

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861475

研究課題名(和文) エストロゲン標的臓器におけるLKB1-AMPKの機能解析

研究課題名(英文) The functional analysis of LKB1-AMPK system in the estrogen responsive organs

研究代表者

大石 元 (Hajime, Oishi)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：40401088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は細胞内のエネルギーバランスを司るAMPKとその上流でAMPKをリン酸化するLKB1とが卵巣、子宮内膜、乳腺組織などのエストロゲン標的臓器での増殖分化あるいは局所でのステロイド合成をどのように調節しているかを明らかにするものである。また我々はAMPKのリン酸化に関連して相互作用するSIRT3に着目し、その抗酸化作用とステロイド合成に与える影響を調査した。その結果、卵巣顆粒膜細胞ではSIRT3によりプロゲステロン合成が調整されていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study is to clarify the involvement of the LKB1-AMPK system in the estrogen responsive organs such as ovary, uterus, and mammary gland. The LKB1 phosphorylates AMPK1, which controls and senses energy balance in the cell. The regulation of both steroidogenesis and cell proliferation by energy sensing system were examined in these organs. We also investigated the function of SIRT3, one of the interacting factor of AMPK, in the ovary. The biosynthesis of progesterone is found to be regulated by SIRT3.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：AMPK SIRT3 卵巣 顆粒膜細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞内のエネルギーセンサーである AMP-activated protein kinase (AMPK) は糖代謝または脂質代謝だけではなく、細胞増殖にも関与している。細胞内のエネルギー源である ATP とその代謝産物である AMP の比を認識し、細胞内のエネルギーバランスを認識することにより細胞レベルから個体レベルまでホメオスタシス維持に関与している。近年の飽食化、食生活の欧風化に伴い、肥満、2型糖尿病あるいはメタボリック症候群が増加しているが、そのような病態では AMPK の発現低下および活性化の抑制を認めることが報告されている。現在糖尿病治療の薬物としてビッグアノイド剤であるメトホルミンが頻用されるが、メトホルミンには AMPK 活性化作用がある。

最近の乳癌、子宮内膜癌をはじめとする性ホルモン依存性の癌の増加は、糖尿病あるいは肥満の増加との関連も示唆されているが、AMPK とホルモン依存性臓器での発癌についての報告は少なく、そのメカニズムは明らかではない。しかし糖尿病患者に対してメトホルミンを投与すると癌の発生が減少すると行った臨床観察研究や、メトホルミン投与により乳癌細胞、子宮体がん細胞、卵巣がん細胞の増殖が抑制されたとの基礎研究の報告もあり、AMPK を介した癌治療の可能性が示唆されている。

一方でメトホルミンが有効な疾患として、月経異常、高アンドロゲン血症を呈する多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) が知られているが、PCOS 患者に対してメトホルミンを投与すると、インスリン抵抗性の改善を介して高アンドロゲン血症が改善するとともに、排卵障害の改善および妊娠率の向上が見られる。PCOS 患者では子宮内膜癌のリスクが上昇するが、これは排卵障害によりプロゲステロンの拮抗が無い状態でのエストロゲン曝露 (unopposed estrogen) により子宮内膜の過増殖が促進され癌発生にいたると考えられている。しかし、PCOS に対するメトホルミン治療後の血清を用いると子宮内膜癌細胞の侵襲性が低下するとの報告もあり (Tan BK, et al. JCEM2011)、子宮内膜癌の発癌予防あるいは補助療法として用いられる可能性も検討されている。

また AMPK をリン酸化し活性化させる因子としてセリン/スレオニンキナーゼである LKB1 が知られている。この遺伝子は癌抑制遺伝子として作用し、変異体では消化管での多発ポリープまたは悪性腫瘍を高頻度に発生する Peutz-Jeghers 症候群を引き起

こす。また肺腺癌、子宮内膜癌でも変異を認めるものが多く認められている。LKB1 は AMPK の活性化を介してエネルギー代謝と細胞増殖を結びつける因子としての役割と同時に抗老化作用も指摘されている。

