian hyperstimulation syndrome in mice. *Endocrinology* **150**, 3369-3375 (2009).
14. Li, X.Zhang, S.Blander, G.Tse, J. G.Krieger, M.Guarente, L. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol Cell* **28**, 91-106 (2007).
15. Dali-Youcef, N, Dali-Youcef, N.Lagouge, M.Froelich, S.Koehl, C.Schoonjans, K.Auwerx, J.. Sirtuins: the 'magnificent seven', function, metabolism and longevity. *Ann Med* **39**, 335-345 (2007).
16. Schwer, B. & Verdin, E. Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. *Cell Metab* **7**, 104-112 (2008).
17. Brunet, ABrunet, A.Sweeney, L. B.Sturgill, J. F.Chua, K. F.Greer, P. L.Lin, Y.Tran, H.Ross, S. E.Mostoslavsky, R.Cohen, H. Y.Hu, L. S.Cheng, H. L.Jedrychowski, M. P.Gygi, S. P.Sinclair, D. A.Alt, F. W.Greenberg, M. E., . Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303**, 2011-2015 (2004).
18. Rodgers, J.T, T.Lerin, C.Haas, W.Gygi, S. P.Spiegelman, B. M.Puigserver, P.. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* **434**, 113-118 (2005).
19. Ford, J., Jiang, M. & Milner, J. Cancer-specific functions of SIRT1 enable human epithelial cancer cell growth and survival. *Cancer Res* **65**, 10457-10463 (2005).
20. Kim, J.E., Chen, J. & Lou, Z. DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature* **451**, 583-586 (2008).
21. Zhao, W, Kruse, J. P.Tang, Y.Jung, S. Y.Qin, J.Gu, W. Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature* **451**, 587-590 (2008).
22. Hiraike, H, Wada-Hiraike, O.Nakagawa, S.Koyama, S, Miyamoto, Y.Sone, K.,Tanikawa, Tsuruga, T.Nagasaka, K.Matsumoto, Y.Oda, K.Shoji,K.Fukuhara, H.Saji, S.Nakagawa, K.Kato, S.Yano, T.Taketani, Y.. Identification of DBC1 as a transcriptional repressor for BRCA1. *Br J Cancer* **102**, 1061-1067 (2010).
23. Tanikawa, M.Wada-Hiraike, O.Yoshizawa-Sugata, N.Shirane, A.Hirano,

- M.Hiraike, H.Miyamoto, Y.Sone, K.Ikeda, Y.Kashiyama, T.Oda, K.Kawana, K.Katakura, Y.Yano, T.Masai, H.Roy, A. L.Osuga, Y.Fujii, T. Role of multifunctional transcription factor TFII-I and putative tumour suppressor DBC1 in cell cycle and DNA double strand damage repair. *British journal of cancer* **109**, 3042-3048 (2013).
24. Trauernicht, A.M., Kim, S.J., Kim, N.H. & Boyer, T.G. Modulation of estrogen receptor alpha protein level and survival function by DBC-1. *Mol Endocrinol* **21**, 1526-1536 (2007).
 25. Yu, E. J.Kim, S. H.Heo, K.Ou, C. Y.Stallcup, M. R.Kim, J. H. Reciprocal roles of DBC1 and SIRT1 in regulating estrogen receptor alpha activity and co-activator synergy. *Nucleic Acids Res* **39**, 6932-6943 (2011).
 26. Koyama, S.Wada-Hiraike, O.Nakagawa, S.Tanikawa, M.Hiraike, H.Miyamoto, Y.Sone, K.Oda, K.Fukuhara, H.Nakagawa, K.Kato, S.Yano, T.Taketani, Y. Repression of estrogen receptor beta function by putative tumor suppressor DBC1. *Biochem Biophys Res Commun* **392**, 357-362 (2010).
 27. Fu, J.Jiang, J.Li, J.Wang, S.Shi, G.Feng, Q.White, E.Qin, J.Wong, J. Deleted in breast cancer 1, a novel androgen receptor (AR) coactivator that promotes AR DNA-binding activity. *J Biol Chem* **284**, 6832-6840 (2009).
 28. Zhang, L.J., Liu, X., Gafken, P.R., Kioussi, C. & Leid, M. A chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I (COUP-TFI) complex represses expression of the gene encoding tumor necrosis factor alpha-induced protein 8 (TNFAIP8). *J Biol Chem* **284**, 6156-6168 (2009).
 29. Escande, C.Chini, C. C.Nin, V.Dykhhouse, K. M.Novak, C. M.Levine, J.van Deursen, J.Gores, G. J.Chen, J.Lou, Z.Chini, E. N. Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice. *J Clin Invest* **120**, 545-558 (2010).
 30. Qiang, L.Wang, L.Kon, N.Zhao, W.Lee, S.Zhang, Y.Rosenbaum, M.Zhao, Y.Gu, W.Farmer, S. R.Accili, D. Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Pparggamma. *Cell* **150**, 620-632 (2012).
 31. Lee, H.Kim, K. R.Noh, S. J.Park, H. S.Kwon, K. S.Park, B. H.Jung, S. H.Youn, H. J.Lee, B. K.Chung, M. J.Koh, D. H.Moon, W. S.Jang, K. Y. Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis for breast carcinoma. *Hum Pathol* **42**, 204-213 (2011).
 32. Cha, E. J.Noh, S. J.Kwon, K. S.Kim, C. Y.Park, B. H.Park, H. S.Lee, H.Chung, M. J.Kang, M. J.Lee, D. G.Moon, W. S.Jang, K. Y. Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis of gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* **15**, 4453-4459 (2009).
 33. Zhang, Y., *et al.* Zhang, Y.Gu, Y.Sha, S.Kong, X.Zhu, H.Xu, B.Li, Y.Wu, K.

- DBC1 is over-expressed and associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* (2013).
34. Kim, K. H.Lee, G. Y.Kim, J. I.Ham, M.Won Lee, J.Kim, J. B. Inhibitory effect of LXR activation on cell proliferation and cell cycle progression through lipogenic activity. *J Lipid Res* **51**, 3425-3433 (2010).
 35. Chen, S. U.Chou, C. H.Lin, C. W.Lee, H.Wu, J. C.Lu, H. F.Chen, C. D.Yang, Y. S. Signal mechanisms of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian hyperstimulation syndrome: dopamine targets their common pathways. *Hum Reprod* **25**, 757-767 (2010).
 36. Lee, A., Christenson, L.K., Patton, P.E., Burry, K.A. & Stouffer, R.L. Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro. *Hum Reprod* **12**, 2756-2761 (1997).
 37. Villasante, A., Pacheco, A., Ruiz, A., Pellicer, A. & Garcia-Velasco, J.A. Vascular endothelial cadherin regulates vascular permeability: Implications for ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 314-321 (2007).
 38. Chilvers, R.A., Bodenbun, Y.H., Denner, L.A. & Urban, R.J. Development of a novel protocol for isolation and purification of human granulosa cells. *J Assist Reprod Genet* **29**, 547-556 (2012).
 39. Zelcer, N. & Tontonoz, P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest* **116**, 607-614 (2006).

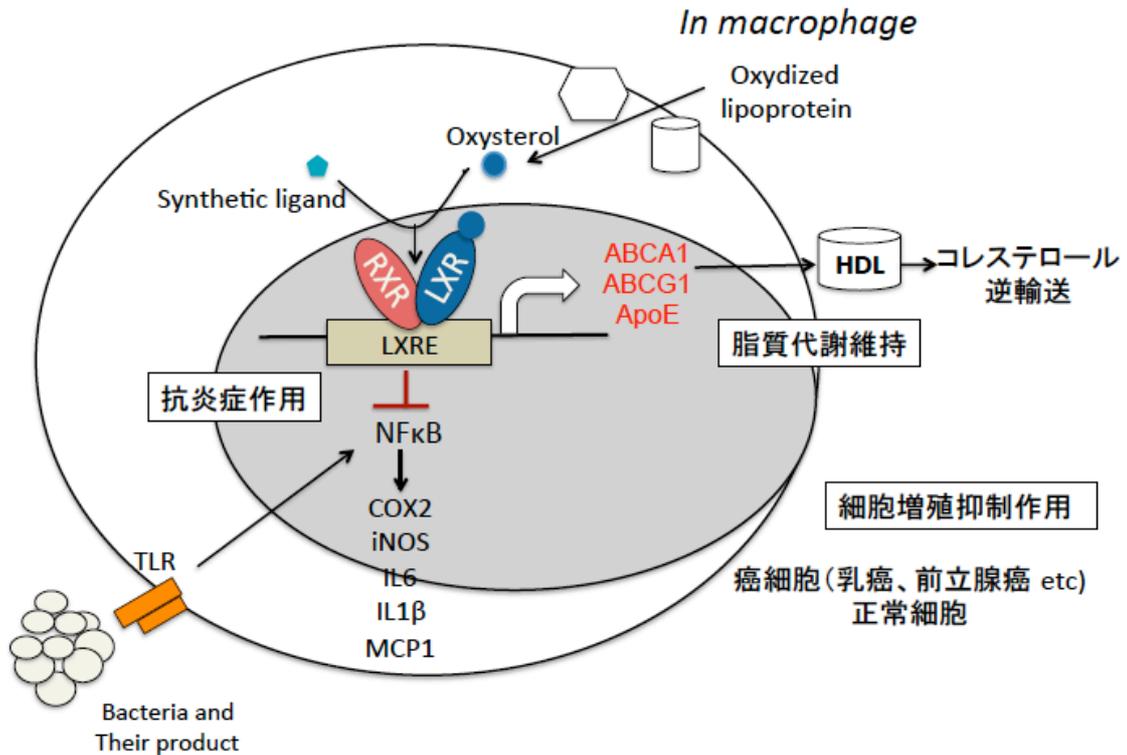
Figure 1 LXR (Liver X receptor) 構造



Anna C. Kalkin: Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors. Nature Reviews Molecular cell biology 13 Apr 2012より引用

- a) 核内受容体の基本構造を示している。主にDNA結合ドメイン(DNA binding domain)、リガンド結合領域 (Ligand binding domain) を有する。また、N末端に存在する、リガンド非依存的な転写活性化領域AF1領域、リガンド依存的に転写活性化能を有するAF2領域がある。
- b) LXRsは同じ核内受容体的一种であるレチノイドX受容体 (Retinoid X receptor RXR) とヘテロダイマーを形成し、LXR応答配列 (LXRE) に結合する。リガンドが結合することでコリプレッサーが解離し、コアクチベーターとの相互作用が起こり、下流に存在する標的遺伝子の転写を制御する。

