



## 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

名古屋市立大学学位論文

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

平成 27 年度 (西暦 2016 年 3 月)

名古屋市立大学大学院薬学研究科

分子生物薬学分野

加藤 大輝

1. 本論文は、2016年3月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 星野 真一 教授

副査 今川 正良 教授

松永 民秀 教授

井上 靖道 准教授

2. 本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

D. Katoh, M. Nishizuka, S. Osada, and 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).

D. Katoh, M. Nishizuka, S. Osada, and 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).

本論文の基礎となる研究は、今川正良教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

## 目次

緒論	1
本論	3
第一章 fad104 ががん細胞の浸潤・転移に与える影響	
第一節 低転移性のメラノーマ細胞 A375C6 ならびに高転移性の A375SM 細胞における fad104 の発現量の解析	3
第二節 fad104 がメラノーマ細胞の移動能および浸潤能に与える影響の解析	6
第三節 fad104 が乳がん細胞の浸潤能に与える影響の解析	12
第四節 fad104 がメラノーマ細胞の足場非依存的増殖能に与える影響の解析	14
第五節 fad104 がメラノーマ細胞の転移能に与える影響の解析	17
第六節 考察および小括	19
第二章 fad104 が STAT3 シグナルを制御する分子機構の解析	
第一節 fad104 が制御するシグナル伝達経路の同定	22
第二節 fad104 が STAT3 の転写活性化能に与える影響の解析	28
第三節 FAD104 と STAT3 の相互作用ならびに相互作用領域の検討	30
第四節 FAD104 の N 末端領域が STAT3 のリン酸化および転写活性化能に与える影響の解析	40
第五節 FAD104 の N 末端領域ががん細胞の足場非依存的増殖能に与える影響の解析	43
第六節 考察および小括	45
総括	48
結論	52
謝辞	53
引用文献	54

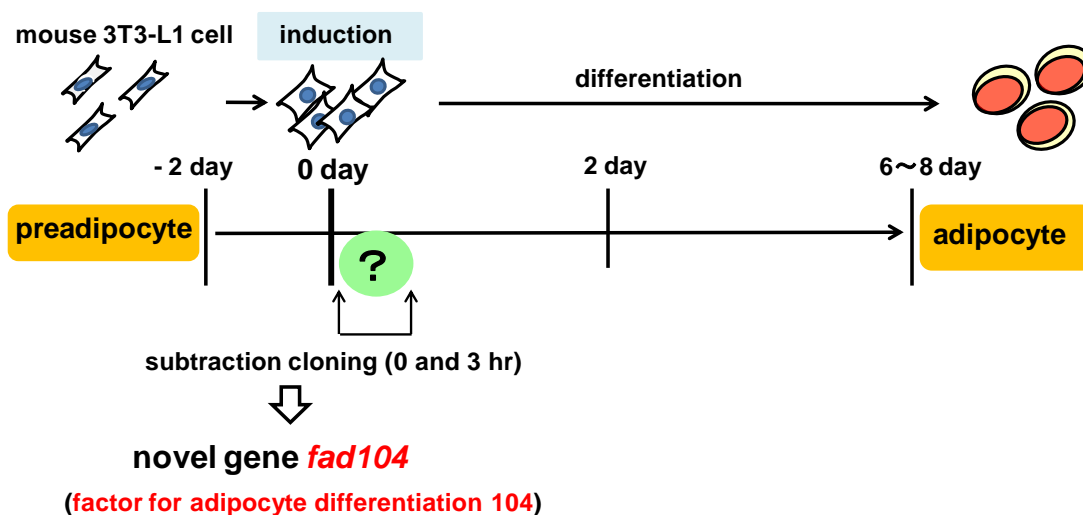
## 略 語

AP-2 $\alpha$	activator protein-2 $\alpha$
ATF	activating transcription factor
BCL-2	B cell leukemia-2
BMP	bone morphogenetic protein
BSA	bovine serum albmin
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CREB	cAMP-responsive element-binding protein
EMT	epithelial-to-mesenchymal transition
ER	endoplasmic reticulum
fad	factor for adipocyte differentiation
FBS	fetal bovine serum
FNIII	fibronectin type III
Fndc	fibronectin type III domain containing protein
FoxO3a	forkhead box O3a
HIF	hypoxia inducible factor
IRE1 $\alpha$	inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$
JAK	Janus kinase
MEF	mouse embryonic fibroblast
MMP	matrix metalloproteinase
NF- $\kappa$ B	nuclear factor- $\kappa$ B
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEI	polyethylenimine
PERK	protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PIAS	protein inhibitors of activated STAT
PTP	protein tyrosine phosphatase
PVDF	polyvinylidene difluoride
Runx	runt related transcription factor
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SIAH1	seven in absentia homolog 1
SOCS	suppressor of cytokine signaling
STAT	signal transducer and activator of transcription
TGF	transforming growth factor
Vegf	vascular endothelial growth factor

## 緒 論

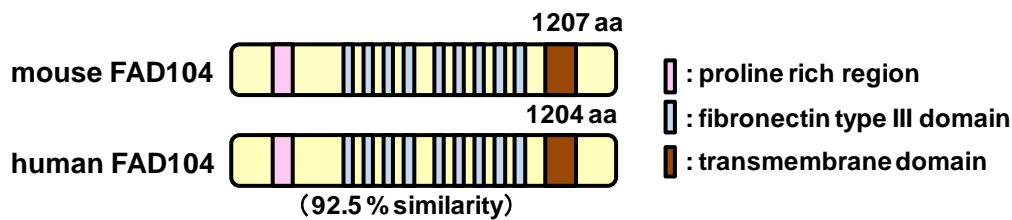
がんは日本国内にとどまらず、世界的に見ても死亡原因の上位を占めており、がんの克服は疾病対策上の最重要課題である。がんは、浸潤・転移することにより治療が困難になる。実際、転移を伴わない患者と比較して、転移を伴うがん患者では、5年生存率が顕著に低い。従来の抗がん剤は、細胞増殖の抑制や細胞死を誘導するものが多く、浸潤・転移を抑制する抗がん剤の開発成功には至っていない。そのため、がんの治療を考える上で、がん細胞の浸潤・転移の分子メカニズムを解明することが極めて重要である。がん細胞の浸潤・転移には細胞接着を制御する分子を始めとした様々な因子群が関与することが知られているが (1-3)、その全容の解明には至っていない。

当研究室では、脂肪細胞分化初期の分子メカニズムを解明するために、マウス前駆脂肪細胞株3T3-L1細胞の分化誘導3時間後に発現上昇する遺伝子をこれまでに多数単離している (Fig. 1) (4, 5)。そのうち、これまでの結果から、factor for adipocyte differentiation (fad)24、fad49、fad158を始めとするいくつかの遺伝子が脂肪細胞分化を促進することを報告してきた (6-10)。



**Fig. 1** The process of adipocyte differentiation and isolation of a novel gene, *fad104*.

その中の1つである *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 (Fig. 2)。*fad104* を単離した当初、*fad104* と類似したタンパク質は知られていなかったが、2006年に fibronectin type III domain containing protein 3a (*fndc3a*) が単離され、*fndc3a* がセルトリ細胞と精原細胞の接着を正に制御すること、ならびに *fndc3a* の類似の構造を有するタンパク質として *fndc3b*、*fndc3c* が存在することが報告された (11)。*Fndc3b* が *fad104* と同一の遺伝子である。



**Fig. 2 Schematic structures of mouse and human FAD104.**

当研究室では、fad104が脂肪細胞分化初期過程に一過性の発現を示すこと、また、shRNAを用いてfad104を発現抑制させると脂肪細胞分化が阻害されたことから、fad104が脂肪細胞分化を正に制御することを明らかにした (12)。さらに、fad104欠損マウスを樹立し、fad104の生体における役割について解析した結果、fad104ホモ欠損マウスは肺の未成熟を伴う機能不全からチアノーゼを呈し、出生直後に死亡することを明らかにした (13)。

これらの知見に加えて、fad104は脂肪細胞分化とは対照的に、bone morphogenetic protein (BMP)/Smadシグナルを阻害することで骨芽細胞分化を負に制御することも報告している (14, 15)。以上の知見から、fad104が脂肪細胞分化の制御に加え、肺形成および骨形成の制御に重要な役割を担うことが明らかとなった。さらに、fad104欠損マウスから調製した胎児由来線維芽細胞 (MEF: Mouse Embryonic Fibroblasts) を用いた解析から、fad104が細胞の接着、移動、増殖を正に制御することも報告している (16)。以上の結果より、fad104は脂肪細胞分化、肺形成および骨形成にとどまらず、細胞間接着等が重要な鍵となる生命現象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、fad104とがんの転移との関係は全くわかっていない。

そこで本研究では、fad104ががん細胞の浸潤・転移に与える影響を明らかにすることを目的とした。検討の結果、fad104はがん細胞の移動能、浸潤能、足場非依存的増殖能を阻害し、がん細胞の転移を抑制することがわかった。さらに、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。これらの結果より、fad104はSTAT3シグナルを抑制し、がん細胞の浸潤・転移を負に制御する新規分子であることを明らかにした。

## 本 論

### 第一章 fad104 ががん細胞の浸潤・転移に与える影響

#### 第一節 低転移性のメラノーマ細胞 A375C6 ならびに高転移性の A375SM 細胞における fad104 の発現量の解析

Fad104 ががん細胞の浸潤・転移に影響を与えるか否か検討するため、ヒトメラノーマ由来 A375 細胞を用いた。A375 細胞には亜株が存在し、高転移性の A375SM 細胞では低転移性の A375C6 細胞と比較し、がん抑制遺伝子である p53 やアポトーシスを促す Bax などの遺伝子の発現量が低く、nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)や Bcl-2 などのがん遺伝子の発現量が高いことが知られている (17)。そこでまず、A375C6 細胞および A375SM 細胞における fad104 の発現量を検討した。

#### (1) 実験材料および実験方法

##### 1-1 実験材料

A375C6 細胞 (本学衛生化学分野より供与)

A375SM 細胞 (本学衛生化学分野より供与)

RPMI-1640 (SIGMA)

Fetal Bovine Serum (FBS) (Biowest)

PBS (-) :137 mM NaCl、2.68 mM KCl、8.10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.47 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.25% trypsin/0.02% EDTA

0.02% EDTA/PBS (-)

Lysis buffer :137 mM NaCl、25 mM Tris-HCl (pH7.5)、1% NP40、5 mM MgCl<sub>2</sub>、

10% Glycerol、protease inhibitor cocktail (1 ml につき 1  $\mu$ l 使用)

Transfer buffer : 25 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane、192 mM glycine、20% methanol

Skim milk (Wako)

TTBS : 150 mM NaCl、10 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.1% Tween20

Rabbit anti-mouse FAD104 polyclonal antibody (5% bovine serum albmin (BSA)/TTBS で 400 倍希釈) (SIGMA GENOSYS に委託して作製)

Mouse anti-mouse  $\beta$ -actin monoclonal antibody (5% BSA/TTBS で 100,000 倍希釈) (SIGMA)

BCIP/NBT Phosphatase Substrate (Kirkegaard Perry Laboratories)

基本培地 : RPMI-1640、5% FBS

##### 1-2 実験方法



- A375C6 細胞および A375SM 細胞の培養  
基本培地 (RPMI-1640、5% FBS)を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub>において培養した。
- Total RNA の調製  
80%コンフレントの細胞から TriPure (Roche)を用いて回収した。クロロホルム抽出、2-プロパノール沈殿を行った。Total RNA は TE に溶解した。
- cDNA の調製  
逆転写反応は ReverTra Ace- $\alpha$ -を用いて、以下の条件により行った。  
<反応液組成>

Total RNA (1 $\mu$ g)	6.00 $\mu$ l
RNase free H <sub>2</sub> O	6.65 $\mu$ l
5 $\times$ RT buffer	4.00 $\mu$ l
dNTP mixture	2.00 $\mu$ l
Random Primer	1.00 $\mu$ l
RNase inhibitor	0.25 $\mu$ l
<u>ReverTra Ace</u>	<u>1.00 <math>\mu</math>l</u>
	20.0 $\mu$ l

  
 <反応条件>  
 30°C 10 min、42°C 20 min、99°C 5 min、4°C 5 min
- 定量 PCR  
ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems)を用い TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)の条件に準じて行った。fad104、18S rRNA の各プライマーおよびプローブセットは Applied Biosystems より購入した。  
  
 <プライマーおよびプローブ>  
 human fad104 : Hs00224289\_m1  
 18S rRNA のプライマーおよびプローブのセット : 4308329
- cell lysate の調製  
35-mm dish (Becton Dickinson)において、80% 程度のコンフレントまで培養した細胞を PBS (-) で洗浄し、Lysis buffer を添加した。氷上で 20 分間静置した後回収し、4°C、15,000 rpm で 30 分間遠心した後の上清を cell lysate とした。

○ Western blot 法

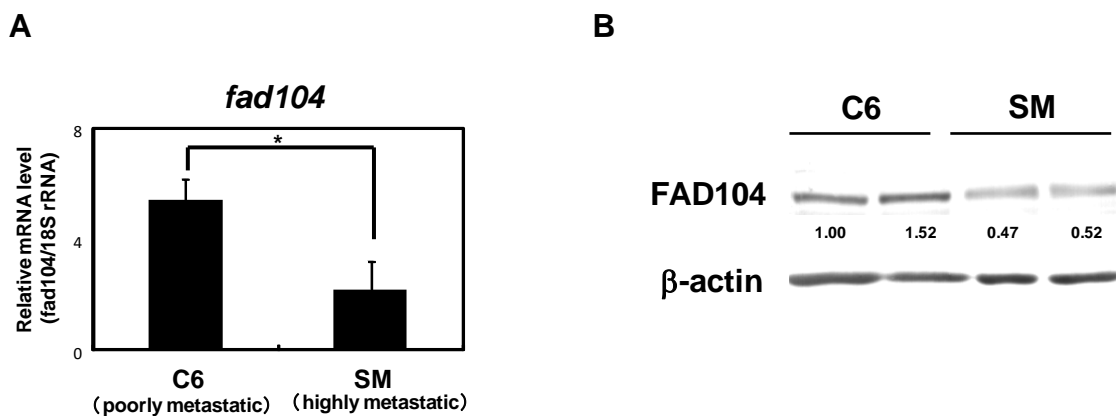
等量のタンパク質 (7.5  $\mu$ g)を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF)膜に、transfer buffer 中で、100 V、2時間氷上で転写した。転写膜は、4% skim milk/TTBS に浸し、4°Cで一晩ブロッキングした。その後、TTBS による洗浄を5分間、3回繰り返した後、一次抗体と4°Cで一晩反応させた。次に、TTBS による洗浄を5分間、3回繰り返した後、二次抗体と室温で2時間反応させた。転写膜を再度 TTBS による洗浄を5分間、3回繰り返した後、BCIP/NBT Phosphatase Substrate を用いて目的のバンドを検出した。

○ 統計処理

Excel 2010 (Microsoft Corp.)を用いて、two-tailed Student's t test により統計処理を行った。

(3) 実験結果

まず、定量 PCR により *fad104* の発現量を検討した結果、高転移性の A375SM 細胞では、低転移性の A375C6細胞と比較し、*fad104* の発現量が有意に低いことが明らかになった (Fig. 3A)。さらに、ウエスタンブロット解析によりタンパク質レベルを検討した結果、A375SM 細胞において FAD104 の発現量が低いことがわかった (Fig. 3B)。これらの結果より、mRNA レベルならびにタンパク質レベルでともに、高転移性の A375SM 細胞では *fad104* の発現量が低いことが明らかになった。



**Fig. 3** The expression level of *fad104* in highly metastatic A375SM cells is lower than that in poorly metastatic A375C6 cells. **A**, The mRNA expression of *fad104* in poorly metastatic A375C6 cells and highly metastatic A375SM cells. *Fad104* mRNA expression in the two cells was examined by qRT-PCR and normalized with 18S rRNA expression. Each column represents the mean with standard deviation (n = 3). \*p < 0.05. **B**, The protein expression of FAD104 in A375C6 cells and A375SM cells. FAD104 protein expression was examined by Western blotting.  $\beta$ -actin expression was used as a control. The ratio of protein level of FAD104/ $\beta$ -actin, as determined by Image J, is shown under each lane.

## 第二節 fad104 がメラノーマ細胞の移動能および浸潤能に与える影響の解析

fad104 がメラノーマ細胞の移動能および浸潤能に与える影響について transwell を用いて検討した。移動能の解析では、細胞の接着性を高めるため fibronectin コートした transwell を用いて検討を行った。浸潤能解析では、基底膜を構成する主要な分子を含む Matrigel でコートした transwell を用いた。

### (1) 実験材料および実験方法

#### 1-1 実験材料

A375C6 細胞 (本学衛生化学分野より供与)  
A375SM 細胞 (本学衛生化学分野より供与)  
A2058 細胞 (JCRB Cell Bank より購入)  
Transwell boyden chamber (Becton Dickinson)  
RPMI-1640 (SIGMA)  
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (ニッスイ)  
FBS (Biowest)  
Lipofectamine™2000 (invitrogen)  
siLuciferase (5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT-3') (ニッポニージーティアー)  
human fad104 siRNA (sifad104-A) (5'-GCAGGUUAUUCUCGUUCAAdTdT-3')  
(ニッポニージーティアー)  
human fad104 siRNA (sifad104-B) (5'-GAAGGGCCCUUCUCAGAAAdTdT-3')  
(ニッポニージーティアー)  
4% paraformaldehyde (PFA) /PBS (-)  
crystal violet (ナカライ)  
Fibronectin, 0.1% Solution, From Bovine plasma (SIGMA)  
BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix (BD Bioscience)

基本培地 : RPMI-1640、5% FBS または DMEM、10% FBS

#### 1-2 実験方法

- A375C6 細胞および A375SM 細胞の培養  
第一章、第一節に準じた。
  
- A2058 細胞の培養  
基本培地 (DMEM、10% FBS)を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub>において培養した。

○ siRNA oligo の作製

ニッポンイージーティーに委託し、*fad104* の ORF 領域内において siRNA の標的配列となる候補を 5 種類得た。5 種類の標的配列が他の遺伝子の発現を抑制しないことを調べるため、ホモロジー検索を行った。各配列を NCBI の Basic BLAST-nucleotide BLAST を用いて検索し、標的配列が *fad104* 以外の遺伝子と 16~17 塩基連続していないことを確認した。5 種類の候補配列のうち特に活性が高いと考えられるものを選択し、ニッポンイージーティーに siRNA oligo の作製を委託した。*sifad104-A* は human *fad104* の ORF 領域内の 108 ~ 126 bp を、*sifad104-B* は human *fad104* の ORF 領域内の 3112 ~ 3130 bp をそれぞれ標的としている。

○ トランスフェクション

A375C6 細胞への siRNA oligo の導入は、Lipofectamine™2000 を用いて行った。細胞を MULTIWELL™ 24 well (FALCON) に  $2 \times 10^4$  cells/well 播種して 24 時間培養後、Lipofectamine™2000 1  $\mu$ l、*sifad104-A* 20 pmol の条件または、Lipofectamine™2000 1  $\mu$ l、*sifad104-B* 40 pmol の条件でトランスフェクションした。その後、37°C、5% CO<sub>2</sub> で 48 時間培養した。

○ アデノウイルスベクターを用いた *fad104* の過剰発現

感染には、既に当研究室において作製済の *fad104* 発現組換えアデノウイルスおよび LacZ 発現コントロールアデノウイルスを用いた。A375SM 細胞をコンプレントまで培養した後、培地を取り除き、RPMI-1640/5% FBS で希釈した 4 次ウイルス液を 35-mm dish に 600  $\mu$ l/dish、MOI=200 となるように加えた。細胞が乾燥しないよう 10 分おきにプレートを振盪させながら、37°C、5% CO<sub>2</sub> において 1 時間感染を行った。その後、基本培地を 35-mm dish に 1.4 ml/dish 加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> において培養した。感染効率は、X-gal 染色により評価した。

○ X-gal 染色

A375SM 細胞を PBS (-) で洗浄後、4% PFA/PBS (-) を加え、室温で 10 分間固定した。その後 PBS (-) で洗浄し、用時調製した染色液 (5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mg/ml X-gal) を加え、37°C で 16 時間インキュベートした。その後、染色液を除き、顕微鏡 (BIOZERO) で観察した。

