

機関番号 : 32607

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20590352

研究課題名 (和文) アポトーシス関連遺伝子 Par-4 による子宮内膜発癌抑制機構の解明と治療への展開

研究課題名 (英文) A functional role of Par-4 in endometrial tumorigenesis

研究代表者

三枝 信 (SAEGUSA MAKOTO)

北里大学・医学部・教授

研究者番号 : 00265711

研究成果の概要 (和文) : アポトーシス関連分子 Prostatic apoptosis response-4 (Par-4)は、正常子宮内膜の間質細胞で月経期に一過性の発現増加を示し、かつ、リン酸化 NF- κ B /p65 やアポトーシスと正の相関を示した。子宮内膜癌はその発現が減少したが、リン酸化 p65 とは正の相関を示した。培養細胞に p65 遺伝子を導入すると、転写レベルで Par-4 発現が誘導された。Par-4 遺伝子導入は bcl-2 や p21^{WAF1} 発現変化を介したアポトーシスや細胞増殖停止を誘導した。以上から、子宮内膜発癌過程で、NF- κ B/p65 依存性 Par-4 系はアポトーシスや細胞周期調節等を含む細胞動態の調節に関与することが明らかになった。

研究成果の概要 (英文) : Constitutively high levels of Par-4 expression were observed in epithelial cells through the menstrual cycle, in contrast to the transient up-regulation in stromal components in the menstrual stage, positively correlated with the phospho-p65 and apoptosis. Most ECs exhibited significant down-regulation, with positive link only to p65 expression. Transfection of p65 led to transactivation of Par-4. Overexpression of Par-4 resulted in induction of not only apoptosis but also senescence, through changes in expression of bcl-2 and p21^{WAF1}, respectively. Together, these findings suggest that as a signaling cascade involving sequential activation of NF- κ B/p65 and Par-4 may participate in relatively early events of endometrial tumorigenesis, leading to modulation of cell kinetics including apoptosis and cell cycle progression.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究代表者の専門分野 : 分子病理学、婦人科病理学

科研費の分科・細目 : 基礎医学・人体病理学

キーワード : Par-4、子宮内膜癌、アポトーシス、細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

(1) Prostate apoptosis response 4 (Par-4) は leucine zipper domain を有する分子で、前立腺癌細胞がアポトーシスに陥る際に発現が増加する分子として発見された(Sell et al, *Cell Growth Diff*1994)。最近、Par-4 null マウスで80%に子宮内膜過形成、36%に子宮内膜癌が発生することが報告され(Garcia-Cao et al, *EMBO reports* 2005)、これを契機に Par-4 は子宮内膜癌の抑制遺伝子と位置づけられた。しかし、ヒト正常子宮内膜および癌組織で、① Par-4 はどのような機序でその発現が制御されているか、② Par-4 のアポトーシス誘導作用と内膜癌抑制作用にはどのような関係があるか、③ Par-4 はどのようなシグナル伝達系に影響を及ぼすか、等の重要な問題は殆ど未解決のままに残されている。