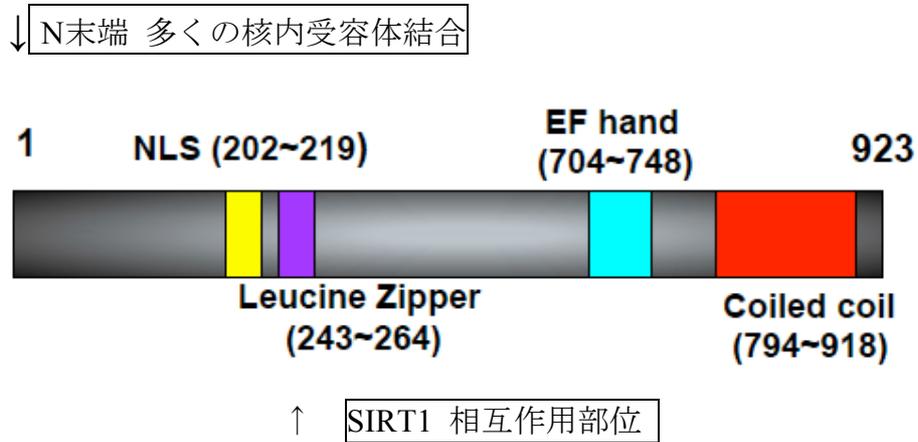
Figure 2 LXR (Liver X receptor) 機能



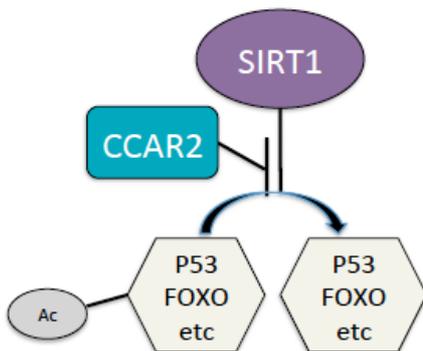
LXRsはコレステロール代謝に関与する遺伝子発現を制御する。マクロファージからATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) やG 1 (ABCG1) の発現を介して、コレステロール逆輸送に関与し、泡沫細胞の形成を防いでいる。さらにLXRsは、最近感染等により引き起こされる、iNOS、COX2、IL-6、MMP9、MCP1、IL-1βなどの遺伝子発現を抑制する。その機序はNF-kB の抑制を介するものである。また種々の細胞増殖抑制作用も併せ持つ。

Figure 3 CCAR2 SIRT1-CCAR2相互作用

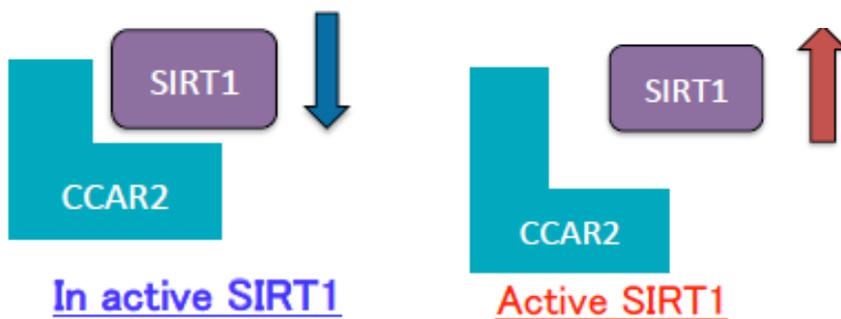
A)



B)



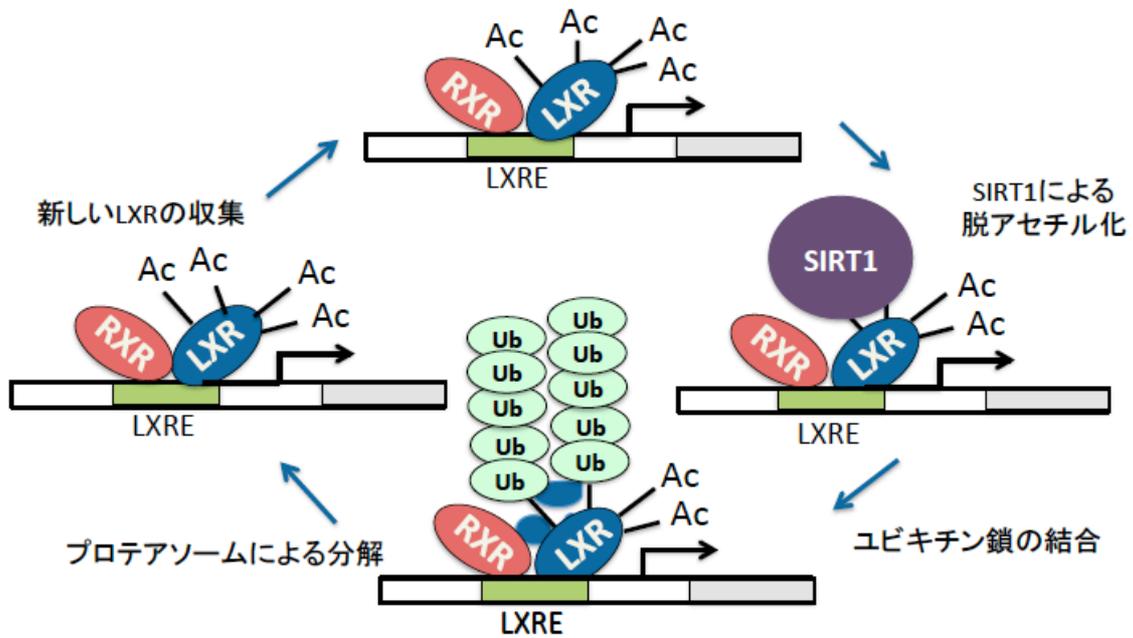
C)



A) CCAR2の構造を示している。N末端で多くの核内受容体と結合し、LZ (Leucine zipper) ドメインでSIRT1と結合することが知られている。

- B) SIRT1は、元来NAD⁺依存性ヒストン脱アセチル化酵素であり、様々な分子（p53、FOXOsなど）と相互作用して生体内で広範な生理機能を有する。CCAR2は、そのSIRT1と直接結合し、SIRT1の脱アセチル化を抑制する。
- C) CCAR2は定常状態ではSIRT1と直接結合し、SIRT1の脱アセチル化を抑制する。カロリー制限下では、SIRT1-CCAR2間の結合が解離しCCAR2による抑制が解除されることでSIRT1の脱アセチル化活性が高まる。

Figure 4 SIRT1のLXRに対する制御機構



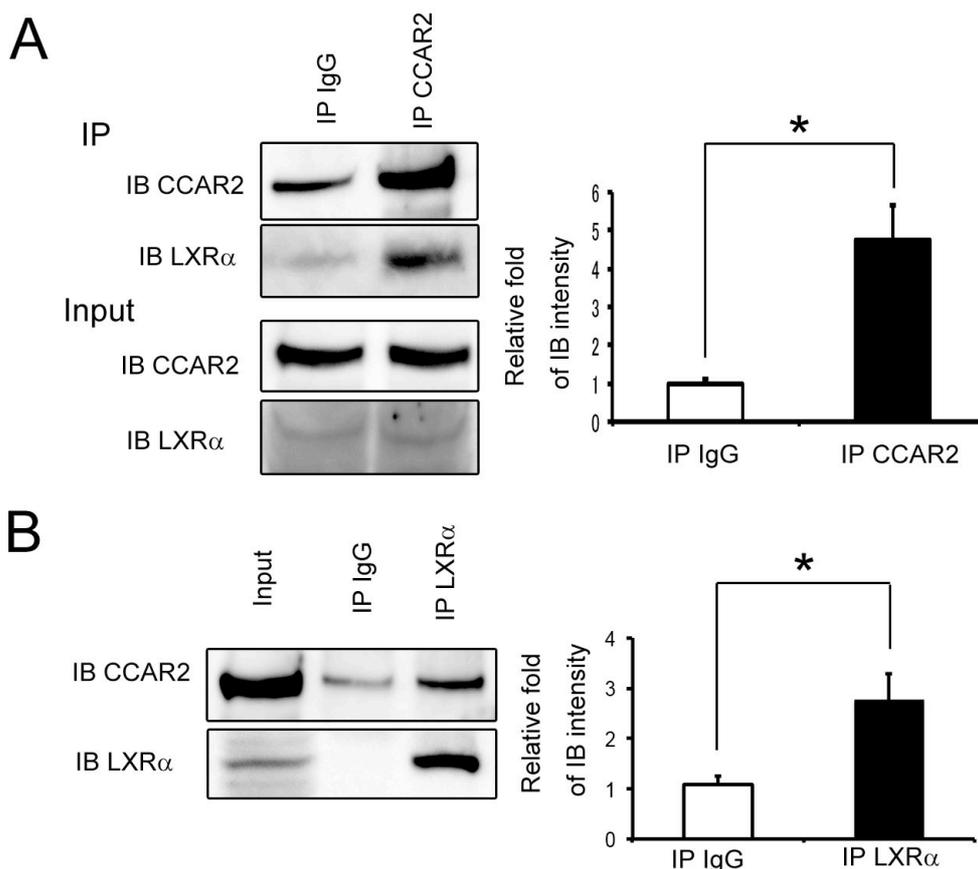
NAD依存性の脱アセチル化酵素、SIRT1は生体内でエネルギー代謝、抗酸化、Aging など様々に関わり、抗老化作用があると知られる。

そのSIRT1がLXRを正に制御しているという報告¹⁴である。その機序は

- 1、 SIRTが、LXRのAf2領域にあるリジン残基を脱アセチル化する。
- 2、 アセチル基の外れた、フリーのリジン残基にユビキチン鎖が結合する。
- 3、 ユビキチン鎖の結合したリジン残基がプロテアソームによって分解を受ける。
- 4、 古いLXRの分解が、新しいLXRの収集に必要である。

といった正のメカニズムである。

Figure 5. CCAR2 と LXR α との複合体形成についての解析

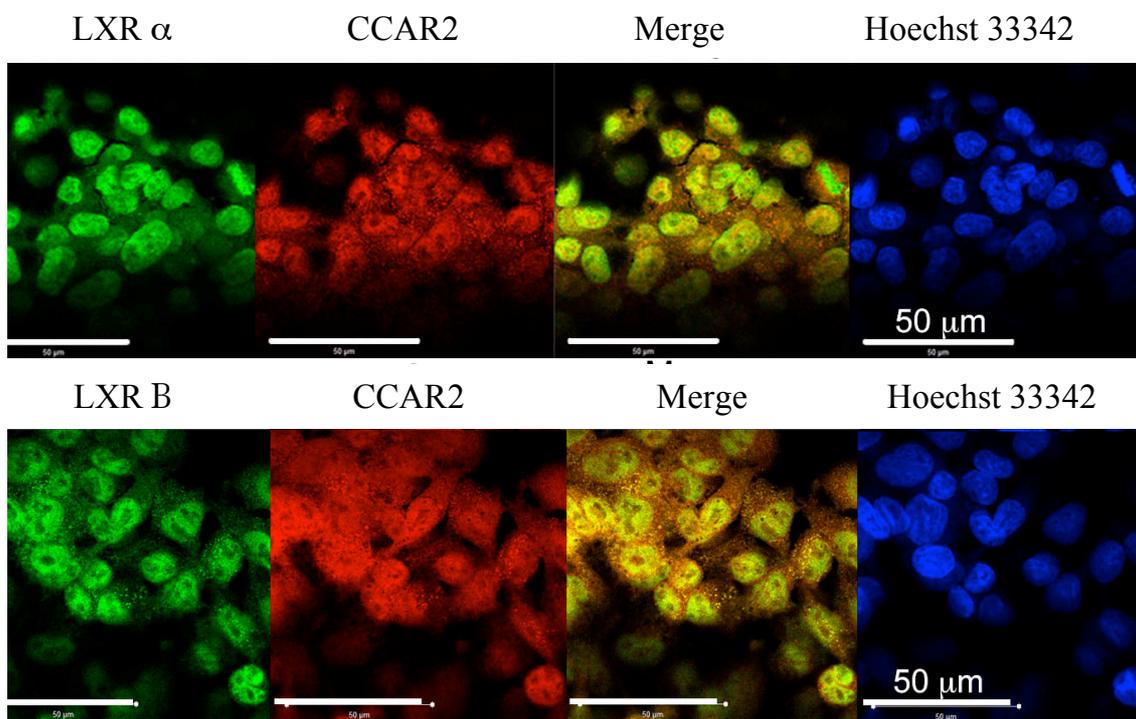


A) 肝細胞癌細胞株HepG2の細胞抽出液を用いて免疫沈降を行い、LXR α とCCAR2の内在性複合体を確認した。

Anti-CCAR2抗体 (方法参照 2 μ g) もしくはコントロールとしてイムノグロブリンIgGで免疫沈降後、anti-LXR α 抗体によってイムノブロットを施行した。バンド強度を画像解析ソフトImageJで解析、3回繰り返して行い、有意差ありを確認した。両者がHepG2細胞内で内因性複合体を形成していることが示された

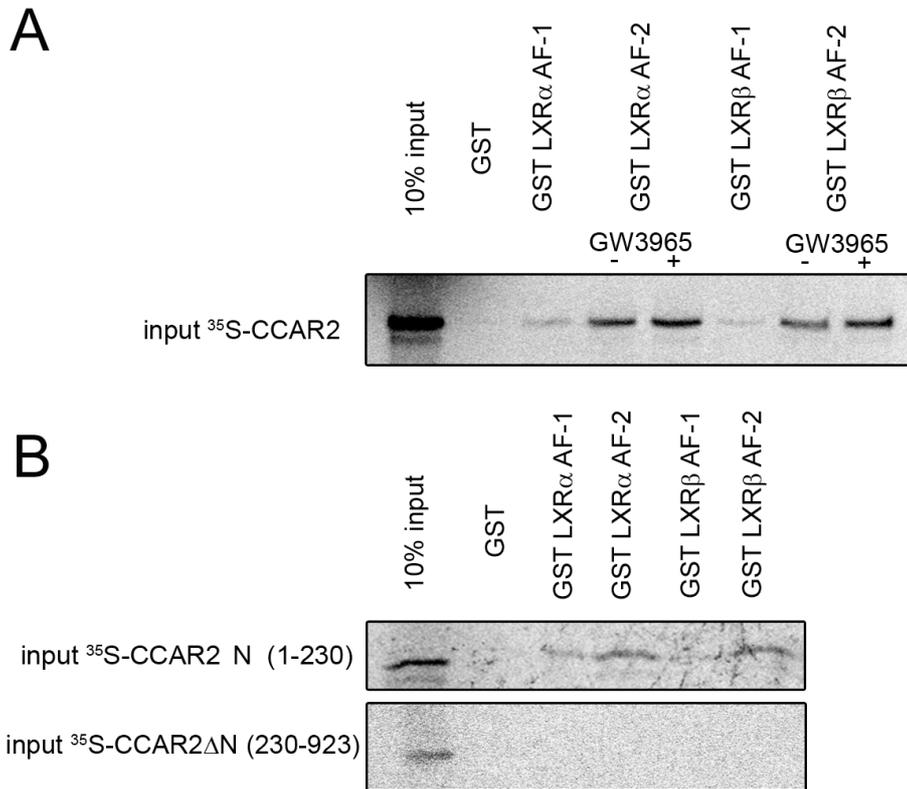
B) 逆免疫沈降ではanti-LXR α 抗体 (2 μ g) で免疫沈降し、anti-CCAR2抗体でウエスタンブロットを行った。同様に3回繰り返して同様LXR α とCCAR2の内在性複合体を確認した。

Figure 6. 内在性 **CCAR2** と **LXR α/β** との共在についての解析



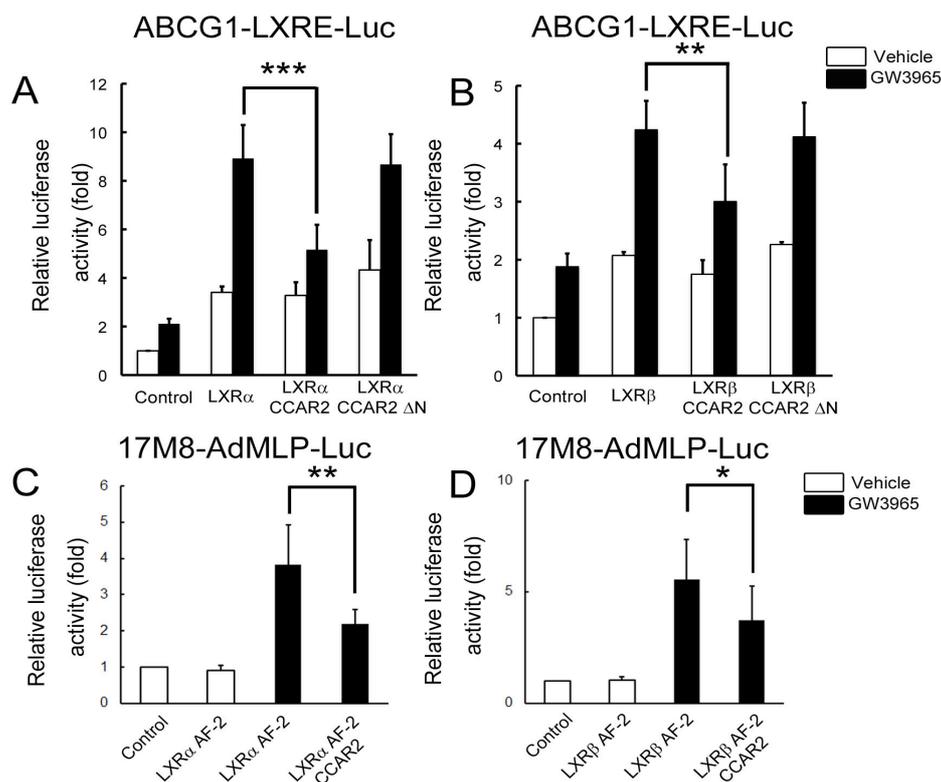
HepG2細胞を用いた蛍光免疫染色法を施行しLXR α 、CCAR2の共在について確認した。anti-LXR α 抗体 (Sigma-Aldrich) およびanti-CCAR2抗体 (先述)、またはanti-LXR β 抗体及びanti-CCAR2抗体over nightで反応させ、蛍光標識二次抗体としてAlexa fluor 488 donkey anti-mouse IgG (Invitrogen) とAlexa fluor 555 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen)、核染色としてHoechst 33342 (Sigma Aldrich) を行い、共焦点顕微鏡 (Carl-Zeiss MicroImaging) を用いて細胞を観察した。HepG2細胞の核内 (Hoechst 33342により青染) でLXR α 及びLXR β は、CCAR2が共在することがわかった。LXR特異的リガンドGW3965 2 μ M投与によりその局在に変化は見られなかった。

Figure 7 CCAR2 と LXR α/β の *in vitro* での直接的結合及びその結合領域についての解析



- A) 大腸菌を用いて発現させた Glutathione-Sepharose 4B (GE healthcare) ビーズに結合した GST-LXR α AF-1/AF-2 および GST-LXR β AF1/AF-2 タンパクに *in vitro* 翻訳によって [³⁵S] methionine 標識された全長 CCAR2 (1-923 amino acids) とともにインキュベートし、CCAR2 と LXR α/β の直接結合の有無及びその結合部位を確認した。LXR α/β はともにリガンド依存性転写活性化領域である AF-2 領域において CCAR2 と結合しており、LXR 特異的リガンドである GW3965 の存在によりその結合の程度に有為差は見られなかった。
- B) 次に全長の CCAR2 の代わりに CCAR2 N 末端 (1~230 amino acid)、CCAR2 Δ N (230~923) 断片と GST-LXR α AF-1/AF-2 および GST-LXR β AF1/AF-2 タンパクをインキュベートした。CCAR2 は N 末端を介して、LXR α/β AF-2 領域と結合していることが判明した。

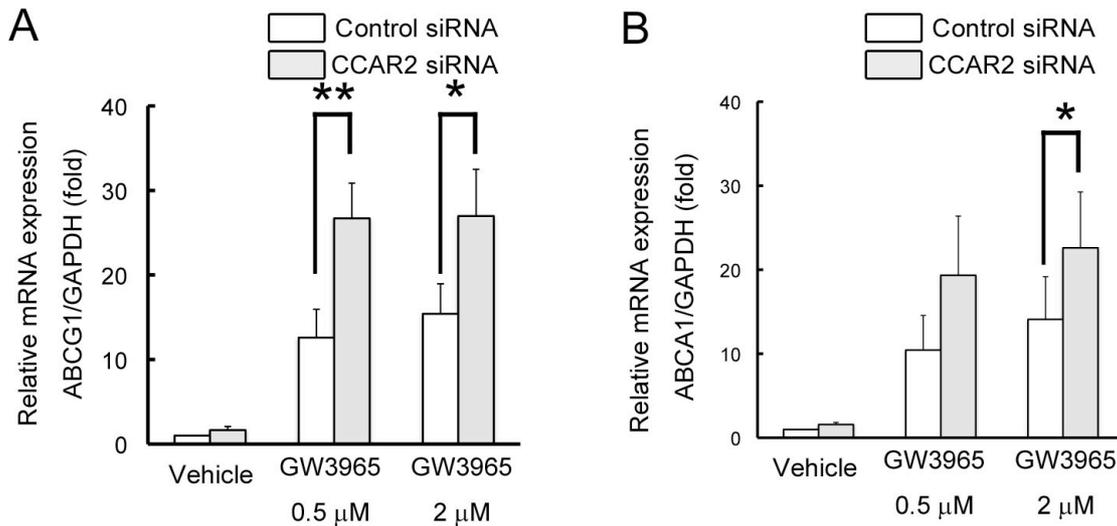
Figure 8 *LXRα/β* のリガンド依存的転写活性化能に対する *CCAR2* の影響についての解析



A-B) 293T 細胞に、*LXRα/β*, *CCAR2*, *CCAR2 ΔN* 発現ベクター、ルシフェラーゼレポーター遺伝子 *ABCG1-LXRE-luc*, *phRL CMV Luc* をトランスフェクションし、*LXR* 特異的リガンド *GW3965* 2μM もしくは *vehicle* を加えて、*CCAR2* が *LXRα/β* のリガンド依存的転写活性化能に与える影響について検討した。*CCAR2* は *LXRα* のリガンド依存性転写活性化能を有意に抑制した。しかしながらその結合部位である N 末端を欠いたコンストラクトである *CCAR2 ΔN* の過剰発現においては、その抑制効果は認めなかったトランスフェクションはトリPLICATEで行い、それぞれ 3 回同様の実験を繰り返して有意差を検討した。 (* $p < 0.05$) (** $p < 0.01$) (***) $p < 0.001$)

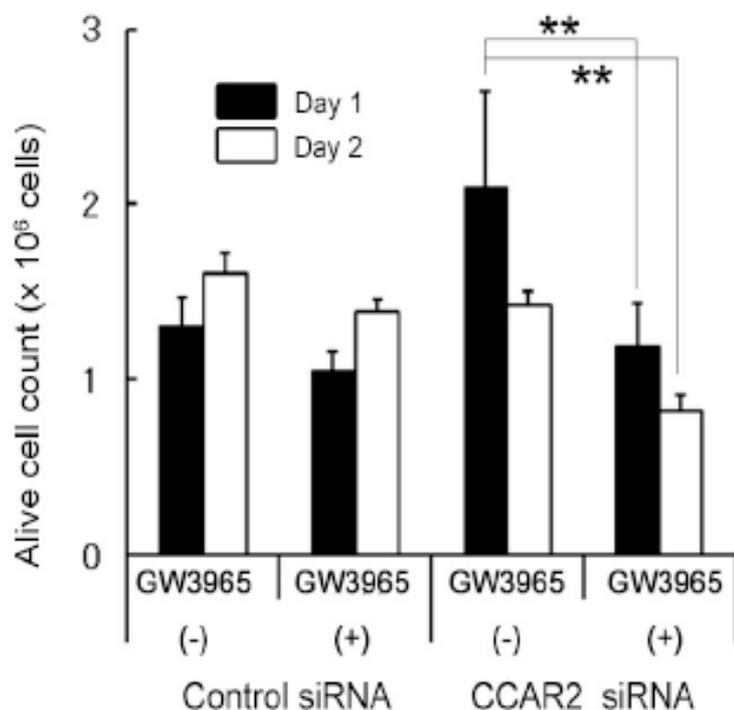
C-D) *LXRα/β* DNA 結合領域の代わりに酵母の *GAL4* 配列を融合させたコンストラクト *LXRα/β AF-2* 及びそれに応答するレポーター遺伝子 (*17m8 AdMLP Luc*) をリポフェクション法にてトランスフェクションし、*LXRα/β AF2* 領域に限定した *CCAR2* の転写活性抑制化能を検討した。*LXRα/β AF2* はリガンド依存的転写活性化能を示し、*CCAR2* 過剰発現により転写活性化能が抑制された。 (* $p < 0.05$) (** $p < 0.01$)

