

審査結果の要旨

氏名 鈴木 淳

本研究はPPAR γ ligandによるcolon cancer cellへの細胞増殖抑制効果のtranscription levelでのpathwayを明らかにするために、colon cancer cell lineであるHCT116にPPAR γ 特異的ligandであるBRL49653を作用させることにより細胞増殖抑制を誘導し、その際のgene expressionの変化をcDNA microarrayを用いて経時的かつ網羅的解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. HCT116にBRL49653を0, 5, 10, 20 μ M添加後12hourにてはcell countには差が認められなかったが、24hourより各濃度にて有意差が認められた。また、FACSの結果にて、BRL49653を20 μ M添加したものでは12hourよりG1-S transition inhibitionが認められた。BRL49653を20 μ M添加したものでは12hourの時点で細胞増殖抑制が生じていることが示された。
2. HCT116に対し、Firefly luciferase vector にrat acyl-CoA oxidase gene上流に存在するPPREを2個組み込んだものを使用しluciferase reporter assayを行ったところ、BRL49653を20 μ M添加したものでは0 μ Mのものと比較し2.9倍の活性を示し、PPAR γ がBRL49653添加により転写因子として作用していることが示された。
3. HCT116にBRL49653を0, 5, 10, 20 μ M添加後1, 3, 6, 12, 24hourにてtotal RNAを抽

出し、このうち20 μ M添加したものにつきin-vitro transcriptionによりCy5でlabelし、time 0で抽出したtotal RNAはCy3でlabelし、それぞれのexpressionの比(Cy5/Cy3=fold induction)をcDNA microarrayを用い解析した。12hour, 24hourにおいて持続的にfold induction 2以上の変化を示すgeneは18、fold induction 0.5以下の変化を示すgeneは6存在した。fold induction 2以上の変化を示したもののうちで細胞増殖抑制作用を有するものが5gene (early growth response 1, immediate early response 3, prostate differentiation facror, B-cell translocation gene 1, cyclin G2) 存在することが示された。これらのうち4geneは6hourよりexpressionの上昇が認められた。この5geneは上記total RNAを用いたRT-PCRにてもcDNA microarrayを同様の結果になっていること、また、BRL49653のdose dependentにexpressionが強くなることが確認された。

4. RB pathway cell cycle component geneについてはcDNA microarrayにおけるsignal intensityがthreshold以下のものが多かったため、3. と同じtotal RNAを用いてRT-PCRを行った。12hourよりE2F1, E2F2, E2F3, DP1のexpressionが低下し、また、24hourにてはexpressionがほぼ消失していることが示された。

以上、本論文はcolon cancer cellであるHCT116においてPPAR γ ligandによりtranscriptionの惹起される細胞増殖抑制に関与するgeneを、cDNA microarrayによる解析により明らかにした。また、細胞増殖抑制がE2F1, E2F2, E2F3, DP1のexpressionの低下によることも明らかにした。本研究はこれまで明らかにされていなかったPPAR γ ligandに細胞増殖抑制のpathwayの解明に重要な貢献をなすものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。