こうした LKB1/AMPK のエストロゲン応答性臓器での役割については明らかではないが、その機能異常により子宮内膜癌あるいは乳癌の発生・進展に関与し、卵巣顆粒膜・莖膜細胞でのステロイド合成異常につながっている可能性が高い。このような背景のもと、当研究では LKB1/AMPK のエストロゲン標的組織特異的な機能を明らかにするとともに、エストロゲンシグナルとの関連を検討する。そのうえで LKB1/AMPK 経路の活性化による乳癌および子宮内膜癌の予防だけではなく、排卵障害に対する診断治療などの臨床応用を展開するための基礎研究を行う。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内のエネルギーバランスをつかさどる AMPK とその上流で AMPK をリン酸化する LKB1 とが、卵巣・子宮内膜・乳腺組織の増殖分化あるいは局所での性ステロイド合成をどのように調節しているかを明らかにするものである。

初代培養系および細胞株を用いて、エストロゲン標的臓器での LKB1-AMPK 経路による細胞増殖制御および性ステロイド合成系への関与を明らかにする。

1) ヒト卵巣顆粒膜細胞、子宮内膜および乳腺細胞の初代培養系または細胞株を用いて、LKB1/AMPK を強制発現あるいは siRNA 法によるノックダウンした場合、または AMPK を活性化させた場合の、性ステロイド合成および細胞の増殖分化に対する影響を検証する。

2) LKB1/AMPK 経路とエストロゲン受容体を介する転写制御機構との間のクロストークを明らかにし、LKB1/AMPK のエストロゲン標的組織特異的な機能を解明する。

3. 研究の方法

上記の背景およびこれまでの知見をふまえ、本研究はヒトのエストロゲン標的臓器における LKB1/AMPK の増殖制御およびステロイド合成調節についての基礎的研究をすすめる。LKB1/AMPK を標的とした卵巣機能不全あるいは子宮体癌、乳癌の新しい診断方法や治療方法の展開を目指し、その基盤となる研究を行う。研究期間内に以下のことを明らかにする。

LKB1/AMPK 系がヒト顆粒膜細胞での性

ステロイド合成(エストロゲンおよびプロゲステロン)、細胞増殖およびアポトーシスに参与しているかどうかを調べる。

乳癌細胞株あるいは子宮内膜癌細胞株を用いて、LKB1/AMPK系が細胞増殖あるいはアポトーシスにどのように参与しているかを調べる。具体的には低栄養状態と高栄養状態での作用の違い、あるいはAMPK活性化剤あるいは抑制剤を用いたとき、LKB1/AMPKの変異体を導入あるいはノックダウンした場合に細胞の増殖/分化が変化するかどうかを調べる。乳癌細胞株あるいは子宮内膜癌細胞株を用いて、LKB1/AMPK系が細胞内のアロマトラーゼ発現に参与しているか、またエストロゲン受容体の転写活性に参与するのかを調べる。LKB1/AMPKの抑制により局所での高エストロゲン状態を引き起こしエストロゲン依存性癌の増殖につながるのか、あるいはLKB1/AMPKの活性化自体がエストロゲン受容体の活性化を抑えて増殖抑制するのかを検証する。

体外受精を行う多嚢胞性卵巣症候群の患者で顆粒膜細胞におけるAMPKの活性化と血中および卵胞液中の性ステロイド濃度の相関を調べる。また年齢に伴うAMPKの顆粒膜細胞での活性化の変化を検討し、顆粒膜細胞の機能低下あるいは卵胞発育との関連を調べる。

子宮内膜癌の組織検体を使用し、リン酸化AMPKとエストロゲン受容体および局所でのアロマトラーゼの発現との関連性を調べる。

1) LKB1/AMPKによるヒト顆粒膜細胞での性ステロイド合成調節機構の解明

LKB1/AMPKを強制発現あるいはRNAiによりノックダウンした場合に、顆粒膜細胞におけるエストロゲン、プロゲステロン、あるいはアンドロゲンの生合成量の変化を検討する。また活性化AMPKの標的となるステロイド合成酵素を同定し、その転写調節機構を明らかにする。

ステロイド生合成系のアッセイ系の確立(平成25年度)

体外受精患者の卵胞液より単離した初代培養系ヒト黄体化顆粒膜細胞でのステロイド測定はELISA法にて十分可能であるが、個体差が大きい。一方で細胞株を用いた系では、安定性には優れるが性ステロイド

合成量は微量でありRIA法による解析法を確立しておく必要がある。

LKB1/AMPK発現系あるいはノックダウン系の確立(平成25年度)
LKB1/AMPKを安定かつ高効率に導入できる方法として、アデノウイルスあるいはレンチウイルスによる遺伝子導入法を検討する。細胞株に対しては、RNAi法あるいは発現ベクターのトランスフェクション法にてLKB1/AMPKのノックダウンまたは導入が可能であるが、初代培養系に対しては効率が悪いいため、ウイルスによる導入法も検討する。

