

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：32409
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659479
 研究課題名（和文） ホルモン依存性癌における細胞・生体イメージングを活用したエネルギー代謝機構の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of energy metabolic pathways in hormone-dependent cancers by utilizing cellular and in vivo imaging analyses
 研究代表者
 堀江 公仁子 (HORIE KUNIKO)
 埼玉医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：90261982

研究成果の概要（和文）：ホルモン依存性がん増殖・進展におけるエネルギー代謝経路を明らかにする目的で、蛍光蛋白質レポーター遺伝子を発現したがん細胞を作製し、環境変化に伴うがん細胞の細胞周期や代謝状態を経時的にモニタリングするシステムを構築した。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定発現したがん細胞を作製してマウスがん移植実験を行い、生体イメージングを用いてがん増殖・転移動態を解析した。がん細胞での代謝遺伝子の発現・転写調節について分子生物学的手法にて解析した。これらの結果より、ホルモン依存性がんの診断・治療・予防に応用できる新規分子標的を発見した。

研究成果の概要（英文）：In order to reveal characterize metabolic pathways involved in the proliferation and progression of hormone-dependent cancers such as breast and prostate cancers, cell models of hormone-naïve and hormone-resistant cancer cells expressing fluorescent reporters were generated. A microscopic imaging system for the observation of these cancer cells was developed in response to environmental alterations by monitoring reporter fluorescence. Inoculation of cancer cells stably expressing luciferase reporter genes into nude mice was performed and the dynamics of cancer cell proliferation and metastasis were investigated based on *in vivo* imaging analysis. Expression and transcriptional regulation of metabolic genes in hormone-dependent cancer cells were analyzed molecular biologically. Taken together, the present study identified novel molecular targets that can be applied to the diagnosis, therapy, and prevention of hormone-dependent cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：性ホルモン、がん、イメージング、エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

がんとエネルギー代謝の関係については、有酸素下でも解糖系が主体となる”Warburg効果”が長年知られており、腫瘍が増大するにつれて内部は低酸素環境になりやすく、多くのがんにおいて、低酸素状態で機能するHIF1 α 転写因子が遺伝子発現調節に重要であり、特に血管新生に重要な血管内皮成長因子

(VEGF)がHIF1 α により発現誘導されることが報告されてきた。一方、がん細胞において解糖系とミトコンドリア酸化リン酸化(OXPHOS)経路は密接に関連する知見が最近得られてきており、がんにおけるOXPHOSの重要性も注目されつつある。

当研究者グループは、ホルモン依存性がんにおけるエネルギー代謝に注目しており、ヒ

トゲノム情報が確立する以前から、ゲノム結合部位クローニング法によりエストロゲン受容体 α (ER α) と結合する新規エストロゲン受容体標的遺伝子について探索を行い、ミトコンドリア呼吸鎖のチトクローム *c* オキシダーゼ (COX) 7a と構造が類似した COX7RP 遺伝子を同定した。当研究者グループは、COX7RP はエストロゲン応答性に発現誘導される遺伝子であり、OXPHOS 遺伝子であることを見出している。また、骨格筋や心臓に多く発現し、OXPHOS を介するエネルギー代謝に重要なエストロゲン関連受容体 ERR α は、乳がんの予後不良因子であることが報告されており、当研究者らも同じ受容体サブファミリーに属する ERR γ について、乳がん細胞への導入により細胞増殖を起こすことを明らかにしている。また、当研究者らは次世代シーケンサーとゲノム情報を活用した、乳がん細胞における新規エストロゲン受容体標的遺伝子と前立腺がん細胞における新規アンドロゲン受容体標的遺伝子の同定を進め、CDH2 や FOXP1、APP などの新規 AR 標的遺伝子を同定してきた。

このような研究背景の下、ホルモン依存性がんの増殖・進展の過程における代謝動態を可視化する実験系として、蛍光蛋白質レポーター遺伝子を発現した培養がん細胞の顕微鏡モニタリングシステムと、ルシフェラーゼ遺伝子を発現したがん細胞のマウス腫瘍移植モデルによる生体イメージングシステムを構築することにより、ホルモン依存性がんにおける代謝状態や細胞周期、がん細胞の動態を可視化し、経時的に解析することが可能になると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ホルモン依存性がん増殖・進展における代謝経路を明らかにする目的で、ホルモン依存性がん細胞に、蛍光蛋白質レポーター遺伝子を安定発現した細胞を作製し、代謝経路阻害薬による刺激や低酸素状態、ホルモンや抗ホルモン薬刺激などの様々な培養条件におけるがん細胞のエネルギー代謝動態を、顕微鏡下でモニタリングするシステムを構築する。各がん細胞の多様な培養環境における代謝遺伝子の発現解析を行い、ホルモン依存性がんのホルモン応答性やホルモン耐性にかかわる代謝経路の詳細を明らかにする。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定発現したがん細胞をマウスへ移植して形成される腫瘍モデルを作製し、生体イメージングにより、原発巣および転移巣における代謝の動態をモニタリングする。以上の実験結果を統合して、ホルモン依存性がんの診断・治療・予防に応用できる新規分子標的を同定する。

3. 研究の方法

(1) 性ホルモン依存性の乳がん、前立腺がん細胞を用いて、GFP、DsRed 等の蛍光蛋白質レポーター遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子を安定発現させた細胞系を作製する。

(2) 各種の薬剤刺激や低酸素状態の培養条件において、顕微鏡モニタリングシステムにより、蛍光蛋白質発現がん細胞における代謝関連遺伝子の機能を可視化する。

(3) 次世代シーケンサーを活用して、がん細胞の形態、薬剤感受性、代謝状態の相違における RNA シーケンス (RNA-seq) による遺伝子発現解析およびクロマチン免疫沈降 (ChIP) シーケンス (ChIP-seq) による転写因子結合解析を行う。

(4) 生体イメージングシステムとして、各種遺伝子プロモーター制御のルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定発現させたホルモン感受性がん細胞ならびにホルモン耐性がん細胞をマウスに移植し、生体イメージングを用いて、腫瘍形成・転移進展の各段階における代謝経路の機能解析を進める。

以上の研究成果を統合して、エネルギー代謝の観点からホルモン依存性がんの診断・治療・予防につながる新規分子標的を同定する。

4. 研究成果

(1) 蛍光蛋白質遺伝子安定発現がん細胞の作製

エストロゲン感受性乳がん細胞、アンドロゲン感受性前立腺がん細胞として、米国 ATCC より購入した MCF-7 細胞および LNCaP-FGC 細胞 (以下 LNCaP 細胞) を使用し、蛍光蛋白質として GFP, DsRed 遺伝子を導入し安定発現させたがん細胞を作製した。蛍光標識細胞周期蛋白質を発現させた MCF-7 細胞および LNCaP 細胞の作製も行った。

MCF-7 細胞および LNCaP 細胞からそれぞれ抗エストロゲン薬のタモキシフェンおよび抗アンドロゲン薬のビカルタミド存在下で長期培養したホルモン耐性がん細胞を作製し、TamR 細胞および BicR 細胞として数種類ずつ用意した。MCF-7 細胞および LNCaP 細胞およびそれぞれのホルモン耐性細胞である TamR と BicR 細胞にルシフェラーゼ遺伝子を安定発現させたがん細胞を生体イメージング解析用に作製した。

(2) 蛍光蛋白質発現がん細胞を用いた顕微鏡モニタリングシステムの構築

蛍光蛋白質発現がん細胞を用いて、顕微鏡下で、細胞増殖や細胞形態、細胞周期あるいは代謝状態の変化をモニタリングするシステムを構築できた。

(3) 次世代シーケンサーを用いた代謝関連遺伝子の発現・転写調節解析

がん細胞での代謝遺伝子の発現について、RT-PCR やマイクロアレイ解析、次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンスの手法を用いて解析した。特に MCF-7 細胞とホルモン耐性 TamR 細胞、LNCaP 細胞とホルモン耐性 BicR 細胞におけるリガンド応答性、低酸素刺激による変化について詳細な比較を行った。

また、ステロイドホルモン受容体や関連転写因子を介する代謝遺伝子の発現調節機構を次世代シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP シーケンス) にて解析し、ホルモン依存性がんのリガンド応答性やホルモン耐性にかかわる代謝経路を明らかにした。

これらの実験結果から、ミトコンドリア酸化リン酸化経路にかかわるホルモン受容体標的遺伝子を乳がんおよび前立腺がん細胞において複数同定した。

(4) ルシフェラーゼ遺伝子安定発現がん細胞移植モデルマウスを用いた生体イメージング解析

ルシフェラーゼ遺伝子定発現がん細胞を用いてマウス心臓 (左心室) へのがん細胞移植実験を行い、ルシフェリン注射後の生体イメージングにより経時的に非観血的にモニタリングするシステムを構築した。特に、ホルモン耐性乳がん細胞の中で細胞増殖速度が早い細胞株を用いることにより、全身性のがん転移動態を生体イメージングにより観察することができた。マウスの剖検により、脳、肝、腎臓、副腎への転移巣を確認できた。

本研究により、ホルモン依存性がんの診断・治療・予防に応用できる新規分子標的を複数発見し、学会発表を行い論文投稿中である。

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 5 件)

(1) Horie-Inoue K, Inoue S. Genome-wide integrated analyses of androgen receptor signaling in prostate cancer based on

high-throughput technology. *Curr Drug Targets*. 2013, 14(4):472-480. 査読有
DOI: 10.2174/1389450111314040008.

(2) Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S. Association of double-positive FOXA1 and FOXP1 immunoreactivities with favorable prognosis of tamoxifen-treated breast cancer patients. *Horm Cancer*. 2012, 3(4):147-159. 査読有
DOI: 10.1007/s12672-012-0111-0.

(3) Takayama K, Horie-Inoue K, Suzuki T, Urano T, Ikeda K, Fujimura T, Takahashi S, Homma Y, Ouchi Y, Inoue S. TACC2 is an androgen-responsive cell cycle regulator promoting androgen-mediated and castration-resistant growth of prostate cancer. *Mol Endocrinol*. 2012, 26(5):748-761. 査読有
DOI: 10.1210/me.2011-1242.

(4) Abe Y, Ijichi N, Ikeda K, Kayano H, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. Forkhead box transcription factor, forkhead box A1, shows negative association with lymph node status in endometrial cancer, and represses cell proliferation and migration of endometrial cancer cells. *Cancer Sci*. 2012, 103(4):806-812. 査読有
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02201.x.

(5) Shigekawa T, Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S. FOXP1, an estrogen-inducible transcription factor, modulates cell proliferation in breast cancer cells and 5-year recurrence-free survival of patients with tamoxifen-treated breast cancer. *Horm Cancer*. 2011, 2(5):286-297. 査読有
DOI: 10.1007/s12672-011-0082-6.

[学会発表] (計 3 件)

(1) Horie-Inoue K, Yamaga R, Okamoto K, Ikeda K, Inoue S. Systemic screening of microRNAs and their targets for breast cancer cells using a comprehensive lentiviral microRNA library and microarrays. (2012. 3. 31-4. 5) *Keystone*

Symposia, Non-coding RNAs, Snowbird, Utah, USA.

(2) Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Cytochrome *c* oxidase subunit 7a related polypeptide COX7RP is an estrogen target gene that plays a role in the OXPHOS pathway. (2011.8.31-9.4) 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia), 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM), 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit), 鹿児島市.

(3) Horie-Inoue K, Takayama K, Ikeda K, Suzuki Y, Inoue S. Identification of androgen-regulated cytochrome *c* oxidase-related genes in hormone-sensitive prostate cancer cells through RNA-sequencing and systemic chromatin immunoprecipitation analysis. (2011.7.17-22) Mitochondrial Assembly & Dynamics in Health, Disease & Aging, FASEB Summer Research Conferences, Steamboat Springs, Colorado, USA.

[その他]

ホームページ等

http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div02_GRST/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 公仁子 (HORIE KUNIKO)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90261982

(2) 研究分担者

池田 和博 (IKEDA KAZUHIRO)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：30343461

(3) 連携研究者

井上 聡 (INOUE SATOSHI)
東京大学・医学部・特任教授
研究者番号：40251251