(2) 研究代表者はこれまでに子宮内膜癌の遺伝子治療確立を目指し、 β -カテニンシグナルループによる内膜癌細胞の増殖抑制・分化誘導機構の解析を行ってきた。その結果、① β -カテニン遺伝子異常は、臨床病理学的に高分化型、早期臨床病期及びリンパ節転移の欠如等の内膜癌の予後良好因子と密接に関連する (*Br J Cancer* 2001)、② 内膜癌細胞の増殖停止・分化誘導の指標となる扁平上皮化生への形質転換の早期シグナルになる (*J Pathol* 2001)、③ 内膜癌細胞に対する大量プロゲステロン療法の効果発現において中心的役割を演じている (*Cancer Sci* 2003) ことを明らかにした。また、 β -カテニンシグナル系は、④ TCF4/p300 と positive feedback loop 形成し、その下流の p14^{ARF}/p53/p21^{WAF1} 系活性化及び p16^{INK4A} 発現誘導化を介して Rb (retinoblastoma gene) の非リン酸化型を増加させて細胞周期を G1/S 期で停止させる (*Am J Pathol* 2004; *Lab Invest* 2005; *Int J Cancer* 2006)、⑤ 細胞増殖促進作用を示す NF- κ B 系と拮抗作用を示す一方で、細胞分化を誘導する Cdx2 系とは協調的に作用する (*J Pathol* 2007; *Carcinogenesis* 2007) ことを明らかにした。加えて、各種細胞外刺激に対して早期に発現が誘導される転写因子 early growth response 1 (Egr1) が TCF4 の転写促進を介して β -カテニンシグナル系を活性化することを見出した (*J Pathol* 2008)。これらの独自の研究成果に加えて Chakraborty らの報告(マウスの皮下に移植した前立腺癌細胞 (PC-3) に外因性に Par-4 遺伝子を導入するとその腫瘍サイズは縮小するが腫瘍片自体は完全には消失しなかったという報告 (*Cancer Res* 2001) を勘案して、 β -カテニンシグナル系による増殖抑制状態下にセカンドヒットとしてアポトーシス関連遺伝子 Par-4 を発現誘導することによって内膜癌細胞を効率よく

死滅させるという独創的かつ斬新な手段を立案した。

2. 研究の目的

本研究は、Par-4 遺伝子の発現調節機構及び機能を分子及び細胞レベルで明らかにすると共に、研究代表者が明らかにした子宮内膜癌の特異的増殖抑制系である β -カテニンシグナル系との協調による「子宮内膜癌細胞の増殖抑制→アポトーシス誘導」を分子基盤とした子宮内膜癌遺伝子治療法確立への展開を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 子宮内膜癌培養細胞とプラスミド

- ① 6 種の子宮内膜癌培養細胞を使用した。
- ② Par-4 遺伝子の全長 cDNA をクローニングし、pcDNA3.1 と pEGFP ベクターに挿入した。
- ③ Par-4 遺伝子プロモーター領域(翻訳開始点から-2805bp から-838b)をクローニングし pGL3B ベクターに挿入した。また、本プラスミドを基盤に段階的に短くした断片を作製した。さらには、本プロモーター領域の NF- κ B 結合部位に変異を挿入した。その他に、pM-p65, pcDNA-p65, pcDNA- β -catenin, pUSE-myr-Akt, pNF κ -B-luc を使用した。

(2) 抗体と試薬

免疫染色や western blot 法には、抗 Par-4、抗 β -カテニン、抗リン酸化 Akt、抗リン酸化 p65、抗 I κ B α 、抗 ER、抗 PR、抗 RelA、抗 bcl2、抗 p21^{WAF1} 等の一次抗体を使用した。また、必要に応じて培養細胞を TNF- α 、LY294002、および nocodazole で処理した。

(3) Transfection

LiopfectAMINE PLUS を用いて、各種プラスミドを子宮内膜癌培養細胞へ導入した。また、siPORT NeoFX で Par-4 siRNA を導入した。

(4) RT-PCR

2 μ g の total RNA で cDNA を作製し、p21^{WAF1} および GAPDH 遺伝子の mRNA 発現を検索した。

(5) ChIP 法

Chromatin Immunoprecipitation Assay Kit で、Par-4 遺伝子プロモーター領域内 NF- κ B 結合配列への RelA 結合性を検索した。

(6) Western blot 法

SDS-PAGE 法でタンパクを分離後、メンブレンに転写して、特異的抗体で検出を行った。

(7) 免疫染色、蛍光免疫染色

免疫染色は Envision 法を用いた。また、蛍光免疫染色は GFP-Par-4 を子宮内膜癌細胞に導入後に抗 γ -tubulin、ロダニンラベルの二次抗体との組み合わせで行った。

(8) アポトーシスの検出

In situ cell death detection kit でアポトーシス細胞を検出した

(9) SA-β-Gal assay

X-gal で senescence 細胞を検出した。

(10) 臨床症例

外科的に切除された子宮内膜癌および子宮内膜増殖症症例の病理標本を使用した。正常子宮内膜生検検体も使用した

(11) In situ hybridization 法

Par-4 遺伝子に対する RNA probe を作製し、GenPoint Tyramide Signal Amplification System で signals を検出した。