LKB1/AMPKの標的となるステロイド合成酵素の検索(平成25年度)
上記の系を用いて、顆粒膜細胞でのステロイド合成に参与するアロマトラーゼ、StAR、3-HSD、17-hydroxylaseなどのmRNAの発現量変化を定量的PCR法にて計測し、標的となるステロイド合成酵素を同定する。

ルシフェラーゼ法によるLKB1/AMPKによるエストロゲン受容体の転写活性調節の検討(平成26年度)

にて同定した標的のプロモーター上でのエストロゲン受容体の挙動を観察するため、ルシフェラーゼアッセイによりエストロゲン受容体(ER)の転写活性調節能を測定する。

SF-1、 β -カテニンなどの因子はステロイド合成系に深く参与していると言われており、これらの転写調節におけるLKB1/AMPKとの相互作用も検討する。

多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)および高年齢不妊症患者における卵胞液中のステロイド濃度と顆粒膜細胞におけるLKB1の発現量または活性化AMPKとの関連(平成26年度)

2) LKB1/AMPKによるヒト顆粒膜細胞の増殖制御機構の解明(平成25年)

AMPKの活性化により顆粒膜細胞の増殖が抑制され、AMPKの抑制により増殖するかを検討する。

ここでは増殖調節を、細胞周期の調節あるいはアポトーシスの制御という視点から評価する。

MMTアッセイやコロニー形成能アッセイにより、顆粒膜細胞株にLKB1/AMPK強制発現あるいはノックダ

ウンした場合、また薬剤で AMPK を活性化させた場合、細胞増殖能がどのように変化するかを検討する。

細胞周期調節に関与しているかを確かめるため、LKB1/AMPK 導入後あるいは AMPK 活性化後にフローサイトメトリーなどで細胞周期分布を評価する。また、細胞周期促進に関与する、サイクリンやサイクリンキナーゼなどの活性化を測定する。

LKB1/MPK が顆粒膜細胞のアポトーシスに関与しているかを検討する。AMPK/LKB1 導入後あるいは AMPK 活性化後に Caspase-3 アッセイ、TUNEL アッセイ、FACS での sub G1 分画の評価などによりアポトーシスの評価を行う。

LKB1/AMPK を強制発現あるいは AMPK を活性化させた場合に顆粒膜細胞の分化に関与する細胞表面マーカーなどがどのような変化を示すかを検討する。

3) 子宮内膜および乳癌における LKB1/AMPK の増殖あるいは局所ステロイド合成調節機構の解明

(平成 25 年)

2) - と同様の手法を用いて増殖機構については解析する。

局所ステロイド合成調節機構については、乳癌細胞あるいは子宮内膜癌細胞内のアロマトラーゼの発現量の変化を LKB1/AMPK の強制発現または RNAi ノックダウン法、あるいは AMPK の活性化剤を用いて定量的 PCR 法あるいはウエスタンブロッティング法にて評価する。

また子宮内膜癌組織または乳癌組織切片を用いて LKB1/AMPK の発現および活性化、アロマトラーゼの発現量の評価する。

4) 卵胞の発育に伴う LKB1/AMPK の顆粒膜細胞での発現パターンの変化の解析 (平成 26 年)

顆粒膜細胞の分化と LKB1/AMPK の発現または活性化の関連性を免疫染色を用いて評価する。

免疫染色に使用可能な抗体を取得し、抗原ペプトドなどを用いてその特異性について検証し、LKB1 または活性化 AMPK の免疫染色系を確立する。

ヒト卵巣の切片で様々な段階の発育卵胞での LKB1/AMPK の発現状態あるいは活性化状態 (リン酸化状態) を評価

する。

5) LKB1/AMPK のシグナル経路とエストロゲン受容体を介する転写制御系との相互作用の解析

(平成 26 年度以降)

リン酸化 AMPK の基質となる転写因子あるいは転写共役因子を同定し、エストロゲン受容体との相互作用を検討する。AMPK を強制発現あるいは活性化させたうえで、エストロゲン受容体の転写活性およびリン酸化状態を評価するとともに、免疫沈降法などを用いてエストロゲン受容体と相互作用する蛋白質を単離し、質量分析器を用いて同定する方法を考慮している。

Constitutive active 型の AMPK を導入あるいは AMPK の活性化剤を用いて、エストロゲン受容体の転写活性をルシフェラーゼ法にて評価する。またウエスタンブロッティング法にてエストロゲン受容体自体のリン酸化の変化を評価する。

Constitutive active 型の AMPK を安定的に発現する乳癌細胞あるいは子宮内膜癌を樹立し、共免疫沈降法により AMPK およびエストロゲン受容体と相互作用する核蛋白質を回収する。

同定された因子を乳癌あるいは子宮体癌細胞培養系に発現させ、細胞増殖調節あるいは局所でのステロイド合成調節機構における機能解析を行う。

4. 研究成果

我々は AMPK のリン酸化に関連して相互作用する SIRT3 に着目し、ヒト顆粒膜細胞に酸化ストレスをくわえた際に SIRT3 の発現量および SIRT3 を介したストレス応答機能について解析し、プロゲステロンの賛成に関与することを明らかにした。SIRT3 の卵巣における局在を免疫組織化学染色にて明らかにし、SIRT3 が顆粒膜細胞に局在していることが明らかとなった。ヒト顆粒膜細胞に hCG および過酸化水素を添加し、酸化ストレスレベル、SIRT3 および抗酸化物質の関連性を RT-PCR, ウエスタンブロッティングにて検討した。カタラーゼ、SIRT3, superoxide dismutase 1 の発現量は過酸化水素添加で増加し、hCG 添加で減少した。細胞内酸化ストレスレベルは蛍光顕微鏡で解析した。内因性の SIRT3 のノックダウンにて細胞内の酸化ストレスレベルは上昇し、17 β -HSD, StAR タンパク、P450scc, 3 β -HSD の発現量は減少し、プロゲステロン生合成量も減少した。

以上より SIRT3 は顆粒膜細胞の黄体化を正

に制御し、酸化ストレスレベルをコントロールしていると考えられる。SIRT3 は卵子のみでなく顆粒膜細胞も酸化ストレスより守り維持する役割をしていると予想される。

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2件)

1. SIRT3 Positively Regulates the Expression of Folliculogenesis- and Luteinization-Related Genes and Progesterone Secretion by Manipulating Oxidative Stress in Human Luteinized Granulosa Cells.

Fu H, Wada-Hiraike O, Hirano M, Kawamura Y, Sakurabashi A, Shirane A, Morita Y, Isono W, Oishi H, Koga K, Oda K, Kawana K, Yano T, Kurihara H, Osuga Y, Fujii T. Endocrinology. 155(8):3079-3087:2014

2. 更年期における身体的・心理的・内分泌的变化 大石 元. 診断と治療. vol.102 no.8, p. 1111-1115, 2014年8月

[学会発表](計2件)

1. The expression of Farnesoid X Receptor in human luteinized granulosa cells and analysis of its role in the biosyntheses of steroids
Houju Fu, Osamu Wada-Hiraike, Ayako Sakurabashi, Tomohiko Fukuda, Wataru Isono, Mana Hirano, Hajime Oishi, Katsutoshi Oda, Kei Kawana, Tetsu Yano, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii 2015.4.10 67th Annual congress of JSOG, Yokohama

2. 家族性卵巣機能不全原因遺伝子 FOXL2 はエストロゲンレセプター(ER) の転写活性化能を抑制する. 平野 菜来、平池 修、白根 晃、櫻橋 彩子、傅 厚菊、磯野 涉、大石 元、織田 克利、川名 敬、矢野 哲、大須賀 穰、藤井 知行 2013.12.7 第18回日本生殖内分泌学会学術集会. 東京

3. セラフィラムの安定的な搬入方法; 腹腔鏡用ガーゼを用いた簡単な搬入方法および貼付の工夫. 大石 元、大西賢人、中西美紗緒、中西恵美、諸宇ヒブン、郷田朋子、榎谷法生、張士青、高本真弥、定月みゆき、矢野 哲. 2014.9.11 第54回日本産科婦人科内視鏡学会学術講演会. 鹿児島

[図書](計1件)

1: F.生殖生理の基礎と最新知識 2.女性内

分泌 大石 元, 矢野 哲. 生殖医療ポケットマニュアル. 医学書院. 2014年12月

[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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

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

()

研究者番号:

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: