

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462518

研究課題名(和文) 乳癌細胞におけるエストロジェンの細胞増殖抑制作用の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of anti-mitogenic effects of estrogen on breast cancer cells

研究代表者

石田 真帆 (ISHIDA, Maho)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：80362086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：エストロジェン(E2)受容体(ERalpha)を安定的に遺伝子導入した乳癌細胞 MDA-MB-231を用いてDNAマイクロアレイ解析を行い、E2の増殖抑制作用メカニズムに關与する遺伝子を探索した。E2反応性に発現抑制されるBCAR3およびFOSL1遺伝子は、ノックダウンにより基礎増殖を抑制したものの、これら遺伝子を過剰発現させてもE2により増殖が有意に抑制されたことから、E2の増殖抑制作用を直接仲介する遺伝子ではないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：MDA-MB-231 is an estrogen receptor (ER)-negative breast cancer cell line. In contrast to the mitogenic effects of 17beta-estradiol (E2) in ER-positive MCF7, E2 suppresses proliferation of MDA-MB-231 stably transfected with ERalpha cDNA (MDA-ER). In MDA-ER, the BCAR3 and FOSL1 gene expressions were found to be suppressed by the treatment with E2. Because the knock-down of those gene expressions using RNA interference caused the inhibition of the proliferation of MDA-ER treated with vehicle, we hypothesized that the suppression of those gene expressions may be involved in the anti-mitogenic effects of E2. The overexpression of those genes, however, had no effect on the anti-mitogenic effects of E2. These results indicate that E2-induced down regulation of BCAR3 or FOSL1 gene expression does not play a key role for the anti-mitogenic effects of E2.

研究分野：医歯薬学

キーワード：エストロジェン エストロジェン受容体 MDA-MB-231 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

女性ホルモンであるエストロジェンは、乳腺、子宮、下垂体前葉といった標的器官の正常な発達を促進することによって女性の生殖機能の発現に重要な役割を果たしている。一方、エストロジェンは乳癌や子宮内膜癌といったホルモン感受性腫瘍の発症と進展に関するリスクファクターとしても知られている。現在、エストロジェン受容体 (ER) を発現する乳癌細胞に対して、エストロジェンの細胞増殖促進作用を阻止する治療が広く行われている。

本来 ER を発現する乳癌細胞に対しては、エストロジェンはその増殖を促進する。一方で、ER を発現しない乳癌細胞に対しては、人為的に ER を発現させた場合、その ER を介して、増殖を抑制することが知られている。この抑制メカニズムが解明されれば、乳癌細胞に対する新たな治療戦略へと発展することが期待される。エストロジェンが結合した ER は転写因子として働き、遺伝子発現を変化させることから、増殖促進時と増殖抑制時の遺伝子発現について DNA マイクロアレイを用いて比較することで、この細胞増殖抑制作用メカニズムに関わる遺伝子の探索が行われているが、候補遺伝子の数が多く、未だ明らかではない。

2. 研究の目的

本来 ER を発現していない MDA-MB-231 乳癌細胞株に ER を安定的に発現させた細胞株 (MDA-ER 細胞) を作成し、エストロジェンの細胞増殖抑制作用を調べた結果、この MDA-ER 細胞の長期培養によりエストロジェンに対する増殖抑制反応が減弱もしくは消失することを認めた。このような MDA-ER 増殖抑制反応消失細胞と元の MDA-ER 細胞は、エストロジェンに対する増殖反応が減弱・消失しているが、遺伝的バックグラウンドは同一であると考えられる。本研究は、DNA マイクロアレイ解析を用いて長期培養前後の MDA-ER 細胞の遺伝子発現を比較することで、エストロジェンの細胞増殖抑制作用メカニズムに関与する遺伝子を探ることを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) MDA-ER および MDA-ER 増殖抑制反応消失細胞について、vehicle 処置および 10 nM 17 β -エストラジオール (E2) 処置 4 時間後の RNA を抽出し、外部委託により、DNA マイクロアレイ解析を行って遺伝子の発現変化を比較し、E2 による増殖抑制作用特異的に発現変化する遺伝子を抽出した。特異的に発現変化する遺伝子として、まず MDA-ER 細胞において E2 処置により発現が促進される遺伝子および抑制される遺伝子を選出し、その E2 反応性を増殖抑制反応消失細胞における E2 反応性と比較することで、MDA-ER 細胞において増殖抑制反応消失細胞よりも強く発現促進、あ

るいは発現抑制されている遺伝子を候補遺伝子として抽出した。

(2) まず候補遺伝子をノックダウンして、E2 の細胞増殖抑制作用におけるその影響を調べた。遺伝子発現のノックダウンには、異なる 4 種類の siRNA からなる、Dharmacon 社の siGENOME SMARTpool を用いた。具体的には、 $1.5-2.0 \times 10^5$ 個の MDA-ER 細胞を、5% の DCC-BS (dextran-coated charcoal treated bovine serum) を含む DMEM を用いて 1 日培養し、候補遺伝子の siRNA (siGENOME Human siRNA-SMART pool) および対照用の siRNA (siGENOME Non-Targeting siRNA) を各 20 nM の濃度で反応させた。翌日 10 nM E2 あるいは vehicle を投与し、4 時間後に抽出した RNA を用いてリアルタイム PCR 法により、候補遺伝子の mRNA 発現変化を、RPLP0 の遺伝子発現を内部標準として求めた。また E2 投与後 24 時間後に、増殖マーカーとして 200 μ M の bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を添加し、2 時間培養後、メタノール固定し、免疫染色法により BrdU 陽性細胞率を BrdU labeling index として検出し、細胞の増殖率とした。

(3) 次に、ノックダウンにより MDA-ER 細胞の vehicle 投与での基礎増殖が抑制された候補遺伝子 BCAR3 と FOSL1 について、これらを過剰発現させた場合、E2 の細胞増殖抑制作用における影響を調べた。BCAR3 遺伝子の cDNA は購入し (OriGene, SC324095)、FOSL1 遺伝子の cDNA は人工遺伝子合成したもの (ユーロフィンジェノミクス社) を用いた。一過性遺伝子導入により目的遺伝子を過剰発現する細胞特異的に増殖率を検出するため、BCAR3 および FOSL1 遺伝子と蛍光蛋白を共発現させた。MDA-ER 細胞には ER 安定発現細胞株樹立の際に既に EGFP 遺伝子が導入されていることから、BCAR3 および FOSL1 遺伝子発現の指標として tdTomato 遺伝子を共発現させるよう、バイディレクショナル発現ベクター pBI-CMV1-tdTomato-BCAR3 vector および pBI-CMV1-tdTomato-FOSL1 vector を作成した (Fig.1)。

$1.5-2.0 \times 10^5$ 個の MDA-ER 細胞を、5% DCC-BS を含む DMEM を用いて 1 日培養し、Lipofectamine 3000 を用いて 2.5 μ g の plasmid vector を一過性遺伝子導入した。翌日 10 nM E2 あるいは vehicle を投与し、24 時間後に、増殖マーカーとして 200 μ M の Edu を添加し、2 時間培養後、メタノール固定し、Click-iT Plus Edu Imaging Kits を用いて tdTomato 発現細胞特異的な細胞増殖率を検出した。増殖マーカーとして Edu を用いた理由は、免疫染色による BrdU 陽性細胞検出の際に必要な塩酸処理により、tdTomato 蛍光が消失してしまうため、塩酸処理を検出反応に要しない Edu を用いた。過剰発現の有無は、ウエスタンブロッティング法により確認した。すなわち、E2 処置後 24 時間後の細胞から蛋白を抽出し、BCAR3 は BCAR3 antibody (Cell signaling technology #24032,

1:1000 希釈)を、FOSL1 は FRA1 Rabbit mAb (Cell signaling technology, D8034, 1:10,000 希釈)を用いて蛋白の過剰発現を確認した。

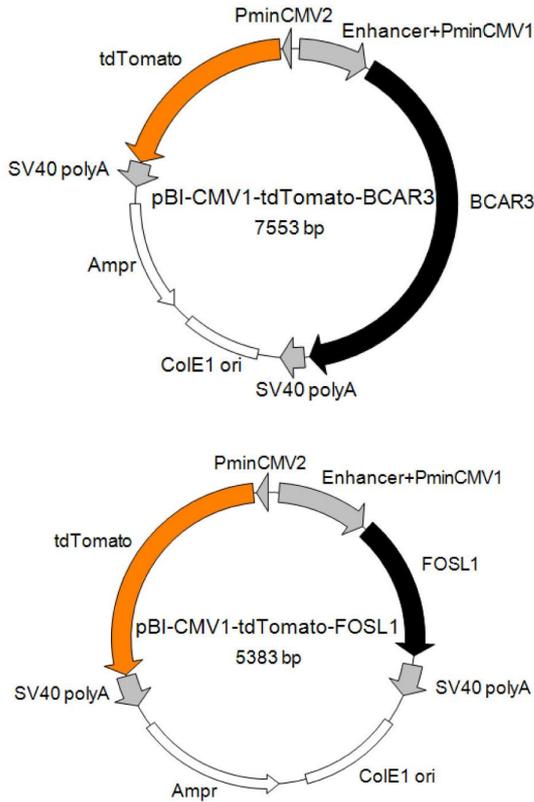


Fig.1 過発現用ベクター

4. 研究成果

(1)DNA マイクロアレイ解析を用いた E2 の細胞増殖抑制作用に關与する候補遺伝子の探索

DNA マイクロアレイ解析により、MDA-ER 細胞と MDA-ER 増殖抑制反応消失細胞の遺伝子発現を比較した。E2 により発現が促進された遺伝子として 163 個、E2 により発現が抑制された遺伝子として 124 個抽出した。

(2)siRNA を用いた候補遺伝子の E2 の細胞増殖抑制作用への關与の検討

(1)において E2 により発現が促進され、その発現促進が増殖抑制に關与すると考えられる候補遺伝子として、ARID4A, ARID5B, ARNTL, BAP1, BCL10, BHLHE40, BIN1, CABLES2, CDKN1A, CDKN1C, CXXC5, DHRS2, DKK3, DUSP7, EGR1, FOXC1, FOXC1, FST, IGFBP3, INHBB, JAZF1, KCTD6, KLF9, LFNG, MAF, MXD1, NAB2, OSGIN1, PGF, PITX1, PRDM1, PRDM6, RASD1, RXRA, SEC14L2, SH2B3, SGSM3, STARD10, TOB1, UPF1, VASN, YPEL2 に着目し、siRNA を用いてこれら遺伝子発現をノックダウンして、10 nM E2 処置による増殖抑制反応が消失するかどうかを調べた。その結果、いずれの遺伝子ノックダウンの条件においても、エストロジェンは細胞増殖を有意に抑制したことから、調べた 42 個の遺伝子発現はエストロジェン

の細胞増殖抑制作用を担うものではないことが判った。

また、(1)において E2 により発現が抑制され、その発現抑制が増殖抑制に關与と考えられる遺伝子としては、BCAR3, ENC1, FOSL1, FOXQ1, TNFAIP8 に着目した。これら遺伝子についても、まず siRNA を用いてノックダウンし、基礎増殖率およびエストロジェンによる細胞増殖抑制作用の変化を調べた。その結果、すべての遺伝子のノックダウンでエストロジェンによる増殖率の低下が認められた。一方で、基礎増殖率に関しては、FOXQ1, ENC1, TNFAIP8 の遺伝子ノックダウンでは有意な低下が見られなかったのに対して、BCAR3 と FOSL1 遺伝子をノックダウンした場合には基礎増殖率が有意に低下した。(Fig.2)

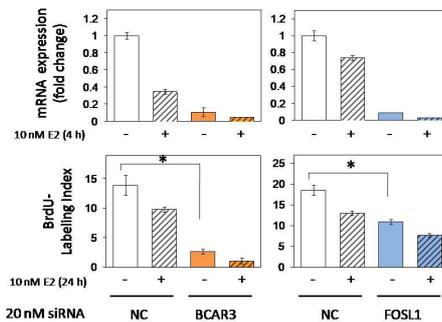


Fig. 2 Effects of RNA interference-mediated knock down on mRNA expression and anti-mitogenic action of E2 in MDA-ER

* Significantly different from the vehicle-treated group of NC siRNA treated cells at $P < 0.01$.

(3)過発現実験系を用いた、BCAR3 および FOSL1 遺伝子発現低下がエストロジェンの細胞増殖抑制作用に關与するかどうかの検討

(2)の結果より、BCAR3 および FOSL1 遺伝子発現の抑制により、MDA-ER 細胞の基礎増殖が抑制されたことから、エストロジェンがこれら遺伝子の発現抑制を介して MDA-ER 細胞の増殖抑制を誘起している可能性を検討した。そのため、これらの遺伝子を過剰に発現させた状態で、10 nM E2 を 24 時間処置し、細胞増殖の抑制が消失するかどうかを調べた。まず各遺伝子の過剰発現用ベクター pBI-CMV1-tdTomato-BCAR3 vector あるいは pBI-CMV1-tdTomato-FOSL1 vector を一過性遺伝子導入した細胞において、ウエスタンブロッティングにより蛋白の過剰発現を確認した。対照群には BCAR3 遺伝子および FOSL1 遺伝子を含まない pBI-CMV1-tdTomato vector を遺伝子導入した細胞を用いた。BCAR3 および FOSL1 蛋白の発現は、対照群(NC)では、エストロジェン処置により低下したのに対して、各遺伝子の過剰発現用ベクターの遺伝子導入群では著明に上昇し、またエストロジェン処置による低下は認められず、BCAR3 および FOSL1 蛋白が過剰発現していることを確認した (Fig.3)

プラスミドベクターの遺伝子導入効率として、全細胞に占める tdTomato 陽性細胞率を検出した結果、BCAR3 遺伝子を導入した実験では、対照群では $7.5 \pm 0.61\%$ 、BCAR3 遺伝

子導入群では $20.2 \pm 0.99\%$ であった。また FOSL1 遺伝子を導入した実験では、対照群では $14.9 \pm 2.08\%$ 、FOSL1 遺伝子導入群では $17.8 \pm 2.29\%$ であった。BCAR3 および FOSL1 遺伝子が過剰発現しているにもかかわらず、エストロゲンによる増殖抑制作用は対照群と同様に認められた(Fig.4)。

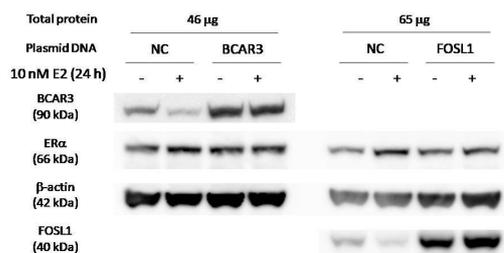


Fig. 3 Western blotting of overexpressing BCAR3 or FOSL1 gene in MDA-ER

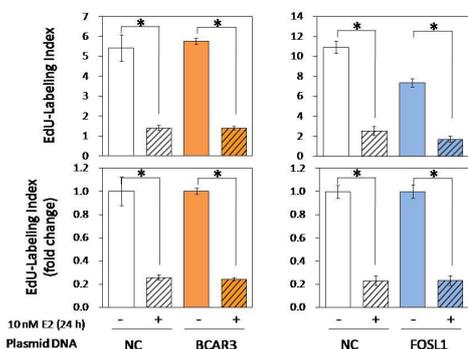


Fig. 4 Anti-mitogenic action of E2 in MDA-ER overexpressing BCAR3 or FOSL1 gene
* Significantly different from the vehicle-treated group at $P < 0.01$.

以上より、エストロゲンによる細胞増殖抑制作用メカニズムに関連する遺伝子の探索を行い、最終的に BCAR3 および FOSL1 遺伝子の発現低下との関連が疑われたが、過剰発現させてもエストロゲンの増殖抑制作用が発現したことから、これら遺伝子発現の低下が関与しているとは言い難いという結論に至った。一方で、特に FOSL1 遺伝子について、ノックダウンした場合と過剰発現した場合共に基礎増殖率が低下するという矛盾した結果となった。MDA-ER 細胞が ER, EGFP, tdTomato, FOSL1 と 4 種もの遺伝子の過剰発現状態であることが、本来の MDA-ER 細胞の性質を反映できていなかった可能性も否定できない。

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)

{その他}

1. Maho Ishida, Tetsuo Mitsui, Michi Izawa, Jun Arita

RNA interference of BCAR3 and FOSL1 genes induces the inhibition of proliferation of

MDA-MB-231 breast cancer cells stably transfected with estrogen receptor. The Journal of Physiological Sciences 66 (Supplement) S150, 2016

2. Maho Ishida, Tetsuo Mitsui, Michi Izawa, Jun Arita

Global gene expression profiling of the inhibitory effect of estrogen on the cell proliferation of MDA-MB-231 breast cancer cells stably transfected with estrogen receptor.

The Journal of Physiological Sciences 65 (Supplement) S239, 2015

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田 真帆 (ISHIDA, Maho)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：80362086

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし