

## 論文の内容の要旨

論文題目 転写因子 CCAR2 による核内受容体 LXR $\alpha$  の細胞増殖抑制機構の解析

氏名 櫻橋 (巷岡) 彩子

### 1) 序文

乳癌は本邦で増加の一途を辿る。肥満と乳癌の関連性についての大規模研究によると、閉経前閉経後共に肥満女性で乳癌リスクが高い。閉経前乳癌についてはエストロゲンメカニズムで説明困難であり、代謝面からの発症機序が注目される。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、全身のコレステロールホメオスタシス維持に働く一方、乳癌を含む種々の癌において細胞増殖抑制作用を併せ持つことが知られる。その制御機構は不明な点も多いが、近年 NAD<sup>+</sup>依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 が、LXR を正に制御することが明らかとなった。Cell cycle and apoptosis regulator 2 (CCAR2; DBC1/KIAA 1967 と同意) は SIRT1 に直接結合して SIRT1 を抑制する一方で種々の核内受容体と相互作用を持つことが知られる。CCAR2 は乳癌で欠損する領域より同定され、癌抑制因子の候補である一方、癌促進の報告もある。又 SIRT に対する CCAR2 の抑制作用はカロリー制限下に解除され、メタボリックセンサーとして機能する。このような代謝と細胞増殖に関する深い生理的意義を踏まえて、LXR と CCAR2 の相互作用と細胞増殖への機能解明が、代謝面からの乳癌発症のメカニズム解明の一助となることを目的として本研究を施行した。

### 2) 方法

#### 1. 免疫沈降法

HepG2 細胞を用いて、LXR $\alpha/\beta$  と CCAR2 の複合体形成を免疫沈降法にて確認した。抗 CCAR 抗体にて免疫複合体を作成後、抗 LXR $\alpha/\beta$  抗体でウェスタンブロッティングを施行した。逆免疫沈降では LXR $\alpha$  抗体で免疫沈降、CCAR2 抗体でウェスタンブロッティングを施行した。

競合的免疫沈降法は CCAR2 の過剰発現もしくは、ノックダウン下での LXR $\alpha$ 、SIRT1 の結合状態を抗 SIRT1 抗体で免疫沈降後、抗 CCAR2 抗体、抗 LXR $\alpha$  抗体でイムノブロットし比較した。

#### 2. 蛍光免疫染色法

HepG2 細胞を用いて LXR $\alpha/\beta$  及び CCAR2 の細胞内局在を解析した。細胞固定後、1 次抗体として抗 LXR $\alpha/\beta$  抗体、抗 CCAR2 抗体、2 次抗体は蛍光標識抗体を使用して二重染色した。核染色は Hoechst 33342 にて行い、共焦点顕微鏡で観察した。

#### 3. GST pull down アッセイ

LXR $\alpha/\beta$  と CCAR2 との直接結合の有無、及びその結合部位を確認のため施行した。LXR $\alpha$  AF-1/AF-2、LXR $\beta$  AF-1/AF-2 の各領域を、GST 遺伝子の下流に組み込み大腸菌に形質転換した。GST 融合タンパクと [<sup>35</sup>S] methionine 標識を行った CCAR2 の全長、分割された断片をインキュベ

ートし、SDS-PAGE で泳動した。

#### 4. ルシフェラーゼアッセイ

CCAR2 の LXR $\alpha/\beta$ リガンド依存性転写活性化能に与える影響の解析のため、293T 細胞を用いて施行した。発現ベクター、ルシフェラーゼレポーター、internal control 用ベクターをトランスフェクションし、LXR 選択的リガンドを添加した。Firefly luciferase と同時に効率是正のため Renilla luciferase 活性も測定した。

#### 5. RNA 抽出及び定量的 RT-PCR 法

CCAR2 の LXR に対する転写活性抑制化能が、内在性遺伝子発現 (ABCA1、ABCG1) に合致する事を確認するため施行した。細胞株は THP1 を使い、CCAR2 特異的 siRNA にてノックダウンした後 LXR 選択的リガンドを加えた。各試料の GAPDH を同時に測定し mRNA 量の補正を行った。細胞増殖関連遺伝子である CyclinD1 や Skp2 の発現に関しては MCF7 を用いて同様の方法にて施行した。

#### 6. 細胞カウント (トリパンプルー色素排除試験)

MCF7 細胞を用いて CCAR2 による LXR の転写活性抑制化能の乳癌の細胞増殖抑制能に与える影響を検討した。CCAR2 の特異的 siRNA にてノックダウンし、LXR 特異的リガンドを加え、24 時間後及び 48 時間後の生存細胞数をトリパンプルー染色の上カウントした。

#### 7. 統計学的手法

統計プログラムとして StatView Version 5 for Windows を使用し、多群間の比較に対し one-way ANOVA の後に、Bonferroni/Dunnnett *post-hoc* test を用いた。2 群間の比較に対しては、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

#### 内在性 CCAR2 と LXR $\alpha$ との複合体についての解析

免疫沈降法にて HepG2 細胞において CCAR2 と LXR $\alpha$ は細胞内で複合体を形成することが示された。

#### 内在性 CCAR2 と LXR $\alpha/\beta$ の共在についての解析

蛍光免疫染色により、CCAR2 と LXR $\alpha/\beta$  は HepG2 細胞において核内で共在することが示された。またリガンドの有無によりその局在に変化は認めなかった。

#### 内在性 CCAR2 と LXR $\alpha/\beta$ 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

GST プルダウンアッセイにより、CCAR2 の N 末端と LXR $\alpha/\beta$  の AF-2 領域が直接結合する事

が示された。リガンドの有無によりその局在に変化は認めなかった。

#### LXR $\alpha/\beta$ 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

ルシフェラーゼアッセイにて、CCAR2 は LXR $\alpha/\beta$  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  $\Delta$ N ではその抑制効果は認めなかった。

#### LXRs の標的遺伝子 (ABCA1、ABCG1) に対する CCAR2 の影響に対する解析

CCAR2 ノックダウンにより、ABCA1、ABCG1 の mRNA は、GW3965 の用量依存性に有意に上昇が見られ、内在性遺伝子発現においても CCAR2 により 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。

#### 乳癌細胞株の細胞増殖に関する CCAR2 の影響に対する解析

内在性の CCAR2 を siRNA にてノックダウンし、LXR 特異的リガンドを加えて 2 日間培養を恵贈した。24 時間後、48 時後の生存細胞数を、それぞれトリパンブルー染色下にカウントした。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。

#### 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

CyclinD1 の発現は LXR 特異的リガンド GW3965 10  $\mu$  M の投与下で CCAR2 ノックダウンにより有意に抑制された。Skp2 の発現は GW 3965 5  $\mu$  M 投与下及びリガンド無し何れにおいても、CCAR2 ノックダウンにより有意に抑制された。

#### SIRT1 による LXR $\alpha$ 制御に対する CCAR2 の影響に対する解析

SIRT1 の過剰発現では有意で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 $\alpha$  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。

#### SIRT1 と LXR $\alpha$ との結合に関する CCAR2 の影響に対する解析

CCAR2 の LXR $\alpha$  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の解明のため、CCAR2 の過剰発現、及びノックダウンでの SIRT1-LXR $\alpha$  間の結合状態の変化を競合的免疫沈降にて検討した。CCAR2 の過剰発現下で、SIRT1 と LXR $\alpha$  の結合状態が減弱し、逆に CCAR2 をノックダウンにて、SIRT1 と LXR $\alpha$  の結合は増強した。CCAR2 は SIRT1 と LXR $\alpha$  への結合に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。

#### 4) 考察

CCAR2 は元々 DBC1 (Deleted in breast cancer) とも呼ばれていた転写因子で、従来名通り乳癌で

欠失している領域から同定され、細胞増殖、アポトーシスその他の役割が徐々に明らかとなっている。主機能の1つに SIRT1 への直接結合、脱アセチル化の阻害作用が挙げられる、カロリー制限下で、両者は解離、CCAR2 による抑制作用が解除されて SIRT1 の脱アセチル化活性が高まることから、メタボリックスイッチとして機能しているとも言及できる。一方で CCAR2 は種々の核内受容体と相互作用する。これらの事実及び SIRT1 による LXR に対する正の制御の報告を元に、CCAR2 と LXR との相互作用と細胞増殖に対する関与の検証を目的として本研究を施行した。結果、両者は細胞内で複合体を形成し、CCAR2 は LXR に直接結合し、そのリガンド依存性転写活性化を抑制することが明らかとなった。この抑制作用の一部は、SIRT1 の LXR に対する正の制御に拮抗（競合的結合阻害）により引き起こされた。LXR は種々の癌及び正常細胞においての細胞増殖抑制効果も報告されている。また CCAR2 は造腫瘍的機能と抗腫瘍的の両者が報告されている。DBC1 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にも関わらず、CCAR2 が細胞増殖に促進的役割を果たすか抑制的役割を果たすか、現時点では定説はない。本研究で明らかとなった CCAR2 の LXR に対する抑制作用は、LXR の持つ細胞増殖抑制作用に拮抗して、乳癌の細胞増殖対して促進的役割を果たすというものである。しかしながら、CCAR2 が乳癌の予防及び治療の標的となるためには、LXRs、CCAR2 の複合体形成のメカニズム、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と思われる。