

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870489

研究課題名(和文)甲状腺癌細胞における細胞内エネルギー/糖代謝調節機構の解明と抗癌治療戦略の構築

研究課題名(英文) Study on the molecular mechanism of intracellular energy of thyroid follicular cancer cells and development of new therapeutic strategy for thyroid cancer

研究代表者

田口 崇文 (Taguchi, Takafumi)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師

研究者番号：40437710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺細胞におけるエネルギー代謝関連因子の同定及び制御機構の分子的解明を行うことを目的として、転写補助因子及び PAX8-PPAR 融合蛋白の甲状腺細胞内エネルギー代謝に及ぼす効果を検討した。結果、PAX8-PPAR 融合蛋白の AQP7 転写調節機構において、リガンド非依存性活性効果は PGC-1 を介した機序が、リガンド依存性活性効果は SRC-1 を介した機序であることが推察され、PPAR ドメインが AQP7 DNA 結合活性の維持に重要であることが示唆された。

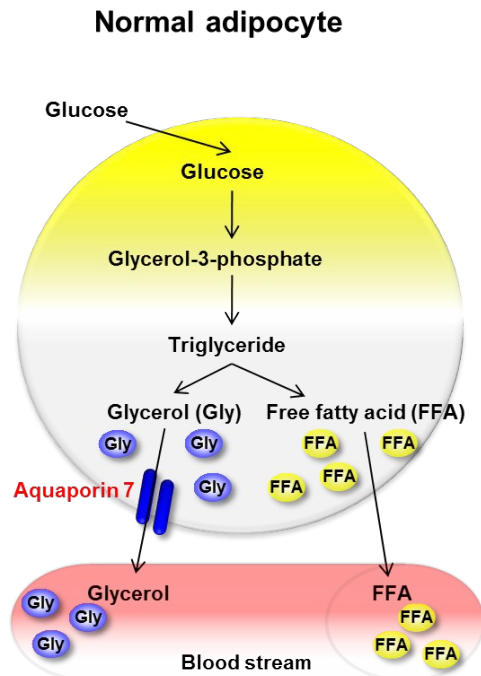
研究成果の概要(英文)：The present research demonstrated that the co-transfected SRC-1 increased transcriptional activity of PPAR and PAX8-PPAR on the AQP7 promoter in the presence of ciglitizone. On the other hand, co-transfected PGC-1 strongly upregulated PAX8-PPAR transcriptional activity on the AQP7 promoter even in the absence of ciglitizone. We confirmed that these transcriptional effects depend primarily on the presence of the PPAR DNA binding domain (DBD), such that either mutation of the PPAR DBD in PAX8-PPAR, or mutation of the putative PPAR response element, was sufficient to abolish PAX8-PPAR-mediated regulation of the AQP7 promoter. We conclude that PAX8-PPAR has strong ligand-independent activity on AQP7 transcription that may be mediated via its interaction with PGC-1 and that ligand-dependent activity may be mediated via SRC-1 recruitment.

研究分野：内分泌

キーワード：甲状腺

1. 研究開始当初の背景

甲状腺癌細胞の増殖に関わる細胞内エネルギー代謝の分子調節機構は明らかではない。近年の報告では、甲状腺濾胞癌の一部に染色体転座 t(2;3)(q13;p25) が認められ、本転座が甲状腺転写因子 PAX8 の DNA 結合ドメインと PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) 結合ドメインの融合蛋白の発現に関連しているとされている。また PAX8-PPAR 含有甲状腺濾胞癌は血管浸潤を来しやすく、予後不良因子であることが判明している (Science 2000;289:1357-1360, Clin Cancer Res 2006;12:1983-1993)。さらに PPAR 標的遺伝子の一つであるアクアポリン(AQP)7 遺伝子は、水/グリセロール輸送蛋白で、PAX8-PPAR 陽性甲状腺濾胞癌において高発現していることが知られている (Clin Can Res. 2006;12:1983-1993, Nature. 2005;438:436-437)。



Nature. 2005;438:436-437

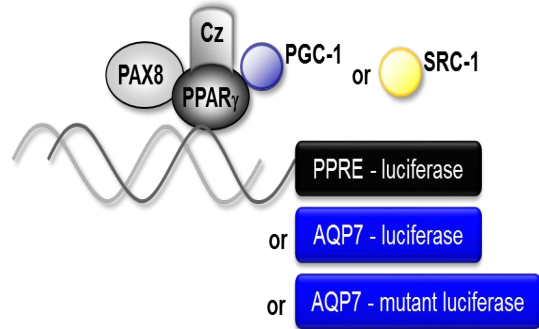
2. 研究の目的

甲状腺細胞における細胞内エネルギー代謝関連因子の同定及び制御機構の分子的解明を行うことを目的として、転写補助因子及び PAX8-PPAR 融合蛋白の甲状腺細胞内エネルギー代謝に及ぼす効果を検討する。

3. 研究の方法

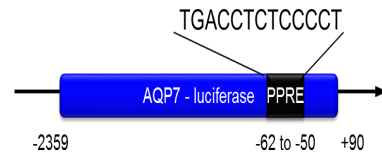
(1) ヒト甲状腺上皮細胞を用いて PPAR リガンド(シグリタゾン: Cz)の添加下に、PAX8、PPAR、PAX8/PPAR 発現プラスミド、また

PPAR coactivator-1 (PGC-1) 及び Steroid Receptor Coactivator-1(SRC-1) をはじめとする共活性化因子の、ペルオキシソーム増殖剤応答配列転写活性及び Glycerol channel protein である Aquaporin7 (AQP7) 転写活性に及ぼす影響を検討した。Reporter assay においては、下記コンストラクトを用いた。



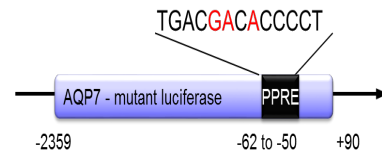
AQP7 - luciferase reporter assay

The AQP7 luciferase promoter construct containing the normal PPRE site.



AQP7 - mutant luciferase reporter assay

AQP7 - mutant luciferase includes GACA mutation in PPRE.



(2) PAX8、PPAR、PAX8/PPAR、AQP7 において、遺伝子配列ノックアウト活性を検討した。

(3) 上記プラスミドよりの in vitro 合成蛋白及び PPRE/AQP7 プロンプを用いて、EMSA での DNA 結合ドメインを検討した。

4. 研究成果

(1)(2)

PPAR 及び PAX8-PPAR と SRC-1 の共発現は、シグリタゾンの添加下で、ペルオキシソーム増殖剤応答配列転写活性及び AQP7 転写活性を亢進させた。他方、PAX8-PPAR と PGC-1 の共発現は、シグリタゾンの非添加下においても、ペルオキシソーム増殖剤応答配列転写活性及び AQP7 転写活性を著明に増加させた (下図)。また PAX8-PPAR 融合蛋白による AQP7 プロモーター活性の亢進は、同遺伝子の変異により失活した。

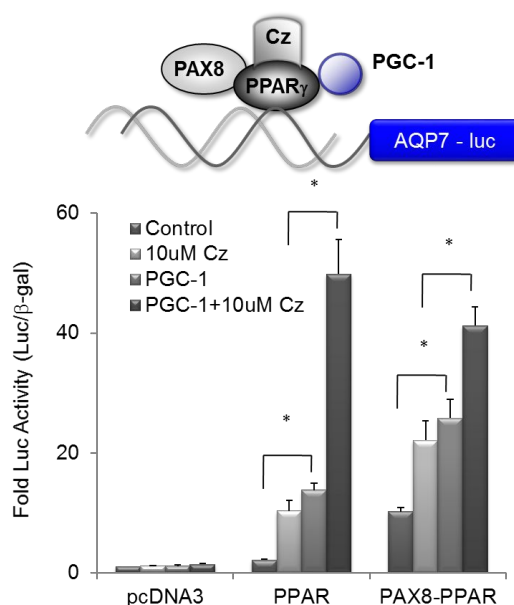
(3)

