

## 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 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790882

研究課題名（和文） エストロゲン受容体の蛋白質脱アセチル化を介した  
新規核外作用の解明と治療への応用研究課題名（英文） Analysis and treatment-application of novel nongenomic action  
of estrogen receptor mediated by protein deacetylation

研究代表者

東 浩太郎（AZUMA KOTARO）

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：30401110

研究成果の概要（和文）：本研究は、乳癌や骨粗鬆症といったエストロゲンとの関連が知られた疾患におけるエストロゲン受容体の nongenomic action の役割について解析することを目的とした。Nongenomic action は、従来知られていた核内における転写因子としての作用では説明のできないエストロゲン受容体の作用であり、核内ではなく細胞膜近傍に存在するエストロゲン受容体が作用していることが示されている。本研究では、膜移行性のエストロゲン受容体を恒常的に発現した乳癌細胞を用いて、膜移行性エストロゲン受容体依存的に発現が制御される遺伝子を見出した。また、膜移行性エストロゲン受容体の転移能に及ぼす影響を評価するためのツールとして使用可能である、ルシフェラーゼと膜移行性エストロゲン受容体を共発現する乳癌細胞株の樹立に成功した。本研究では、骨粗鬆症における nongenomic action に対しても解析を目標としており、同様の膜移行性エストロゲン受容体を恒常的に発現する骨芽細胞株を樹立中である。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to analyze the role of nongenomic action of estrogen receptor in the disease such as breast cancer and osteoporosis, which has relationship with estrogen action. Nongenomic action is newly clarified action of estrogen receptor, which cannot be explained by the formerly-known action of estrogen receptor as a ligand-dependent transcription factor. It was shown that nongenomic action was mediated by estrogen receptor at the plasma membrane instead of estrogen receptor in the nucleus. In this study we demonstrated some genes dependent on the membrane-localizing estrane receptor by using breast cancer cells stably expressing membrane-localizing estrogen receptor. We also established breast cancer cell line expressing both luciferase and membrane-localizing estrogen receptor, which can be a useful tool for evaluating effect of nongenomic action of estrogen receptor on metastatic potential. In this study, we are also preparing osteoblastic cell line expressing membrane-localizing estrogen receptor for evaluating effect of nongenomic action of estrogen receptor on osteoporosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：エストロゲン受容体、nongenomic action、乳癌、骨粗鬆症、認知症

### 1. 研究開始当初の背景

エストロゲンは、子宮内膜や乳腺といった女性特有の臓器だけでなく、骨組織や血管内皮、神経細胞においても発現していることが知られており、骨粗鬆症や動脈硬化、認知症といった高齢者の生活の質を著しく落とす疾患とも密接に関連している。また、近年増加している乳癌においては、エストロゲンは増殖刺激因子として作用し、エストロゲン・エストロゲン受容体は治療の標的となっている。エストロゲン受容体は、細胞質においてシグナル伝達分子として機能することが、複数の独立した研究室より報告されており、**nongenomic action** と呼ばれるようになった。これは、従来知られてきたリガンド依存性の転写因子としての核内受容体の作用では説明できないものであり、従来の作用メカニズムは、これに対比して **genomic action** と呼ばれるようになった。

### 2. 研究の目的

我々は、乳癌細胞においてエストロゲン刺激時にエストロゲン受容体が細胞膜近傍において細胞骨格である微小管の成分である **tubulin**、その脱アセチル化酵素である **HDAC6** と複合体を形成し、**tubulin** の即時型の脱アセチル化を引き起こす新規の **nongenomic action** を見出し、これまで報告してきた (Azuma K et al: *FEBS Lett* 577, 339-344, 2004. Azuma K et al: *Cancer Res* 69, 2935-2940, 2009)。エストロゲンの **nongenomic action** の発見は、乳癌だけでなく、骨組織、血管、神経においてエストロゲンが複数のメカニズムで作用していることを示唆しており、**nongenomic action** が生理的、病的に生物学的意義を有し、治療の標的となる可能性があると考えられた。本研究では、我々が見出した新規 **nongenomic action** が乳癌や骨粗鬆症においてどのような生物学的意義を有するか検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 乳癌細胞におけるエストロゲン受容体新規 **nongenomic action** の解析