Figure 9. LXRs の標的遺伝子 (ABCA1, ABCG1) に対する CCAR2 の影響に対する解析



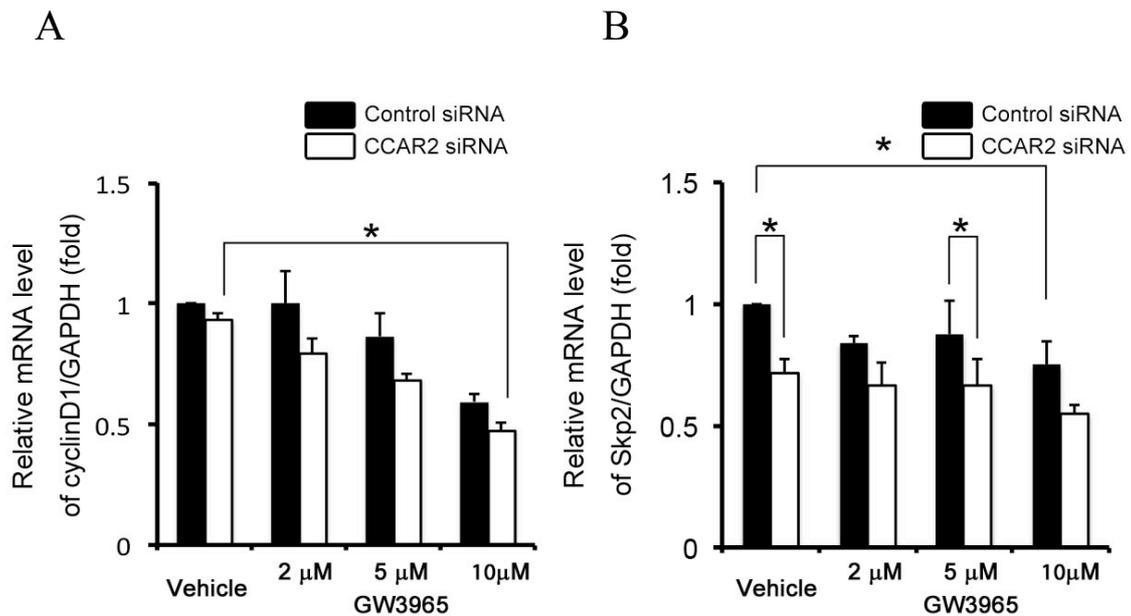
THP1 細胞において、SiRNA を用いた CCAR2 ノックダウンさせた場合の下流遺伝子の発現の変化を確認した。トランスフェクションは不死化センダイウィルスを用いた GenomONE-SI を使用し、トランスフェクション後 24 時間で LXR 特異的リガンド GW3965 0.5μM/2μM もしくは vehicle を加え、さらに 24 時間培養を継続した上で回収した。mRNA を逆転写した後、ABCA1, ABCG1 の相対的 cDNA 濃度を定量的 RT-PCR 法にて測定した。コントロールと比較して、CCAR2 のノックダウンにより ABCA1、ABCG1 の mRNA は LXR 特異的リガンド GW3965 の用量依存性に有意な上昇がみられた (* p < 0.05) (** p < 0.01)

Figure 10. MCF7 細胞における細胞増殖に関する CCAR2 の影響に対する解析



CCAR2 の LXR に対する転写活性抑制化能が、乳癌細胞株 MCF7 細胞の細胞増殖において与える影響を検討した。MCF7 (1×10^5 /well) において内在性 CCAR2 を siRNA (Lipofectamin RNA imax) にてノックダウンし、特異的リガンド GW3965 2 μ M または vehicle を加えて 2 日間培養を継続した。24 時間後、48 時間後の生存細胞数を、それぞれトリパンブルー染色をしてカウントした。実験はトリPLICATEで行い、3 回繰り返して有意差検定を行った。LXR 特異的リガンドの有無に関わらず、CCAR2 のノックダウン群により、コントロール群と比較して細胞増殖は有意に抑制された。 (** p < 0.01)

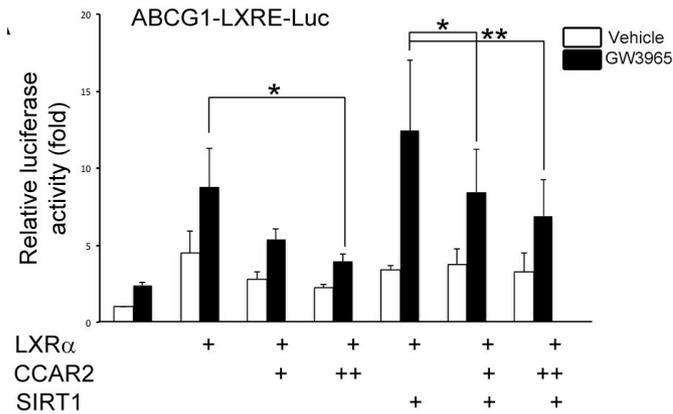
Figure 11. 細胞増殖関連遺伝子 (CyclinD1, Skp2) に関する CCAR2 の影響に対する解析



細胞周期関連遺伝子 CyclinD1、Skp2 に対する CCAR2 の作用を、乳癌細胞株 MCF7 細胞株を用いて siRNA にて内在性 CCAR2 をノックダウンすることで検討した Cyclin D1 の発現は、LXR 特異的リガンド GW3965 10 μM の投与下において CCAR2 ノックダウンにより有意に抑制された。 Skp 2 の発現は GW3965 5 μM 投与下及びリガンド無し何れにおいても、CCAR2 のノックダウンによって有意に抑制された。 (* p < 0.05)

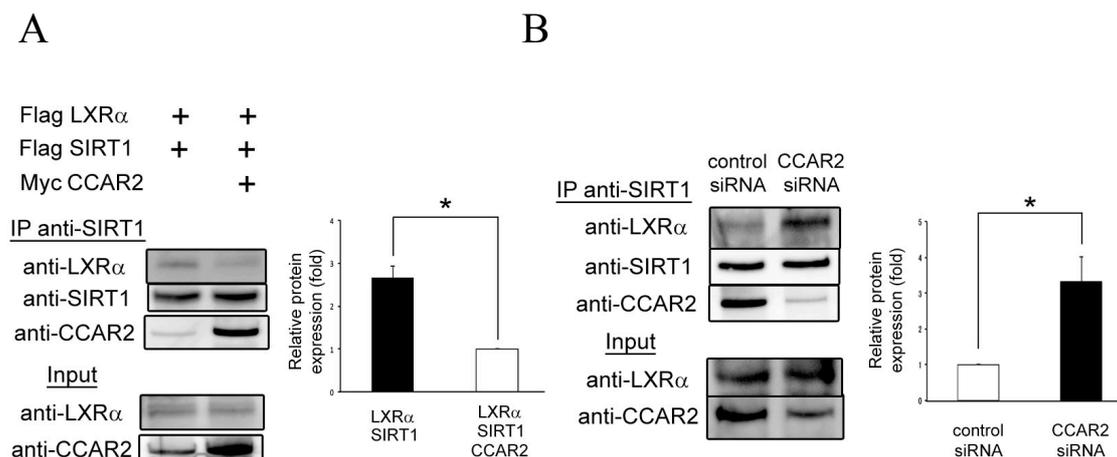
Figure 12. SIRT1 による LXR α 制御への CCAR2 の影響に対する解析

A)



図に示すように LXR α 、CCAR2 の SIRT1 を一過性に過剰発現させ、CCAR2 及び SIRT1 の LXR α の転写活性化能に与える影響をルシフェラーゼアッセイにて検討した。前述のルシフェラーゼアッセイ同様に、HEK293T 細胞に、LXR α 、SIRT1、CCAR2 (3 倍量、6 倍量) 発現ベクター、ルシフェラーゼレポーター遺伝子 ABCG1-LXRE-luc、phRL CMV Luc をトランスフェクションし、LXR 特異的リガンド GW3965 2 μ M もしくは vehicle を加えて 24 時間後ルシフェラーゼアッセイを行った。トランスフェクションはトリPLICATEで行い、それぞれ 3 回同様の実験を繰り返して有意差を検討した。SIRT1 の過剰発現では、有意ではないものの弱い転写活性促進作用を認めた。CCAR2 を共過剰発現させると、SIRT1 の存在下でより顕著に LXR α に対する転写活性抑制能を認めた。 (* p < 0.05) (** p < 0.01)

Figure 13. SIRT1 の LXR α との結合に関する CCAR2 の影響に対する解析



CCAR2 の LXR α に対する転写抑制作用のメカニズムを解明するため、SIRT1 LXR α との結合状態が、CCAR2 の過剰発現にて変化をするか競合免疫沈降 (Competitive immunoprecipitation assay) にて検討した。

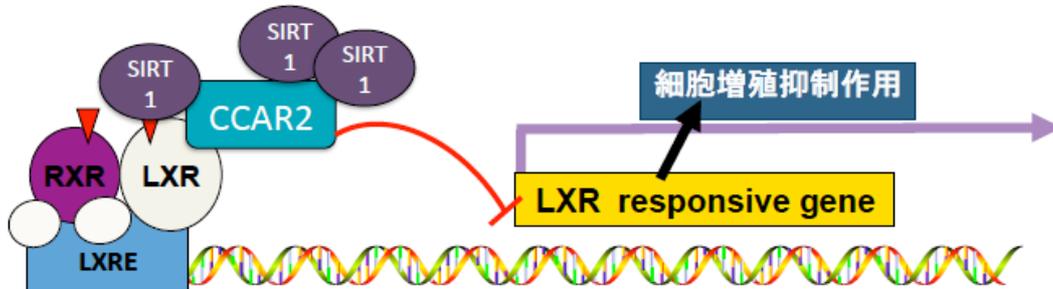
A)

293T 細胞を前培養し、発現ベクターFlag-LXR α 、Flag-SIRT1、Myc-CCAR2 をそれぞれ、① Flag-LXR α 、Flag-SIRT1、pcDNA ②Flag-LXR α 、Flag-SIRT1、Myc-CCAR2 のようにトランスフェクションし、2 μ M GW3965 を培養液に添加した。トランスフェクションの 24 時間後、細胞を回収。anti-SIRT1 抗体 (Abcam) で免疫沈降し、Anti-LXR α 抗体でイムノブロットすることで両者の結合度合いを比較した。CCAR2 の過剰発現下では、SIRT1 と LXR α の結合状態は減弱した。(* p < 0.05)

B)

CCAR2 を siRNA にてノックダウンさせた上で、SIRT1 と LXR α の結合は増強した。24 時間後、それぞれ発現ベクターFlag-LXR α 、Flag-SIRT1 をトランスフェクションし、同時に 2 μ M の GW3965 を添加、さらに 24 時間追加培養した後に回収した anti-SIRT1 抗体 (Abcam) で免疫沈降し、Anti-LXR α 抗体でイムノブロットすることで両者の結合度合いを比較した。CCAR2 をノックダウンすると SIRT1 と LXR α の結合状態は増強した。(* p < 0.05)1

Figure 14 LXR, SIRT1, CCAR2 の関連性について



CCAR2はLXRと細胞内で複合体を形成、直接結合してLXRの有するリガンド依存性転写活性化能を抑制した。その機序の一部は、SIRT1のLXRに対する正の制御に拮抗作用（競合的結合阻害）によるものである。さらにCCAR2はLXRのもつ細胞増殖抑制作用に拮抗して、乳癌の細胞増殖に対して促進的に働くという新規機能を明らかにした。