(12) Methylation specific PCR 法

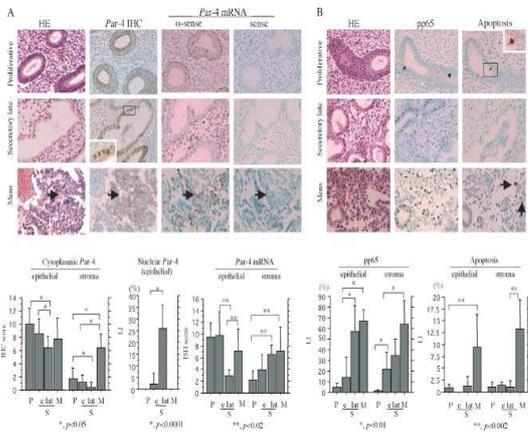
組織より抽出した DNA を EZ DNA Methylation-Gold Kit で bisulfate 処理し、Par-4 遺伝子のプロモーター領域の methylation の有無を検索した。

(13) 統計処理

Mann-Whitney U-test, Spearman's correlation coefficient 処理を行った。

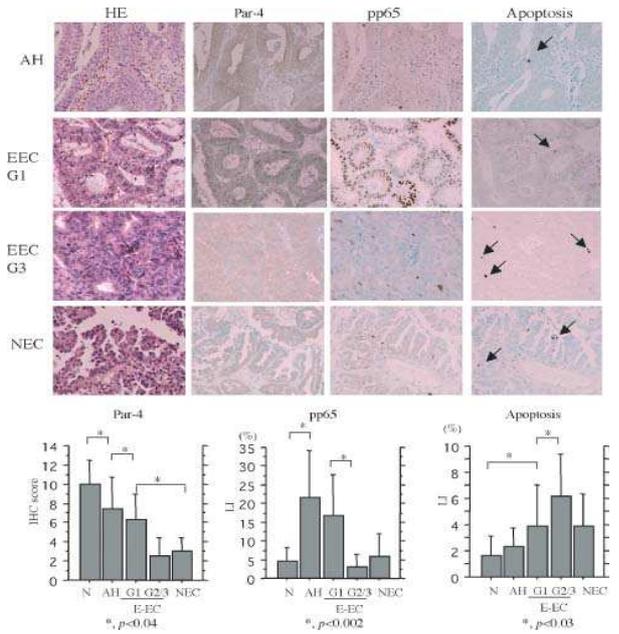
4. 研究成果

(1) Par-4 発現について：免疫組織化学検索で、正常子宮内膜での Par4 蛋白発現は、子宮内膜腺上皮では細胞質内増殖期から分泌期を通じて恒常的に発現し、核内発現は分泌期後期にのみ認められた。一方、間質細胞では、分泌期中期から月経期にかけてその細胞質及び核発現が認められた。In situ hybridization による検討で、Par-4 mRNA 発現は子宮内膜腺上皮細胞で月経周期を通じて恒常的に発現が認められたが、間質細胞ではその蛋白発現と一致して分泌期後期にかけてその発現が増加する傾向があった。以上から、①Par-4 発現制御機構は、子宮内膜腺上皮細胞と間質細胞で異なる、②子宮内膜腺上皮細胞では、細胞質内 Par-4 の核内移行、及び間質細胞では Par4 発現誘導が月経期の子宮内膜脱落に関与することが示唆された。



一方、子宮内膜癌組織での Par-4 蛋白発現は正常子宮内膜に比べて著しく減少し、殆どの症例は陰性ないし散在性の弱シグナルを示した。

正常子宮内膜、子宮内膜癌、およびその培養細胞で、Par-4 遺伝子プロモーター領域を Methylation specific PCR 法で検索したが、いずれの検体でも陽性シグナルは認められなかった。