① **nongenomic action** の転写に及ぼす影響の解析

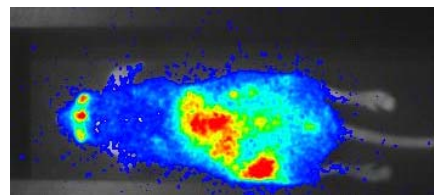
これは、内因性にエストロゲン受容体を発現していない乳癌細胞 **MDA-MB-231** に膜移行性のエストロゲン受容体 (蛋白の N 末に膜移行性配列を付加し、核移行配列を欠失させたエストロゲン受容体) を恒常的に過剰発現させた株と、過剰発現していない株を用い、エストロゲン刺激を加えた際に、転写状態がどのように変化するかを検証した。エストロゲン (100 nM) にて 24 時間刺激した後マイクロアレイを用いて、発現遺伝子を網羅的

に解析した。

② **nongenomic action** が転移能に及ぼす影響の解析

これは、乳癌細胞 **MDA-MB-231** に膜移行性のエストロゲン受容体とルシフェラーゼ遺伝子を共発現した細胞株を樹立し、免疫不全マウス (ヌードマウス) の尾静脈または心腔に細胞を注射し、*in vivo* イメージングの手法を用いて (図 1)、転移巣形成能を評価した。

図1. ルシフェラーゼ発現癌細胞を用いた転移巣の *in vivo* イメージング



(2) 骨芽細胞におけるエストロゲン受容体新規 **nongenomic action** の解析

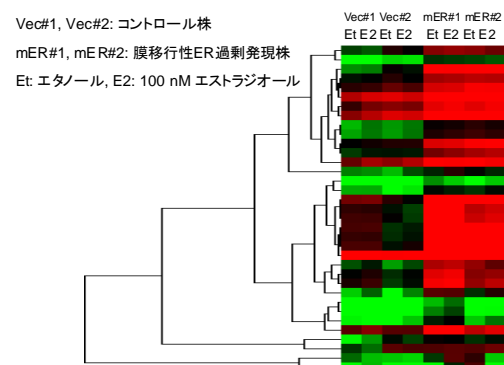
骨芽細胞におけるエストロゲンの **nongenomic action** の解析。これは、骨芽細胞株 **ST2**、**MC-3T3-E1** を用いて、エストロゲンの骨芽細胞分化、増殖に及ぼす影響の評価を行った。また、膜移行型エストロゲン受容体を恒常的に過剰発現させた **MC-3T3-E1** を用いて、**nongenomic** シグナルの骨芽細胞に及ぼす影響の評価を試みた。

### 4. 研究成果

(1) 乳癌細胞におけるエストロゲン新規 **nongenomic action** の解析

① **MDA-MB-231** 株のうち、膜移行型エストロゲン受容体過剰発現株 2 株および陰性対照株 2 株に対し、エストロゲン刺激および陰性対照としてエタノール刺激を行った群のマイクロアレイの結果を用いてクラスター解析を行い、膜移行型エストロゲン受容体依存性に発現が高まる遺伝子および抑制される遺伝子候補を複数同定し (図 2)、そのうち誘導遣

図2. 膜移行性ERにより誘導される遺伝子群



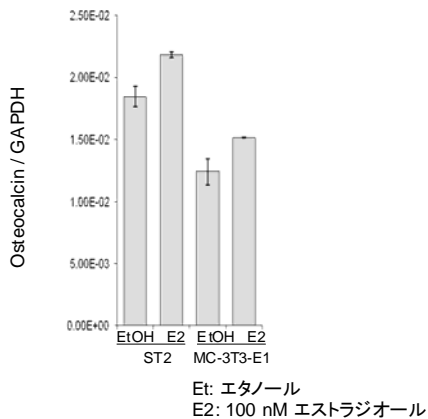
伝子を 10 遺伝子、抑制遺伝子を 4 遺伝子に関して、定量的 RT-PCR 法にて発現の変化を確認した。この中には、細胞運動にかかわる遺伝子も含まれており、乳癌の悪性化にかかわる新たな作用メカニズムである可能性が示唆された。

②乳癌細胞 MDA-MB-231 に膜移行性のエストロゲン受容体とルシフェラーゼ遺伝子を共発現した細胞株を樹立に成功し、尾静脈注射を行ったが、明らかな転移巣の形成が得られなかった。細胞数不足を考え、より多数の細胞を心腔内注射を行い、現在経過を追っている。

(2) 骨芽細胞 ST2, MC-3T3-E1 をエストロゲンにて刺激することにより、ST2 では、増殖抑制、分化促進、MC-3T3-E1 においては増殖促進、分化促進作用を認め、増殖作用の違いは骨芽細胞の分化段階による違いと考えられた(図 3)。現在、MC-3T3-E1 に膜移行型エストロゲン受容体を過剰発現する細胞株を樹立中であり、分化・増殖に与える影響を解析中である。

図3.

#### エストロゲンによる骨芽細胞株の分化促進



#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Azuma K, Inoue S: Genomic and non-genomic actions of estrogen: Recent developments. *BioMol Concepts* (in press) 査読有.
  2. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Tanaka T, Zhang W, Azuma K, Takayama K, Obinata D, Murata T, Horie-Inoue K, Kodama T, Ouchi Y, Homma Y, Inoue S: Clinical significance of steroid and xenobiotic receptor (SXR) and its targeted gene CYP3A4 in human prostate cancer. *Cancer Sci* 103, 176-180, 2012, 査読有.  
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02143.x.
  3. Azuma K, Urano T, Watabe T, Ouchi Y, Inoue S: PROX1 suppresses vitamin K-induced transcriptional activity of steroid and xenobiotic receptor. *Genes Cells* 16, 1063-1070, 2011, 査読有.  
DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01551.x.
  4. Azuma K, Casey SC, Ito M, Urano T, Horie K, Ouchi Y, Kirchner S, Blumberg B, Inoue S: Pregnane X receptor knockout mice display osteopenia with reduced bone formation and enhanced bone resorption. *J Endocrinol* 207, 257-263, 2010, 査読有.  
DOI: 10.1677/JOE-10-0208.
- [学会発表] (計 11 件)
1. Azuma K, Urano T, Ouchi Y, Inoue S: Novel transcriptional and post-transcriptional effects of estrogen receptor at plasma membrane. (2011.12.13-16) New Horizon in Cancer Research, AACR International Conference, Delhi, India.
  2. 東浩太郎、池田和博、浦野友彦、大内尉義、井上聡: 骨軟骨における新規エストロゲン応答遺伝子の探索 (2011.11.3-5) 第 13 回日本骨粗鬆症学会 (神戸)
  3. Azuma K, Urano T, Horie K, Ouchi Y, Inoue S: Novel function of vitamin K on age-related bone and cartilage diseases. (2011.10.23-27) 9th Asia / Oceania Congress of Geriatrics and Gerontology, Melbourne, Australia.
  4. 東浩太郎、池田和博、浦野友彦、大内尉義、井上聡: 骨芽細胞および骨髄ストローマ細胞におけるエストロゲン応答遺伝子の解析 (2011.6.15-17) 第 53 回日本老年医学会学術集会 (東京)
  5. 東浩太郎、Stephanie Casey、浦野友彦、大内尉義、Bruce Blumberg、井上聡: [優秀演題賞(プレナリーセッション)受賞] ビタミン K をリガンドとする核内受容体 SXR/PXR の関節軟骨に対するアンチエイジング作用 (2011.5.27-29) 第 11 回日本抗加齢医学会総会 (京都)
  6. Azuma K, Ikeda K, Urano T, Ouchi Y, Inoue S: Estrogen receptor alpha knockout mice display osteoarthritis-like phenotype. (2011.5.7-11) 3<sup>rd</sup> Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society & the International Bone and Mineral Society (ECTS/IBMS), Athens, Greece.
  7. 東浩太郎、大内尉義、井上聡: [シンポジウム] 性ホルモンと骨代謝—骨軟骨におけるエストロゲン作用 (2010.7.21-23) 第 28 回日本骨代謝学会学術集会 (東京)
  8. 東浩太郎、池田和博、大内尉義、井上聡: エストロゲンの genomic および nongenomic 作用 (Genomic and nongenomic actions of estrogen) (2010.7.9) The 6<sup>th</sup> Young Endocrinologist conference (長崎)

9. 東浩太郎、Stephanie Casey、浦野友彦、大内尉義、Bruce Blumberg、井上聡：核内受容体 PXR ノックアウトマウスは加齢に伴い変形性膝関節症様の変化を呈する (2010.6.24-26) 第 52 回日本老年医学会学術集会 (神戸)
10. 東浩太郎、池田和博、浦野友彦、大内尉義、井上聡：エストロゲン受容体欠損マウスを用いた骨芽細胞におけるエストロゲン応答遺伝子の検討 (2010.6.11-13) 第 10 回日本抗加齢医学会総会 (京都)
11. Azuma K, Casey S, Kirchner S, Ito M, Urano T, Horie K, Ouchi Y, Blumberg B, Inoue S: Pregnane X receptor knockout mice display osteopenia with reduced bone formation and enhanced bone absorption. (2010.5.5-8) IOF World Congress on Osteoporosis & 10th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis, Florence, Italy.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東 浩太郎 (AZUMA KOTARO)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：30401110