

平成22年2月

橋口浩一 学位論文審査要旨

主査 豊島良太
副主査 久留一郎
同 汐田剛史

主論文

Involvement of ETS1 in thioredoxin-binding protein 2 transcription induced by a synthetic retinoid CD437 in human osteosarcoma cells

(合成レチノイドCD437によるTBP2発現誘導におけるETS1転写因子の関与)

(著者：橋口浩一、土谷博之、富田暁子、上田知沙、明地雄司、坂部友彦、栗政明弘、
汐田剛史)

平成22年 Biochemical and Biophysical Research Communications 39巻 621頁～626頁

学 位 論 文 要 旨

Involvement of ETS1 in thioredoxin-binding protein 2 transcription induced by a synthetic retinoid CD437 in human osteosarcoma cells

(合成レチノイドCD437によるTBP2発現誘導におけるETS1転写因子の関与)

合成レチノイドの一つであるCD437は、小胞体ストレスやミトコンドリア機能障害などにより、レチノイン酸レセプター (RAR) 非依存的な経路を介して、癌細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている。さらに、CD437による新たな作用機序として、thioredoxin-binding protein 2 (TBP2) の発現亢進によって誘導されるapoptosis signal-regulating kinase1 (ASK1) およびc-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) の活性化が重要であることが最近明らかにされた。本研究ではCD437によるTBP2遺伝子の転写制御機構に着目し、その詳細な機序について検討した。

方 法

ヒト骨肉腫由来細胞株MG-63を用いた。CD437による細胞増殖抑制作用はWSTアッセイにより、アポトーシス誘導はHoechst33258染色およびDNAラダー解析により、それぞれ評価した。遺伝子発現量については、real-time RT-PCR法およびWestern blot法により行った。TBP2遺伝子プロモーター活性の解析は、転写開始点より3kbp上流をそれぞれの長さでクローニングした構造領域を、ルシフェラーゼ遺伝子の5'上流に配置した発現プラスミドを構築し、レポーターアッセイにより定量した。ETS1転写因子のTBP2プロモーター領域への結合は、ChIPアッセイにより検討した。

結果・考察

CD437はMG-63細胞の成長を妨げて、濃度依存的に生存細胞を減少させた。CD437で処理されたMG-63細胞はアポトーシスに特異的な核の形態を示し、アポトーシス細胞数は、濃度・時間依存性に増加した。つまり、CD437が、アポトーシスによって、MG-63細胞の細胞死を誘導することが示唆された。またCD437は、TBP2のmRNA発現を誘導した。さらに、この作用はRAR非依存性経路を介していた。MG-63細胞におけるCD437によるTBP2発現は、TBP2特異的siRNA (siTBP2) の導入により、抑制された。NegativeコントロールsiRNA (siNC) を導入したMG-63細胞では、CD437処理によりJNK1が活性化されたが、siTBP2を導入したMG-63細胞

ではJNK1の活性化が見られなかった。したがって、CD437処理されたMG-63細胞では、JNK1が活性化されることを示している。さらにレポーターアッセイを行ったところ、TBP2遺伝子転写開始点の上流-400~-300bpにCD437応答領域があることが明らかとなった。この領域の塩基配列を精査したところETS結合配列がクラスター状に存在していたため、ETSファミリー転写因子（ETS1、ELF1、TEL、ESE1）発現ベクターを強制発現させ、レポーターアッセイを行った。その結果、ETS1とESE1は、TBP2プロモーター活性を増加させたが、ELF1とTELでは活性の増加は見られなかった。さらに、4 μ MのCD437により、ETS1が発現誘導され、TBP2プロモーター活性を増加させたが、ESE1では増加しなかった。また、ChIPアッセイにより、CD437処理後には、TBP2プロモーター領域へのETS1転写因子の結合能が有意に増加することを明らかにした。以上の結果より、ETSファミリー転写因子、特にETS1がこの領域を介したTBP2遺伝子発現誘導に関与していることが示唆された。

結 論

本研究において、合成レチノイドCD437は骨肉腫由来MG-63細胞のアポトーシスを誘導した。CD437によるMG-63細胞のアポトーシス誘導機序として、CD437によるTBP2の発現誘導が重要であり、下流のJNK1の活性化に寄与することを示した。さらに、CD437のTBP2誘導はETS1転写因子が関与していることを明らかにした。合成レチノイドCD437は、今後、骨肉腫の有用な治療薬となりうる可能性が示唆された。