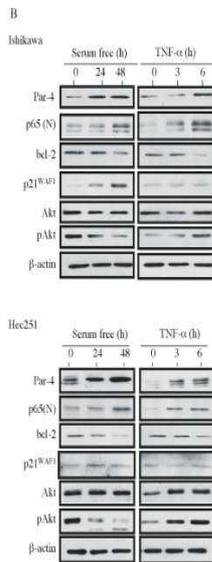
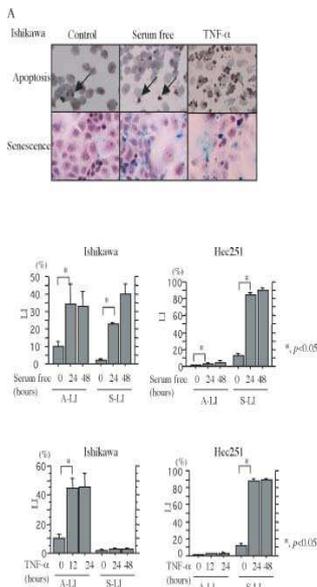
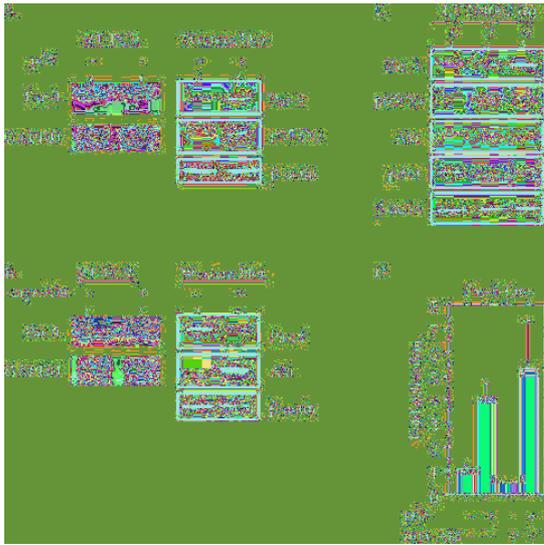


以上から、子宮内膜腺上皮細胞では、細胞質内 Par-4 の核内移行、及び間質細胞では Par-4 発現誘導が月経期の子宮内膜脱落に関与することが示唆された。

(2) アポトーシスとの関連：正常子宮内膜組織では、アポトーシスは子宮内膜腺上皮細胞のみならず間質細胞でその陽性率が増加した。子宮内膜癌組織では、腫瘍の組織学的悪性度と一致して増加した。Par-4 発現とアポトーシスの関連は、正常間質細胞で正の相関を示したが、正常子宮内膜腺上皮細胞や癌組織では認めなかった。

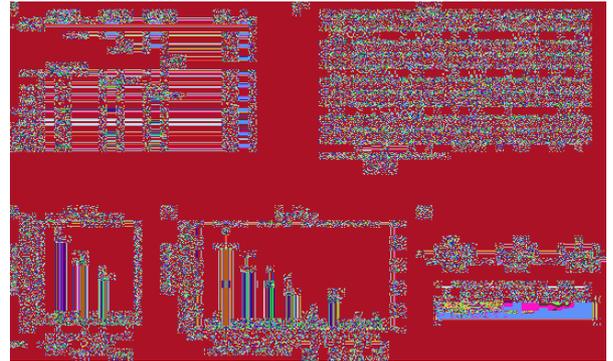
(3) アポトーシス関連分子との関係：免疫染色でアポトーシスに関与する relA, pAkt, bcl-2, 及び WT1 に加えてホルモンレセプター (ER, PR) 発現を検索し、Par-4 発現との関連性を検討した結果、正常子宮内膜での Par-4 発現は、上皮成分でホルモンレセプター発現とのみ正の相関を示し、間質細胞では relA と正の、pAkt と負の相関を示した。一方、子宮内膜癌では、relA, bcl-2 と正の相関を示した。

(4) 子宮内膜癌細胞培養: Ishikawa 及び Hec251 細胞で、血清除去または TNF- α 処理によるアポトーシスや senescence 誘導と一致して Par-4 発現が誘導され、同時にアポトーシス誘導により Par-4 蛋白の発現増加とその蛋白の核内への移行が認められた。また、relA 発現誘も増加した。外因性の Par-4 遺伝子導入は、アポトーシスと senescence 細胞の増加を示した。レポーターアッセイでは、Par-4 プロモーター活性が relA により活性化することを見出した。

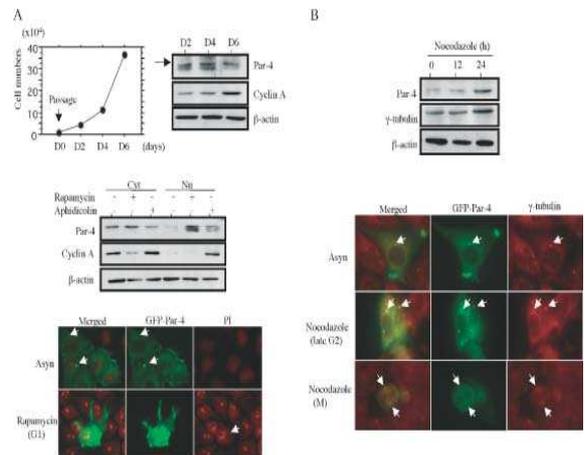


(5) Par-4 遺伝子制御機構: 子宮内膜癌細胞に外因性に NF- κ B/p65 を過剰発現させると、内因性 Par-4 発現が蛋白及び mRNA レベルで増加した。そこで、Par-4 遺伝子プロモーター領域を段階的に欠落した constructs を作製し、NF- κ B/p65 に対する反応性を検索し、-2805bp から -1448bp の領域に

その反応配列の存在が疑われ、3 ヶ所に NF- κ B/p65 結合配列 (GGRNNYYCC) を認められた。これらの領域に変異を加えると、Par-4 プロモーターの NF- κ B/p65 に対する反応性が著明に減弱した。また、ChIP assay でこれらの領域に NF- κ B/p65 蛋白が結合することが確認できた。以上から、Par-4 遺伝子は NF- κ B/p65 により転写レベルで制御されることが示唆された。



(6) 子宮内膜癌細胞の細胞周期を G1 期で停止させると、Par-4 蛋白は核内に異常集積を示し、G2/M 期で停止させると centrosome に集積した。以上から、Par-4 発現およびその局在は細胞周期によっても変化し、細胞増殖抑制や細胞分裂に密に関与する可能性を得た。



(7) 子宮内膜癌細胞で、外因性に Par-4 遺伝子を過剰発現させると、内因性の bcl-2 蛋白発現減少と p21^{WAF1} 蛋白発現増加がそれらのプロモーター活性とは無関係に認められたことから、Par-4 による蛋白レベルでの改変が生じている可能性が考えられた。また、これらの分子の発現変化は、Par-4 遺伝子過剰発現による子宮内膜癌細胞のアポトーシス誘導や増殖抑制の原因と考えた。

(8) β -カテニンシグナル系との関連性 : in vitro および in vivo で Par-4 と β -カテニンシグナル系との関連性を検索したが、明らかな関連性は見いだせなかった。

(9) まとめ : 以上の結果から、子宮内膜癌において Par-4 遺伝子発現は NF- κ B/p65 シグナル系によって制御され、bcl-2 や p21^{WAF1} 発現調節による増殖抑制やアポトーシス誘導を介して子宮内膜発癌に重要な役割を演じる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文

(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 1 件)

- ① Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, Okayasu I. Transcriptional regulation of pro-apoptotic *Par-4* by NF- κ B/p65 and its function in controlling cell kinetics during early events in endometrial tumorigenesis. *J Pathol* 2010, 221:26-36. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 三枝信、橋村美紀、桑田健、岡安勲.
アポトーシス関連遺伝子 Par-4 による子宮内膜細胞動態調節機構と発癌. 第 99 回日本病理学会総会. 2010 年 5 月. 東京

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
三枝 信 (SAEGUSA MAKOTO)
北里大学・医学部・教授
研究者番号 : 00265711
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし