

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19790912

研究課題名（和文） 乳癌の薬剤耐性機序の解明—核内受容体SXRによるUGT発現の関与

研究課題名（英文） mechanism of drug resistance in breast cancer: the correlation between steroid and xenobiotic receptor (SXR) and UDP-glucuronosyltransferase (UGT)

研究代表者

小田原 宏樹 (ODAWARA HIROKI)

群馬大学・医学部・医員

研究者番号：10420134

研究成果の概要（和文）：

Steroid and xenobiotic receptor (SXR)は核内ホルモン受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性の転写因子である。これまでに、我々は乳癌細胞においてSXRがシトクロームP450 3A4蛋白 (CYP3A4) およびP-糖タンパク (MDR-1) の発現を活性化することを明らかにした。薬物代謝のphase IIは抱合でありUDP-glucuronosyltransferase (UGT)が担うことから、本研究では乳癌細胞におけるUGTとSXRの関係について注目した。UGT1A1はエストロゲンを代謝する酵素として知られている。UGT1A4およびUGT2B7は乳癌治療薬のタモキシフェンを代謝する酵素である。我々は乳癌細胞株におけるUGT1A1, UGT1A4, UGT2B7の発現をmRNAレベルで確認した。肝細胞癌の培養細胞レベルではSXRによりUGT1A1およびUGT1A4の発現がコントロールされるという報告が存在する。我々は乳癌細胞株を用いてUGT1A4のmRNAがSXRにより発現増加することをRT-PCRで確認した。次に、乳癌組織におけるUGT1A1, UGT1A4およびUGT2B7の発現を調べた。平成19年から20年度にかけて当院にて手術を行った乳癌症例のうち70症例を用いて、Real-time RT-PCRで測定したところ、UGT1A1およびUGT1A4の発現とSXRの間には相関を認めなかった。UGT2B7は測定困難であった。乳癌においてUGT1A1およびUGT1A4の発現は確認できたが肝臓同様にSXRにてコントロールされているという根拠は現時点では乏しいと考えられるが、コントロールを示唆する結果も存在し、さらなる研究が必要である。

研究成果の概要（英文）：

Steroid and xenobiotic receptor (SXR) is ligand-activated transcription factor, which is a member of the nuclear hormone receptor superfamily. We have reported that SXR activated the expression of CYP3A4 and MDR-1, playing a part of phase I stage in drug metabolism, in breast cancer cells lines. Conjugation is the phase II stage of drug metabolism, and is catalyzed by UDP-glucuronosyltransferase (UGT). So, we investigated the correlation between SXR and UGT in breast cancer cells.

We confirmed the expression of UGT1A1, UGT1A4 and UGT2B7 mRNA by RT-PCR in breast cancer cell lines. UGT1A1 can conjugate estrogens. UGT1A4 and UGT2B7 can conjugate tamoxifen, which is the drug for hormone therapy of for breast cancer. It was reported that Since the expression of UGT1A1 and UGT1A4 are is regulated by SXR in hepatocellular carcinoma cell lines. W, we also studied and confirmed the up-regulation of UGT1A4 expression by SXR in breast cancer cell lines. Furthermore, Wwe investigated the expression levels of UGT1A1, UGT1A4 and UGT2B7 in breast cancer tissues by real-time RT-PCR, using the specimens from 70 breast cancer patients, who were undergone the operation in Gunma University Hospital between in 2007 and 2008. There was were no correlations between SXR and UGT1A1, and. There was also no correlation between SXR and UGT1A4 mRNA levels. But wWe could not measure the expression level of UGT2B7 mRNA. In summary, Wwe could not obtain fund the evidence for regulation of UGT by SXR from this experiment plan. Because there is a fewseveral evidences of that such regulation, so we need more experiment.more study may be necessary.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	570,000	3,870,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳癌. 薬物代謝. UGT. SXR. エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

乳癌治療において、薬物治療は重要な役割を担っている。「乳癌は全身疾患で、全身的治疗が必要である」という考え方が普及した現在、乳癌の再発治療のみならず、初期治療（術後補助療法）の段階から抗癌剤とホルモン剤を用いた全身的治疗の必要性が認識されている。乳癌の手術後、リンパ節転移の有無や、組織核異型度、脈管侵襲の程度、ヒト上皮増殖因子受容体2 (HER2) の過剰発現の有無、そして年齢により再発リスクが分類され、加えてエストロゲンレセプター (ER) やプロゲステロンレセプターの発現の有無によるホルモン感受性を加味して抗癌剤やホルモン剤治療の適応が決定されている。しかし、適応を考慮して薬物治療を行っても応答の乏しい症例が少なからず存在し、乳癌治療薬の薬剤効果を推測できるような新たな予後因子の開発が求められている。

Steroid and xenobiotic receptor (SXR)

は1998年に報告された2型核内ホルモン受容体である。薬物代謝に重要なCYP3A4やMDR-1遺伝子のプロモーター領域にあるSXR応答領域 (SXRE) に結合し、転写を活性化させる。SXRのリガンド結合ポケットは広く、様々なステロイド産物や薬剤が結合し、その薬物自体の代謝を促進する。SXRは肝臓や小腸などの薬物代謝に重要な臓器に発現しているが、乳癌細胞にも発現していることが分かっている (H Dotzlaw et al, *Clinical Cancer Research*, 5, 2103-2107, 1999)。我々は従来からSXRが乳癌細胞に及ぼす影響を検討してきた。そして、乳癌のホルモン療法に用い

られる抗エストロゲン剤タモキシフェン

(TAM) により、乳癌細胞におけるCYP3A4遺伝子の転写がSXRの発現量依存性に促進されることを発見した。CYP3A4はTAMの代謝酵素であり、発現上昇はTAM耐性の原因の1つとなりうると考えられた (Nagaoka R. et al. *Endocrine* 30, 261-8, 2006)。また、SXRとERの間に転写共役因子を介したクロストークがあり、SXRの発現がエストロゲン作用を増強し乳癌の発育につながることを見いだした。この機序は、通常ERに結合しているコリプレッサーのsilencing mediator for retinoid and thyroid receptor (SMRT) がSXRと優先的に結合することでERから解離し、ERを介する転写活性の脱抑制が生じるためであることを解明した。(Rokutanda N. et al. *Endocrine*, 33, 305-16, 2008)。これらの研究からSXRの発現が乳癌の進展やホルモン耐性や化学療法耐性につながり新しい乳癌の予後因子になりうると考えた。

つぎに、薬物代謝のphase II (抱合) を担うUDP-glucuronosyltransferase (UGT) とSXRの関係に注目した。UGTは多くのステロイドや薬剤を代謝基質としてグルクロン酸抱合し、薬物の活性を下げ、かつ、親水性を上げて排泄しやすくする。UGTは約20のアイソフォームがあるが、基質・発現ともに未知な部分が多い。基質に関しては多少の重なりはあるが、各々のアイソフォームごとに代謝する基質が決まっている。発現は主に肝臓だが、他の臓器にも広く発現し、臓器により発現するアイソフォームが異なることが分かっている。

2. 研究の目的

UGT1A1は乳癌細胞にも発現していることが分かっており、エストロゲンのグルクロン酸抱合を担っていると考えられている。**乳癌細胞におけるUGTの発現の報告は現時点ではUGT1A1のみであり、他のアイソフォームに関しては未知である。**また、UGT1A1はそのプロモーター領域にSXR response element (SXRE)が同定され、肝細胞内ではSXRによりコントロールされていることも報告されている。SXREが同定はされていないものの、UGT1A1以外にも肝細胞においてSXRにより発現が増加するアイソフォームの報告がある。UGT1A4とUGT2B7は、肝細胞において、乳癌治療薬タモキシフェン (TAM) のグルクロン酸抱合の大部分を担っており、SXRにより転写制御されること (SXREは未同定) がわかっている。肝細胞内と同様に乳癌細胞内においても同様の作用が生じ、乳癌治療におけるTAM耐性の原因の1つとなっている可能性がある。今回、我々は基礎研究と臨床研究の両面から、SXRとUGTの関係について解析し、TAM耐性機序および、SXRの薬剤効果予測因子としての可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

基礎研究において

- ① 乳癌培養細胞株におけるUGTアイソフォームの発現をRT-PCRおよびWestern blot法で解析する。
- ② 乳癌培養細胞株におけるSXR過剰発現状態、siRNAによるSXR非発現状態、そして様々なリガンド添加などによるUGTアイソフォームの発現変化をRT-PCRで解析する。
- ③ ヒトUGT1A4およびUGT2B7のプロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドを作成し、レポーターアッセイにてSXREを絞り込む。mutation実験にてSXREを同定する。
- ④ デュアルレポーターアッセイにて同一細胞内の2つのプロモーター (例えば、CYP3A4とUGT, UGT1A4とUGT2B7など) へのSXRの競合的影響を解析する。
- ⑤ UGT assay kitを用いてUGT活性を測定しSXRによるグルクロン酸抱合力能への影響を解析する。

臨床研究において

- ① 乳癌手術検体におけるSXRおよびUGTの発現量をReal-time RT-PCR法により測定する。
- ② 臨床所見や病理免疫組織学的組織所見、薬剤感受性などの因子とSXRの関係を解析する。

4. 研究成果

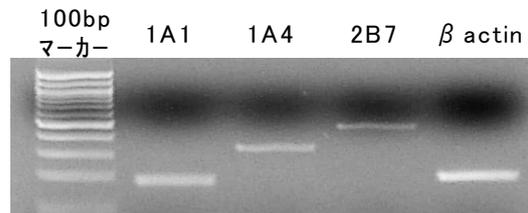
基礎研究

- ① 乳癌細胞株におけるUGTアイソフォームの発現確認

<目的>UGT1A1の乳癌における発現は既に報告されているが、他のアイソフォームの発現に関する報告はない。まず、乳癌に関係が深いと考えられるUGT1A4とUGT2B7の発現を確認する。

<方法>乳癌細胞株MCF7からtotal RNAを採取しUGT1A1, UGT1A4, UGT2B7に特異的なプライマーを用いてRT-PCRを施行。また、Western blotにて蛋白の発現確認も施行する。

<結果>乳癌培養細胞株MCF7においてUGT3種の発現を認めた。Western blotにて蛋白の発現も確認したが、各アイソフォームを識別する抗体は市販されておらず断念した。



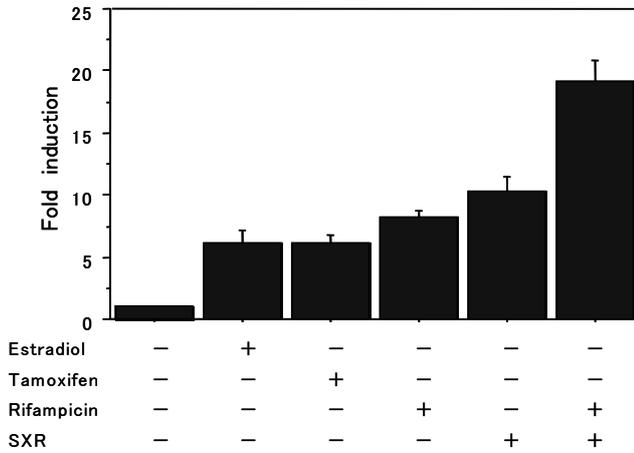
- ② 乳癌培養細胞株におけるSXRによるUGTの発現変化

<目的>SXRの発現量に応じてUGTアイソフォームの発現量に変化が生じるかどうかをRT-PCRで解析する。

<方法>乳癌培養細胞株MCF7にSXR発現プラスミドベクターを遺伝子導入し発現量を増加させ、UGTのmRNAの変化をreal-time RT-PCRで解析する。

<結果>MCF7はSXRの発現が元々あり、リガンド (リファンピシン) のみの投与でもUGT1A4の発現が増加した。SXR過剰発現にてUGT1A4の発現増加を認めた。Estradiolにより増加しているのはSXRを介するためかERを介するためかは現時点では不明だが、UGT1A4のプロモーター領域にER応答部位が存在する可能性

も示唆された。siRNA を用いて内因性の SXR を減らす実験においてはもとの発現量が少ないためか特に変化を確認できなかった。



③ UGT1A4 および UGT2B7 のプロモーター解析

<目的>少なくとも UGT1A4 のプロモーター領域には SXRE の存在がうかがえる。SXRE を同定したい。

<方法>UGT1A4 のプロモーター領域 5kbp を組み込んだレポータープラスミドを作成しレポーター遺伝子アッセイを行う。その後、SXRE の絞り込みを行う。最終的には DNA-蛋白結合実験や mutation 実験にて SXRE を同定する。

<結果>UGT1A4 のプロモーター領域の PCR には成功しルシフェラーゼ発現プラスミドベクターへの組み込みは成功したが、MCF7 にて SXR 応答性を確認できなかった。プラスミドベクターが不完全である可能性が第一に考えられる。

方法 4) 及び 5) は施行できていない

臨床研究

① 乳癌手術検体における SXR および UGT アイソフォームの発現量測定

<目的>SXR の発現量解析報告は少数存在するが UGT の発現解析は存在しない

<方法>乳癌手術検体より組織を採取し各 mRNA の発現量を real-time RT-PCR で定量する。

<結果>70 例を用いて測定した。全例において SXR の発現を認めた。UGT1A1 および UGT1A4 は測定がやや不安定であったが発現を認めた。UGT2B7 は培養細胞株と異なり発現が測定できず、real-time 測定は困

難であった。primer の再検討が必要である。

② SXR および UGT と臨床病理学的因子との関係

<目的>臨床病理学的因子との関連や他種の核内ホルモン受容体との相関関係の解析を行う。

<方法>相関係数の測定。T 検定

<結果>UGT1A4 と SXR の発現には相関を認めなかった。また、グルココルチコイド受容体と負の相関を認めた。ほか、UGT1A1 も SXR とは相関を認めず、アンドロゲン受容体と正の相関を認めた。乳癌組織における SXR の発現はリンパ節転移陽性群、核異型度の高い群、エストロゲン受容体の陰性群・HER2 陽性群で有意に低かった。予後良好因子である可能性が高い。

考察

乳癌において UGT1A1 および UGT1A4 の発現は確認できたが肝臓同様に SXR にてコントロールされているという根拠は現時点では乏しいと考えられるが、コントロールを示唆する結果も存在し、さらなる研究が必要である。乳癌における SXR の発現は、予後解析を行ってはいないため結論付けられないが、分化度の高い乳癌で発現しており、予後良好因子である可能性が示唆された。

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 4 件)

1. Hiroki Odawara, Toshiharu Iwasaki, Jun Horiguchi, Nana Rokutanda, Kazumi Hirooka, Wataru Miyazaki, Yukio Koibuchi, Noriaki Shimokawa, Yuichi Iino, Izumi Takeyoshi, and Noriyuki Koibuchi. Activation of Aromatase Expression by Retinoic Acid Receptor-related Orphan Receptor (ROR) α in Breast Cancer Cells: Identification of a novel ROR response element IDENTIFICATION OF A NOVEL ROR RESPONSE ELEMENT. J Biologic Chem **284**: 17111-9, 2009 査読有
2. Rokutanda N, Horiguchi J, Koibuchi Y, Nagaoka R, Sato A, Odawara H, Tokiniwa H, Iino Y, Hirato J, Takeyoshi I. Isolated retromammary lymph node metastasis of breast cancer without

axillary lymph node involvement: a case report with a false-negative sentinel lymph node biopsy. Breast Cancer. **16**:162-5, 2009 査読有

3. Rokutanda N, Iwasaki T, Odawara H, Nagaoka R, Miyazaki W, Takeshita A, Koibuchi Y, Horiguchi J, Shimokawa N, Iino Y, Morishita Y, Koibuchi N. Augmentation of estrogen receptor-mediated transcription by steroid and xenobiotic receptor. Endocr. **33**:305-316, 2008 査読有
4. 堀口淳, 鯉淵幸生, 六反田奈和, 長岡りん, 菊地麻美, 佐藤亜矢子, 小田原宏樹, 石川裕子, 時庭英彰, 飯野佑一, 竹吉泉. 手術不能または再発乳癌に対する Capecitabine (Xeloda) と Weekly Paclitaxel (Taxol) の併用化学療法における容量設定試験. 癌と化療 **35**:1877-1881, 2008 査読有

〔学会発表〕(計15件 全て筆頭演者)

国際学会

1. Hiroki Odawara, Jun Horiguchi, Toshiharu Iwasaki, Yukio Koibuchi, Nana Rokutanda, Wataru Miyazaki, Hideaki Tokiniwa, Yuichi Iino, Noriyuki Koibuchi, Izumi Takeyoshi. Activation of breast cancer cell proliferation by ROR-alpha through aromatase promoter. European Breast Cancer Conference 7, 2010. 3. 24-27 (Barcelona)
2. Hiroki Odawara, Jun Horiguchi, Toshiharu Iwasaki, Yukio Koibuchi, Rin Nagaoka, Nana Rokutanda, Ayako Sato, Hideaki Tokiniwa, Yuichi Iino, Noriyuki Koibuchi, Izumi Takeyoshi. Direct interaction of ROR α with aromatase promoter in breast cancer cells. Global Breast Cancer Conference 2009 2009. 10. 8-10 (Seoul)

国内学会

3. 小田原宏樹, 堀口淳, 岩崎俊晴, 鯉淵幸生, 六反田奈和, 長岡りん, 佐藤亜矢子, 時庭英彰, 戸塚勝理, 飯野祐一, 鯉淵典之, 竹吉泉. 乳癌組織における核内ホルモン受容体 ROR α 発現の意義. 第71回日本臨床外科学会総会 2009. 11. 19-21 (京都)
4. 小田原宏樹, 堀口淳, 岩崎俊晴, 鯉淵幸生, 六反田奈和, 長岡りん, 佐藤亜矢子,

時庭英彰, 飯野佑一, 鯉淵典之, 竹吉泉. 乳癌組織における核内ホルモン受容体 ROR α とアロマターゼ発現の関係. 第10回ホルモンと癌研究会 2009. 7. 31-8. 1 (仙台)

5. 小田原宏樹, 堀口淳, 岩崎俊晴, 鯉淵幸生, 六反田奈和, 長岡りん, 佐藤亜矢子, 時庭英彰, 戸塚勝理, 飯野佑一, 鯉淵典之, 竹吉泉. 核内ホルモン受容体 ROR α によるアロマターゼ遺伝子の新たな活性化機序. 第19回乳癌基礎研究会 2009. 7. 25-6 (群馬)
6. 小田原宏樹, 堀口淳, 岩崎俊晴, 鯉淵幸生, 六反田奈和, 長岡りん, 佐藤亜矢子, 時庭英彰, 飯野祐一, 鯉淵典之, 竹吉泉. 乳癌組織における核内受容体 ROR α の発現解析. 第17回日本乳癌学会総会 2009. 7. 3-4 (東京)
7. 小田原宏樹, 岩崎俊晴, 堀口淳, 鯉淵幸生, 六反田奈和, 長岡りん, 宮崎航, 飯野佑一, 竹吉泉, 鯉淵典之. ROR α によるアロマターゼ遺伝子の新たな活性化メカニズムの解明-乳癌への影響-. 日本内分泌学会総会 2009. 4. 23-25 (群馬)
8. 小田原宏樹, 堀口淳, 岩崎俊晴, 鯉淵幸生, 六反田奈和, 長岡りん, 時庭英彰, 樋口徹, 飯野祐一, 鯉淵典之, 竹吉泉. 核内受容体 ROR α による乳癌細胞増殖能の活性化. 日本外科学会第109回総会 2009. 4. 2-4 (福岡)
9. 小田原宏樹, 堀口淳, 鯉淵幸生, 長岡りん, 六反田奈和, 佐藤亜矢子, 時庭英彰, 樋口徹, 飯野祐一, 竹吉泉. 術前化学療法による縮小形態が特殊であった pCR の1例, 日本臨床外科学会 第70回総会 2008. 11. 27-11. 29 (東京)
10. 小田原宏樹, 堀口淳, 岩崎俊晴, 鯉淵幸生, 六反田奈和, 長岡りん, 佐藤亜矢子, 時庭英彰, 宮崎航, 飯野祐一, 鯉淵典之, 竹吉泉. 核内受容体 ROR α によるアロマターゼ遺伝子の活性化とその影響, 日本乳癌学会 第16回総会 2008. 9. 26-9. 27 (大阪)
11. 小田原宏樹, 堀口淳, 岩崎俊晴, 鯉淵幸生, 六反田奈和, 長岡りん, 佐藤亜矢子, 時庭英彰, 宮崎航, 飯野祐一, 鯉淵典之, 竹吉泉. 乳癌における ROR α の発現とその影響-アロマターゼ遺伝子の活性化-, 第9回ホルモンと癌研究会

2008. 6. 20-6. 21 (岐阜)

12. 小田原宏樹, 堀口淳, 岩崎俊晴, 鯉淵幸生, 六反田奈和, 長岡りん, 佐藤亜矢子, 時庭英彰, 飯野祐一, 鯉淵典之, 竹吉泉. 乳癌における核内受容体 ROR α によるアロマターゼ遺伝子の活性化, 第 18 回 群馬 clinical oncology research 勉強会 2008. 6. 5 (群馬)
13. 小田原宏樹, 堀口淳, 岩崎俊晴, 鯉淵幸生, 六反田奈和, 宮崎航, 時庭英彰, 飯野祐一, 鯉淵典之, 竹吉泉. 乳癌における ROR α によるアロマターゼ遺伝子発現の活性化, 日本外科学会 第 108 回総会 2008. 5. 15-5. 17 (長崎)
14. 小田原宏樹, 堀口淳, 岩崎俊晴, 鯉淵幸生, 六反田奈和, 長岡りん, 宮崎航, 飯野祐一, 鯉淵典之, 竹吉泉. 乳癌細胞における PCB による核内ホルモン受容体を介する転写の活性化, 日本乳癌学会 第 15 回総会 2007. 6. 29-6. 30 (横浜)
15. 小田原宏樹, 堀口淳, 鯉淵幸生, 長岡りん, 六反田奈和, 佐藤亜矢子, 石川裕子, 飯野祐一. アルドステロン産生腫瘍の術前局在診断としての副腎静脈血サンプルリングの有用性, 日本外科学会 第 107 回総会 2007. 4. 11-4. 13 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田原 宏樹 (ODAWARA HIROKI)

群馬大学・医学部・医員

研究者番号：10420134

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし