



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士(薬科学)
報告番号	甲第1535号
学位記番号	第311号
氏名	加藤 大輝
授与年月日	平成 28年 3月 25日
学位論文の題名	がん細胞の浸潤・転移における脂肪細胞分化関連因子 fad104 の機能解析
論文審査担当者	主査： 星野 真一 副査： 今川 正良, 松永 民秀, 井上 靖道

氏名	かとう だいき 加藤 大輝
学位の種類	博士（薬科学）
学位の番号	薬博第 311 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	がん細胞の浸潤・転移における脂肪細胞分化関連因子 fad104 の機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 星野 真一 (副査) 教授 今川 正良・教授 松永 民秀・准教授 井上 靖道

論文内容の要旨

【研究背景および目的】

がんは日本人の死亡原因第一位であるばかりでなく、世界的にみても死因の上位を占めており、がんの予防・治療によるがん克服は疾病対策上の最重要課題である。がんは転移することにより治療が困難となり、転移を伴わない患者と比較し、遠隔転移を伴うがん患者では5年生存率が顕著に低い。既存の抗がん剤は、細胞増殖の抑制や細胞死を誘発するものが多く、浸潤・転移を抑制する抗がん剤の開発は未だ進んでいない。そのため、がんの治療を考える上で、がん細胞の浸潤・転移の分子メカニズムを解明することが重要である。がん細胞の浸潤・転移には細胞の接着等を制御する様々な因子が関与することが報告されているが、その全容は未だ解明されていない。

Factor for adipocyte differentiation 104 (fad104) は脂肪細胞分化初期に発現が上昇する遺伝子として当研究室で単離された新規遺伝子である。Fad104 はマウスとヒトで高い類似性を示し、proline-rich region, fibronectin type III (FNIII) domain の9回繰り返し構造および膜貫通領域を有するタンパク質をコードする。当研究室では、fad104が脂肪細胞分化を正に制御すること、また、fad104が肺形成ならびに骨形成の制御にも重要な役割を担うことを報告した。さらに、当研究室で樹立したfad104ノックアウトマウスから調製した胎児由来線維芽細胞 (MEFs: Mouse Embryonic Fibroblasts) を用いた解析から、fad104が細胞の接着、移動、増殖を制御することを明らかにした。これらの結果より、fad104は脂肪細胞分化、肺形成および骨形成にとどまらず、細胞の接着等が重要な役割を担う生命現象の1つであるがん細胞の浸潤・転移に寄与していることが考えられるが、これまでfad104とがんの関係は全くわかっていない。

そこで本研究では、がん細胞の浸潤・転移におけるfad104の役割を明らかにすることを目指した。検討の結果、fad104はがん細胞の移動能、足場非依存的増殖能を阻害し、浸潤・転移を抑制することがわかった。また、fad104はがん細胞の浸潤・転移に重要な役割を担うsignal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)の活性化を阻害することを見出した。さらに、proline-rich regionを含むFAD104のN末端領域を介し、STAT3と相互作用することにより、STAT3の活性化を制御することを明らかにした。これらの結果より、fad104はSTAT3シグナルを負に制御し、がんの悪性を制御する新規遺伝子であることが明らかとなった。

【結果】

1. がん細胞の浸潤・転移におけるfad104の役割

がん細胞の浸潤・転移にfad104が与える影響を明らかにするため、皮膚がんの一種であるメラノーマ細胞を用いて検討を行った。まず、転移性の異なる2種類のヒトメラノーマ細胞A375C6 (低転移性)およびA375SM (高転移性)におけるfad104の発現量を評価した。その結果、mRNAおよびタンパク質レベルともに、高転移性のA375SM細胞においてfad104の発現量が低いことがわかった。浸潤には、細胞の移動能が関与する。そこで次に、transwell migration assayにより移動能を検討した。A375C6細胞においてfad104を発現抑制させた結果、コントロールと比べ移動能が亢進した。一方、アデノウイルスを用いて、A375SM細胞にfad104を過剰発現させた結果、A375SM細胞の移動能が低下した。これらの結果より、fad104はがん細胞の移動能を抑制することがわかった。次に、基底膜を構成する主要な分子を含んだマトリゲルでコートされたtranswellを用いて、transwell invasion assayを行い、浸潤能について検討した。その結果、fad104の発現抑制により、浸潤した細胞の数は増加した。一方、fad104の過剰発現により浸潤能が低下した。また、fad104の過剰発現により、浸潤に重要な遺伝子の一つであるmatrix metalloproteinase 2の発現量が減少した。これらの結果より、fad104はメラノーマ細胞の浸潤能を抑制することが明らかとなった。次に、A375細胞だけでなく、他のメラノーマ細胞においてもfad104が浸潤能を負に制御するか否か検討した。高転移性ヒトメラノーマ由来A2058細胞においてfad104を発現抑制させた結果、コントロールと比べ浸潤した細胞の数が顕著に増加した。これらの結果より、fad104は複数のメラノーマ細胞において浸潤能を負に制御している可能性が示唆された。

次に、メラノーマ以外のがん細胞においてもfad104が浸潤能を制御するか否か検討を行った。高転移性ヒト乳がん細胞であるMDA-MB-231にアデノウイルスを用いてfad104を過剰発現させた結果、浸潤した細胞の数が有意に減少した。この結果から、fad104はメラノーマ細胞に限らず、乳がん細胞においても浸潤能を負に制御することが明らかになった。

がん細胞の浸潤・転移の過程には、足場非依存的増殖能の亢進が重要である。そこで次に、fad104ががん細胞の足場非依存的増殖能に与える影響を解析した。結果、fad104の過剰発現により、軟寒天培地上に形成されたコロニーの数が顕著に減少した。この結果より、fad104はがん細胞の足場非依存的増殖能を抑制することが明らかになった。次に、転移能の解析を行った。Fad104安定発現細胞をマウスに尾静脈注射し、2週間後に肺表面に形成されたコロニーの数を計測した。コントロールでは肺一面に無数のコロニーを形成したのに対し、fad104安定発現細胞では肺表面に形成されたコロニーの数が有意に減少した。これらの結果より、新規遺伝子fad104はがん細胞の浸潤・転移の抑制因子であることを明らかにした。

2. fad104がSTAT3シグナルを制御する分子機構の解析

次に、fad104が浸潤・転移を制御する分子機構の解明を目指した。当研究室では、骨細胞分化過程においてfad104がBMP/Smadシグナルを制御することを明らかにしている。BMP/Smadシグナルはメラノーマならびに乳がん細胞の浸潤・転移にも重要であることから、がん細胞においてもfad104がBMP/Smadシグナルを制御するか否か検討した。アデノウイルスを用いてFAD104を過剰発現させたA375SM細胞にBMP2を添加し、Smad1/5/8のリン酸化レベルを評価した。その結果、コントロールとFAD104過剰発現細胞でSmad1/5/8のリン酸化レベルに変化は見られなかった。がん細胞の浸潤・転移には、Janus Kinase (JAK)-STAT 経路、mitogen-activated protein kinase (MAPK)経路等が重要な役割を担うことが知られている。そこで次に、これらのシグナル伝達経路にfad104が寄与するか否か検討を行った。その結果、FAD104を過剰発現させるとSTAT3のリン酸化レベルが減弱することを見出した。さらに、A375SM細胞においてfad104の発現を抑制した結果、STAT3のリン酸化レベルが亢進した。STAT3の結合配列を有するレポータープラスミド4xM67-tk-Lucを用いて、fad104がSTAT3の転写活性化能に与える影響を解析した。その結果、fad104の過剰発現により、STAT3の転写活性化能が低下した。これらの結果より、メラノーマ細胞においてfad104はSTAT3のリン酸化レベルならびに転写活性化能を抑制することを明らかにした。

FAD104は、タンパク質間の相互作用に重要なproline-rich regionならびにFNIIIドメインを有することから、まず、FAD104がSTAT3と相互作用するか否か検討した。抗STAT3抗体を用いた免疫沈降実験の結果、メラノーマ細胞においてFAD104とSTAT3が相互作用することがわかった。次に、FAD104のどの領域がSTAT3との相互作用に重要か検討を行った。まず、N末端領域を欠損させたFAD104ΔNおよびN末端領域と膜貫通領域を有するFAD104ΔFNIII発現プラスミドを作製した。作

製したFAD104各種欠損変異体の細胞内局在を調べた結果、full length (FL)と同様に、FAD104ΔNならびにFAD104ΔFNIIIは小胞体に局在を示した。次に、免疫沈降法を行った。FAD104ΔNとSTAT3の相互作用を検討した結果、FAD104FLはSTAT3と結合したのに対し、FAD104ΔNではSTAT3との相互作用が認められなかった。さらに、FAD104ΔFNIIIについて検討を行った結果、FAD104ΔFNIIIはSTAT3と相互作用することがわかった。次に、GST-pull down assayによりFAD104のN末端領域がSTAT3と相互作用するか否か検討した。Proline-rich regionを含むFAD104 (1-277 aa)領域を、GST融合タンパク質として発現、精製し、メラノーマ細胞から得られたcell lysateと反応させ、GST pull down assayを行った。その結果、FAD104 (1-277 aa)の領域がSTAT3と結合することが明らかになった。これらの結果より、STAT3との相互作用にはFAD104のN末端領域が重要であることが示唆された。

STAT3はN末端側より、N-terminal ドメイン (ND)、coiled-coilドメイン (CC)、DNA結合ドメイン (DBD)、リンカードメイン (LD)、SH2ドメイン (SH2)ならびに転写活性化ドメイン (TD)を有する。STAT3の各ドメインは様々な機能を有することが報告されており、FAD104が結合する領域を同定することは、FAD104によるSTAT3の制御機構の解明につながる。そこで、FAD104がSTAT3のどの領域と結合するか検討を行った。ND、CC、DBDからなるSTAT3 (1-407 aa)、LDのみを有する STAT3 (465-585 aa)およびSH2、TDからなるSTAT3 (586-770 aa)を作製した。作製したSTAT3 各種欠損変異体発現プラスミドをA375SM 細胞に導入し、24時間後にcell lysate を調製した。調製したcell lysateとGST融合FAD104 (1-277 aa)とを反応させ、GST-pull down assayを行った。その結果、FAD104 (1-277 aa)とSTAT3 (586-770 aa)が強く結合した。STAT3 (1-407 aa)はわずかに結合した。一方、STAT3 (465-585 aa)とFAD104 (1-277 aa)の相互作用は認められなかった。免疫沈降法を用いた検討の結果でも、GST-pull down assayの結果と同様に、FAD104はSTAT3 (586-770 aa)と強く結合することが明らかになった。これらの結果より、FAD104はSTAT3のSH2とTDを含む領域と相互作用することが明らかになった。

SH2ドメインを含む、STAT3のC末端領域はY705のリン酸化制御に重要である。そこで次に、FAD104のN末端がSTAT3のリン酸化レベルに与える影響を解析した。FAD104FL、FAD104ΔN、FAD104ΔFNIIIをそれぞれ過剰発現させたA375SM細胞にIL6刺激を行った。刺激後、30分におけるSTAT3のリン酸化レベルを検討した。空ベクターを導入したコントロールではIL6刺激により、STAT3のリン酸化レベルが上昇した。FAD104FLおよびFAD104ΔFNIIIを過剰発現した細胞では、コントロールと比較しSTAT3のリン酸化レベルが低下した。一方、FAD104ΔN過剰発現細胞では、リン酸化レベルの低下が見られなかった。さらに、fad104各種欠損変異体を用いてSTAT3の転写活性化能を評価した結果、FAD104FL、FAD104ΔFNIIIの過剰発現によりSTAT3転写活性化能は低下したが、FAD104ΔN過剰発現では転写活性化能の抑制が見られなかった。これらの結果より、FAD104のN末端領域が、STAT3のC末端領域と相互作用することにより、STAT3のリン酸化レベルならびに転写活性化能を抑制することが明らかになった。

【総括】

本研究において、fad104ががん細胞の浸潤・転移の制御に重要な役割を担うことを明らかにした。さらに、fad104はがん細胞におけるSTAT3シグナルの新規調節因子であることも見出した。また、FAD104のN末端領域がSTAT3のSH2、TDを含む領域と相互作用することにより、STAT3の活性化を抑制していることも明らかにした。以上の結果より、脂肪細胞分化関連因子fad104は、N末端領域を介してSTAT3シグナルを調節することにより、がんの浸潤・転移を抑制する新規因子であることが明らかになった。

本研究の成果は、がん細胞の浸潤・転移を制御する新たな因子を発見したものであり、がん細胞の浸潤・転移の分子機構の理解がさらに進むと共に、新たながん治療薬の創薬につながることを期待される。

【結論】

1. fad104はがん細胞の浸潤・転移を負に制御する。
2. fad104はSTAT3シグナルを阻害する。
3. fad104はN末端領域を介しSTAT3と相互作用し、STAT3の活性化を負に制御する。

【基礎となる報文】

1. D. Katoh, M. Nishizuka, S. Osada, M. Imagawa
Fad104, a positive regulator of adipocyte differentiation, suppresses invasion and metastasis of melanoma cells by inhibition of STAT3 activity.
PLOS ONE, 10, e0117197 (2015).
2. D. Katoh, M. Nishizuka, S. Osada, M. Imagawa
FAD104, a regulator of adipogenesis and osteogenesis, interacts with the C-terminal region of STAT3 and represses malignant transformation of melanoma cells.
Biol. Pharm. Bull., 39, 849-855, (2016).

論文審査の結果の要旨

加藤大輝氏は、脂肪細胞分化、肺形成、骨形成に重要な役割を果たすことが知られている新規遺伝子 *fad104* (factor for adipocyte differentiation 104) が、細胞の接着、移動、増殖に関与していることに着目し、がん細胞との関連性について研究を行った。その結果、がん細胞の浸潤・転移を負に制御する新規因子であることを明らかにした。さらにそのシグナル伝達について複数の経路を検討した結果、STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) を介した経路が重要な役割を果たしていることを明らかにした。以上、本研究結果は、がん細胞の浸潤・転移に関与する新たな因子を発見したものであり、重要な業績と認められる。

公開発表会（平成 28 年 1 月 6 日開催）においては、良くまとまったわかりやすい口頭発表を行った。また質疑応答については、多くの先生方の質問に対して概ね適切に返答した。さらに、平成 28 年 3 月 2 日に開催された最終審査会においては、公開発表会ならびに主査・副査による精査・面接指導で指摘された事項を整理したスライドを加え、質の高い口頭発表を行った。さらに質疑応答についても的確に返答した。以上の結果より、加藤氏は博士（薬科学）の学位を得る資格があると認め、主査および副査全員より最終試験合格の判定を得た。

これらの結果を、教授および准教授で構成される薬学研究科論文審査会（平成 28 年 3 月 11 日開催）において主査が報告したところ、合格が認定された。