

審査の結果の要旨

氏名 櫻橋（巷岡）彩子

本研究は、乳癌を含む癌の増殖機転及びエネルギー代謝に重要な役割を演じていると考えられる核内受容体 LXR(α/β)及び CCAR2 の相互作用と制御機構、さらに乳癌の細胞増殖に及ぼす影響を明らかにするため、培養細胞株を用いて過剰発現もしくはノックダウンする系にて解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. LXR (α/β)、CCAR2 は肝細胞癌培養細胞株 HepG2 において、免疫沈降法で複合体を形成すること、蛍光免疫染色法では核内で共在していることが示された。また GST pull down assay にて LXR のリガンド依存性転写活性化領域、AF2 領域と CCAR2 の N 末端は直接結合しており、その結合の強度はリガンドの有無により変化しない事が示された。
2. 一過性の過剰発現下での転写活性を luciferase assay で確認したところ、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。LXR の標的遺伝子であるトランスポーター遺伝子 (ABCA1, ABCG1) の発現は LXR ノックダウンによりリガンドの用量依存性に上昇し、CCAR2 の LXR に対する抑制作用を確認した。
3. CCAR2、LXR の乳癌の細胞増殖に与える影響を、乳癌培養細胞株 MCF7 を用いてトリパンプルー染色下に生存細胞数をカウントし解析した結果、CCAR2 はリガンドの有無に関わらず CCAR2 ノックダウン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。また CCAR2 ノックダウンにより細胞周期関連遺伝子(Cyclin D1, Skp2)の発現は抑制され、CCAR2 は LXR の持つ細胞増殖抑制作用に拮抗することで、乳癌の細胞増殖に対して促進的に働くと考えられた。
4. LXR の正の制御因子であり、CCAR2 が直接結合することでその脱アセチル化活性を抑制する事が知られる SIRT1 について、LXR α 、CCAR2 との相互作用を解析した。一過性過剰発現下での転写活性の変化を luciferase assay にて解析したところ、SIRT1 の過剰発現では弱い転写活性促進作用を認め、CCAR2 の共過剰発現では、LXR α に対する転写活性抑制作用を認め、その抑制作用は SIRT1 の存在下でより顕著であった。また CCAR2 の過剰発現、ノックダウン下で LXR α 、SIRT1 の結合状態の変化を競合免疫沈降にて確認したところ、CCAR2 の過剰発現下で両者の結合は減弱し、ノックダウンにて増強した。これらの結果から、CCAR2 の LXR に対する抑制作用の機序の一端は SIRT1 と LXR との結合阻害（競合的結合阻害）である事が示唆された。

以上本論文は、全身のコレステロール代謝を司り、脂質センサーとして作用する一方で細胞増殖抑制作用を併せ持つ LXR に対する、転写因子 CCAR2 の制御機構を明らかにした。昨今特に本邦において罹患率の上昇している乳癌の進展に関して、代謝の側面からの機序解明に重要な貢献をなすと考え、学位の授与に値するものと考えられる。