

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月11日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591422

研究課題名（和文） アンドロゲン受容体がアロマターゼ発現に与える影響

研究課題名（英文） Effects of androgen receptor on aromatase expression

## 研究代表者

堀口 淳 (HORIGUCHI JUN)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70272242

## 研究成果の概要（和文）：

アロマターゼはアンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素であり、乳癌の増殖に関わる重要な酵素である。一方、グルココルチコイド受容体（GR）とretinoic acid receptor-related orphan receptor（ROR） $\alpha$ は核内ホルモン受容体であり、乳癌での発現が確認されている。我々は乳癌組織におけるROR $\alpha$ の発現解析を行い、ROR $\alpha$ がアロマターゼ遺伝子の新規制御因子であることを同定した。それはアロマターゼプロモーターI.4上にROR $\alpha$ 応答領域を見出したことによる。このプロモーターの約200bp上流にはGR応答領域が存在し、骨や脂肪組織においてGRがアロマターゼ制御因子である。乳癌組織を用いたROR $\alpha$ 、GRおよびアロマターゼのmRNA発現解析結果によると、ROR $\alpha$ およびGRにはアロマターゼ発現との間に正の相関関係を確認できた。ROR $\alpha$ はエストロゲン受容体陽性乳癌またはHER2陰性乳癌で発現が高く、核異型度の高い乳癌で発現が低いことを示した。また、正常乳腺と乳癌を比較したところ、正常乳腺の発現量が有意に高いという結果を得た。つまり、乳腺組織が癌化するに伴いROR $\alpha$ の発現は低下し、さらに癌が低分化になるにしたがい発現が低下している。ROR $\alpha$ の働きに関しては未解明な点が多いが、筋肉や大脳、小脳、さらにはリンパ球など全身の多くの臓器・細胞に発現しており、それぞれの臓器の正常な発達や恒常性を保つ方向に働いていると考えられる。

## 研究成果の概要（英文）：

Estrogen is a key regulator of the proliferation and differentiation of breast cancer cells. In addition to the estrogen supply from the ovary, estrogen is produced locally from androgen by aromatase. However, the regulation of aromatase gene expression in breast cancer has not yet been fully clarified. Retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR)  $\alpha$  plays an important role in the differentiation of many organs by regulating the transcription of target genes. Because aromatase and ROR $\alpha$  are expressed in breast cancer, the effect of ROR $\alpha$  on aromatase gene expression was studied. ROR $\alpha$  significantly augmented the expression of aromatase mRNA, particularly those containing exon I.4, in MCF7 cells, and aromatase activities in T47D and MCF7 cells. ROR $\alpha$  also stimulated the proliferation of these cells. Transient transfection-based reporter gene assays using the promoter at exon I.4 showed that ROR $\alpha$  augmented the transcription. A series of truncated mutation studies revealed that ROR $\alpha$  activated the transcription through -147 to +14 bp of the promoter I.4. Furthermore, ROR $\alpha$  bound to the fragment containing -119 to -107 bp of the promoter in vitro, indicating that this region may contain a novel ROR response element. Chromatin immunoprecipitation assay showed that ROR $\alpha$  bound to the region containing this site of the promoter I.4 in MCF7 cells.

Moreover, we examined clinical samples and found a correlation between RORalpha and aromatase expression. These results suggest that RORalpha directly activates the aromatase expression to accelerate the local production of estrogen, which results in the proliferation of breast cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

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：アロマトラーゼ、アンドロゲン受容体

#### 1. 研究開始当初の背景

乳癌におけるエストロゲン受容体 (ER) , プロゲステロン受容体 (PgR) そしてヒト上皮増殖因子受容体2 (HER2) の発現は重要な予後因子であり, これらの発現パターンによって薬剤感度がグループ化され, 治療方針が決定されている. しかし, 「遺伝子解析に基づいた乳癌治療の個別化」などが話題となっている現状があり, 現在の予後因子だけでは不十分であることは明白である. 乳癌には様々なホルモン受容体やコファクターが発現していることが報告されており, 乳癌治療における実用的な予後因子は他にも存在すると考えている. 昨今, 我々は核内ホルモン受容体 Retinoic acid Receptor-related orphan receptor

(ROR)  $\alpha$  に注目して, アロマトラーゼの発現が ROR  $\alpha$  によりコントロールされていることを発見し, アロマトラーゼ遺伝子上に ROR 応答領域を同定した. さらに, アロマトラーゼ遺伝子の活性化に起因すると考えられるエストロゲン感受性乳癌細胞株の増殖能活性化も確認した. つまりは ROR  $\alpha$  が乳癌の予後因子, もしくは治療薬であるアロマトラーゼインヒビターの効果予測因子になる可能性を見出し (Odawara

H et al. J Biol Chem 2009) . 我々はこの研究を経て, 次にアンドロゲン受容体に注目した. アンドロゲン受容体も乳癌に発現していることが報告されている. しかし, 我々は, 遺伝子導入にてアンドロゲン受容体の発現量を増加させた乳癌細胞株では有意にアロマトラーゼ遺伝子の転写活性が増加することを確認したものの, 乳癌組織中におけるアンドロゲン受容体の発現とアロマトラーゼ発現との間に相関関係を見出せなかった. 3 番目としグルココルチコイド受容体に注目している. アロマトラーゼの遺伝子のうちプロモーター I.4 上にはグルココルチコイド応答領域がすでに同定されており, 骨芽細胞ではその応答性が確認されている. しかし乳癌では確認されていない. 予備実験では乳癌細胞株 MCF7 においてグルココルチコイドに対する応答性を確認した.

#### 2. 研究の目的

アロマトラーゼはアンドロゲンをエストロゲンに変換することから, 乳癌の分化・進展に大きく関わる重要な酵素であり, 近年では重要な治療ターゲットとなった. 一方で, 多くの核内ホルモン受容体は乳癌に発現しているこ

とが分かっているものの、それぞれ乳癌によって増殖傾向に働くのか抑制傾向に働くのか、その影響は明らかではないものが多い。我々は、乳癌細胞内における核内ホルモン受容体の影響解析をテーマとし研究を行ってきたが、本研究はグルココルチコイド受容体を中心に核内ホルモン受容体の発現が乳癌に及ぼす影響を、アロマターゼ遺伝子への関わりを中心に解析する。

### 3. 研究の方法

グルココルチコイド受容体の発現が乳癌に与えている影響は多岐にわたる可能性があると考えられるが、本研究ではアロマターゼ遺伝子の制御を中心に解析する。また、他の核内ホルモン受容体のうちアロマターゼ遺伝子に影響のある受容体の検索を行う。

### 4. 研究成果

アロマターゼはアンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素であり、乳癌の増殖に関わる重要な酵素である。一方、グルココルチコイド受容体 (GR) と retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR)  $\alpha$  は核内ホルモン受容体であり、乳癌での発現が確認されている。我々は乳癌組織における ROR  $\alpha$  の発現解析を行い、ROR  $\alpha$  がアロマターゼ遺伝子の新規制御因子であることを同定した。それはアロマターゼプロモーターI. 4上に ROR  $\alpha$  応答領域を見出したことによる。このプロモーターの約200bp上流にはGR応答領域が存在し、骨や脂肪組織においてGRがアロマターゼ制御因子である。乳癌組織を用いた ROR  $\alpha$ 、GRおよびアロマターゼのmRNA発現解析結果によると、ROR  $\alpha$  およびGRにはアロマターゼ発現との間に正の相関関係を確認できた。このことから、①乳癌組織におけるアロマターゼ発現はROR  $\alpha$  により直接制御されており、②乳癌組織においても骨や脂肪組織と同様にGR制御があることが考えられる。また、乳癌培養細胞を用いた実験ではアロマターゼプロモ

ーターI. 4遺伝子の活性がROR  $\alpha$  とGRそれぞれ単独よりも両者の共発現により著明な相乗効果があることを確認した。ROR  $\alpha$  はエストロゲン受容体陽性乳癌またはHER2陰性乳癌で発現が高く、核異型度の高い乳癌で発現が低いことを示した。また、正常乳腺と乳癌を比較したところ、正常乳腺の発現量が有意に高いという結果を得た。つまり、乳腺組織が癌化するに伴いROR  $\alpha$  の発現は低下し、さらに癌が低分化になるにしたがい発現が低下している。ROR  $\alpha$  の働きに関しては未解明な点が多いが、筋肉や大脳、小脳、さらにはリンパ球など全身の多くの臓器・細胞に発現しており、それぞれの臓器の正常な発達や恒常性を保つ方向に働いていると考えられる。

### 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8件)

1. 小田原広樹、堀口 淳. 乳癌 (第2版) 基礎と臨床の最新研究動向、乳癌治療戦略を旨とした基礎研究. 乳癌における ROR  $\alpha$  発現および GR 発現によるアロマターゼ遺伝子抑制. 日本臨床 70:213-217, 2012 査読無

2. Tokiniwa H, Horiguchi J, Takata D, Kikuchi M, Rokutanda N, Nagaoka R, Sato A, Odawara H, Tozuka K, Oyama T, Takeyoshi I. Topoisomerase II alpha expression and the Ki-67 labeling index correlate with prognostic factors in estrogen receptor-positive and human epidermal growth factor type-2-negative breast cancer. Breast Cancer 19: 309-14, 2012 査読有

3. Furuya M, Horiguchi J, Nakajima H, Kanai Y, Oyama T: Correlation of L-type amino

acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis, *Cancer Sci* 103: 382-389, 2012 査読有

4. Takahashi S, Iwase T, Kohno N, Ishikawa T, Taguchi T, Takahashi M, Horiguchi J, Nakamura S, Hozumi Y, Fukunaga M, Noguchi S: Efficacy of zoledronic acid in postmenopausal Japanese women with early breast cancer receiving adjuvant letrozole: 12-month results. *Breast Cancer Res Treat* 133: 685-92, 2012 査読有

5. Ishikawa Y, Horiguchi J, Toya H, Nakajima H, Hayashi M, Tagaya N, Takeyoshi I, Oyama T: Triple-negative breast cancer: histological subtypes and immunohistochemical and clinicopathological features. *Cancer Sci* 102: 656-662, 2011 査読有

6. Horiguchi J: New trends in primary systemic therapy for breast cancer. *Breast Cancer* 18: 73, 2011 査読無

7. Tokiniwa H, Horiguchi J, Takata D, Kikuchi M, Rokutanda N, Nagaoka R, Sato A, Odawara H, Tozuka K, Oyama T, Takeyoshi I: Papillary lesions of the breast diagnosed using core needle biopsies. *Experimental Therapeutic Med* 2: 1069-1072, 2011 査読有

8. Horiguchi J, Oyama T, Takata D, Rokutanda N, Nagaoka R, Odawara H, Tokiniwa H, Tozuka K, Kikuchi M, Sato A,

Takeyoshi I: Pathological Complete Response and Prognosis in Patients Receiving Neoadjuvant Paclitaxel and Trastuzumab with and without Anthracyclines for Stage II and III, HER2-positive Operable Breast Cancer: A Single-institute Experience. *Anticancer Res* 31:3041-3046, 2011 査読有

[学会発表] (計3件)

1. J. Horiguchi, D. Takata, N. Rokutanda, R. Nagaoka, A. Sato, H. Tokiniwa, K. Tozuka, S. Uchida, M. Kikuchi, T. Oyama, I. Takeyoshi. Change of circulating tumor cells before and after neoadjuvant chemotherapy in patients with primary breast cancer. San Antonio Breast Cancer Symposium 2012年12月4日～8日、サンアントニオ

2. J. Horiguchi, D. Takata, N. Rokutanda, R. Nagaoka, A. Sato, H. Tokiniwa, K. Tozuka, M. Kikuchi, Y. Iino, I. Takeyoshi. Circulating tumor cells before and after neoadjuvant chemotherapy in patients with primary breast cancer European Breast Cancer Conference 8, 2012. 3 Wien、EBCC ポスター発表、2012年3月23日、ウィーン

3. Horiguchi J, Takata D, Rokutanda N, Nagaoka R, Sato A, Tokiniwa H, Tozuka K, Kikuchi M, Takeyoshi I: Circulating tumor cells in primary and metastatic breast cancer patients, Global Breast Cancer conference 2011, October 6-8, 2011, Seoul, Korea

[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〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀口 淳 (HORIGUCHI JUN)  
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：70272242

(2)研究分担者

六反田 奈和 (ROKUTANDA NANA)  
群馬大学・医学部・助教  
研究者番号：50420097  
時庭 英彰 (TOKINIWA HIDEAKI)  
群馬大学・医学部・助教  
研究者番号：50455979  
鯉淵 典之 (KOIBUCHI NORIYUKI)  
群馬大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：80234681  
岩崎 俊晴 (IWASAKI TOSHIHARU)  
群馬大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：80375576

(3)連携研究者

( )

研究者番号：