○ Cell migration assay

8  $\mu$ m の孔を有する transwell に  $2.5 \times 10^4$  cells/well 播種した。細胞の接着性を高めるため、transwell の膜を fibronectin でコートした。37°C、5% CO<sub>2</sub> で 24 時間培養後、transwell を 4% PFA/PBS (-) に室温で 10 分間浸し固定した。PBS (-) で洗浄した後、

transwell の膜の上面に残った細胞を綿棒で取り除いた。その後、0.4% crystal violet/10% ethanol で 5 分間染色し、PBS で 3 回洗浄後、transwell の膜をカッターで切り取った。切り取った膜をスライドガラスにのせ、顕微鏡で任意の 5 視野を観察することで膜を通過した細胞の数を評価した。

○ Cell invasion assay

8  $\mu\text{m}$  の孔を有する transwell に  $1 \times 10^5$  cells/well 播種した。transwell の膜には laminin や collagenIV など基底膜を構成する主要な分子を含む Matrigel をコートした。37°C、5% CO<sup>2</sup> で 24 時間培養後に transwell を 4% PFA/PBS (-) に室温で 10 分間浸し固定した。PBS (-) で洗浄した後、transwell の膜の上面に残った細胞を綿棒で取り除いた。その後、0.4% crystal violet/10% ethanol で 5 分間染色し、PBS で 3 回洗浄後、transwell の膜をカッターで切り取った。切り取った膜をスライドガラスにのせ、顕微鏡で任意の 5 視野を観察することで膜を通過した細胞の数を評価した。

○ 定量 PCR

第一章、第一節に準じた。Matrix metalloproteinase 2 (mmp2) の各プライマーおよびプローブセットは Applied Biosystems より購入した。

<プライマーおよびプローブ>

human mmp2 : Hs00224289\_m1

○ cell lysate の調製

第一章、第一節に準じた。ただし、MULTIWELL™ 24 well (FALCON) から細胞を回収し、Lysis buffer 50  $\mu\text{l}$  を用いて cell lysate を調製した。

○ タンパク定量

第一章、第一節に準じた。

○ SDS-PAGE

第一章、第一節に準じた。

○ Western blot 法

第一章、第一節に準じた。ただし、検出には ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Bioscience) を用いた。

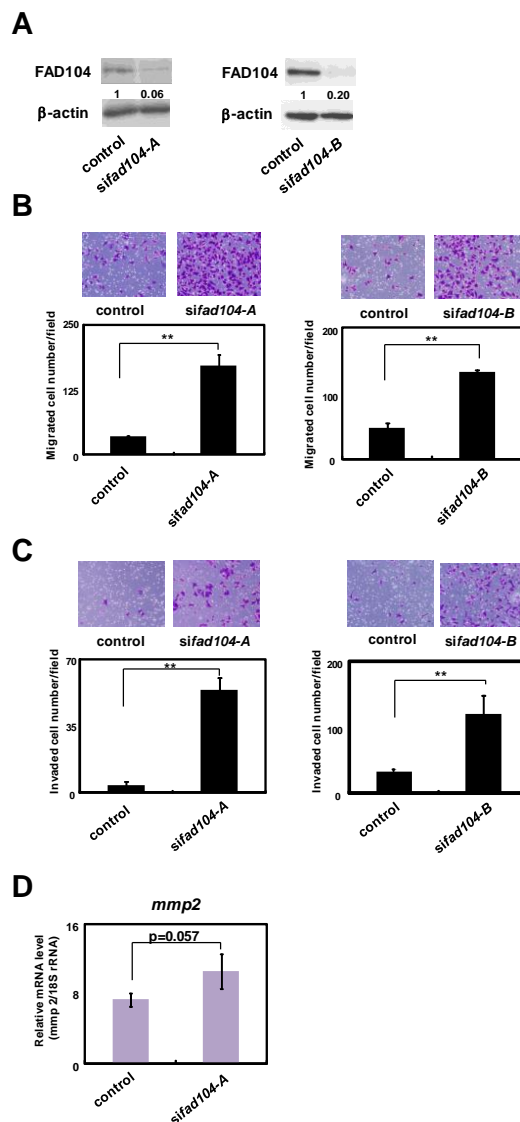
○ 統計処理

## 第一章、第一節に準じた。

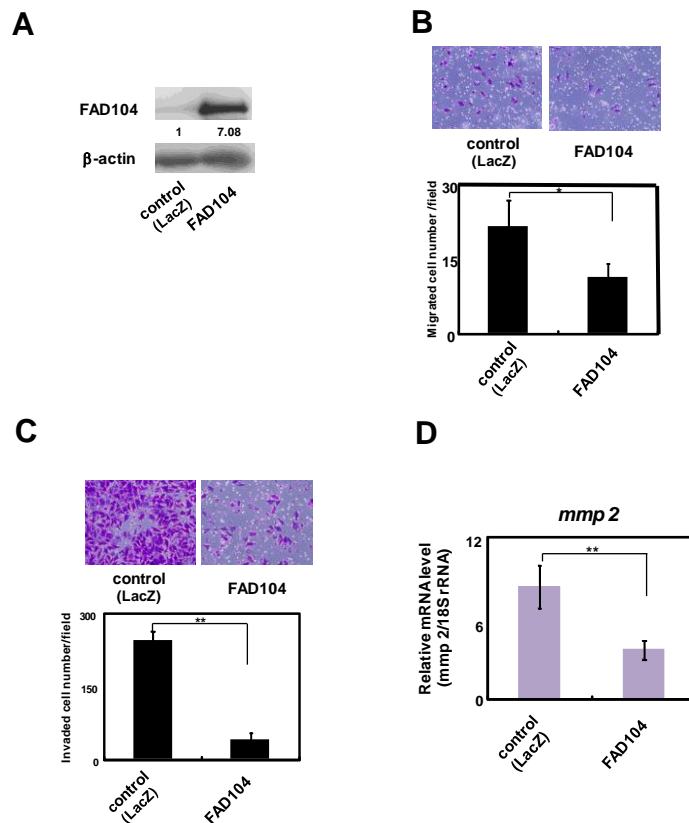
### (2) 実験結果

siRNA oligo を用いた発現抑制およびアデノウイルスを用いた過剰発現実験により、*fad104* がメラノーマ細胞の移動能および浸潤能に与える影響を解析した。まず、*fad104* の発現抑制が A375C6 細胞の移動能ならびに浸潤能に与える影響について検討を行った。標的配列の異なる 2 種類の human *fad104* siRNA oligo (*sifad104-A*, *sifad104-B*) を導入した A375C6 細胞について、*fad104* のタンパク質レベルの発現量を検討した。その結果、*luciferase* siRNA oligo を導入したコントロール細胞と比較し、*sifad104-A* ならびに *sifad104-B* 導入細胞では *fad104* の発現量がいずれも 80% 以上抑制された (Fig. 4A)。この条件で、移動能解析を行った結果、コントロール細胞と比べ、*fad104* 発現抑制細胞では、transwell の膜を通過した細胞の数が有意に増加した (Fig. 4B)。次に、浸潤能を検討した結果、*fad104* 発現抑制細胞では、Matrigel でコートした transwell の膜を通過する細胞の数が有意に増加した (Fig. 4C)。浸潤・転移には matrix metalloproteinase (MMP) ファミリーが重要な役割を担うことが知られている(18)。メラノーマ細胞においては、特に *mmp2* が浸潤・転移に寄与することが報告されていることから、*mmp2* の発現量を検討した (19)。その結果、*fad104* 発現抑制細胞では、コントロール細胞と比べ *mmp2* の発現量が高い傾向が見られた (Fig. 4D)。

次に、*fad104* の過剰発現が高転移性の A375SM 細胞の移動能ならびに浸潤能に与える影響を解析した。FAD104 の過剰発現にはアデノウイルスを用いた。まず、FAD104 の過剰発現効果をウエスタンブロット解析により検討した (Fig. 5A)。FAD104 を過剰発現した細胞を用いて、移動能および浸潤能を評価した。その結果、*LacZ* 発現アデノウイルスを感染させたコントロール細胞と比較し、FAD104 過剰発現細胞では、移動能および浸潤能が低下することが明らかになった (Figs. 5B, C)。さらに、FAD104 過剰発現細胞では、コントロール細胞と比較し、*mmp2* の発現量が有意に低いこともわかった (Fig. 5D)。これらの結果より、*fad104* の過剰発現により、A375SM 細胞の移動能および浸潤能が抑制されることが明らかになった。



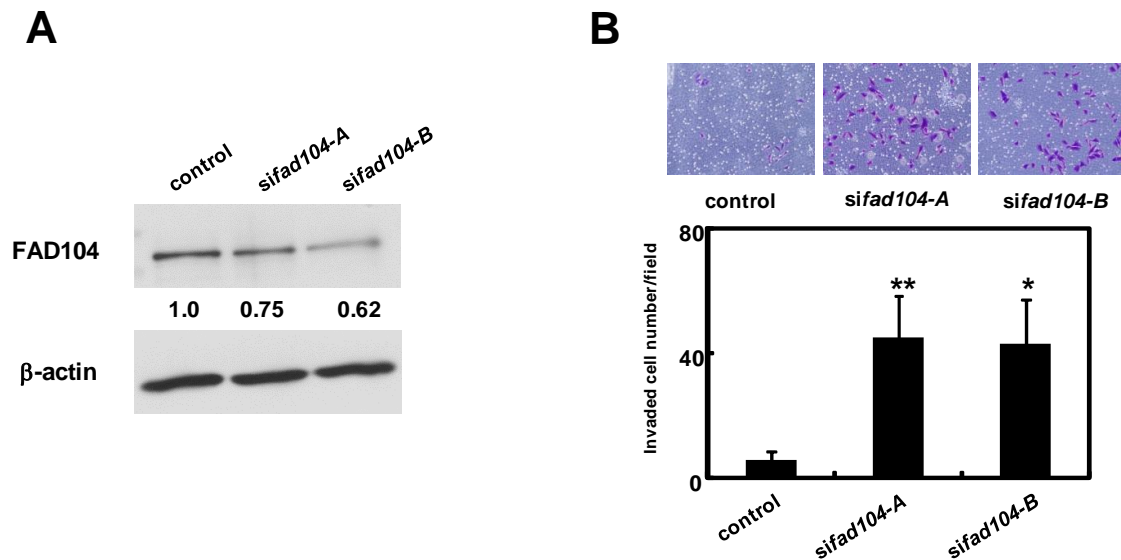
**Fig. 4 Reduction of *fad104* facilitates migration and invasion of A375C6 cells.** **A**, Knockdown efficiency of *fad104* in A375C6 cells. A375C6 cells were transfected with two different siRNAs targeting *fad104* (*sifad104-A*, *sifad104-B*). Luciferase siRNA was used as a control. FAD104 protein expression was examined by Western blotting.  $\beta$ -actin expression was used as a loading control. The ratio of protein level of FAD104/ $\beta$ -actin, as determined by Image J, is shown under each lane. **B**, Transwell migration assay of *fad104* knockdown A375C6 cells and control cells. A total of  $2.5 \times 10^4$  cells were plated in the upper chamber of the filters that had been coated with fibronectin. Cells that migrated to the underside of the transwell insert were measured after 24 hr. Representative images of migrated cells are shown (upper panel). The mean number of migrated cells in the field was calculated (lower panel). **C**, Transwell invasion assay of A375C6 cells transfected with *fad104*siRNAs. A total of  $1 \times 10^5$  cells were plated in the upper chamber of the filters that had been coated with Matrigel. The cells that invaded the underside of the transwell insert were measured after 24 hr. Representative images of invaded cells are shown (upper panel). The mean number of invaded cells in the field was calculated (lower panel). **D**, The expression levels of *mmp2* mRNA in A375C6 cells transfected with *sifad104-A* were determined by qRT-PCR and normalized with 18S rRNA expression. Each column represents the mean with standard deviation ( $n = 3$ ). \*\* $p < 0.01$ .



**Fig. 5 Over-expression of FAD104 inhibits migration and invasion of A375SM cells.** **A**, FAD104 over-expression in A375SM cells. A375SM cells were infected with FAD104 or LacZ (MOI = 200). FAD104 protein expression was determined by Western blotting.  $\beta$ -actin expression was used as a loading control. The ratio of protein level of FAD104/ $\beta$ -actin, as determined by Image J, is shown under each lane. **B**, Transwell migration assay of FAD104 over-expressing A375SM cells and control cells. Cells that migrated to the underside of the transwell insert were measured after 24 hr. Representative images of migrated cells are shown (upper panel). The mean number of migrated cells in the field was calculated (lower panel). **C**, Transwell invasion assay of A375SM cells over-expressing FAD104. A total of  $1 \times 10^5$  cells were plated in the upper chamber of the filters that had been coated with Matrigel. The cells that invaded the underside of the transwell insert were measured after 36 hr. Representative images of invaded cells are shown (upper panel). The mean number of invaded cells in the field was calculated (lower panel). **D**, The expression levels of *mmp2* mRNA in A375SM cells over-expressing FAD104 were determined by qRT-PCR and normalized with 18S rRNA expression. Each column represents the mean with standard deviation (n = 3). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

次に、*fad104* が A375 細胞に限らず、他のメラノーマ細胞においても浸潤能を制御するかどうか明らかとするため、高転移性ヒトメラノーマ細胞 A2058 を用いて浸潤能解析を行った。*sifad104-A* または *sifad104-B* を細胞に導入し *fad104* を発現抑制した (Fig. 6A)。その結果、*fad104* 発現抑制細胞では、A375C6 細胞と同様に、浸潤した細胞の数が有意に増加した (Fig. 6B)。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抑制することが明らかになった。





**Fig. 6 Reduction of *fad104* promotes invasion of A2058 cells.** **A**, Knockdown efficiency of *fad104* in A2058 cells. A2058 cells were transfected with two different siRNAs targeting *fad104* (*sifad104-A*, *sifad104-B*). Luciferase siRNA was used as a control. FAD104 protein expression was examined by Western blotting.  $\beta$ -actin expression was used as a loading control. The ratio of protein level of FAD104/ $\beta$ -actin, as determined by Image J, is shown under each lane. **B**, Transwell invasion assay of A2058 cells transfected with *fad104*siRNAs. A total of  $2.5 \times 10^4$  cells were plated in the upper chamber of the filters that had been coated with Matrigel. The cells that invaded the underside of the transwell insert were measured after 24 hr. Representative images of invaded cells are shown (upper panel). The mean number of invaded cells in the field was calculated (lower panel). Each column represents the mean with standard deviation ( $n = 3$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

### 第三節 *fad104* が乳がん細胞の浸潤能に与える影響の解析

メラノーマ細胞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明らかにするため、高転移性のヒト乳がん由来 MDA-MB-231 細胞を用いて検討を行った。

#### (1) 実験材料および実験方法

##### 1-1 実験材料

MDA-MB-231 細胞 (本学細胞情報学分野より供与)

Transwell boyden chamber (Becton Dickinson)

DMEM (ニッスイ)

FBS (Biowest)

PBS (-)

4% PFA/PBS (-)

0.25% trypsin/0.02% EDTA

0.4% crystal violet/10% ethanol

BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix (BD Bioscience)

基本培地 : DMEM、10% FBS

## 1-2 実験方法

### ○ MDA-MB-231 細胞の培養

基本培地 (DMEM、10% FBS)を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub>において培養した。

### ○ アデノウイルスベクターを用いた ad fad104 の感染

第一章、第二節に準じた。

### ○ Cell invasion assay

第一章、第二節に準じた。

### ○ cell lysate の調製

第一章、第二節に準じた。

### ○ タンパク定量

第一章、第一節に準じた。

### ○ SDS-PAGE

第一章、第一節に準じた。

### ○ Western blot 法

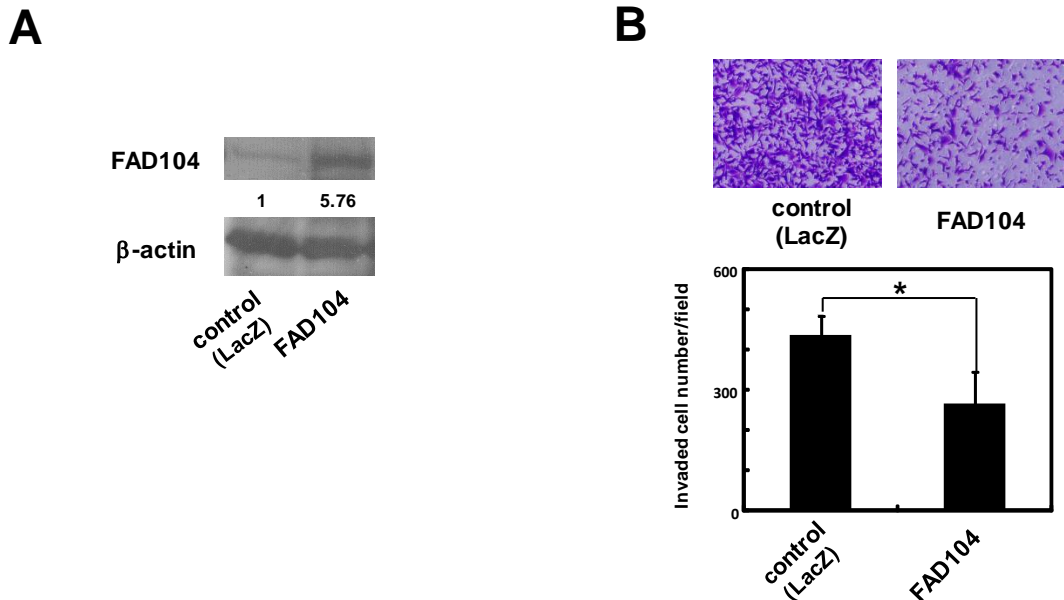
第一章、第二節に準じた。

### ○ 統計処理

第一章、第一節に準じた。

## (2) 実験結果

MDA-MB-231細胞にアデノウイルスを用いて fad104を過剰発現し、浸潤能を検討した。まず、fad104 の過剰発現効果をウエスタンブロッティング解析により評価した結果、fad104が過剰発現していることが確認された (Fig. 7A)。この細胞を Matrigel コートした transwell に播種した結果、コントロール細胞と比較し、膜を通過した細胞の数が有意に減少した (Fig. 7B)。この結果より、fad104 はメラノーマ細胞にとどまらず、乳がん細胞においても浸潤能を抑制することが明らかになった。



**Fig. 7 Over-expression of FAD104 negatively regulates invasion of MDA-MB-231 cells.** *A*, FAD104 over-expression in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were infected with FAD104 or LacZ (MOI = 200). FAD104 protein expression was determined by Western blotting.  $\beta$ -actin expression was used as a loading control. The ratio of protein level of FAD104/ $\beta$ -actin, as determined by Image J, is shown under each lane. *B*, Transwell invasion assay of MDA-MB-231 cells over-expressing FAD104. A total of  $1 \times 10^5$  cells were plated in the upper chamber of the filters that had been coated with Matrigel. The cells that invaded the underside of the transwell insert were measured after 24 hr. Representative images of invaded cells are shown (upper panel). The mean number of invaded cells in the field was calculated (lower panel). \* $p < 0.05$ ,

#### 第四節 fad104 がメラノーマ細胞の足場非依存的増殖能に与える影響の解析

がん細胞の転移のプロセスには、移動能および浸潤能に加え、足場非依存的増殖の変化が重要な役割を担うことが知られている (20)。そこで、fad104 がメラノーマ細胞における足場非依存的増殖に寄与するか否か検討を行った。

##### (1) 実験材料および実験方法

###### 1-1 実験方法

B16F10 細胞 (理研 Cell Bank より購入)

RPMI-1640 (SIGMA)

DMEM (ニッスイ)

FBS (Biowest)

G418 (ナカライ)

Lipofectamine™2000 (SIGMA)

SeaPlaque Agarose (Combrex)

## Crystal violet (ナカライ)

### 1-2 実験方法

#### ○ B16F10 細胞の培養

基本培地 (RPMI-1640、10% FBS)を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub>において培養した。

#### ○ fad104 安定発現細胞の作製

##### トランスフェクション

B16F10 細胞への遺伝子導入は、Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 を用いて行った。細胞を 60-mm dish に  $8 \times 10^5$  cells/dish で播種して 24 時間培養した。その後、Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 32  $\mu$ l、pCMV7.1-3xFLAG-fad104 発現プラスミド 3.2  $\mu$ g および GFP 発現プラスミド 3.2  $\mu$ g の条件でトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後にトリプシンを用いて細胞をはがし、段階希釈した (1/100, 1/1,000, 1/10,000, 1/100,000)。その翌日より、G418 (400  $\mu$ g/ml)含有の基本培地に交換し、37°C、5% CO<sub>2</sub>において培養した。

##### 形成したコロニーの選択

トランスフェクションから 3 週間後、形成されたコロニーをトリプシンを含ませたろ紙を用いてプレートからはがし、6 well プレートへ移した。移した細胞は、その後 60-mm dish に植え継いだ後、細胞ストック用ならびに cell lysate 調製用に再び 60-mm dish に播き直した。

#### ○ ソフトアガロースアッセイ

1% SeaPlaque Agarose (Combrex)と 20% FBS 2xDMEM を混ぜ、終濃度 0.5% の agarose 培地を 35-mm dish プレートに 1 ml 加えた後、4°C に静置して固めた (Bottom Agarose)。1.05% SeaPlaque Agarose、20% FBS 2xDMEM および 10% FBS 1xDMEM を混ぜ、終濃度 0.35%の agarose 培地を作製し、 $2.5 \times 10^3$  cells/1.5 ml の条件で Bottom Agarose 上加えた (Top Agarose)。15 日間 37°C、5% CO<sub>2</sub>において培養した後、0.01% crystal violet/10% ethanol で 1 時間染色し、PBS (-)で 3 回洗浄した。その後、形成されたコロニーの数を計測した。

#### ○ cell lysate の調製

第一章、第一節に準じた。ただし、60-mm dish (Becton Dickinson) から細胞を回収し、Lysis buffer 300  $\mu$ l を用いて cell lysate を調製した。

#### ○ タンパク定量

第一章、第一節に準じた。

○ SDS-PAGE

第一章、第一節に準じた。

○ Western blot 法

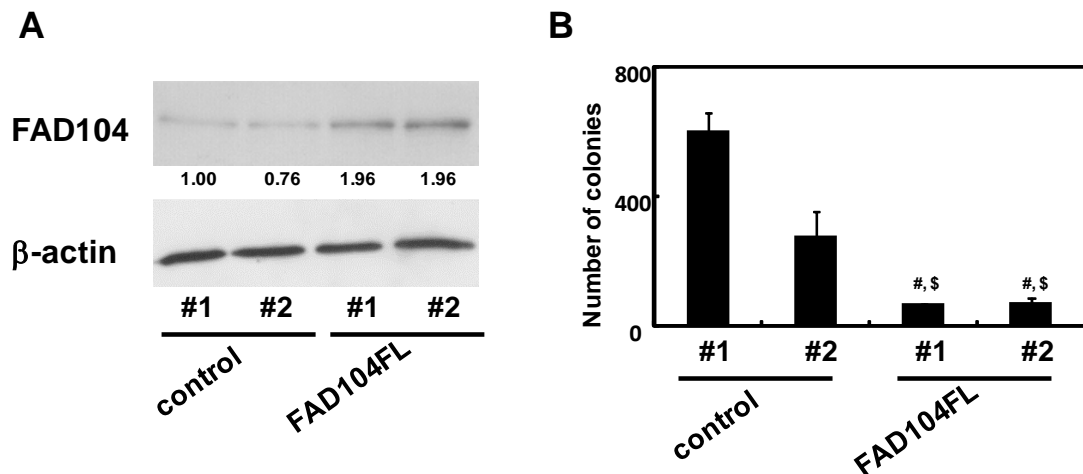
第一章、第二節に準じた。ただし、タンパク質は 5  $\mu$ g を用いた。

○ 統計処理

R (<http://cran.r-project.org/>)を用いて、one-way ANOVA with *posthoc* Tukey-Kramer HSD test により統計処理を行った。

(2) 実験結果

fad104 が足場非依存的増殖能に寄与するか否か検討するため、まず、マウスメラノーマ由来 B16F10 細胞を用いて fad104 安定発現細胞を作製した。fad104 安定発現細胞における fad104 の発現量をウエスタンブロット解析により評価した結果、コントロール細胞と比較し、2 倍程度 fad104 が過剰発現されていた (Fig. 8A)。次に、空ベクターを導入したコントロール 2 クローン (control #1, #2) ならびに fad104 安定発現細胞 2 クローン (FAD104 #1, #2) を用いてソフトアガロースアッセイを行った。その結果、コントロールと比較し、fad104 安定発現細胞では、ソフトアガロース培地上に形成されたコロニーの数が有意に減少した (Fig. 8B)。この結果より、fad104 はメラノーマ細胞の足場非依存的増殖能を阻害することが明らかになった。



**Fig. 8 Over-expression of FAD104 inhibits colony forming activity of B16F10 cells.** **A**, The protein expression of FAD104 in B16F10 cells stably expressing FAD104. FAD104 protein expression levels in FAD104-over-expressing cells (FAD104 #1, #2) and control cells (control #1, #2) were assessed by Western blotting.  $\beta$ -actin expression was used as a control. The ratio of protein level of FAD104/ $\beta$ -actin, as determined by Image J, is shown under each lane. **B**, Effect of over-expression of FAD104 on anchorage-independent growth of B16F10 cells. B16F10 cells ( $2.5 \times 10^3$ ) derived from independent stable transformants were seeded in soft agarose in a 35-mm plate. After 15 days, the colonies were stained with 0.01% crystal violet and colony numbers were counted in each plate. Each bar shows the mean  $\pm$  standard deviation (n = 3). # denotes differences between the control #1 group and FAD104 #1 or FAD104 #2 group. \$ denotes differences between the control #2 group and FAD104 #1 or FAD104 #2 group. #, \$ p < 0.01.

#### 第五節 fad104 がメラノーマ細胞の転移能に与える影響の解析

これまでの検討により、fad104 は転移のプロセスに重要な移動能、浸潤能ならびに足場非依存的増殖能を負に制御することが明らかになった。そこで次に、転移モデルを用いて、がん細胞の肺転移に fad104 が与える影響について検討した。

##### (1) 実験材料および実験方法

###### 1-1 実験材料

B16F10 細胞 (理研 Cell Bank より購入)

C57BL/6J マウス (CHARLES RIVER)

ペトリ皿

Bouin's 液 (SIGMA)

PBS (-)

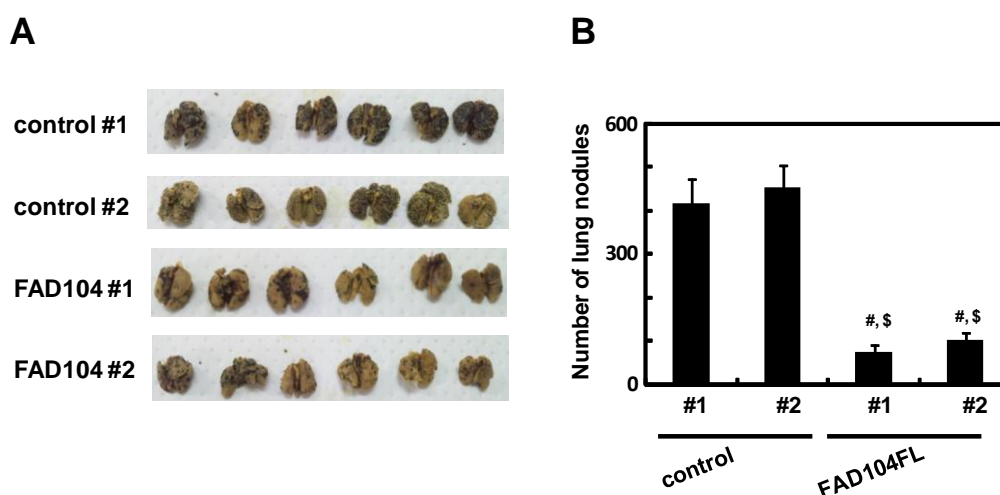
基本培地 : RPMI-1640、10%FBS

###### 1-2 実験方法

- fad104 安定発現細胞の培養  
基本培地 (RPMI1640、10% FBS、G418) を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> において培養した。
- メラノーマ細胞の尾静脈注射  
6週齢の C57BL/6J 雌マウスの尾静脈にコントロールまたは fad104 安定発現細胞を 1x10<sup>6</sup> cells 注入した。その後 15 日間飼育し、肺を摘出した。
- 転移したコロニーの計測  
摘出した肺を、PBS (-) で洗浄した。その後 Bouin's 液に一晩浸し、固定を行った。翌日、PBS (-) で洗浄を行い、肺表面に形成されたコロニーの数を計測した。
- 統計処理  
第一章、第四節に準じた。

## (2) 実験結果

コントロール細胞または fad104 安定発現細胞をマウスに尾静脈注射し、15 日後に肺を摘出した。摘出した肺を Bouin's 液で固定した後、肺表面に形成されたコロニーの数を計測した。その結果、コントロール細胞と比較し、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 (Fig. 9)。この結果より、fad104 はメラノーマ細胞の転移能を抑制することが明らかになった。



**Fig. 9 Over-expression of FAD104 suppresses metastasis of B16F10 cells.** *A*, Appearance of murine lungs 15 days after injection of FAD104 over-expressing cells and control cells through the tail vein of 6-week-old mice. *B*, The quantification data of number of surface colonies is shown in right panel. Each column represents the mean with standard error (n = 6). Statistical analysis was conducted using one-way ANOVA with Tukey-Kramer HSD test. # denotes differences between the control #1 group and FAD104 #1 or FAD104 #2 group. \$ denotes differences between the control #2 group and FAD104 #1 or FAD104 #2 group. #, \$ p < 0.01.

## 第六節 考察および小括

### (1) 考察

がんは世界的に死亡原因の上位を占める疾患であり、致死率を高める主な要因として浸潤・転移が挙げられる。がん細胞の転移は複雑なプロセスから構成されており、1) 原発巣からの解離 2) 細胞外基質、基底膜への移動・浸潤 3) 血管内への侵入および循環 4) 標的臓器への生着ならびに増殖から成る (21)。これらのステップには細胞接着、移動および増殖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 (1-3)、その全容が解明されているとは言い難い。

本研究により、*fad104* ががん細胞の転移を負に制御することが明らかになった。また、*fad104* はがん細胞の足場非依存的増殖、移動能、ならびに浸潤能を抑制することを明らかにした。これらの結果より、*fad104* は浸潤・転移に重要なプロセスである足場非依存的増殖、移動能を阻害することによりがん細胞の浸潤・転移を抑制すると考えられる。

転移促進因子である *tenascin-C* がメラノーマ細胞において高発現していることや、転移性メラノーマ細胞では *RhoA*、*RhoC* の発現量が高いなど、メラノーマを含む種々のがん細胞では、浸潤・転移に関与する遺伝子の発現量のがんの進行に伴い変化することが知られている (22, 23)。本研究により、高転移性の A375SM 細胞において *fad104* の発現量が低いことが明らかとなった。このことは、がん細胞の進行と *fad104* の発現量が負の相関を示す可能性を示唆するものである。今後、転移性の異なる複数のメラノーマ細胞ならびに進行ステージの異なるメラノーマにおける *fad104* の発現量を比較検討し、*fad104* とがんの進行との相関性についてより詳細に解明していく必要がある。

当研究室では、*fad104* が脂肪細胞および骨細胞の分化、ならびに肺の器官形成を制御することを明らかにしている。*Fad104* が制御するこれらの多彩な生命現象において、*fad104* の発現量は、脂肪細胞分化過程において上昇し、逆に、骨細胞分化過程では低下することを報告している (12, 14)。さらに、肺では発生の後期過程において *fad104* の発現量が増加する (13)。これらのことから、*fad104* の機能はその発現の調節により制御される可能性が考えられる。しかしながら、*fad104* の発現制御機構はこれまでに明らかになっていない。メラノーマ細胞の浸潤・転移に関連する遺伝子の発現を制御する転写因子群として p53 ファミリー、NF- $\kappa$ B、activating transcription factor-1/2 (ATF-1/2)、cAMP-responsive element-binding protein (CREB)ならびに activator protein-2 $\alpha$  (AP-2 $\alpha$ )などが報告されていることから (24-28)、今後、*fad104* のプロモーター領域の同定および解析により、これらの転写因子群により *fad104* の発現が制御されるか否か検討していく必要がある。

がんの浸潤過程においては基底膜ならびに細胞外基質の分解が必要である。MMP は金属イオンが活性中心に結合する特徴をもつタンパク分解酵素であり、細胞外基質の分解に関与することから、がんの浸潤・転移との関係について多数報告されている (18, 29-31)。基底膜に特異的に存在する基質として IV 型コラーゲンがある。IV 型コラーゲンを特異的に



分解する酵素として MMP2 および MMP9 が報告されており、MMP2、9 はその発現および活性が様々ながんの浸潤・転移に関与することが知られている (29, 32)。メラノーマにおいても MMP2、9 が浸潤能および転移能の亢進に関与しているとの報告がなされている (19, 33)。本研究において、*mmp9* についても定量 PCR により発現量を検討したが、理由は不明であるが、検出ができなかった。*mmp2* の発現量は、*fad104* を発現抑制した A375C6 細胞においてわずかに高い傾向が見られた (Fig. 4D)。さらに、A375SM 細胞において *fad104* を過剰発現した結果、コントロール細胞と比較し、*mmp2* の発現量が有意に低いことが明らかになった (Fig. 5D)。これらの結果より、*fad104* は *mmp2* の発現を抑制することにより浸潤・転移を負に制御する可能性が考えられる。メラノーマ細胞では、*mmp2* に加え、*mmp1*、*mmp14* も浸潤能の亢進に関与していることから (18)、今後、*mmp2* 以外の *mmp* ファミリーの発現量に *fad104* が与える影響について検討することにより、がん細胞の浸潤・転移におけるより詳細な *fad104* の役割の解明につながると考えられる。

本研究において、*fad104* がメラノーマ細胞だけに限らず、乳がん細胞においても浸潤能を負に制御することを明らかとした。この結果より、*fad104* は様々ながん種において浸潤能の制御に関与している可能性が示唆された。タンパク質発現データベース The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>) では、*fad104* は正常細胞と比較し、すい臓がんや腎臓がんにおいて発現が低いことが報告されている。今後、これらのがん細胞株を用いて、*fad104* がメラノーマや乳がん細胞以外のがん細胞においても浸潤能を制御するか検討することにより、複数のがん種における *fad104* の役割について解明していく必要がある。乳がん細胞は、肺への転移に加え、骨にも転移する。本章の検討結果より、*fad104* は高転移性乳がん細胞 MDA-MB-231 細胞の浸潤能を抑制することが明らかとなったが、転移に寄与するか否かは不明である。そこで今後、転移モデルを用いた肺転移、およびマウス左心室腔内にがん細胞を注射することによる骨転移モデルを用いた解析により、*fad104* が乳がん細胞の転移能にも寄与するか否か検討することが重要である。

生体におけるがんは原発巣において足場非依存的増殖能が亢進し、腫瘍を形成するとともに転移プロセスが促進する。本研究において、*fad104* は足場非依存的増殖能を抑制することを明らかにした。さらに、*in vitro* ならびに転移モデルを用いた検討結果より、*fad104* ががん細胞の浸潤・転移を抑制することが明らかになった。しかしながら、*in vivo* における腫瘍形成に *fad104* が関与するか否か不明である。また、本研究で用いた転移モデルは脈管内に侵入後の転移過程を模倣しており、原発巣からの遠隔転移については評価できていない。そこで今後、がん細胞の皮下移植により、*fad104* ががん細胞の腫瘍形成に寄与するか検討するとともに、鼠径部や皮下への同所移植実験を用いた自然転移モデルにより、がん細胞の転移能に *fad104* が与える影響についてより詳細な検討を行っていく必要がある。

(2) 小 括

1. 高転移性 A375SM 細胞では、低転移性の A375C6 細胞と比較し、fad104 の発現量が低い。
2. fad104 はメラノーマ細胞の移動能ならびに浸潤能を負に制御する。
3. fad104 は乳がん細胞の浸潤能を負に制御する。
4. fad104 はメラノーマ細胞の足場非依存的増殖能を負に制御する。
5. fad104 はメラノーマ細胞の転移能を負に制御する。

## 第二章 fad104 が STAT3 シグナルを制御する分子機構の解析

### 第一節 fad104 が制御するシグナル伝達経路の同定

これまでの検討により、fad104 ががん細胞の浸潤・転移を負に制御することを明らかにした。そこで次に、がん細胞の浸潤・転移過程において fad104 が制御するシグナル伝達経路の同定を目指した。がん細胞の浸潤・転移には BMP-Smad 経路、transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )-Smad 経路および Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT)経路などが重要な役割を担うことが知られている (34-36)。そこで、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。

#### (1) 実験材料および実験方法

##### 1-1 実験材料

A375SM 細胞 (本学衛生化学分野より供与)

RPMI1640 (SIGMA)

BMP2 (peprotech)

TGF $\beta$  (R&D system)

FBS (Biowest)

PBS (-)

0.25% trypsin/0.02% EDTA

RIPA buffer : 150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、1% NP40、0.1% SDS、0.5% deoxychorate、phosphatase inhibitor cocktail (1 ml につき 10  $\mu$ l 使用)、protease inhibitor cocktail (1 ml につき 1  $\mu$ l 使用)

Nonfat dry milk (Cell Signaling)

Polyvinylidene difluoride (PVDF)膜

Rabbit anti-human phospho-Smad1 (Ser463/465)/Smad5 (Ser463/465)/Smad8 (Ser426/428) polyclonal antibody (5% BSA/TTBS で 500 倍希釈) (Cell Signaling)

Rabbit anti-human Smad1/5/8 polyclonal antibody (5% BSA/TTBS で 200 倍希釈) (SANTA CRUZ)

Rabbit anti-phospho-Smad3 (Ser423/425) monoclonal antibody (5% BSA/TTBS で 2,000 倍希釈) (Cell Signaling)

Rabbit anti-human Smad3 polyclonal antibody (5% BSA/TTBS で 500 倍希釈) (Cell Signaling)

Rabbit anti-phospho-STAT3 (Tyr705) monoclonal antibody (5% BSA/TTBS で 1,000 倍希釈) (Cell Signaling)

Rabbit anti-mouse STAT3 polyclonal antibody (5% BSA/TTBS で 1,000 倍希釈) (SANTA CRUZ)

Rabbit anti-mouse FAD104 polyclonal antibody (5% BSA/TTBS で 400 倍希釈) (SIGMA GENOSYS)

Mouse anti-mouse  $\beta$ -actin monoclonal antibody (5% BSA/TTBS で 100,000 倍希釈) (SIGMA)

Donkey anti rabbit IgG conjugated HRP (PBST で 10,000 倍希釈) (Cell Signaling)

Sheep anti mouse IgG conjugated HRP (PBST で 10,000 倍希釈) (Amersham Bioscience)

TTBS : 150 mM NaCl、10 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.1% Tween20

Transfer buffer: 25 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane、192 mM glycine、20% methanol

ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Bioscience)

基本培地 : RPMI-1640、5% FBS

## 1-2 実験方法

### ○ A375SM 細胞の培養

第一章、第一節に準じた。

### ○ アデノウイルスベクターを用いた fad104 の過剰発現

第一章、第二節に準じた。

### ○ BMP2 刺激

アデノウイルスを感染させてから 24 時間後に培地交換を行い、4 時間無血清培地で培養した。その後、100 ng/ml BMP2 含有培地で 0.5、1、1.5、2、4 時間培養した。

### ○ TGF- $\beta$ 刺激

アデノウイルスを感染させてから 24 時間後に培地交換を行い、4 時間無血清培地で培養した。その後、1 ng/ml TGF $\beta$  含有培地で 15、30、60 分培養した。

### ○ 5% FBS による血清刺激

アデノウイルスを感染させてから 24 時間後に培地交換を行い、4 時間無血清培地で培養した。その後、5% FBS 含有培地で 0.5、1、2、4 時間培養した。

### ○ cell lysate の調製

第一章、第一節に準じた。ただし、35-mm dish (Becton Dickinson)から細胞を回収し、RIPA buffer 150  $\mu$ l を用いて cell lysate を調製した。

### ○ タンパク定量

第一章、第一節に準じた。

○ SDS-PAGE

第一章、第一節に準じた。

○ Western blot 法

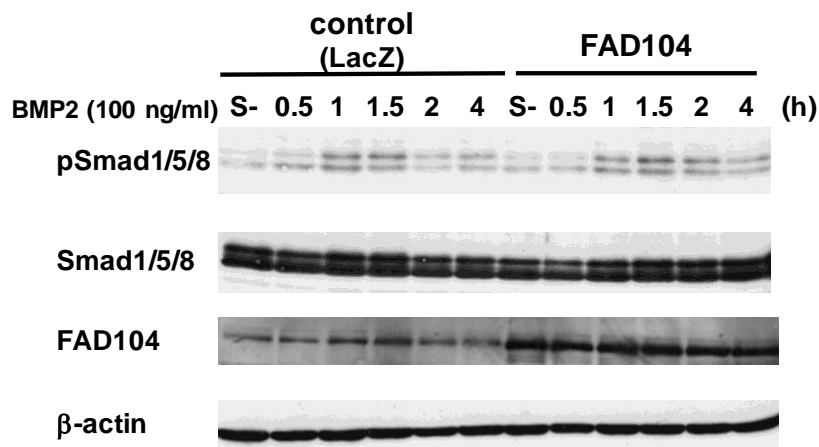
第一章、第四節に準じた。

○ 統計処理

第一章、第一節に準じた。

(2) 実験結果

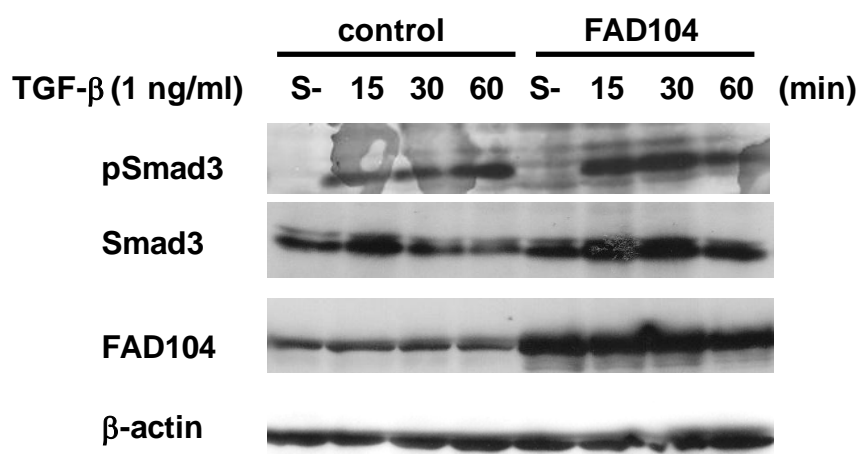
当研究室では、骨細胞分化過程において *fad104* が BMP/Smad 経路を抑制することを明らかにしている (15)。BMP2 はメラノーマ細胞において高発現していることやメラノーマを始めとする種々のがん細胞において、浸潤・転移を亢進することが報告されている (34, 37, 38)。そこでまず、*fad104* ががん細胞において BMP/Smad 経路の制御に関与するか否か検討を行った。A375SM 細胞にアデノウイルスを用いて *fad104* を過剰発現させた。その後、100 ng/ml の BMP2 を添加し、Smad1/5/8 のリン酸化レベルを評価した。その結果、コントロール細胞と FAD104 過剰発現細胞で Smad1/5/8 のリン酸化レベルに差は見られなかった (Fig. 10)。



**Fig. 10** The phosphorylation levels of Smad1/5/8 in A375SM cells infected with adenoviruses expressing FAD104 or LacZ. The phosphorylation levels of Smad1/5/8 and protein levels of total Smad1/5/8 at indicated points after BMP2 (100 ng/ml) treatment were detected by Western blotting. LacZ-expressing viruses were used for infection control. β-actin expression was used as a loading control.

TGFβは BMP と同じく TGFβ super family に属する増殖因子である。TGFβは主に Smad2/3

のリン酸化を誘導する。がんの進行初期において、TGFβは増殖を抑制したり、アポトーシスを促すことでがんの進展を抑制する。一方、がんの悪性化が進んだ状態では、浸潤・転移を促進する因子として機能することが報告されている (36, 39)。また、メラノーマ細胞株を用いた検討においても、TGFβは浸潤能を促進することが知られている (40)。そこで、fad104 が TGFβ-Smad 経路を制御するか検討を行った。FAD104 を過剰発現させた A375SM 細胞に TGFβを添加し、Smad3 のリン酸化レベルを評価した。その結果、コントロール細胞と FAD104 過剰発現細胞で Smad3 のリン酸化レベルに大きな差は見られなかった (Fig. 11)。



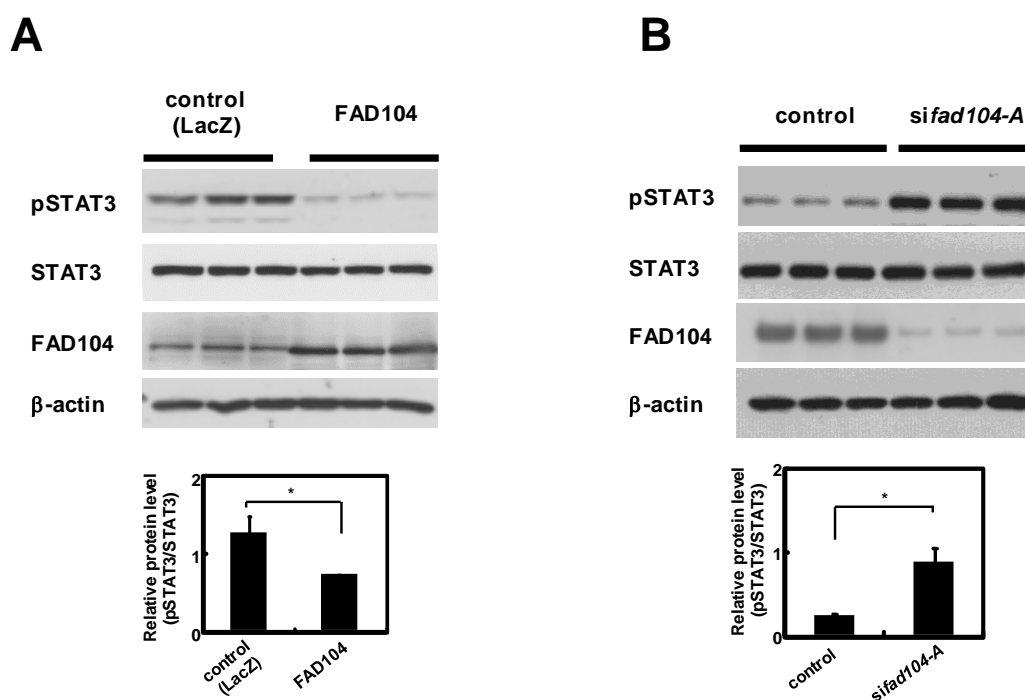
**Fig. 11 The phosphorylation levels of Smad3 in A375SM cells infected with adenoviruses expressing FAD104 or LacZ.** The phosphorylation levels of Smad3 and protein levels of total Smad3 at indicated points after TGFβ (1 ng/ml) treatment were detected by Western blotting. LacZ-expressing viruses were used for infection control. β-actin expression was used as a loading control.

JAK-STAT 経路は IL6 を始めとする様々なサイトカインや増殖因子により活性化される (41-43)。STAT は哺乳類において 1, 2, 3, 4, 5a, 5b および 6 の 7 種類存在するが、その中でも STAT3, 5 は、がんの浸潤・転移と相関性が高いことが報告されている (41, 44)。特に、メラノーマ細胞では、STAT3 が恒常的に活性化されていることが知られている (45)。加えて、STAT3 の活性化は浸潤・転移を促進することも報告されている (46)。そこで、FAD104 の過剰発現が STAT3 のリン酸化に与える影響について検討を行った。その結果、STAT3 のタンパク質量には影響が見られない一方で、STAT3 のリン酸化レベルは FAD104 の過剰発現により有意に低下していた (Fig. 12A)。逆に、siRNA を用いて fad104 を発現抑制した結果、コントロール細胞と比較し、STAT3 のリン酸化レベルが有意に亢進した (Fig. 12B)。

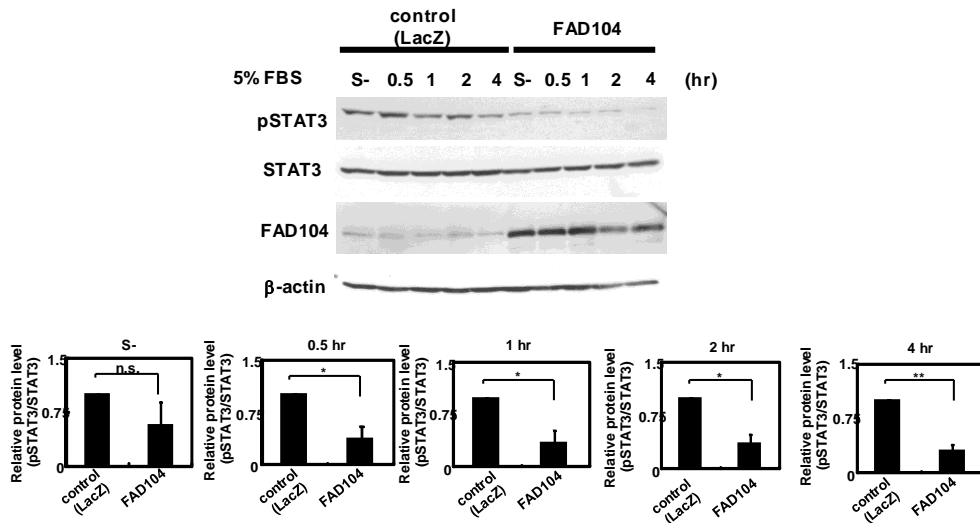
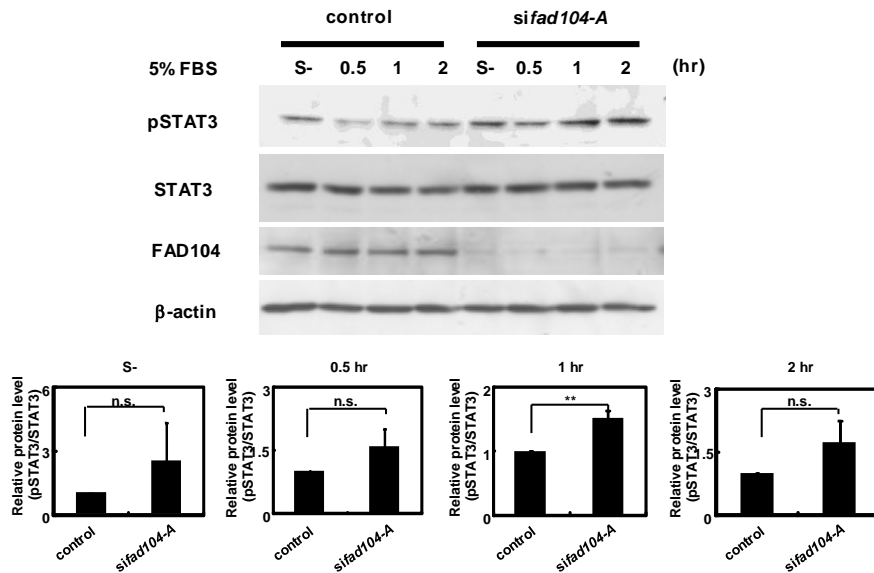
浸潤能の測定実験においては、transwell chamber の下側に 5% FBS を含んだ培地を用意し、chamber の上側に無血清培地で懸濁した細胞を播種する。transwell の上部に存在する細胞は下側からの血清に誘引され、浸潤する。このことを考慮すると、メラノーマ細胞が Matrigel 内を浸潤する際には、血清による何らかのシグナル伝達経路が活性化されることが必要で

あると考えられる。そこで次に、血清刺激時における STAT3 のリン酸化レベルを検討した。

アデノウイルスを感染させてから 24 時間後に培地を交換し、さらに 4 時間無血清培地で培養した。その後、5% FBS 含有培地で 0.5、1、2、4 時間培養し、STAT3 のリン酸化レベルを検討した。コントロール細胞では、FBS 刺激により STAT3 のリン酸化レベルが亢進した。total STAT3 の発現レベルはコントロール細胞と FAD104 過剰発現細胞において差が見られなかったが、STAT3 のリン酸化レベルは FAD104 の過剰発現により、いずれの時間においても有意に低いことがわかった (Fig. 13A)。次に、*fad104* 発現抑制細胞に血清刺激を行い、刺激後 0.5、1、2 時間における STAT3 のリン酸化レベルを検討した。その結果、*fad104* 発現抑制細胞では、いずれの時間においても STAT3 のリン酸化レベルが増加し、特に、血清刺激後 1 時間における STAT3 のリン酸化レベルは有意に亢進することがわかった (Fig. 13B)。これらの結果より、*fad104* はメラノーマ細胞の定常状態および血清刺激時における STAT3 のリン酸化レベルを低下させることが明らかになった。



**Fig. 12 *Fad104* negatively regulates the phosphorylation level of STAT3 in melanoma cells.** **A**, The phosphorylation level of STAT3 in A375SM cells over-expressing FAD104. The phosphorylation level of STAT3 and total protein level of STAT3 were detected by Western blotting (upper panel). 5  $\mu$ g of protein was loaded per lane.  $\beta$ -actin expression was used as a loading control. Quantification of the blots in A was shown on lower panel. **B**, The phosphorylation level of STAT3 in A375SM cells transfected with *sifad104-A*. The level of phosphorylation and total protein level of STAT3 were detected by Western blotting (upper panel). 5  $\mu$ g of protein was loaded per lane.  $\beta$ -actin expression was used as a loading control. Quantification of the blots in B was shown on lower panel. \* $p < 0.05$ .

**A****B**

**Fig. 13** *Fad104* negatively regulates the phosphorylation level of STAT3 in melanoma cells treated with FBS. **A**, The phosphorylation level of STAT3 in A375SM cells infected with FAD104 after treatment with medium containing 5% FBS. At indicated points after serum treatment, the phosphorylation and total protein levels of STAT3 were detected by Western blotting (upper panel). 5  $\mu$ g of protein was loaded per lane.  $\beta$ -actin expression was used as a loading control. Quantification of the blots in A was shown on lower panel. **B**, The phosphorylation level of STAT3 in *fad104* knockdown A375SM cells after treatment with medium containing 5% FBS. At indicated points after serum treatment, the level of phosphorylation and total protein level of STAT3 were detected by Western blotting (upper panel). 5  $\mu$ g of protein was loaded per lane.  $\beta$ -actin expression was used as a loading control. Quantification of the blots in B was shown on lower panel. \*p<0.05. \*\*p<0.01.



## 第二節 fad104 が STAT3 の転写活性化能に与える影響の解析

細胞質における STAT3 は、リン酸化により核内へと移行し転写活性化能が亢進される。fad104 は STAT3 のリン酸化レベルを低下させたことから、STAT3 の転写活性化も制御するか否か検討した。

### (1)実験材料および実験方法

#### 1-1 実験材料

A375SM 細胞 (本学衛生化学分野より供与)

RPMI-1640 (SIGMA)

FBS (Biowest)

IL6 (Wako)

polyethylenimine (PEI)

pCMV-3×FLAG-fad104FL (当研究室で構築済)

5 × lysis buffer : 125 mM Tris-HCl (pH 7.8)、10 mM DTT、10 mM CDTA (pH 7.8)、50% glycerol、5% Triton X-100

発光基質液 : 20 mM Tricine (pH 7.8)、2.67 mM MgSO<sub>4</sub>、0.1 mM EDTA、33.3 mM DTT、270 μM Coenzyme A、530 μM ATP、470 μM luciferin-K

Z-buffer : 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 mM KCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、50 mM β-mercaptoethanol

基本培地 : RPMI1640、5% FBS

#### 1-2 実験方法

##### ○ A375SM 細胞の培養

第一章、第一節に準じた。

##### ○ Myc タグ融合 fad104 発現プラスミドの構築

マウス fad104 の ORF をサブクローニングした pCMV7.1-3×FLAG (pCMV7.1-3×FLAG-fad104FL)を制限酵素 *Hind*III および *Xba*I で消化した。インサートを回収精製後、Klenow (Takara)を用いて末端を平滑化した。pCMV-Myc は制限酵素 *Sal*I で消化し、Klenow を用いて消化断片を平滑化した。その後、インサートを pCMV-Myc にサブクローニングした。

##### ○ プラスミドの調製

トランスフェクションに用いたプラスミドは、QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN)

を用いて調製した。  
使用したプラスミド  
4×M67-tk-Luc (adgene)  
pCMV-Myc empty vector  
pCMV-Myc-fad104  
pCMV-βgal  
pBluescript KS+

#### ○トランスフェクション

A375SM 細胞へのトランスフェクションは、PEI を用いて全量 250 ng のプラスミドを導入した。細胞を 24-well プレートに  $3 \times 10^4$  cells/well 播種して 24 時間培養後、トランスフェクションの 1 時間前に RPMI (5% FBS) で、培地交換を行った。細胞に 25 ng の 4×M67-tk Luc レポータープラスミド、75ng の Myc タグ融合 fad104 発現プラスミド、および内部標準として 6.25 ng の pCMV-βgal を導入した。プラスミドの総量は pBluescript KS+ を加えることにより一定量にそろえた。

#### ○血清刺激ならびに IL6 刺激

トランスフェクション 16 時間後に無血清培地に交換し、4 時間培養した。その後、50 ng/ml の IL6 または 5% FBS 含有培地で 4 時間培養した。

#### ○ルシフェラーゼ活性の測定

トランスフェクション 24 時間後の細胞を PBS (-) で 2 回洗浄し、PBS (-) で希釈した  $1 \times$  lysis buffer 70 μl を入れ、室温で 10 分間振盪した。全量をマイクロチューブにとり、15,000 rpm、10 分間、室温で遠心し、上清を細胞溶解液とした。ルシフェラーゼ基質溶液 100 μl に細胞溶解液 2 μl を加え、10 秒間の relative light unit (RLU) をルミノメーター (Lumat LB 9507 (EG&GBERTHOLD)) を用いて測定した。β-ガラクトシダーゼ活性の測定は、細胞溶解液 30 μl に Z-buffer 600 μl および 2 mg/ml o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside 120 μl を加え、37°C、60 分間反応させた。1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 300 μl 加え、反応を止めた後、Abs=570 nm を測定した。ルシフェラーゼ活性の測定値を内部標準である β-ガラクトシダーゼ活性値により補正した。

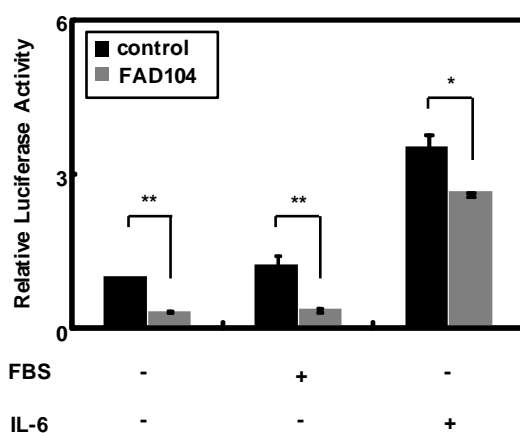
#### ○統計処理

第一章、第一節に準じた。

### (2) 実験結果

STAT3 の結合サイトを有するレポータープラスミド(4×M67-tk-Luc)を細胞に導入し、

STAT3 の転写活性化能に *fad104* が与える影響を検討した。コントロール細胞では、FBS 刺激によりわずかに STAT3 の転写活性化が亢進し、IL6 刺激によって顕著に STAT3 の転写活性化能が亢進した。*fad104* を過剰発現させた結果、いずれの条件においても STAT3 の転写活性化能が有意に低下した (Fig. 14)。この結果より、*fad104* は STAT3 の転写活性化能を阻害することが明らかになった。



**Fig. 14 *Fad104* suppresses the transcriptional activity of STAT3 in melanoma cells.** A375SM cells were transfected with 4×M67-tk-Luc luciferase reporter plasmid, in the presence or absence of Myc-tagged FAD104 expression plasmid. At 16 hr after transfection, the cells were starved for 4 hr and then incubated in the presence or absence of 5% FBS or IL-6 for 4 hr. The cell lysates were prepared and subjected to a luciferase assay. Luciferase activity was normalized to the  $\beta$ -gal activity. The relative luciferase activity was calculated from the mean value relative to control (leftmost lane), set as 1. Each column represents the mean with standard deviation (n=3). \* $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.01$ .

### 第三節 FAD104 と STAT3 の相互作用ならびに相互作用領域の検討

これまでの検討により、*fad104* は STAT3 シグナルを抑制することが明らかになった。そこで次に、STAT3 シグナルを制御する分子機構の解明を試みた。FAD104 は proline-rich region、FNIII domain といったタンパク質間相互作用に重要な構造を有することから、まず、FAD104 と STAT3 が相互作用するか否か検討を行った。

#### (1) 実験材料および実験方法

##### 1-1 実験材料

A375SM 細胞 (本学衛生化学分野より供与)

RPMI1640 (SIGMA)

FBS (Biowest)

PBS (-)

PEI

Mouse monoclonal anti-DYKDDDDK tag antibody (PBS (-)で 200 倍希釈) (Wako)

Monoclonal anti-c-Myc FITC conjugated (PBS (-)で 200 倍希釈) (SIGMA)  
Lysis buffer : 150 mM NaCl、 50 mM Tris-HCl (pH7.5)、 0.5% NP40  
Mouse anti-FLAG M2 monoclonal antibody (SIGMA)  
Rabbit anti-mouse STAT3 polyclonal antibody (5% BSA/TTBS で 1,000 倍希釈) (SANTA CRUZ)  
Rabbit anti-mouse FAD104 polyclonal antibody (5% BSA/TTBS で 400 倍希釈) (SIGMA GENOSYS)  
Donkey anti rabbit IgG conjugated HRP (PBST で 10,000 倍希釈) (Cell Signaling)  
Sheep anti mouse IgG conjugated HRP (PBST で 10,000 倍希釈) (Amersham Bioscience)  
TTBS : 150 mM NaCl、 10 mM Tris-HCl (pH8.0)、 0.1% Tween20  
Transfer buffer: 25 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane、 192 mM glycine、 20% methanol  
ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Bioscience)  
PBS-G : 10% glycerol/PBS (-)

基本培地 : RPMI1640、 5% FBS

## 1-2 実験方法

- A375SM 細胞の培養  
第一章、第一節に準じた。

- プラスミドの構築

pCMV7.1-3×FLAG-fad104ΔN 発現プラスミド

DK2 5'-CCAAGCTTATCTACAAGAACAGCTG-3'

*HindIII*

DK4 5'-GGTGTCTGGACCATGATAAACG-3'

上記のプライマーを用いて PCR を行い、回収精製後に、得られたフラグメントを pBluescript KS+ にサブクローニングした。このプラスミドを制限酵素 *HindIII* および *ApaI* (DK4 の下流に存在する) で消化し、得られたインサートを回収し、pCMV7.1-3×FLAG-fad104 の *HindIII* および *ApaI* 部位間にサブクローニングした (Fig. 15)。

pCMV7.1-3×FLAG-fad104ΔFNIII 発現プラスミド

DK29 5'-GCGAAGCTTATGTACGTCACCATGATG-3'

*HindIII*

DK30 5'-GAGAAGCTTGTCTTGCACCCTCTTTAC-3'

*HindIII*

上記のプライマーを用いて PCR を行い、回収精製した。得られたフラグメントを制限酵素 *Hind*III で消化し、pCMV7.1-3×FLAG-fad104TM の *Hind*III 部位にサブクローニングした (Fig. 15)。

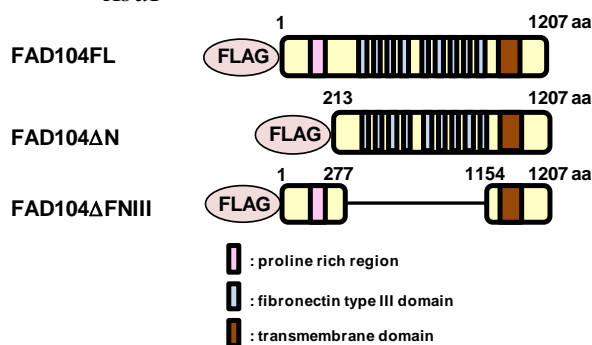
fad104 の膜貫通領域のみを発現する pCMV7.1-3×FLAG-fad104TM は、下記のプライマーを用いて PCR を行い、回収精製後に、得られたフラグメントを制限酵素 *Hind*III および *Xba*I で消化し、pCMV7.1-3×FLAG の *Hind*III および *Xba*I 部位間にサブクローニングし、構築した。

DK18 5'-ACAAGCTTCAACAGCGTGAGGTTAT-3'

*Hind*III

DK30 5'-GGTCTAGATTACTTCATTAAGAAGT-3'

*Xba*I



**Fig. 15 Schematic representation of the domain structures of full length or deletion mutants of FAD104.**

pCMV7.1-3×FLAG-STAT3FL および欠損変異体発現プラスミド

• STAT3FL

DK21 5'-GCAAGCTTATGGCTCAGTGGAACCA-3'

*Hind*III

DK22 5'-ATAGTCGACTCACATGGGGGAGGTA-3'

*Sal*I

• STAT3 (1-407)

DK21 5'-GCAAGCTTATGGCTCAGTGGAACCA-3'

*Hind*III

DK23 5'-AAGTCGACTCACTCTGCAGACAGGC-3'

*Sal*I

• STAT3 (465-585)

DK24 5'-GCAAGCTTCCAACATCTGTCAGAT-3'

*Hind*III

DK25 5'-GAGTCGACTCAGATGTACCCTTCAT-3'

*SaII*

• STAT3 (586-770)

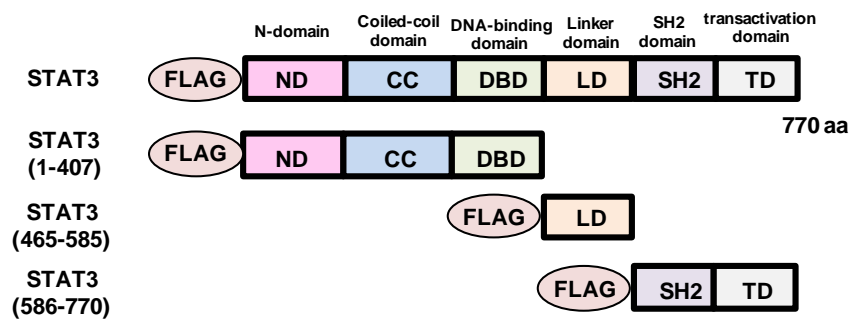
DK26 5'-TCGAAGCTTATGGGTTTCATCAGCA-3'

*HindIII*

DK22 5'-ATAGTCGACTCACATGGGGGAGGTA-3'

*SaII*

上記のプライマーを用いて PCR を行い、回収精製後に、得られたフラグメントを制限酵素 *HindIII* および *SaII* で消化し、pCMV7.1-3×FLAG の *HindIII* および *SaII* 部位間にサブクローニングした (Fig. 16)。



**Fig. 16 Schematic representation of the domain structures of full length or deletion mutants of STAT3.**

○プラスミドの調製

第二章、第二節に準じた。

使用したプラスミド

pCMV7.1-3×FLAG empty vector

pCMV7.1-3×FLAG-fad104FL

pCMV7.1-3×FLAG-fad104ΔN

pCMV7.1-3×FLAG-fad104ΔFNIII

pCMV7.1-3×FLAG-STAT3FL

pCMV7.1-3×FLAG-STAT3 (1-407)

pCMV7.1-3×FLAG-STAT3 (465-585)

pCMV7.1-3×FLAG-STAT3 (586-770)

pCMV-Myc-fad104

○免疫沈降実験

抗 STAT3 抗体を用いた免疫沈降実験

Cell lysate を 1,000 μg/500 μl と抗 STAT3 抗体 (SANTA CRUZ) 2 μg を 4°C で一晩ゆ

るやかに攪拌して反応させた。抗体-cell lysate 反応物に lysis buffer により平衡化した Protein A Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences) 30  $\mu$ l を加え、4°C で 4 時間ゆるやかに反応させた。ビーズを lysis buffer で 3 回洗浄した後、ビーズに結合したタンパク質を SDS-loading buffer (6.25 mM Tris-HCl (pH 6.8)、10% glycerol、2% SDS、5%  $\beta$ -mercaptoethanol、0.01% bromophenol blue)により溶出した。コントロールには normal rabbit IgG (SANTA CRUZ) 2  $\mu$ g を使用した。

#### 抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降実験

Cell lysate を 1,000  $\mu$ g/500  $\mu$ l と抗 FLAG 抗体 (SIGMA) 3.8  $\mu$ g を 4°C で一晩ゆるやかに攪拌して反応させた。抗体-cell lysate 反応物に lysis buffer により平衡化した Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences) 40  $\mu$ l を加え、4°C で 4 時間ゆるやかに反応させた。ビーズを lysis buffer で 3 回洗浄した後、ビーズに結合したタンパク質を SDS-loading buffer (6.25 mM Tris-HCl (pH 6.8)、10% glycerol、2% SDS、5%  $\beta$ -mercaptoethanol、0.01% bromophenol blue)により溶出した。コントロールには normal mouse IgG (SANTA CRUZ) 3.8  $\mu$ g を使用した。

#### ○ 免疫染色

##### FAD104 と STAT3 の細胞内局在の検討

pCMV7.1-3 $\times$ FLAG-STAT3FL および pCMV-Myc-fad104 をトランスフェクションした A375SM 細胞を、PBS (-)で 2 回洗浄した後、4% PFA/PBS (-)を用いて室温で 10 分間固定した。これを PBS (-)で 3 回洗浄した後、0.5% BSA/0.2% Triton X-100 中に室温で 10 分間放置した。PBS (-)で 3 回洗浄した後、抗 FLAG 抗体 (SIGMA)と室温で 1 時間反応させた。その後、PBS (-)で 3 回洗浄した。ここに二次抗体 (Goat anti-mouse IgG conjugated TRITC)を加え、室温で 30 分間遮光して反応させた。その後、PBS (-)で 3 回洗浄し、Monoclonal anti-c-Myc FITC conjugated (SIGMA)と室温で 1 時間遮光して反応させた。PBS (-)で 3 回洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510-V, ZEISS)で観察した。

##### FAD104 欠損変異体の細胞内局在の検討

FAD104 全長または欠損変異体発現プラスミドをトランスフェクションした A375SM 細胞を、PBS (-)で 2 回洗浄した後、4% PFA/PBS (-)を用いて室温で 10 分間固定した。これを PBS (-)で 3 回洗浄した後、0.5% BSA/0.2% Triton X-100 中に室温で 10 分間放置した。PBS (-)で 3 回洗浄した後、FLAG タグ検出用の anti-DYKDDDDK tag 抗体 (Wako)と室温で 1 時間反応させた。その後、PBS (-)で 3 回洗浄した。ここに二次抗体 (Goat anti-mouse IgG conjugated TRITC)を加え、室温で 30 分間遮光して反応させた。その後、PBS (-)で 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus)で観察した。

○ GST-pull down assay

FAD104 と STAT3 の相互作用

GSH Sepharose を PBS-G で平衡化し、GST または GST 融合 FAD104 (1-277)領域を含む大腸菌可溶性画分を懸濁させ、4°C で一晩攪拌した。その後、Sepharose を PBS-G で 3 回洗浄した。この GSH Sepharose 融合 GST 融合タンパク質の一部を SDS-PAGE により分離し、GST あるいは GST 融合 FAD104 (1-277)領域のタンパク質量が等量存在することを CBB 染色により確認した。相互作用には、A375SM 細胞から調製した cell lysate と反応させ、4°C で一晩攪拌した。その後、lysis buffer で 3 回洗浄し、beads に SDS-loading buffer (6.25 mM Tris-HCl (pH 6.8)、10% glycerol、2% SDS、5%  $\beta$ -mercaptoethanol、0.01% bromophenol blue)を加え、タンパク質を変性させた。

FAD104 と STAT3 各種欠損変異体の相互作用

FAD104 と STAT3 の相互作用の方法に準じた。ただし、GST あるいは GST 融合 FAD104 (1-277)領域のタンパク質との反応には、pCMV7.1-3 $\times$ FLAG-STAT3FL、(1-407)、(465-585)、または(586-770)をトランスフェクションした A375SM 細胞から調製した cell lysate を用いた。

○ タンパク定量

第一章、第一節に準じた。

○ SDS-PAGE

第一章、第一節に準じた。

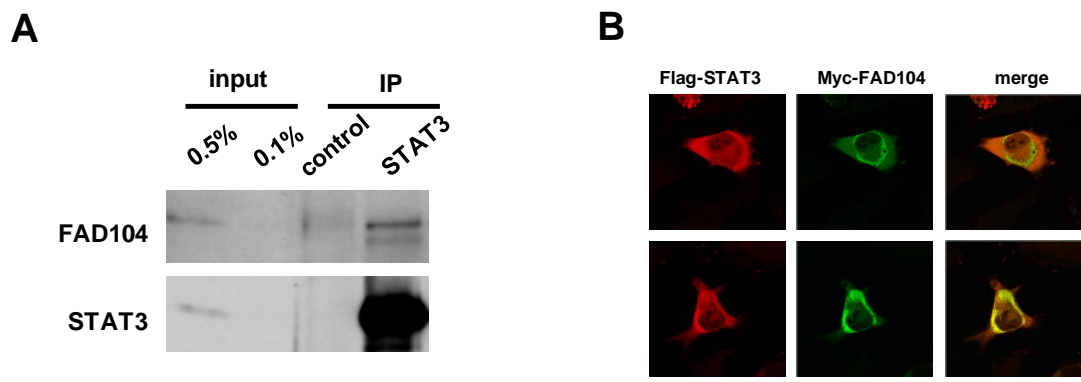
○ Western blot 法

第一章、第四節に準じた。

(2)実験結果

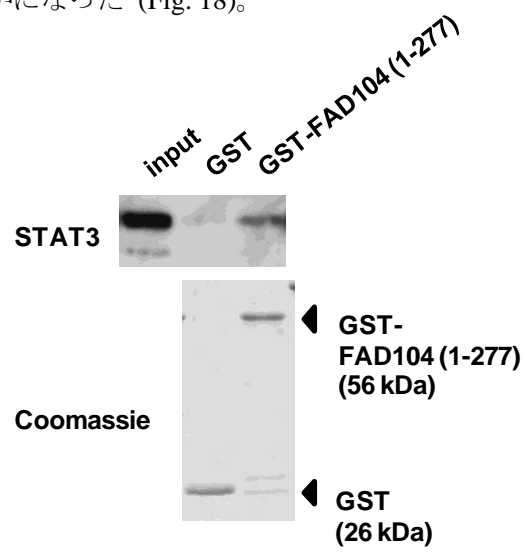
FAD104 と STAT3 が相互作用するか否かを明らかにするため、A375SM 細胞から調製した cell lysate を用いて抗 STAT3 抗体による免疫沈降実験を行った。その結果、メラノーマ細胞において FAD104 と STAT3 が結合することが明らかになった (Fig. 17A)。次に、FAD104 と STAT3 の細胞内局在を検討した。A375SM 細胞に FLAG タグ融合 STAT3 ならびに Myc タグ融合 FAD104 発現プラスミドを導入し、24 時間培養後に免疫染色を行った。STAT3 は定常状態において細胞質と核に局在することが報告されている (47)。本検討においても STAT3 は細胞質と核内に局在を示した (Fig. 17B left panel)。さらに、STAT3 は FAD104 と小胞体において一部共局在することがわかった (Fig. 17B right panel) (16)。これらの結果より、FAD104 と STAT3 はメラノーマ細胞において相互作用することが明らかになった。





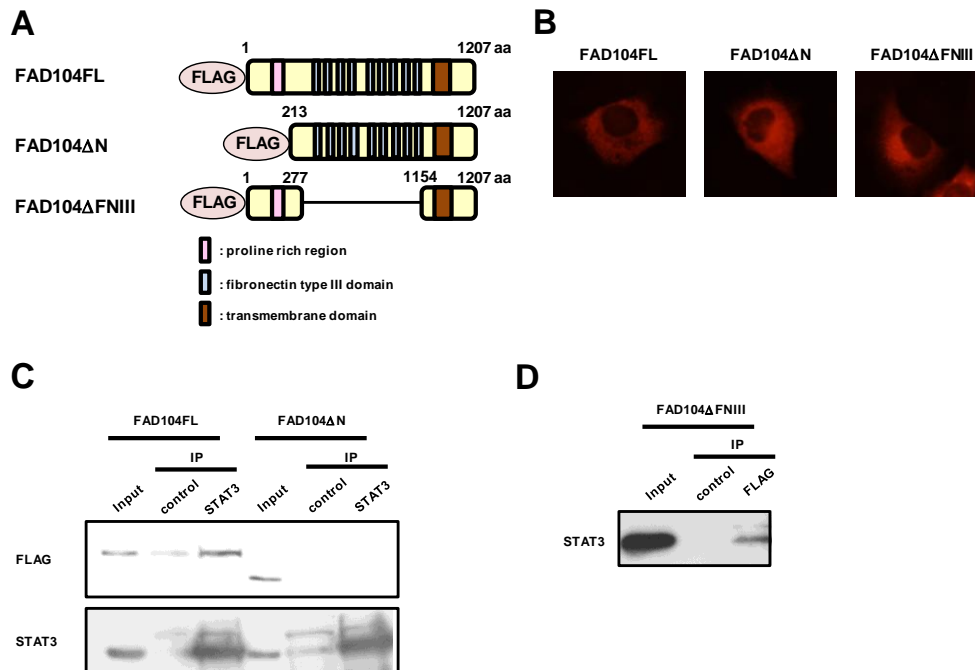
**Fig. 17 FAD104 interacts with STAT3 in A375SM cells.** *A*, The interaction of FAD104 with STAT3 under physiological conditions. Lysates from intact A375SM cells were immunoprecipitated using antibody against STAT3. Immunoprecipitates and inputs were resolved and detected by Western blotting with anti-FAD104 antibody. *B*, FLAG-tagged STAT3 expression plasmid and Myc-tagged FAD104 expression plasmid were transiently introduced into A375SM cells. The signals of FLAG-STAT3 (red) and Myc-FAD104 (green) were detected with confocal microscopy.

次に、STAT3 との相互作用に重要な FAD104 の領域を解析した。FAD104 の N 末端領域には、SH3 ドメインや type I WW ドメインの結合サイトを持ち、タンパク質間の相互作用に重要な proline-rich region が存在する (48, 49)。そこでまず、proline-rich region に着目し、GST-FAD104 (1-277)を用いて GST-pull down assay を行った。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させ精製し、メラノーマ細胞からの cell lysate と反応させ GST-pull down assay を行った。その結果、FAD104 (1-277 aa)領域は STAT3 と結合することが明らかになった (Fig. 18)。



**Fig. 18 Interaction of the N-terminal region of FAD104 with STAT3 by the GST pull-down assay.** Cell lysates prepared from A375SM cells were used for a GST pull-down assay with GST or GST-FAD104 (1-277). Coomassie Blue staining of the GST proteins (lower panel). Bound protein samples were immunoblotted with anti-STAT3 antibody (upper panel). The input volume was 0.5% of that of the cell lysate for the pull-down assay.

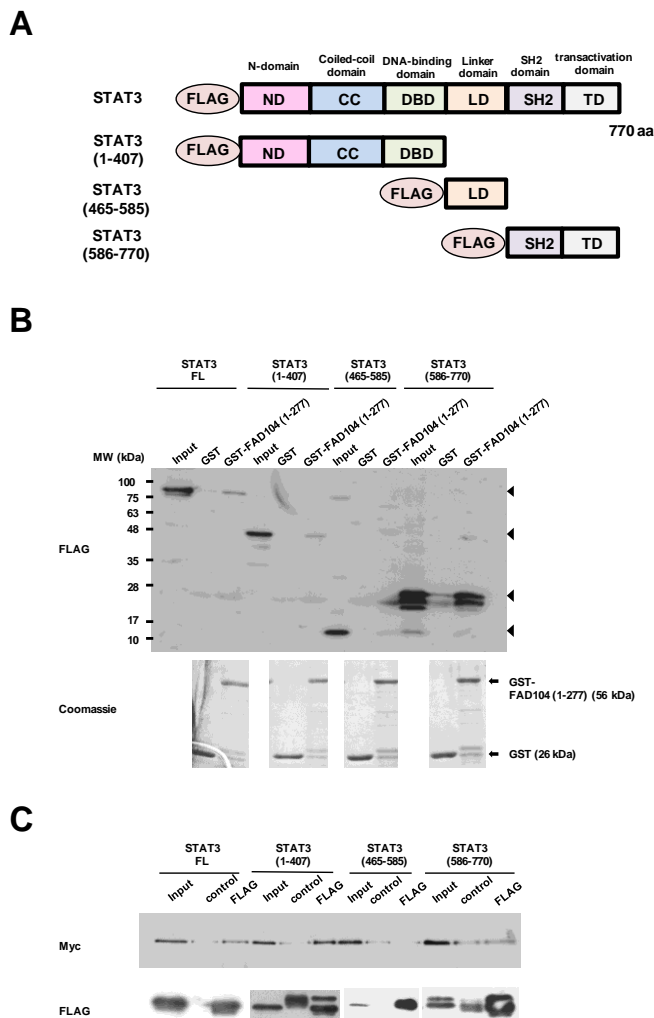
FAD104 はタンパク質間相互作用に重要な FNIII ドメインも有している。そこで、proline-rich region に加え、FNIII ドメインについても STAT3 との相互作用に与える影響を検討した。まず、proline-rich region を含む N 末端領域を欠損した FAD104 $\Delta$ N および N 末端領域と膜貫通領域からなる FAD104 $\Delta$ FNIII 発現プラスミドを構築した (Fig. 19A)。次に、FAD104 各種欠損変異体の細胞内局在を検討した。FLAG タグ融合 FAD104FL または欠損変異体発現プラスミドを A375SM 細胞に導入し、免疫染色を行った。その結果、FAD104FL と同様に、FAD104 $\Delta$ N および FAD104 $\Delta$ FNII は小胞体に局在を示した (Fig. 19B)。次に、FAD104 $\Delta$ N と STAT3 の相互作用について検討を行った。pCMV7.1-3xFLAG-fad104FL または fad104 $\Delta$ N をトランスフェクションした A375SM 細胞から得られた cell lysate を用いて、抗 STAT3 抗体による免疫沈降実験を行った。その結果、FAD104FL は STAT3 と相互作用したが、FAD104 $\Delta$ N では STAT3 との結合が見られなかった (Fig. 19C)。さらに、FAD104 $\Delta$ FNIII と STAT3 の相互作用について検討を行った。FAD104 $\Delta$ FNIII 発現プラスミドをトランスフェクションした A375SM 細胞から調製した cell lysate を用いて、FAD104FL および $\Delta$ N と同様に、抗 STAT3 抗体による免疫沈降実験を行ったが、非特異的なバンドが検出されてしまい、相互作用の評価を行えなかった。そこで、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降実験を行った。その結果、STAT3 と FAD104 $\Delta$ FNIII は相互作用することがわかった (Fig. 19D)。これらの結果より、FAD104 は N 末端領域を介して STAT3 と相互作用することが明らかになった。



**Fig. 19 The N-terminal region of FAD104 is essential for interaction with STAT3.** **A**, Schematic representation of the domain structures of full length or deletion mutants of FAD104. **B**, The FLAG signal in A375SM cells transfected with FLAG-tagged full length or deletion mutants of FAD104 expression plasmid was observed using fluorescence microscopy. **C**, Effect of N-terminal region of FAD104 on interaction with STAT3. A375SM cells introduced with FLAG-tagged FAD104FL or ΔN expression plasmid were lysed. The immunoprecipitation was done with anti-STAT3, and the precipitates and inputs (0.5%) were blotted with anti-FLAG antibody. **D**, The interaction of FAD104ΔFNIII with STAT3. The cells introduced with FLAG-tagged FAD104ΔFNIII expression plasmid were lysed, and immunoprecipitated with anti-FLAG antibody. The precipitates and input (0.5%) were detected with anti-STAT3 antibody.

STAT3は、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)を有するタンパク質である。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 (50-53)、FAD104が相互作用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)、LDのみを有する STAT3 (465-585)およびSH2、TDからなるSTAT3 (586-770)発現プラスミドを作製した (Fig. 20A)。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)が相互作用した。また、STAT3 (1-407)では、FAD104 (1-277 aa)とわずかに結合が認められた。しかしながら、STAT3 (465-585)とFAD104 (1-277 aa)の相互作用は認められなかった (Fig. 20B)。次に、免疫沈降法により両因子の相互作用を検討した。FLAGタグ融合STAT3全長または欠損変異体発現プラスミドとMycタグ融合FAD104発現プラスミ

ドをA375SM細胞にトランスフェクションした。24時間培養後に細胞溶解液を調製し、抗FLAG抗体を用いた免疫沈降実験を行った。その結果、FAD104はSTAT3 (1-407)および(586-770)と相互作用することが明らかになった (Fig. 20C)。これらの結果より、FAD104はN末端領域を介して、STAT3のN末端領域ならびにC末端領域と結合することが明らかになった。



**Fig. 20 FAD104 interacts with both N-terminal and C-terminal region of STAT3.** **A**, Schematic representation of the domain structures of full length or deletion mutants of STAT3. **B**, GST pull-down assay for the interaction of the N-terminus of FAD104 with STAT3 in A375SM cells. The cells transfected with the expression plasmid for FLAG-tagged full length or deletion mutants of STAT3 were lysed, pulled-down with GST or GST-FAD104 (1–277), and blotted with anti-FLAG antibody. The input was equivalent to 0.5% volume of the cell lysate. Arrowheads indicate the bands of FLAG-tagged full length or deletion mutants of STAT3 (upper panel). Arrows indicate the bands of GST or GST-FAD104 (1-277) (lower panel) stained with Coomassie Brilliant Blue. **C**, The interaction of FAD104 with deletion mutants of STAT3. Lysates from A375SM cells introduced with the expression plasmid for FLAG-tagged full length or deletion mutants of STAT3 and Myc-tagged FAD104 expression plasmid were immunoprecipitated using antibody against FLAG. Immunoprecipitates and inputs were resolved and detected by Western blotting with anti-Myc antibody. For detection of FLAG tag or Myc tag, the input was equivalent to 0.5% or 1% volume of the cell lysate, respectively.

#### 第四節 FAD104 の N 末端領域が STAT3 のリン酸化および転写活性化能に与える影響の解析

FAD104 は N 末端領域を介し、STAT3 の C 末端領域と結合することが明らかになった。そこで次に、FAD104 の N 末端領域が STAT3 のリン酸化および転写活性化能に与える影響を検討した。

##### (1) 実験材料および実験方法

###### 1-1 実験材料

A375SM 細胞 (本学衛生化学分野より供与)

RPMI-1640 (SIGMA)

FBS (Biowest)

IL6 (Wako)

Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 (invitrogen)

PEI

Rabbit anti-phospho-STAT3 (Tyr705) monoclonal antibody (5% BSA/TTBS で 500 倍希釈した) (Cell Signaling)

Rabbit anti-mouse STAT3 polyclonal antibody (5% BSA/TTBS で 1,000 倍希釈) (SANTA CRUZ)

Mouse anti-mouse  $\beta$ -actin monoclonal antibody (5% BSA/TTBS で 100,000 倍希釈) (SIGMA)

Donkey anti rabbit IgG conjugated HRP (PBST で 10,000 倍希釈) (Cell Signaling)

Sheep anti mouse IgG conjugated HRP (PBST で 10,000 倍希釈) (Amersham Bioscience)

TTBS : 150 mM NaCl、10 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.1% Tween20

Transfer buffer

ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Bioscience)

5 × lysis buffer : 125 mM Tris-HCl (pH 7.8)、10 mM DTT、10 mM CDTA (pH 7.8)、50% glycerol、5% Triton X-100

発光基質液 : 20 mM Tricine (pH 7.8)、2.67 mM MgSO<sub>4</sub>、0.1 mM EDTA、33.3 mM DTT、270  $\mu$ M Coenzyme A、530  $\mu$ M ATP、470  $\mu$ M luciferin-K

Z-buffer : 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 mM KCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、50 mM  $\beta$ -mercaptoethanol

基本培地 : RPMI-1640、5% FBS

###### 1-2 実験方法

○ A375SM 細胞の培養

第一章、第一節に準じた。

○プラスミドの調製

第二章、第二節に準じた。

使用したプラスミド

pCMV7.1-3×FLAG empty vector

pCMV7.1-3×FLAG-fad104FL

pCMV7.1-3×FLAG-fad104ΔN

pCMV7.1-3×FLAG-fad104ΔFNIII

4×M67-tk-Luc

pCMV-β-gal

pBluescript KS

○ トランスフェクション

STAT3 のリン酸化レベルに与える影響

A375SM 細胞に Lipofectamine™2000 を用いてプラスミドを導入した。細胞を MULTIWELL™ 24 well (FALCON) に  $8 \times 10^4$  cells/well 播種して 24 時間培養後、Lipofectamine™2000 2 μl、プラスミド 0.8 μg の条件で細胞に導入した。ただし、各タンパク質の発現量が揃うように FLAG タグ融合 fad104 全長発現プラスミドは 0.8 μg、fad104 欠損変異体発現プラスミドは 0.5 μg を導入し、プラスミドの総量は pCMV7.1-3×FLAG で揃えた。

STAT3 の転写活性化能に与える影響

A375SM 細胞へのトランスフェクションは PEI を用いて、全量 250 ng のプラスミドを導入した。細胞を MULTIWELL™ 24 well (FALCON) に  $3 \times 10^4$  cells/well 播種して 24 時間培養後、トランスフェクションの 1 時間前に RPMI (5% FBS) で、培地交換を行った。細胞に 25 ng の 4×M67-tk Luc レポータープラスミド、内部標準として 6.25 ng の pCMV-βgal および 75 ng の pCMV-3×Flag-fad104FL、12.5 ng の pCMV7.1-3×Flag-fad104ΔN、または 7.5 ng の pCMV7.1-3×Flag-fad104ΔFNIII を導入した。プラスミドの総量は pBluescript KS+ を加えて一定量にそろえた。

○ IL6 刺激

トランスフェクション 36 時間後、5 ng/ml IL6 含有培地で 4 時間培養した。

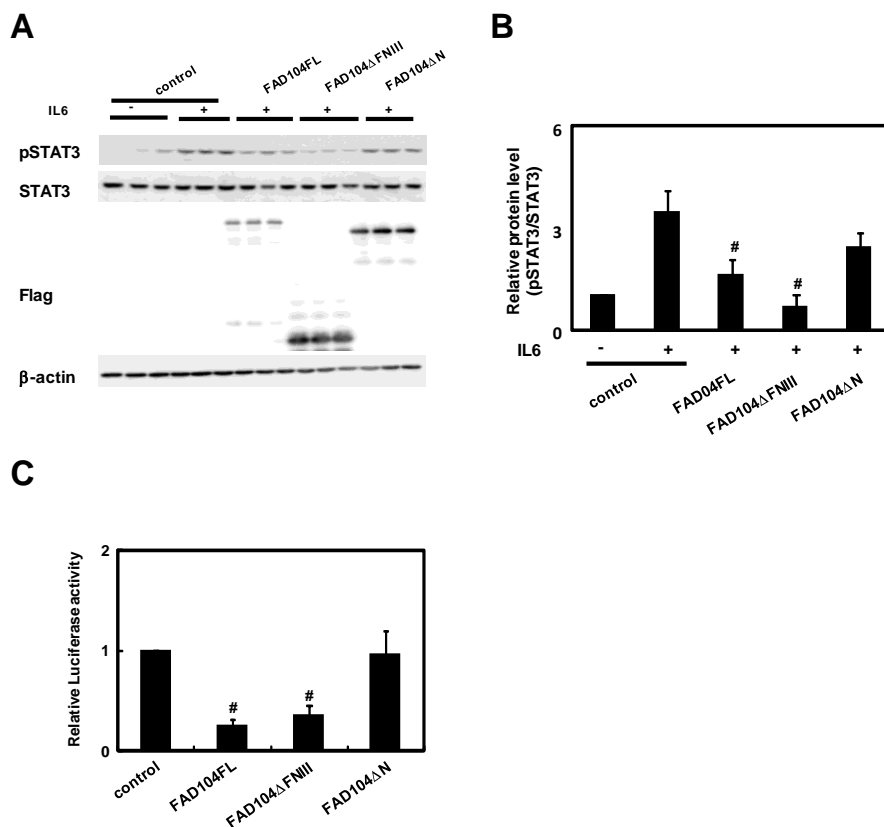
○ cell lysate の調製

第一章、第一節に準じた。ただし、RIPA buffer 50 μl を用いて cell lysate を調製した。

- タンパク定量  
第一章、第一節に準じた。
- SDS-PAGE  
第一章、第一節に準じた。
- Western blot 法  
第一章、第四節に準じた。
- ルシフェラーゼ活性の測定  
第二章、第二節に準じた。
- 統計処理  
第一章、第四節に準じた。

## (2) 実験結果

まず、FAD104 の N 末端領域が STAT3 のリン酸化レベルに与える影響について検討を行った。STAT3 は IL6 刺激によりリン酸化が亢進することが報告されている (41)。そこで、A375SM 細胞に FAD104 全長または欠損変異体発現プラスミドを導入し、IL6 刺激下における STAT3 のリン酸化レベルを評価した。コントロール細胞では、IL6 刺激により STAT3 のリン酸化レベルが有意に亢進した。この条件において、FAD104FL 過剰発現細胞では STAT3 のリン酸化レベルが有意に低下した。FAD104 $\Delta$ FNIII 過剰発現細胞でも FAD104FL と同様に、STAT3 のリン酸化レベルが有意に低下することがわかった。その一方で、FAD104 $\Delta$ N 過剰発現細胞では、STAT3 のリン酸化レベルが低下しなかった (Figs. 21A, B)。これらの結果より FAD104 は N 末端領域を介し、STAT3 のリン酸化を抑制することが明らかになった。次に、転写活性化能について解析を行った。STAT3 結合サイトを有するレポータープラスミドならびに FAD104 全長または欠損変異体発現プラスミドを A375SM 細胞にトランスフェクションし、24 時間後にレポーターアッセイを行った。その結果、コントロールと比べ、FAD104FL ならびに FAD104 $\Delta$ FNIII 過剰発現細胞では STAT3 の転写活性化能が有意に低下した。一方、FAD104 $\Delta$ N 過剰発現細胞では、STAT3 の転写活性化能は抑制されなかった (Fig. 21C)。これらの結果より、FAD104 の N 末端領域は STAT3 の転写活性化能の制御に重要な役割を担うことが明らかになった。



**Fig. 21 The N-terminal region of FAD104 is required to regulate STAT3 activity.** **A**, A375SM cells were introduced with full length or deletion mutants of FAD104, and treated with IL6 for 30 min. Protein (5  $\mu$ g) per lane was loaded, and detected using corresponding antibody. **B**, Quantification of the blots in A was shown. **C**, Effect of N-terminal region of FAD104 on transcription ability of STAT3 in A375SM cells. 4 $\times$ M67-tk-Luc was used as a reporter gene. At 24 h after co-transfection of FLAG-tagged FAD104FL,  $\Delta$ N, or  $\Delta$ FNIII expression plasmid, the cells were harvested and tested by a luciferase assay. Normalization was done with the activity of  $\beta$ -galactosidase, and the relative values to control were shown. Each bar shows the mean  $\pm$  standard deviation (n = 4). Statistical analysis was performed with one-way ANOVA with Tukey–Kramer HSD test. # shows (p < 0.01) between the control treated with IL6 and FAD104FL or FAD104 $\Delta$ FNIII group, and the control and FAD104FL or FAD104 $\Delta$ FNIII group, in B and C, respectively.

#### 第五節 FAD104 の N 末端領域ががん細胞の足場非依存的増殖能に与える影響の解析

fad104 は N 末端領域を介し、STAT3 シグナルを負に制御することが明らかになった。そこで次に、がん細胞の足場非依存的増殖に fad104 の N 末端領域が与える影響について検討を行った。

##### (1) 実験材料および実験方法

###### 1-1 実験材料

B16F10 細胞 (理研 Cell Bank)



RPMI1640 (SIGMA)  
DMEM (ニッスイ)  
FBS (Biowest)  
G418 (ナカライ)  
Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 (SIGMA)  
SeaPlaque Agarose (Combrex)  
Crystal violet

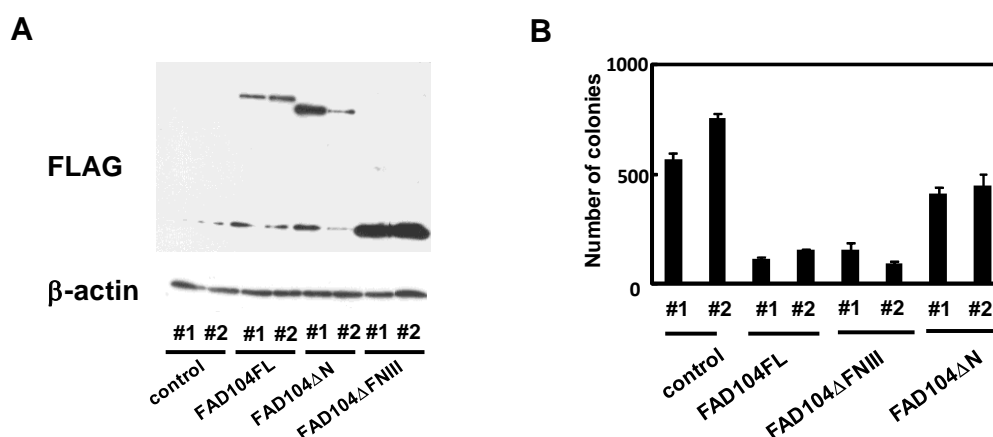
## 1-2 実験方法

- B16F10 細胞の培養  
第一章、第四節に準じた。
  
- fad104 安定発現細胞の作製  
第一章、第四節に準じた。
  
- ソフトアガロースアッセイ  
第一章、第四節に準じた。
  
- cell lysate の調製  
第一章、第四節に準じた。
  
- タンパク定量  
第一章、第一節に準じた。
  
- SDS-PAGE  
第一章、第一節に準じた。
  
- Western blot 法  
第一章、第二節に準じた。ただし、タンパク質は 10  $\mu$ g を用いた。
  
- 統計処理  
第一章、第四節に準じた。

## (2) 実験結果

fad104 の N 末端領域ががん細胞の足場非依存的増殖能に与える影響を解析するため、まず、B16F10 細胞を用いて FAD104FL に加えて、proline-rich region を欠損した FAD104 $\Delta$ N な

らびに FNIII domain を欠損した FAD104 $\Delta$ FNIII 安定発現細胞を作製した (Fig. 22A)。次に、各 2 クローン の安定発現細胞を用いて、ソフトアガロースアッセイを行った。その結果、FAD104FL 安定発現細胞では、第一章、第四節の結果と同様に、コントロール細胞と比較し、形成されたコロニーの数が顕著に減少した。FAD104 $\Delta$ FNIII 安定発現細胞においても、FL と同様に、形成されたコロニーの数が顕著に減少した。一方、FAD104 $\Delta$ N 安定発現細胞では、足場非依存的増殖能の抑制効果が減弱した (Fig. 22B)。これらの結果より、FAD104 は N 末端領域を介し、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。



**Fig. 22 FAD104 inhibits colony forming activity of B16F10 cells through the N-terminal region of FAD104.** **A**, The expression levels of FLAG-tagged FAD104FL, FAD104 $\Delta$ N, and FAD104 $\Delta$ FNIII were determined by Western blotting with anti-FLAG antibody. Protein (10  $\mu$ g) was loaded in each lane.  $\beta$ -actin expression was used as a control. **B**, Effect of FAD104FL, FAD104 $\Delta$ N, or FAD104 $\Delta$ FNIII over-expression on anchorage-independent growth of B16F10 cells. B16F10 cells ( $2.5 \times 10^3$ ) derived from independent stable transformants were seeded in soft agarose in a 35-mm plate. After 15 days, the colonies were stained with 0.01% crystal violet and colony numbers were counted in each plate. Each bar shows the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ).

## 第六節 考察および小括

### (1) 考 察

本研究により、FAD104はN末端領域を介してSTAT3と相互作用することにより、STAT3シグナルを負に制御することが明らかになった。細胞株ならびにヒト臨床検体を用いた検討から、メラノーマ細胞においてSTAT3が恒常的に活性化されていること、また、STAT3の阻害剤およびSTAT3の不活性型変異体を用いた検討から、STAT3がメラノーマ細胞の腫瘍成長、浸潤ならびに転移に関連することが明らかにされている(45, 54-56)。さらに、STAT3はメラノーマ細胞以外のがん細胞において浸潤・転移の促進因子として機能することが知られている(57-59)。したがって、STAT3の活性化制御機構を解明することはメラノーマを始めとする様々ながん種における治療薬の開発につながると考えられる。

本研究から、FAD104 は STAT3 と相互作用し、そのシグナルを抑制することが明らかになったが、fad104 が STAT3 シグナルをどのように制御するか、その詳細な機構については不明であり、今後の最重要課題である。STAT3 のリン酸化部位は C 末端領域の転写活性化ドメインに存在する。本章の検討から、FAD104 は STAT3 の N 末端領域に加え、C 末端領域とも相互作用した。FAD104 は脱リン酸化酵素活性を有していないと考えられることから、STAT3 のリン酸化部位をマスクすることにより、リン酸化を阻害している可能性が考えられる。本章の検討において、細胞質における STAT3 は FAD104 と小胞体において一部共局在を示すことが明らかになった。したがって、FAD104 は STAT3 を小胞体においてトラップすることにより膜近傍におけるリン酸化を阻害している可能性もある。小胞体に局在するタンパク質として endoplasmic reticulum p57 (ERp57) や protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) が STAT3 シグナルに関与することが知られている。ERp57 は小胞体内腔において STAT3 と相互作用し STAT3 のリン酸化を抑制する (60)。一方、PTP1B は JAK2 や Src のリン酸化レベルを負に制御することにより STAT3 シグナルを阻害する (61, 62)。今後、これらのタンパク質の機能に FAD104 が与える影響や FAD104 の小胞体膜上におけるトポロジーを決定することにより、STAT3 シグナルを制御する分子機構の一端を解明することにつながると考えられる。

STAT3 のリン酸化は様々な因子により制御されており、protein tyrosine phosphatases Meg2 (PTPMeg2) を始めとする脱リン酸化酵素、protein inhibitors of activated STAT (PIAS) などの活性化 STAT3 阻害因子ならびに suppressor of cytokine signaling (SOCS) を始めとするネガティブフィードバック因子によってもリン酸化制御を受ける (63-65)。そのため、これら因子群と FAD104 が協調的に機能し、STAT3 シグナルを制御する可能性も考えられる。今後、FAD104 の相互作用因子を同定し、その相互作用が STAT3 シグナルにどのような影響を与えるのか解析を行う必要がある。

STAT3 は血管新生、転移に重要な vascular endothelial growth factor (VEGF)、hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) および MMP2 の発現や抗アポトーシス関連遺伝子 B cell leukemia-2 (BCL-2) ファミリーの発現を正に制御する一方で、p53 などのがん抑制遺伝子の発現を負に制御することが報告されている (66)。本研究において、fad104 は STAT3 シグナルを抑制することや MMP2 の発現量を負に制御することを明らかにしており、これらの結果を考慮すると、fad104 は STAT3 の標的遺伝子の発現量を調節している可能性が高い。今後、fad104 が STAT3 の標的遺伝子の発現量に与える影響を解析することにより、がんの浸潤・転移における fad104 の役割についてより詳細に解明されることが期待される。

BMP は骨細胞分化に重要な役割を担うことが広く報告されている増殖因子であるが、がん細胞の浸潤・転移にも密接に関与することが知られている (34, 67)。当研究室では、骨細胞分化過程において、fad104 が BMP/Smad 経路を負に制御することを明らかとしている (15)。本研究結果より、メラノーマ細胞において fad104 は STAT3 シグナルを抑制することが明らかになったが、乳がん細胞における機能は不明である。乳がん細胞においても STAT3、

BMP/Smad シグナルは重要な役割を担うことから、これらシグナル伝達経路に *fad104* が関与するか否か検討が必要である (68, 69)。また近年、Pratap らにより、乳がん細胞において、*Runx2* が浸潤・転移を促進することが明らかにされた (70)。当研究室では、*fad104* が骨細胞分化過程において *Runx2* の発現を負に調節することを報告している (14)。これらのことから、乳がん細胞において *fad104* が、*Runx2* の発現を制御か否か検討する必要がある。今後、*fad104* が乳がん細胞において制御するシグナル伝達経路を同定し解析することにより、異なるがん細胞における *fad104* の機能が解明されることが期待される。

本研究により、*FAD104* は N 末端領域を介して、がん細胞の足場非依存的増殖を抑制することが強く示唆された。しかしながら、*FAD104* の N 末端領域が転移能に重要な役割を担うか否かは不明である。今後、*fad104ΔN* または  $\Delta$ FNIII 安定発現細胞を用いた自然転移モデルにより、がん細胞の転移能に *FAD104* の N 末端領域が与える影響について検討する必要がある。また、本研究では、*FAD104* の N 末端領域が *STAT3* シグナルの制御に重要であることも見出した。今後、*STAT3* 活性変異体を用いたレスキュー実験により、がん細胞の浸潤・転移における *STAT3* シグナルの寄与についても検討を行う必要がある。

## (2) 小 括

1. *FAD104* は *STAT3* のリン酸化および転写活性化能を阻害する。
2. *FAD104* は N 末端領域を介して、*STAT3* の N 末端領域および C 末端領域と相互作用する。
3. *FAD104* の N 末端領域は、*STAT3* シグナルの抑制に重要である。
4. *FAD104* は N 末端領域を介して、足場非依存的増殖能を抑制する。

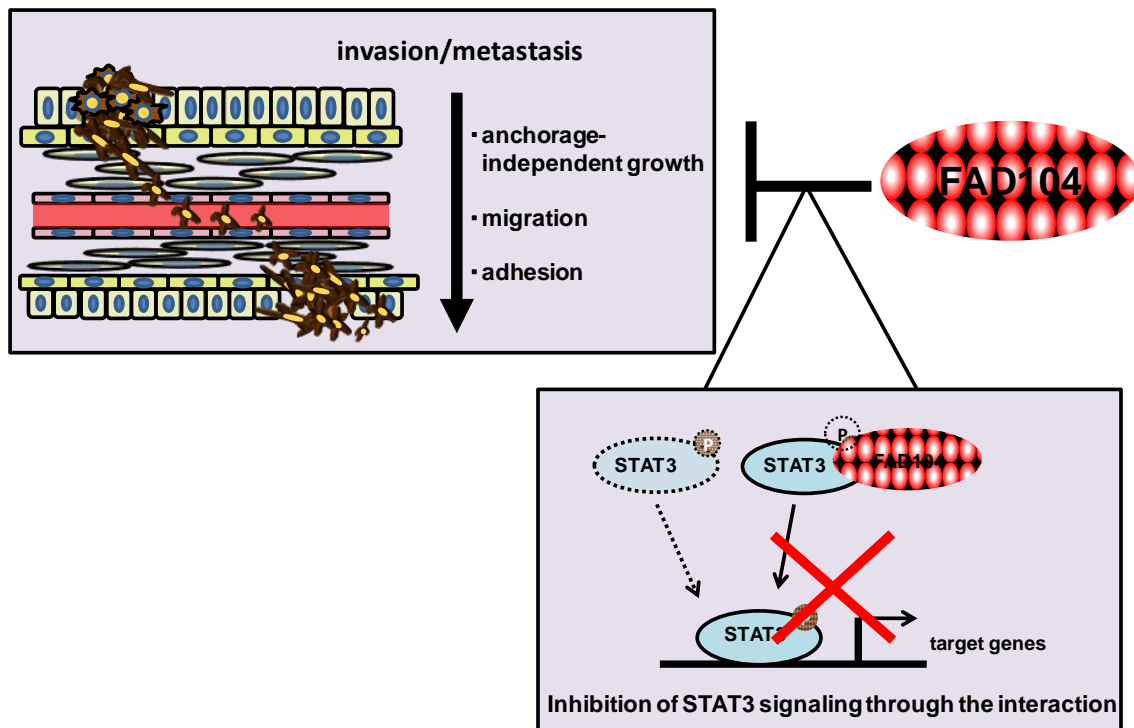
## 総括

腫瘍マーカーの開発や外科的手術の進歩により、近年では、がんの高い治癒率が期待されるようになった。しかしながら、がんは国内外を問わず、未だ死亡原因の上位を占める疾患である。日本人では、3人に1人ががんに罹患すると言われており、がん患者の死亡原因の多くは転移によるものであることから、がんによる死亡率を低下させるためには、転移を抑制することが最重要である。より効果が望まれ、かつ安全性の高い抗がん剤の開発が進んでいるが、転移を阻止する抗がん剤の開発はあまり進んでいない。そのため、がん細胞の浸潤と転移の分子機構を解明することが、がん治療を改善させる上で必要不可欠である。

当研究室では、脂肪細胞分化初期の分子機構の解明を目的とし、脂肪細胞分化誘導後3時間に発現上昇する遺伝子を多数単離した(4, 5)。これら遺伝子の中の一つである *fad104* が脂肪細胞分化を促進すること、また、肺形成ならびに骨形成の制御に重要な役割を担うことを明らかにした(12-15)。さらに、*fad104* 欠損マウス由来の MEF を用いた検討において、*fad104* は細胞の接着や移動を正に制御したことから、*fad104* は脂肪細胞分化、肺形成ならびに骨形成のみならず、細胞接着等が重要な役割を担う生命現象に寄与していると考えられた。そこで本研究では、*fad104* が細胞間接着等が重要な鍵となる生命現象であるがん細胞の浸潤・転移に与える影響について解析を行った。その結果、*fad104* は転移プロセスに重要な足場非依存的増殖、移動および浸潤を抑制することにより、がん細胞の転移を負に制御することが明らかになった。また、*FAD104* が N 末端領域を介して、*STAT3* と相互作用することにより、*STAT3* シグナルを抑制することも新たに見出した。これらの結果より、*FAD104* は *STAT3* シグナルの制御を介してがん細胞の浸潤・転移を抑制する新規分子であることを明らかとした (Fig. 23)。

*STAT3* は脂肪細胞分化誘導後2時間以内に活性化し、*C/EBPβ*の発現を正に制御することにより脂肪細胞分化を促進する(71)。また、*STAT3* は肺サーファクタントの発現量を増加することや肺胞上皮II型細胞において *ATP-binding cassette A3 (ABCA3)*の発現を正に制御し、肺形成に重要なラメラ体の形成を促すことが報告されている(72, 73)。さらに、*STAT3* は骨芽細胞の分化ならびに骨形成を亢進することが明らかになっている(74)。これらの知見から、脂肪細胞分化、肺、および骨の形成過程においても、*fad104* は *STAT3* シグナルを介して制御している可能性が考えられる。今後、これらの生命現象における *FAD104* と *STAT3* シグナルとの関係について詳細に検討することにより、脂肪細胞、肺、骨における *fad104* の機能や *STAT3* シグナルの新たな調節機構の一端が解明されることが期待される。

*Fad104* 欠損 MEF では野生型と比較し細胞の接着が遅れること、また、移動能が低下することも当研究室において明らかにしている(16)。本研究により、*fad104* はがん細胞の移動能を負に制御することを明らかにした。この2つの検討結果より、*fad104* は正常細胞とがん細胞では移動能に対して相反する影響を与えることが強く示唆された。*fad104* と同様に、



**Fig. 23** The proposed model of the function of *fad104* on invasion and metastasis of cancer cells.

細胞種によって移動能に与える影響が異なる因子として seven in absentia homolog 1 (SIAH1) が報告されている。SIAH1 は正常細胞である MEF においては  $p27^{Kip1}$  を標的とし移動能を負に制御する一方、肝がん細胞では far-upstream element-binding protein 3 (FBP3) を制御することにより移動能を促進する (75, 76)。これらの知見より、SIAH1 は制御するシグナル伝達経路ならびにタンパク質を変えることにより、正常細胞とがん細胞で移動能に逆の影響を与えたと考えられる。*fad104* は骨細胞分化過程では BMP/Smad シグナル、メラノーマ細胞では STAT3 シグナルを制御することから、SIAH1 と同じように細胞種により制御するシグナル伝達経路を変えていることが予想される。今後、各種がん細胞に加え、脂肪細胞分化、肺ならびに骨形成における FAD104 の相互作用因子を同定することが、*fad104* の機能の全容解明につながると考えられる。

FAD104 は細胞外マトリクスに存在するタンパク質の多くが持つ fibronectin type III domain を有する。FAD104 と同様に FNIII domain の 9 回繰り返し構造を有するタンパク質が小胞体に局在し、かつ、がん細胞の浸潤・転移に関与するという報告はこれまでにない。そのため、*fad104* によるがん細胞の浸潤・転移制御の分子メカニズムを解明することは、全く新しい浸潤・転移の制御機構の発見につながることが期待される。小胞体ストレスとがん細胞の浸潤・転移は密接に関与することが知られている (77, 78)。小胞体ストレスにより開始される unfolded protein response (UPR) は小胞体に局在する protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)、inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ )、および activating

transcription factor 6 (ATF6)の3つのタンパク質によって制御される (79-81)。最近では、その中の一つ IRE1 $\alpha$ の下流因子 XBP1 が結腸がん細胞の浸潤を促進することや乳がん細胞の転移能を正に制御することが報告されている (82, 83)。今後、fad104 がこれら小胞体ストレス関連因子の機能や発現に与える影響を検討することにより、小胞体における fad104 の役割と機能が解明されることが期待される。

FAD104 が FNIII domain および 1 回膜貫通型の構造を有することから、何らかの刺激により FAD104 が切断され、細胞膜や細胞外へ局在変化する可能性に着目し、MEF、3T3-L1 および HeLa 細胞に外因性の FAD104 を過剰発現した後、BMP2 や IL6 を添加し、FAD104 の局在が変化するか否か検討を行ったが、これまでに FAD104 の局在を変化させる要因は見つからない。今後、添加する薬剤または増殖因子や細胞種を変えることにより、FAD104 の局在変化についても検討していく必要がある。

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)はEカドヘリンを始めとする上皮マーカータンパク質の発現量の減少ならびにNカドヘリンなどの間葉性マーカータンパク質の発現量の増加を伴う生命現象であり、がん細胞の浸潤・転移に寄与するとされていた (84)。最近、EMT は乳がんや膵臓がんなどにおける転移に必ずしも必要でないとされる報告がなされたが、EMT は、浸潤・転移以外にもがん幹細胞様形質の獲得や薬剤抵抗性に関与することから、がん治療において EMT は重要な現象と考えられている (85-87)。STAT3 は、EMT に関連する転写因子 twist や snail の発現を正に調節することにより、EMT の促進因子として機能する (88-90)。fad104 は STAT3 のリン酸化および転写活性化能を抑制することに加え、アクチン骨格形成を制御することから、がん細胞の EMT に fad104 が与える影響についても検討する必要がある。

2006 年、Obholtz らにより fndc3b が fad104 と同一遺伝子であること、また、同じファミリーに属する遺伝子として fndc3a、fndc3c が存在することが報告された (11)。肝がん細胞ならびに前立腺がん細胞において miR-143 が fndc3b の発現を抑制することによりがん細胞の浸潤・転移を促進することが報告されている (91, 92)。しかしながら、これらの論文では FNDC3B ががん細胞の転移能に関与するか否か、さらに、制御するシグナル伝達経路が何か明らかになっていない。今後、肝がん細胞や前立腺がん細胞において、fad104 が制御するシグナル伝達経路を解析するとともに、メラノーマ細胞における miR-143 の機能について明らかにしていく必要がある。FNDC3C の機能に関してはこれまでに報告はないが、FNDC3A はセルトリ細胞と精原細胞の接着を正に制御すること、ならびに FNDC3A の変異が雄マウスの不妊につながるということが知られている (11)。Fad104 欠損マウスは肺に異常をきたし、出生直後に死亡するが、fndc3a を欠損したマウスは出生直後に死亡しない (11, 16)。このことから、FAD104 は FNDC3A と構造は類似しているものの、異なる細胞内機能を有している可能性が考えられる。これまで fndc3a、fndc3c とがん細胞の浸潤・転移における役割は全く分かっていないため、がん細胞の浸潤・転移における fndc3a および fndc3c の機能についても解析することにより、fndc3 ファミリーががん細胞の浸潤・転移において担う役

割の全容の解明につながることを期待される。

本研究により、脂肪細胞分化初期に発現が上昇する遺伝子として単離された **fad104** ががん細胞の浸潤・転移を抑制することを明らかにした。さらに、**fad104** は **STAT3** シグナルを負に制御することも見出した。これらの研究成果は、がんの浸潤・転移の新たな制御機構や **STAT3** シグナルの新たな調節機構の解明に加え、がんの浸潤・転移を標的とした新規抗がん剤の開発につながることを期待される。さらに、**fad104** は、脂肪、骨細胞分化ならびに肺の器官形成にも重要な役割を担うことから、より詳細な **FAD104** の分子機構の解明は、がんの浸潤・転移だけに限らず、肥満、骨代謝疾患、肺に関連した新生児疾患に対する新しい創薬開発の一助になることが期待される。



## 結 論

1. fad104 はがん細胞の浸潤・転移を負に制御する。
2. fad104 は N 末端領域を介して、がん細胞の浸潤・転移に重要な STAT3 シグナルを負に制御する。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始熱心な御指導、御鞭撻を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科教授 今川正良 先生に篤く御礼申し上げます。

研究途上有益な御助言をいただきました、名古屋市立大学大学院薬学研究科准教授 長田茂宏 先生に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、終始温かい御指導を頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科講師 西塚 誠 先生に深く感謝いたします。

A375C6 細胞、A375SM 細胞をご供与いただきました名古屋市立大学大学院薬学研究科講師 伊藤佐生智 先生に深く感謝いたします。また、MDA-MB-231 細胞をご供与いただきました名古屋市立大学大学院薬学研究科教授 林 秀敏 先生、准教授 井上靖道 先生に深く感謝いたします。

マウスの尾静脈注射を行うにあたり、熱心な御指導をいただきました、名古屋市立大学大学院薬学研究科准教授 大澤匡弘 先生に深く感謝いたします。

実験にご協力いただきました後藤元晴 学士をはじめ、名古屋市立大学大学院薬学研究科分子生物薬学分野の皆様には感謝いたします。

最後に、常日頃から支えてくれた友人、家族に深く感謝いたします。

## 引用文献

1. G. Christofori (2006) New signals from the invasive front, *Nature*, 441, 444-450.
2. E. C. Woodhouse, R. F. Chuaqui, L. A. Liotta (1997) General mechanisms of metastasis, *Cancer*, 80, 1529-1537.
3. M. Yilmaz, G. Christofori (2010) Mechanisms of motility in metastasizing cells, *Mol. Cancer Res.*, 8, 629-642.
4. M. Imagawa, T. Tsuchiya, T. Nishihara (1999) Identification of inducible genes at the early stage of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 254, 299-305.
5. M. Nishizuka, T. Tsuchiya, T. Nishihara, M. Imagawa (2002) Induction of Bach1 and ARA70 gene expression at an early stage of adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells, *Biochem. J.*, 361, 629-633.
6. K. Tominaga, Y. Johmura, M. Nishizuka, M. Imagawa (2004) Fad24, a mammalian homolog of Noc3p, is a positive regulator in adipocyte differentiation, *J. Cell Sci.*, 117, 6217-6226.
7. T. Hishida, T. Eguchi, S. Osada, M. Nishizuka, M. Imagawa (2008) A novel gene, fad49, plays a crucial role in the immediate early stage of adipocyte differentiation via involvement in mitotic clonal expansion, *FEBS J.*, 275, 5576-5588.
8. K. Tominaga, C. Kondo, T. Kagata, T. Hishida, M. Nishizuka, M. Imagawa (2004) The novel gene *fad158*, having a transmembrane domain and leucine-rich repeat, stimulates adipocyte differentiation, *J. Biol. Chem.*, 279, 33840-33848.
9. T. Hishida, K. Naito, S. Osada, M. Nishizuka, M. Imagawa (2007) Peg10, an imprinted gene, plays a crucial role adipocyte differentiation, *FEBS Lett.*, 581, 4272-4278.
10. K. Tominaga, T. Kagata, Y. Johmura, T. Hishida, M. Nishizuka, M. Imagawa (2005) SLC39A14, a LZT protein, is induced in adipogenesis and transports zinc, *FEBS J.*, 272, 1590-1599.
11. K.L. Obholz, A. Akopyan, K.G. Waymire, G.R. MacGregor (2006) FNDC3A is required for adhesion between spermatids and Sertoli cells, *Dev. Biol.*, 298, 498-513.
12. K. Tominaga, C. Kondo, Y. Johmura, M. Nishizuka, M. Imagawa (2004) The novel gene *fad104*, containing a fibronectin type III domain, has a significant role in adipogenesis, *FEBS Lett.*, 577, 49-54.
13. K. Kishimoto, M. Nishizuka, T. Ueda, K. Kajita, S. Ugawa, S. Shimada, S. Osada, M. Imagawa (2011) Indispensable role of factor for adipocyte differentiation 104 (*fad104*) in lung maturation, *Exp. Cell Res.*, 317, 2110-2123.
14. K. Kishimoto, A. Kato, S. Osada, M. Nishizuka, M. Imagawa (2010) Fad104, a positive regulator of adipogenesis, negatively regulates osteoblast differentiation, *Biochem. Biophys.*

- Res. Commun.*, 397, 187-191.
15. K. Kishimoto, M. Nishizuka, D. Katoh, A. Kato, S. Osada, M. Imagawa (2013) FAD104, a regulatory factor of adipogenesis, acts as a novel regulator of calvarial bone formation, *J. Biol. Chem.*, 288, 31772-31783.
  16. M. Nishizuka, K. Kishimoto, A. Kato, M. Ikawa, M. Okabe, R. Sato, H. Niida, M. Nakanishi, S. Osada, M. Imagawa (2009) Disruption of the novel gene fad104 causes rapid postnatal death and attenuation of cell proliferation, adhesion, spreading and migration, *Exp. Cell Res.*, 315, 809-819.
  17. J. H. Um, J. K. Kwon, C. D. Kang, M. J. Kim, D. S. Ju, J. H. Bae, D. W. Kim, B. S. Chung, S. H. Kim (2004) Relationship between Antiapoptotic Molecules and Metastatic Potency and the Involvement of DNA-Dependent Protein Kinase in the Chemosensitization of Metastatic Human Cancer Cells by Epidermal Growth Factor Receptor Blockade, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 311, 1062-1070.
  18. U. B. Hofmann, J. R. Westphal, G. N. P. van Muijen, D. J. Ruiter (2000) Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma, *J. Invest. Dermatol.*, 115, 337-344.
  19. U. B. Hofmann, J.R. Westphal, E.T. Waas, A. J. Zendman, I. M. Cornelissen, D. J. Ruiter, G. N. van Muijen (1999) Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression, *Br. J. Cancer*, 81, 774-782.
  20. V. H. Freedman, S. I. Shin (1974) Cellular tumorigenicity in nude mice: Correlation with cell growth in semi-solid medium, *Cell*, 3, 355-359.
  21. G. P. Gupta, J. Massagué (2006) Cancer metastasis: building a framework, *Cell*, 127, 679-695.
  22. K. M. Fukunaga, G. Martinez, T. K. Nguyen, D. Kim, W. A. Santiago, A. Roesch, M. Herlyn (2010) Tenascin-C promotes melanoma progression by maintaining the ABCB5-positive side population, *Oncogene* 29, 6115-6124.
  23. D. Hoshino, N. Koshikawa, M. Seiki (2011) A p27<sup>kip1</sup>-binding protein, p27RF-Rho, promotes cancer metastasis via activation of RhoA and RhoC, *J. Biol. Chem.*, 286, 3139-3148.
  24. J. R. Stretch, K. C. Gatter, E. Ralfkiaer, D. P. Lane, A. L. Harris (1991) Expression of mutant p53 in melanoma, *Cancer Res.*, 51, 5976-5979.
  25. K. I. Amiri, A. Richmond (2005) Role of nuclear factor-kappa B in melanoma, *Cancer Metastasis Rev.*, 24, 301-313.
  26. A. S. Dobroff, H. Wang, V. O. Melnikova, G. J. Villares, M. Zigler, L. Huang, M. Bar-Eli (2009) Silencing cAMP-response element-binding protein (CREB) identifies CYR61 as a tumor suppressor gene in melanoma, *J. Biol. Chem.*, 284, 26194-26206.
  27. A. Bhoumik, Z. Ronai (2008) ATF2: a transcription factor that elicits oncogenic or tumor suppressor activities, *Cell Cycle*, 7, 2341-2345.

28. C. Tellez, M. McCarty, M. Ruiz, M. Bar-Eli (2003) Loss of activator protein2alpha results in overexpression of protease-activated receptor-1 and correlates with the malignant phenotype of human melanoma, *J. Biol. Chem.*, 278, 46632-46642.
29. A. F. Chambers, L. M. Matrisian (1997) Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis, *J. Natl. Cancer Inst.*, 89, 1260-1270.
30. L. M. Coussens, Z. Werb (1996) Matrix metalloproteinases and the development of cancer, *Chem. Biol.*, 3, 895-904.
31. S. Curran, G. I. Murray (1999) Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis, *J. Pathol.*, 189, 300-308.
32. H. C. Li, D. C. Cao, Y. Liu, Y. F. Hou, J. Wu, J. S. Lu, G. H. Di, G. Liu, F. M. Li, Z. L. Ou, C. Jie, Z. Z. Shen, Z.M. Shao (2004) Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma, *Breast Cancer Res. Treat.*, 88, 75-85.
33. J. R. MacDougall, M. R. Bani, Y. Lin, R. J. Muschel, R. S. Kerbel (1999) 'Proteolytic switching': opposite patterns of regulation of gelatinase B and its inhibitor TIMP-1 during human melanoma progression and consequences of gelatinase B overexpression, *Br. J. Cancer*, 80, 504-512.
34. J. M. Bailey JM, P. K. Singh, M. A. Hollingsworth (2007) Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins, *J. Cell Biochem.*, 102, 829-839.
35. D. Javelaud, V. I. Alexaki, A. Mauviel (2008) Transforming growth factor-beta in cutaneous melanoma, *Pigment Cell Melanoma Res.*, 21, 123-132.
36. J. L. Orgaz, V. S. Moreno (2013) Emerging molecular targets in melanoma invasion and metastasis, *Pigment Cell Melanoma Res.*, 26, 39-57.
37. T. Rothhammer, I. Poser, F. Soncin, F. Bataille, M. Moser, A. K. Bosserhoff (2005) Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration, *Cancer Res.*, 65, 448-456.
38. C. Busch, U. Drews, S. R. Eisele, C. Garbe, M. Oppitz (2008) Noggin blocks invasive growth of murine B16-F1 melanoma cells in the optic cup of the chick embryo, *Int. J. Cancer*, 122, 526-533.
39. R. L. Elliott, G. C. Blobe (2005) Role of transforming growth factor Beta in human cancer, *J. Clin. Oncol.*, 23, 2078-2093.
40. D. Javelaud, V. Delmas, M. Möller, P. Sextius, J. André, S. Menashi, L. Larue, A. Mauviel (2005) Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells inhibits their tumorigenicity in vitro and in vivo, *Oncogene*, 24, 7624-7629.
41. J. E. Darnell Jr. (1997) STATs and gene regulation, *Science*, 277, 1630-1635.

42. P. C. Heinrich, I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Müller-Newen, F. Schaper (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation, *Biochem. J.*, 374, 1-20.
43. S. Abroun, N. Saki, M. Ahmadvand, F. Asghari, F. Salari, F. Rahim (2015) STATs: An Old Story, Yet Mesmerizing, *Cell J.*, 17, 395-411.
44. D. A. Frank (1999) STAT signaling in the pathogenesis and treatment of cancer, *Mol. Med.*, 7, 432-456.
45. G. Niu, T. Bowman, M. Huang, S. Shivers, D. Reintgen, A. Daud, A. Chang, A. Kraker, R. Jove, H. Yu (2002) Roles of activated Src and STAT3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene*, 21, 7001-7010.
46. T. X. Xie, F. J. Huang, K. D. Aldape, S. H. Kang, M. Liu, J. E. Gershenwald, K. Xie, R. Sawaya, S. Huang (2006) Activation of Stat3 in human melanoma promotes brain metastasis, *Cancer Res.*, 66, 3188-3196.
47. M. Böhm, U. Schulte, J. O. Funk, M. Raghunath, I. Behrmann, M. Kortylewski, P. C. Heinrich, T. Kues, T.A. Luger, T. Schwarz (2001) Interleukin-6-resistant melanoma cells exhibit reduced activation of STAT3 and lack of inhibition of cyclin E-associated kinase activity, *J. Invest. Dermatol.*, 117, 132-140.
48. M. J. Macias, S. Wiesner, M. Sudol (2002) WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands, *FEBS Lett.*, 513, 30-37.
49. A. Musacchio, T. Gibson, V. P. Lehto, M. Saraste (1992) SH3, an abundant protein domain in search of a function, *FEBS Lett.*, 307, 55-61.
50. T. Zhang, W. H. Kee, K. T. Seow, W. Fung, X. Cao (2000) The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6, *Mol. Cell Biol.*, 20, 7132-7139.
51. Z. Yu, B. C. Kone (2004) The STAT3 DNA-binding domain mediates interaction with NF-kappaB p65 and inducible nitric oxide synthase transrepression in mesangial cells, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 15, 585-591.
52. M. S. Ali, P. P. Sayeski, K. E. Bernstein (2000) Jak2 acts as both a STAT1 kinase and as a molecular bridge linking STAT1 to the angiotensin II AT1 receptor, *J. Biol. Chem.*, 275, 15586-15593.
53. M. Paulson, S. Pisharody, L. Pan, S. Guadagno, A. L. Mui, D. E. Levy (1999) Stat protein transactivation domains recruit p300/CBP through widely divergent sequences, *J. Biol. Chem.*, 274, 25343-25349.
54. N. M. Fofaria, S. K. Srivastava (2014) Critical role of STAT3 in melanoma metastasis through anoikis resistance, *Oncotarget*, 5, 7051-7064.
55. C. H. Yang, M. Fan, A. T. Slominski, J. Yue, L. M. Pfeffer (2010) The role of constitutively

- activated STAT3 in B16 melanoma cells. *Int. J. Interferon Cytokine Mediat. Res.*, 2, 1-7.
56. G. Niu, R. Heller, R. Catlett-Falcone, D. Coppola, M. Jaroszeski, W. Dalton, R. Jove, H. Yu (1999) Gene Therapy with Dominant-negative Stat3 suppresses growth of murine melanoma B16 Tumor in Vivo, *Cancer Res.*, 59, 5059-5063.
  57. J. Bromberg (2002) Stat proteins and oncogenesis, *J. Clin. Invest.*, 109, 1139-1142.
  58. J. F. Bromberg, M. H. Wrzeszczynska, G. Devgan, Y. Zhao, R. G. Pestell, C. Albanese, J. E. Darnell Jr. (1999) Stat3 as an oncogene, *Cell*, 98, 295-303.
  59. F. M. Corvinus, C. Orth, R. Moriggl, S. A. Tsareva, S. Wagner, E. B. Pfitzner, D. Baus, R. Kaufmann, L. A. Huber, K. Zatloukal, H. Beug, P. Ohlschläger, A. Schütz, K. J. Halbhuber, K. Friedrich (2005) Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth, *Neoplasia*, 7, 545-555.
  60. H. Coe, J. Jung, J. Groenendyk, D. Prins, M. Michalak (2010) ERp57 modulates STAT3 signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.*, 285, 6725-6738.
  61. M. P. Myers, J. N. Andersen, A. Cheng, M. L. Tremblay, C. M. Horvath, J. P. Parisien, A. Salmeen, D. Barford, N. K. Tonks (2001) TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B, *J. Biol. Chem.*, 276, 47771-47774.
  62. J. Zhang, B. Wang, W. Zhang, Y. Wei, Z. Bian, C. Y. Zhang, L. Li, K. Zen (2013) Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency ameliorates murine experimental colitis via the expansion of myeloid-derived suppressor cells, *PLoS One*, 8, e70828.
  63. F. Su, F. Ren, Y. Rong, Y. Wang, Y. Geng, Y. Wang, M. Feng, Y. Ju, Y. Li, Z. J. Zhao, K. Meng, Z. Chang (2012) Protein tyrosine phosphatase Meg2 dephosphorylates signal transducer and activator of transcription 3 and suppresses tumor growth in breast cancer, *Breast Cancer Res.*, 14, R38.
  64. F. J. Huang, P. S. Steeg, J. E. Price, W. T. Chiu, P. C. Chou, K. Xie, R. Sawaya, S. Huang (2008) Molecular basis for the critical role of suppressor of cytokine signaling-1 in melanoma brain metastasis, *Cancer Res.*, 68, 9634-9642.
  65. E. C. Brantley, L. B. Nabors, G. Y. Gillespie, Y. H. Choi, C. A. Palmer, K. Harrison, K. Roarty, E. N. Benveniste (2008) Loss of protein inhibitors of activated STAT-3 expression in glioblastoma multiforme tumors: implications for STAT-3 activation and gene expression, *Clin. Cancer Res.*, 14, 4694-4704.
  66. M. Kortylewski, R. Jove, H. Yu (2005) Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts, *Cancer Metastasis Rev.*, 24, 315-327.
  67. D. Chen, M. Zhao, G. R. Mundy (2004) Bone morphogenetic proteins, *Growth Factors*, 22, 233-241.
  68. S. R. Walker, M. Xiang, D. A. Frank (2014) Distinct roles of STAT3 and STAT5 in the pathogenesis and targeted therapy of breast cancer, *Mol. Cell Endocrinol.*, 382, 616-621.

69. M. W. Helms, J. Packeisen, C. August, B. Schittek, W. Boecker, B. H. Brandt, H. Buerger (2005) First evidence supporting a potential role for the BMP/SMAD pathway in the progression of oestrogen receptor-positive breast cancer, *J. Pathol.*, 206, 366-376.
70. J. Pratap, J. J. Wixted, T. Gaur, S. K. Zaidi, J. Dobson, K. D. Gokul, S. Hussain, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, G. S. Stein, J. B. Lian (2008) Runx2 transcriptional activation of Indian Hedgehog and a downstream bone metastatic pathway in breast cancer cells, *Cancer Res.*, 68, 7795-7802.
71. K. Zhang, W. Guo, Y. Yang, J. Wu (2011) JAK2/STAT3 pathway is involved in the early stage of adipogenesis through regulating C/EBP $\beta$  transcription, *J. Cell Biochem.*, 112, 488-497.
72. I. Hokuto, M. Ikegami, M. Yoshida, K. Takeda, S. Akira, A. K. Perl, W. M. Hull, S. E. Wert, J. A. Whitsett (2004) Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia, *J. Clin. Invest.*, 113, 28-37.
73. Y. Matsuzaki, V. Besnard, J. C. Clark, Y. Xu, S. E. Wert, M. Ikegami, J. A. Whitsett (2008) STAT3 regulates ABCA3 expression and influences lamellar body formation in alveolar type II cells, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 38, 551-558.
74. T. Bellido, V. Z. Borba, P. Roberson, S. C. Manolagas (1997) Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation, *Endocrinology*, 138, 3666-3676.
75. Y. Nagano, T. Fukushima, K. Okemoto, K. Tanaka, D. D. Bowtell, Z. Ronai, J. C. Reed, S. Matsuzawa (2011) Siah1/SIP regulates p27(kip1) stability and cell migration under metabolic stress, *Cell Cycle*, 10, 2592-2602.
76. A. Brauckhoff, M. Malz, D. Tschaharganeh, N. Malek, A. Weber, M. O. Riener, C. Soll, J. Samarin, M. Bissinger, J. Schmidt, T. Longerich, V. Ehemann, P. Schirmacher, K. Breuhahn (2011) Nuclear expression of the ubiquitin ligase seven in absentia homolog (SIAH)-1 induces proliferation and migration of liver cancer cells, *J. Hepatol.*, 55, 1049-1057.
77. Y. Li, H. Liu, Y. Y. Huang, L. J. Pu, X. D. Zhang, C. C. Jiang, Z. W. Jiang (2013) Suppression of endoplasmic reticulum stress-induced invasion and migration of breast cancer cells through the downregulation of heparanase, *Int. J. Mol. Med.*, 31, 1234-1242.
78. P. P. Shah, J. Beverly (2015) Regulation of VCP/p97 demonstrates the critical balance between cell death and epithelial-mesenchymal transition (EMT) downstream of ER stress, *Oncotarget*, 6, 17725-17737.
79. C. E. Shamu, P. Walter (1996) Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus, *EMBO J.*, 15, 3028-3039.
80. H. P. Harding, Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, D. Ron (2000) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response, *Mol. Cell*, 5, 897-904.



81. K. Haze, H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, K. Mori (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress, *Mol. Biol. Cell*, 10, 3787-3799.
82. N. M. Mhaidat, K. H. Alzoubi, A. Abushbak (2015) X-box binding protein 1 (XBP-1) enhances colorectal cancer cell invasion, *J. Chemother.*, 27, 167-173.
83. X. Chen, D. Iliopoulos, Q. Zhang, Q. Tang, M. B. Greenblatt, M. Hatziapostolou, E. Lim, W. L. Tam, M. Ni, Y. Chen, J. Mai, H. Shen, D. Z. Hu, S. Adoro, B. Hu, M. Song, C. Tan, M. D. Landis, M. Ferrari, S. J. Shin, M. Brown, J. C. Chang, X. S. Liu, L. H. Glimcher (2014) XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 $\alpha$  pathway, *Nature*, 508, 103-107.
84. S. Lamouille, J. Xu, R. Derynck (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15, 178-196.
85. X. Zheng, J. L. Carstens, J. Kim, M. Scheible, J. Kaye, H. Sugimoto, C. C. Wu, V. S. LeBleu, R. Kalluri (2015) Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer, *Nature*, 527, 525-530.
86. K. R. Fischer, A. Durrans, S. Lee, J. Sheng, F. Li, S. T. Wong, H. Choi, T. El Rayes, S. Ryu, J. Troeger, R. F. Schwabe, L. T. Vahdat, N. K. Altorki, V. Mittal, D. Gao (2015) Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance, *Nature*, 527, 472-476.
87. A. Singh, J. Settleman (2010) EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer, *Oncogene*, 29, 4741-4751.
88. R. Y. Liu, Y. Zeng, Z. Lei, L. Wang, H. Yang, Z. Liu, J. Zhao, H. T. Zhang (2014) JAK/STAT3 signaling is required for TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells, *Int. J. Oncol.*, 44, 1643-1651.
89. D. Zhao, A. H. Besser, S. A. Wander, J. Sun, W. Zhou, B. Wang, T. Ince, M. A. Durante, W. Guo, G. Mills, D. Theodorescu, J. Slingerland (2015) Cytoplasmic p27 promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis via STAT3-mediated Twist1 upregulation, *Oncogene*, 34, 5447-59.
90. A. Yadav, B. Kumar, J. Datta, T. N. Teknos, P. Kumar (2011) IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway, *Mol. Cancer Res.*, 9, 1658-1667.
91. X. Zhang, S. Liu, T. Hu, S. Liu, Y. He, S. Sun (2009) Up-regulated microRNA-143 transcribed by nuclear factor kappa B enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing fibronectin expression, *Hepatology*, 50, 490-499.
92. X. Fan, X. Chen, W. Deng, G. Zhong, Q. Cai, T. Lin (2013) Up-regulated microRNA-143 in cancer stem cells differentiation promotes prostate cancer cells metastasis by modulating FNDC3B expression. *BMC Cancer*, 13, 61.