

学位論文題名

Differential Activation of the IGF Binding Protein-3 Promoter by Butyrate in Prostate Cancer Cells.

(酪酸による IGFBP-3 プロモーターの活性化：前立腺癌細胞における検討)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

酪酸は、食物繊維が大腸内で腸内細菌の働きにより発酵・分解されて生じる短鎖脂肪酸である。これまで、酪酸の細胞増殖抑制作用・分化促進作用・アポトーシス誘導作用が種々の細胞系（例えば、大腸癌・乳癌・肺癌・肝癌・前立腺癌細胞など）で調べられてきた。それらの作用の分子機構は未だ解明されてはいないが、酪酸の持つ histone deacetylase (HDAC) inhibitor としての働きとそれによりもたらされる hyperacetylation が重要な鍵を握ると考えられている。

IGF binding protein (IGFBP)-3 は、IGF と結合しその生理活性を調節する以外に、IGF とは独立して細胞増殖を抑制しアポトーシスを誘導することが報告されている。我々は以前、IGFBP-3 と酪酸の作用の類似性に着目し、乳癌細胞において酪酸が IGFBP-1~6 のうち特に IGFBP-3 の生産を特異的に増加させることを確認した（参考文献-1）。

そこで今回、前立腺癌細胞の中で2つの代表的な細胞系である PC-3 (androgen-nonresponsive) cells と LNCaP (androgen-responsive) cells を使用し、酪酸の IGFBP-3 生産に及ぼす影響について検討した。酪酸 (Sodium butyrate (以下 NaB) 0-10 mM) の添加により、IGFBP-3 mRNA 及び蛋白の発現は PC-3 及び LNCaP 両細胞で共に増加した。

2つの細胞系で、酪酸による IGFBP-3 のプロモーター調節を調べる為に、1.87 kb のヒト IGFBP-3 プロモーターを pGL2-basic luciferase reporter vector に導入し、酪酸添加によりプロモーター活性がどう変化するかを調べた。その結果、PC-3, LNCaP 細胞共に、NaB 10 mM 添加によりリポーター活性は 20-30 倍に増加した。さらに、段階的な deletion mutants を使用してリポーター活性を検討したところ、PC-3 細胞では Sp1 site を除いた時にその活性が失われたのに対し、LNCaP 細胞ではなお原活性を保持していた。酪酸応答領域に Sp1 site を含まない例はこれまで報告が無いため、LNCaP 細胞での新しい応答領域の検討を本研究の目的とした。

【方法】

目的とするタンパクの検出には、western immunoblot 及び western ligand blot analysis 法を用いた。Northern blot analysis は、NaB あるいは HDAC inhibitor である trichostatin A (TSA) で添加処理した PC-3 あるいは LNCaP 細胞より total RNA を採取し、³²P でラベルした p21 あるいは IGFBP-3 の cDNA プローブを用いて施行した。Luciferase assay は、1.87 kb の human IGFBP-3 プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流につないだコンストラクトを pGL2 basic vector に組み込み、細胞に導入した後、

luciferase assay system (Promega)にてレポーター活性を測定した。この基本コンストラクトを基に、各種のdeletion mutantsとsite-directed mutantsを作成、各々について同様にluciferase assayを行った。目的とするDNA fragmentsとタンパクの結合を調べる為に、³²PでラベルしたDNA fragmentsと核抽出液を用いてEMSA (electro-mobility shift assay)を行った。

【結果】

NaB添加は、他の細胞系で報告されているのと同様にPC-3及びLNCaP両細胞においても、用量依存性にヒストンH3及びH4のアセチル化を誘導した。また、NaB添加により乳癌細胞で観察したのと同様に、PC-3, LNCaP両細胞においてもIGFBP-3のmRNA, 蛋白量は著明に増加した。

酪酸がIGFBP-3の転写を活性化するメカニズムを調べるため、1.87 kbのヒトIGFBP-3プロモーター領域をpGL2-basic luciferase reporter vectorに組み込み、レポーター活性を測定した。コンストラクトの導入後、NaB添加により活性はPC-3細胞, LNCaP細胞共に著明に増加した。このコンストラクトを基に、段階的なdeletion mutantsを作成し、同様にレポーター活性を測定したところ、PC-3細胞においては転写開始点から-120と-75の間に位置するSpI siteを除いた時に、プロモーター活性はほぼ失活した。これは、乳癌細胞において既に報告されているのと同様な結果だった。しかし、興味深いことに、LNCaP細胞においてはこの部分を除いてもなおプロモーター活性はもともとの1.87 kb プロモーターの場合と同程度に保持されていた。NaBのかわりにTSAを添加した際にも同様の結果が得られた。NaBによる転写活性化が調べられている遺伝子で、これまでプロモーターの応答領域にSpI siteを含まない報告例は無かったので、LNCaP細胞におけるIGFBP-3プロモーターの新たなNaB応答領域の検索を次の目的として研究を進めた。

新たに作成したdeletion mutantsによるluciferase assayの結果、LNCaP細胞におけるIGFBP-3プロモーターのNaBによる活性化には、TATA boxをはさんでほぼ対称的に位置する2つの領域が重要であることが判明した。この領域には、モチーフ検索によりp53 (single) consensus binding siteとGATA siteがそれぞれ含まれていた。次に、site-directed mutantsによるluciferase assayの結果、p53 siteはLNCaP細胞におけるIGFBP-3プロモーター活性化に重要であることがわかったが、GATA siteは活性に影響を与えてはいなかった。しかし、DNA-蛋白結合を調べる目的でEMSAを行ったところ、p53 binding siteとGATA siteに相当する部位でのDNA-蛋白結合が確認された。この結合自体は、NaB添加の有無で変化は認められなかった。

最後に、p53 binding siteに結合しているDNA-蛋白複合体にp53自身が関わっているかどうかをsupershiftにて確認したが、p53自身の関与は否定的であった。

【考察】

これまでの報告では、酪酸がヒストンのhyperacetylationを引き起こすことにより多数の転写因子とDNAによって形成されるDNA-蛋白複合体に何らかの変化が起こり、標的遺伝子の転写活性が活発化するモデルが提唱されている。LNCaP細胞は、wild type p53を発現している一方、PC-3細胞はp53 null細胞である。しかし、p53自身はLNCaP細胞におけるIGFBP-3プロモーターの酪酸応答には無関係であった。何故LNCaP細胞では乳癌細胞やPC-3細胞と異なる酪酸応答領域を持っているのか、また、この細胞でDNA-蛋白複合体に関わる未知の蛋白は何か、さらにはLNCaP細胞以外にもユニークな酪酸応答領域を示す細胞系があるのか、といった疑問を解いていくことが、今後の課題と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 野々村 克也

副 査 教 授 守 内 哲也

学 位 論 文 題 名

Differential Activation of the IGF Binding Protein-3 Promoter by Butyrate in Prostate Cancer Cells.

(酪酸による IGFBP-3 プロモーターの活性化：前立腺癌細胞における検討)

酪酸は、食物繊維が大腸内で腸内細菌の働きにより発酵・分解されて生ずる短鎖脂肪酸である。これまで、酪酸の細胞増殖抑制作用・分化促進作用・アポトーシス誘導作用が種々の細胞系（例えば、大腸癌・乳癌・肺癌・肝癌・前立腺癌細胞など）で調べられてきた。それらの作用の分子機構は未だ解明されていないが、酪酸の持つ histone deacetylase (HDAC) inhibitor としての働きとそれによりもたらされる hyper-acetylation が重要な鍵を握ると考えられている。

IGF binding protein (IGFBP)-3 は、IGF と結合しその生理活性を調節する以外に、IGF とは独立して細胞増殖を抑制しアポトーシスを誘導することが報告されている。我々は以前、IGFBP-3 と酪酸の作用の類似性に着目し、乳癌細胞において酪酸が IGFBP-1~6 のうち特に IGFBP-3 の産生を特異的に増加させることを確認した。そこで本研究では、前立腺癌細胞の中で 2 つの代表的な細胞系である PC-3 (androgen-non-responsive) cells と LNCaP (androgen-responsive) cells を用いて、酪酸添加によるプロモーター活性の変化とその応答領域の詳細な検討を行った。

【結果】 NaB 添加は、他の細胞系での報告と同様に PC-3 及び LNCaP 両細胞とも、用量依存性にヒストン H3 及び H4 のアセチル化を誘導した。また、NaB 添加により乳癌細胞で観察したのと同様に、PC-3, LNCaP 両細胞で IGFBP-3 の mRNA, 蛋白量は著明に増加した。

酪酸が IGFBP-3 の転写を活性化するメカニズムを調べるため、1.87 kb のヒト IGFBP-3 プロモーター領域を pGL2-basic luciferase reporter vector に組み込み、レポーター活性を測定した。コンストラクトの導入後、酪酸添加により活性は PC-3 細胞, LNCaP 細胞共に著明に増加した。このコンストラクトを基に、段階的な deletion mutants を作成し、同様にレポーター活性を測定したところ、PC-3 細胞においては転写開始点から-120 と-75 の間に位置する Sp1 site を除いた時に、プロモーター活性はほぼ失活した。これは、乳癌細胞において既に報告されているのと同様な結果だった。一方、LNCaP 細胞においてはこの部分を除いてもなおプロモーター活性はもとの

1.87 kb プロモーターの場合と同程度に保持されていた。酪酸のかわりに histone deacetylase inhibitor である TSA を添加した際にも同様の結果が得られた。酪酸による転写活性化が調べられている遺伝子で、これまでプロモーターの応答領域に Sp1 site を含まない報告は無かったので、LNCaP 細胞における IGFBP-3 プロモーターの新たな酪酸応答領域の検索をさらに進めた。新たに作成した deletion mutants による luciferase assay の結果、LNCaP 細胞における IGFBP-3 プロモーターの酪酸による活性化には、TATA box をはさんでほぼ対称的に位置する 2 つの領域が重要であることが判明した。この領域には、モチーフ検索により p53 (single) consensus binding site と GATA site がそれぞれ含まれていた。次に、site-directed mutants による luciferase assay の結果、p53 site は LNCaP 細胞における IGFBP-3 プロモーター活性化に重要であることがわかったが、GATA site は活性に影響を与えていなかった。しかし、DNA-蛋白結合を調べる目的で EMSA (electron-mobility shift assay) を行ったところ、p53 binding site と GATA site に相当する部位での DNA-蛋白結合が確認された。この結合自体は、酪酸添加の有無で変化は認められなかった。p53 binding site に結合している DNA-蛋白複合体に p53 自身が関わっているかどうかを supershift にて確認したが、p53 自身の関与は否定的であった。

【考察】これまでの報告では、酪酸がヒストンの hyperacetylation を引き起こすことにより多数の転写因子と DNA によって形成される DNA-蛋白複合体に何らかの変化が起こり、標的遺伝子の転写活性が活発化するモデルが提唱されている。LNCaP 細胞は、wild type p53 を発現している一方、PC-3 細胞は p53 null 細胞である。しかし、p53 自身は LNCaP 細胞における IGFBP-3 プロモーターの酪酸応答には無関係であった。何故 LNCaP 細胞では乳癌細胞や PC-3 細胞と異なる酪酸応答領域を持っているのか、また、この細胞で DNA-蛋白複合体に関わる未知の蛋白は何か、さらには LNCaP 細胞以外にもユニークな酪酸応答領域を示す細胞系があるのか、といった疑問を解いていくことが、今後の課題と考えられた。

公開発表に際し、副査の守内教授から、他の cell line でのデータの有無、Sp1 と似た構造が他の部位に無かったか、p53 site の結合分子の同定法についてなど、副査の野々村教授から、細胞の androgen 依存性と酪酸反応性との関連について、小児科関係の疾患とこの研究の関連性、胎児性癌細胞における酪酸反応性についてなど、主査の小林教授から、ヒストンアセチル化と DNA メチル化との関係、細胞内への酪酸移行のメカニズムについてなどの質問があったが、申請者は自らの研究結果と文献から概ね妥当に解答した。

本研究は、癌細胞の酪酸に対する種々の反応性の分子機構を詳細に検討したもので、結果として既知の機構とは異なる新しい機構の存在を示した点で評価され、今後のさらなる研究の進展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位をうけるのに十分な資格を有するものと判定した。