AQP7 プロンプを用いた EMSA では、PPAR 変異により PPAR /PAX8PPAR とともに結合失活し、PPAR ドメインが AQP7 DNA 結合活性の維持に重要であることが示唆された。

以上の結果より、PAX8-PPAR 融合蛋白は転写補助因子と協調して、ペルオキシソーム増殖剤応答配列転写活性及びアクアポリン 7 転写活性を増強させることが明らかとなった。

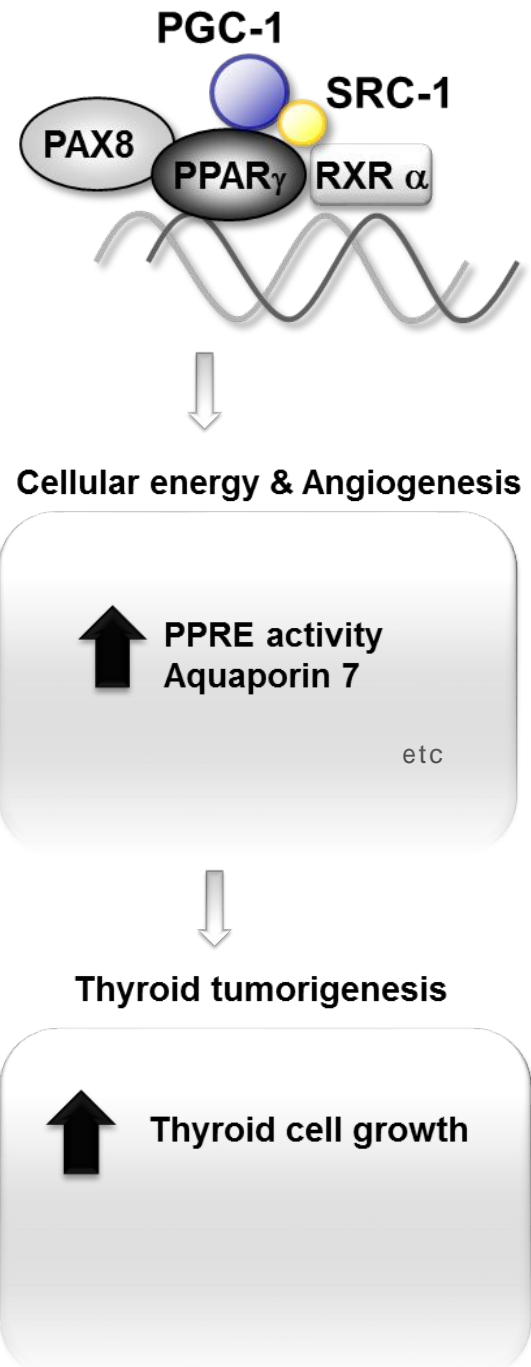
さらに PAX8-PPAR 融合蛋白のペルオキシソーム増殖剤応答配列転写活性及び AQP7 転写活性の調節機構において、リガンド非依存性活性効果は PGC-1 を介した機序が、リガンド依存性活性効果は SRC-1 を介した機序であることが推察された。

本研究結果は、甲状腺細胞内エネルギー代謝制御機構における転写補助因子の分子調節機序の一端を明らかとした。



仮説:

The role of PAX8/PPAR in follicular thyroid tumorigenesis



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計1件)

田口 崇文, 中山 修一, 次田 誠, 西山 充, 岩崎 泰正, 橋本 浩三, 寺田 典生
甲状腺癌細胞における転写補助因子のエネルギー代謝調節機構に関する検討, 第 57 回日本甲状腺学会学術集会, 2014 年 11 月 13 日
ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター・大阪府・大阪市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 崇文 (TAGUCHI, Takafumi)
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師
研究者番号：40437710