

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5月30日現在

機関番号：17701
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592094
 研究課題名(和文) エストロゲン依存性疾患の活性酸素種産生に対するエストロゲンレセプター量の役割
 研究課題名(英文) Roles of expressions of estrogen receptor against ROS production in estrogen-dependent diseases
 研究代表者
 末永 重明(SUENAGA SHIGEAKI)
 鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
 研究者番号：00136889

研究成果の概要(和文)：

正常ヒト線維芽細胞、ヒト関節滑膜炎細胞およびヒト乳癌由来細胞のミトコンドリア内のエストロゲンレセプター(α , β)の発現量を定性的、定量的に測定し、各々の細胞におけるミトコンドリア ROS、過酸化脂質産生、アポトーシス誘導に対するエストロゲンの効果について検討した。得られたエストロゲン効果とエストロゲンレセプター発現量、エストロゲン濃度との関連性について評価を行った。

ROS、過酸化脂質産生、アポトーシス誘導に対する Antioxidant, prooxidant 効果は、細胞の違い、エストロゲンレセプター (α , β)発現量、エストロゲン濃度(10^{-10}M ~ 10^{-4}M)と大いに関係していることが示された。

研究成果の概要(英文)：

We examined the expressions of estrogen receptor, the production and activity of mitochondrial reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation and apoptosis following a cytokine plus estrogen (dose: 10^{-10}M ~ 10^{-4}M) treatment in human normal fibroblasts, RA fibroblasts, VA-13, MCF-7, and MDA-MB453 cells.

The oxidant and anti-oxidant effects of estrogen on the ROS generation, lipid peroxidation product, and subsequent apoptotic cell death depended on cell types, expressions of estrogen receptor (α , β), doses of estrogen.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 病態科学系歯学・歯科放射線学

 キーワード：(1)活性酸素 (2)エストロゲン (3)エストロゲンレセプター (4)ミトコンドリア
 (5)過酸化脂質 (6)アポトーシス (7)アンチオキシダント効果 (8)オキシダント効果

1. 研究開始当初の背景

多くの疾患の発症要因としてミトコンドリア由来の活性酸素(ROS)との関連性が数多く報告されている。関節リウマチ (RA)、発癌、糖尿病、神経性疾患、老化などは ROS 疾患であることがわかってきた。

われわれは、これまでに RA 滑膜細胞を用いた研究において、細胞内の ROS と NO 産生、過酸化脂質およびアポトーシスの発現は、エストロゲン処理(体内濃度レベル)により低下し、関節炎病変ではエストロゲン(E2)が ROS やアポトーシスに対して抑制効果(エストロゲン効果)を示すことを初めて報告した。一方、エストロゲンレセプターの発現を抑制した RA 滑膜細胞では、ROS や過酸化脂質産生、アポトーシス発現に対してエストロゲンによる効果は認められなかった。この細胞内 ROS 発生のほとんどは、蛍光測定試薬 (HPF) により、ミトコンドリア由来であることが証明された (Indo HP, Suenaga S, Tomita K, Majima HJ et al. *Mitochondrion*. 2006.)。

脳神経疾患における神経細胞や血管内皮、上皮細胞では、エストロゲンはミトコンドリア発生の ROS やアポトーシス誘導を抑制し、しかもミトコンドリアに局在する MnSOD 量を増加させることが示されている (Lee SY et al. *FASEB J*. 2003.)。いっぽう、乳癌病変では、エストロゲンはエストロゲンレセプター存在下で ROS 産生やアポトーシスを増加させ、細胞増殖や病変の進展をきたしたとの報告がみられる (Roy D et al. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2007.)。ヒト癌細胞では、エストロゲンはカテコールエストロゲンに置換され、DNA 損傷や ROS 産生を引き起こすことが知られている (Bosland MC. *Ann NY Acad Sci*. 2006.)。また、エストロゲンの長期暴露ならびに過剰状態は細胞増殖を促進させ、DNA 障害により遺伝子のミューテーションをしばしば誘発することが解明されている (Chen JQ et al. *Adv Exp Med Biol*. 2008.)。

いっぽう、生体内エストロゲン濃度は月経周期により変動することが知られており、このような濃度変動は疾患(病変)に対するエストロゲン作用の違いとして反映されることが予想される。また、エストロゲンの作用には、アンチオキシダント(抗酸化)効果あるいは逆に酸化を誘導するプロオキシダント効果の両効果が報告されている。

本研究では、ミトコンドリア内に存在するエストロゲンレセプター (α , β) の発現の有無や発現量が、炎症や腫瘍病変におけるエストロゲン

作用を左右するのではないかと仮説を立てた。さらに、ROS 産生やアポトーシスに対するエストロゲンのアンチオキシダント効果とプロオキシダント効果は、その濃度に依存するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1)正常ヒト線維芽細胞、ヒト関節滑膜炎細胞およびヒト乳癌由来細胞のミトコンドリア内のエストロゲンレセプター (α , β) の発現量を定性的、定量的に測定すること。(2)各々の細胞におけるミトコンドリア ROS と NO 産生、過酸化脂質、アポトーシス誘導に対するエストロゲンの効果について検討すること。(3)得られたエストロゲン効果とエストロゲンレセプター発現の有無とその発現量、エストロゲン濃度との関連性について評価を行い、仮説を実証した。

3. 研究の方法

材料として、①女性胎児肺由来の正常ヒト線維芽細胞 (WI-38)、②ヒト RA 滑膜線維芽細胞、③ヒト線維芽細胞の悪性形質転換株 (VA-13) および④ヒト乳癌由来細胞 (MCF-7, MDA-MB 453) を用いて、以下の研究を行った。

(1)WI-38、RA、VA-13、MCF-7 および、MDA-MB453 細胞内のエストロゲンレセプター (α , β) 量については、蛍光免疫染色法を用い、レーザー共焦点顕微鏡(波長 488 nm)にて、半定量的に評価した。

(2)WI-38、RA、VA-13、MCF-7 および MDA-MB453 細胞に、E2 処理(24 時間)を行い、サイトカイン (IL-1 β (1ng/ml), TNF- α (20ng/ml)) 刺激および無刺激下で 3 時間培養を行った。E2 濃度については、 10^{-9} から 10^{-4} M の範囲とした。

(3)培養細胞の ROS の分布は、HPF (Hydroxyphenyl Fluorescein, 第一化学薬品) 蛍光試薬を用い、レーザー共焦点顕微鏡(波長 488 nm)で観察を行い、緑色蛍光度を半定量的に評価した。

(4)過酸化脂質を検出するために、細胞をホルマリン固定後、HNEモノクローナル抗体による免疫染色を行い、過酸化脂質産生をレーザー共焦点顕微鏡(波長 488 nm)にて、半定量的に評価した。

(5)アポトーシスの発現は、Hoechst 33342 染色法により核染色体の断片化を観察した。3個以上の核断片化をアポトーシス有りと判定を行った。

(6) 細胞内のiNOS, eNOS, cNOS mRNAの発現は、TaqMan probeを用いた定量PCR法で、NOS蛋白レベルについては、Western blot法で評価を行った。

(7) RA 細胞のエストロゲンレセプター α の発現抑制については、市販されているエストロゲンレセプター α siRNA のコンストラクト (Santa Cruz 社) を用いて、Lipofectamine TM2000 により細胞内に遺伝子の導入を行った。RNA の抽出には、当研究室に現有する自動核酸抽出システム(QuickGene-800)を用いて行った。蛍光免疫染色法および Western blot 法でエストロゲンレセプター α 量を定性的・定量的に評価し、親株細胞と比較した。

エストロゲンレセプター α の発現が抑制された細胞を用いて、E2 処理(24 時間)を行い、サイトカイン (IL-1 β (1ng/ml), TNF- α (20ng/ml)) 刺激および無刺激下で 3 時間培養を行った。

4. 研究成果

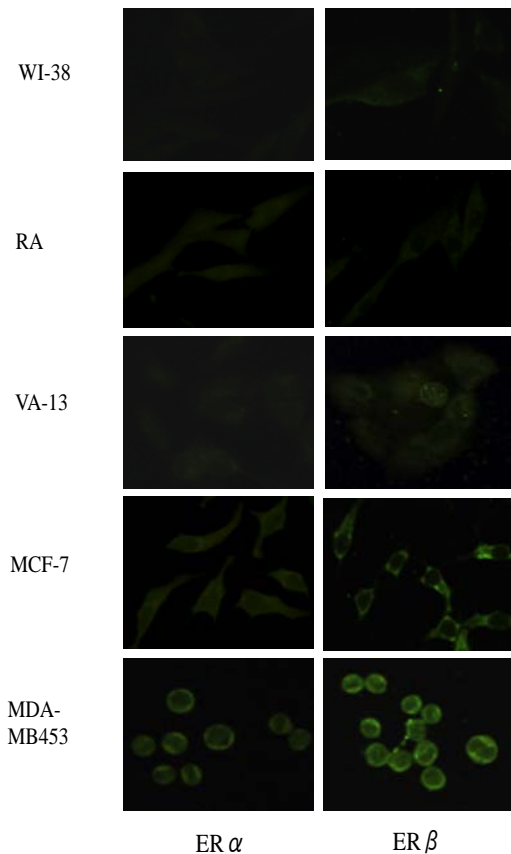


図1. 蛍光免疫染色法によるエストロゲンレセプター (α 、 β) 量の検討

表1. 各細胞におけるエストロゲンレセプター (α 、 β) 量の蛍光強度測定(平均値

±標準偏差)

	ER α	ER β
WI-38	22.40 ± 1.63	24.83 ± 4.40 **
RA	25.62 ± 3.18	25.90 ± 3.84
VA-13	24.95 ± 2.56	26.33 ± 3.75 *
MCF-7	28.95 ± 4.25	31.89 ± 5.21 **
MDA-MB453	42.31 ± 7.87	46.28 ± 5.06 **

*P<.05, **P<.01 (Scheffe's F test)

(1) VA-13, RA, MCF-7, MDA-MB453 細胞内のエストロゲンレセプター発現量は、WI-38 細胞と比較して有意に多く、とくに、MDA-MB453 細胞では、約2倍の発現量を示した。VA-13, MCF-7, MDA-MB453 細胞では、エストロゲンレセプター α よりもエストロゲンレセプター β の発現量が有意に高かった (図1、表1)。

(2) エストロゲンレセプター (α 、 β) 発現量の少ない WI-38 細胞では、E2 濃度 $10^{-10}M \sim 10^{-4}M$ 処理により、無刺激下およびサイトカイン刺激間で ROS、過酸化脂質産生およびアポトーシス頻度に違いは認められなかった。

(3) RA 細胞においては、ROS、過酸化脂質産生およびアポトーシス発現は、E2 濃度 $10^{-4}M$ で増加し、逆に $10^{-9}M \sim 10^{-6}M$ では抑制がみられた。E2 濃度 $10^{-6}M$ で、iNOS mRNA および蛋白は有意に減少した。

(4) VA-13, MCF-7, MDA-MB453 細胞では、E2 濃度 $10^{-4}M$ 処理により、サイトカイン刺激群と比較して、ROS、過酸化脂質産生およびアポトーシスは有意に増加し、 $10^{-10}M \sim 10^{-6}M$ では変化は認められなかった。エストロゲンレセプター (α 、 β) 発現量の多い MDA-MB453 細胞では、VA-13 や MCF-7 細胞群と比較して、E2 濃度 $10^{-4}M$ で、ROS、過酸化脂質産生は有意に高かった。

(5) RA 滑膜細胞において、蛍光免疫染色法ではエストロゲンレセプター α 蛋白は siRNA 3 日後より抑制され、5 日後で最も抑制された。Western blot 法では、エストロゲンレセプター α 蛋白は、siRNA 後 5 日目で、親株細胞や control siRNA を行った細胞と比較して約35%の抑制がみられた。

このエストロゲンレセプター量の発現を抑制した細胞は、親株細胞や control siRNA 細胞群と比較して、E2 濃度 $10^{-6}M$ 処理で、ROS、過酸化脂質産生およびアポトーシス発現の抑

制は認められなかった。

E2 による Antioxidant, prooxidant 効果は、細胞の違い、エストロゲンレセプターの種類や発現量、E2 濃度と関係していることが示唆された。

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 2 件)

①Indo HP, Inanami O, Koumura T, Suenaga S, et al. Roles of mitochondria-generated reactive oxygen species on X-ray-induced apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line, *Free Radic Res.*, 46: 1029-1043, 2012.

DOI: 10.3109/10715762.2012.698012.

(査読あり)

②Majima HJ, Indo HP, Suenaga S, Matsui H, Yen H-C, Ozawa T. Mitochondria as possible pharmaceutical targets for the effects of vitamin E and its homologues in oxidative stress-related diseases., *Curr Pharm Des.* 17: 2190-2195. 2011.

DOI: 10.2174/138161211796957490.

(査読あり)

[学会発表](計 3 件)

①末永重明、犬童寛子、川畑義裕、河野一典、佐藤強志、比地岡浩志、中村典史、仙波伊知郎、馬嶋秀行、口腔扁平上皮癌における所属リンパ節転移の画像診断精度-造影 CT、US および PET による評価-、日本歯科放射線学会 第 53 回学術大会、2012 年 6 月 1 日～3 日、盛岡。

②Suenaga S, Indo HP, Yen H-C, Ijiri K, Komiya S, Matsuyama T, Higuchi M, Matsui H, Ozawa T, Majima HJ, Induction of mitochondrial ROS and cell death by cytokines and its prevention by estrogen in rheumatoid arthritis fibroblasts., 5th SFRR-Asia, 8th ASMRM, 11th J-mit 2011, August 31-September 4, 2011, Kagoshima.

③Suenaga S, Indo HP, Tomita K, Ijiri K,

Komiya S, Yen H-C, Higuchi M, Matsui H., Ozawa T, Majima HJ. Nitric- and oxidative mitochondria related cell death by cytokines and its prevention by estrogen in estrogen receptor expressed rheumatoid arthritis synovial fibroblasts., The 6th International Conference Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 14-18, 2010., Kyoto.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末永 重明 (SUENAGA SHIGEAKI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：00136889

(2) 研究分担者

犬童 寛子 (INDO HIROKO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00301391

富田 和男 (TOMITA KAZUO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60347094

馬嶋 秀行 (MAJIMA HIDEYUKI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60165701

(3) 連携研究者

該当者なし