

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591936

研究課題名 (和文)

新たな内分泌治療薬開拓に向けたエストロゲン受容体標的遺伝子の同定と機能解析

研究課題名 (英文)

Identification of novel estrogen receptor α target gene and its function in endometrial cancer

研究代表者

宇都宮 裕貴 (UTSUNOMIYA HIROKI)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10359507

研究成果の概要 (和文)：子宮内膜癌細胞株を用いてER α が直接結合する新たな転写制御領域を同定しその機能解析を行うことにより、新たな分子機構の解明を試みた。

始めに転写制御領域を同定するために ChIP クローニングを行い、47 の標的部位を得た。それらの中には、従来まで重要でないとされてきたイントロンも多数含まれていた。そして、ER α 転写コアクチベーターである GRIP1 に着目しその機能を検討したところ、子宮内膜癌細胞株において GRIP1 はアポトーシスを抑制することにより生存細胞数を増加させる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)： Significant progress has been made in understanding the role of ER α as a transcription factor that regulates the expression of target genes by directly binding to an estrogen response element or by association with other transcription factors on promoter targets. Until recently, however, little had been known about the distribution of ER α -binding sites within the genome and the identity of genes regulated by these *cis*-acting elements. Our aims were to determine the nature of ER α binding relative to the structure of a gene and increase our understanding of ER α action in Ishikawa endometrial cancer cell line.

Here, we used ChIP cloning technique and identified 47 ER α target loci in Ishikawa cells. The great majority of the binding sites were located in either introns or far distant to coding regions of genes. Among estradiol-induced genes, *GRIP1* was found to increase cell survival by significantly reducing apoptosis in Ishikawa cells.

Our findings suggest that at least a subset of these genes may play important biological roles in endometrial cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究代表者の専門分野：婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：Estrogen receptor、子宮内膜癌、クロマチン免疫沈降、GRIP1

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌は更年期前後を好発年齢とするエストロゲン依存性腫瘍であり、日本において近年著しい増加傾向にある。Estradiol (E2)は女性の発育および生殖機能に関して必要不可欠であり、従来から子宮内膜癌や乳癌の発症および増殖・進展に深く関わっている。

エストロゲンに関連する遺伝子の発現は、核内受容体スーパーファミリーの一員であるEstrogen Receptor (ER) α を介して制御されている。核内受容体はリガンド誘導性転写制御因子であって、それぞれの特異的な標的遺伝子群プロモーターに結合することで、標的遺伝子群の発現を正負に転写レベルで制御する。これまでにER α の構造やその機能が明らかになり、さらにDNAとの相互関係などの研究も行われてきた。その結果、クラス異なる巨大タンパク複合体群と相互作用することで、ER α が染色体構造調節を伴う転写を制御することが分子レベルで確認された。

従来、プロモーター領域に存在するEREという短い配列の領域をER α が認識することによって、標的遺伝子の転写調節を担う能力が獲得されると考えられていたが、最近になってER α が直接結合する領域は非常に広範囲に存在すると考えられるようになってきた。

2. 研究の目的

代表的な子宮内膜癌細胞株のIshikawa細胞を用いてER α に直接結合する新たな転写制御領域を同定する。さらに同定された遺伝子に関して機能解析を行い、子宮内膜癌におけるER α を介した新たな分子制御機構の可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1)クロマチン免疫沈降(ChIP)クローニング

ER α 陽性のIshikawa細胞株を培養し(閉

経前の正常子宮組織E2濃度に近い 10^{-8} M)を添加した。次にこれらの細胞にホルマリンを加え架橋構造を作り、1.5mlチューブに回収・タンパク分解酵素阻害剤を添加し-80度で保存した。そしてそれらを用いて下記の手順でクロマチン免疫沈降クローニングを行った。

① クロマチンの断片化(ソニケーション)

Sonic Dismembrator Model 100 (Fisher Scientific 社)を使用して断片化を行った。通常のChIP assayでは200~1000bpのサイズに切断するが、その長さではクローニング不可能なことも多く、今回は500~3000bpに切断して行った。

② ER α 抗体を用いた免疫沈降

acetyl-histone H4 ChIP assay kit (Upstate 社)のプロトコールに従い、Upstate社のモノクローナル抗体で免疫沈降を行った。

③ 沈降物を回収、クロスリンクの解除

この際、回収されたDNAには非特異的なものが多く含まれることが多いためクローニングを行う際には8~10回洗浄(通常のChIP assayでは回収したDNA-Antibody複合体に対し4~5回の洗浄を行う)、可能なかぎり非特異的なものを取り除いた。65度で一晩置きクロスリンクを解除する。

④ 回収したDNA (ER α 結合領域) をクローニング、標的遺伝子の特定

DNAを制限酵素で処理後 linker ligation し pGEM-T Easy Vector System を使用してPCRを行う。シークエンスを確認し、得られた塩基配列より BLAT search function (University of California Santa Cruz genome browser)を用いて遺伝子を特定した。

(2)ChIP assay および real-time PCR を用いた ER α 結合領域の確認

保存しておいた同一の細胞を用いて E2 を添加後、ER α 抗体で免疫沈降を行い、ER α 結合領域の DNA を回収。その結合部位に設定したプライマーを用いて ChIP assay を行い、定量的 PCR を施行し DNA 結合部位の発現強度を確認した。

(3)siRNA と Cell viability and apoptosis assay

標的遺伝子に対する 20~23 bp の siRNA をデザインし、合成を委託する (Dharmacon 社)。Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) を用いて transfection し、遺伝子ノックダウンによる細胞の活動性およびアポトーシス誘導を検討する。

トリパン・ブルーを用いて死亡した細胞数を確認し、さらに poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage Western Blot assay を用いてアポトーシスを検討した。さらに propidium iodide (PI) 染色および flow cytometry により細胞周期における S 期の細胞数を検討し、活動性のある細胞数の変化がアポトーシスによるものか細胞増殖によるものかを検討した。

4. 研究成果

(1) Ishikawa 細胞における ER α 結合部位の同定

ER α 結合部位を同定するために、ER α 抗体を用いて ChIP クローニングを行い、47 の標的遺伝子が同定された (表 1)。それらの標的遺伝子は、1) 従来からエストロゲンの働きに深く関わると考えられている遺伝子、2) これまで関連の認められなかった遺伝子、3) これまで重要と認識されていなかったイントロン内の ER α 結合領域、に分類された。

その中には *Glutamate receptor interacting protein 1 (GRIP1)*, *Cathepsin D (CTSD)*, *V-myc myelocytomatosis viral oncogene homologue (MYC)* などエストロゲンに関連する重要な遺伝子が含まれていた (表 2)。また一方で、19 の結合領域 (全体の 40%) は従来まで重要でないと言われてきたイントロンに存在していた。

表1. Ishikawa細胞におけるER α 結合部位の遺伝子に対する位置関係

Proximity to the closest gene	ER α 結合部位
Intronic	19
5'-Flanking region (kb)	18
<10	5
10-50	4
>50	9
3'-Flanking region (kb)	10
<4	5
4-10	1
10-50	2
> 50	2

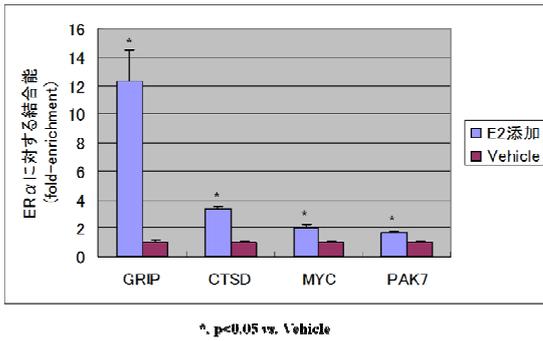
表2. Ishikawa細胞におけるE2により制御されたER α 標的遺伝子 (一部抜粋)

遺伝子	遺伝子ID	遺伝子位置	機能
Glutamate receptor interacting protein 1 (GRIP1)	24826	int: on	Transcription repressor
Cathepsin D (CTSD)	1509	1.0kb 5'	Protease
3-hydroxyisovaleryl-CoA	4676	13.0kb 5'	Transcription factor
3-protein coupled receptor 173 (GPCR173)	54128	49.0kb 5'	Signal transduction
V-myc myelocytomatosis viral oncogene homologue 1 (MYC)	4009	1.0kb 5'	Transcription factor
P21-activated kinase 7 (PAK7)	57144	int: on	Phosphatase
V-myc myelocytomatosis viral oncogene homologue 1 (MYC)	4009	48.3kb 5'	Signal transduction, Oncogene

(2) 代表的な ER α 結合部位の発現確認

ER α 抗体を用いて、重要な遺伝子と考えられる *GRIP1*, *CTSD*, *MYC*, *P21-activated kinase 7 (PAK7)* をランダムに選択し、ChIP assay を行った。E2 添加により 4 つの遺伝子全ての ER α との結合能が有意に上昇することが確認された (図 1)。なかでも *GRIP1* は著しい上昇を認めた。

図1. real-time PCRによるERαとの結合能



(3) *GRIP1* ノックダウンと Ishikawa 細胞生存率との関連

E2 添加により最も大きな変化を示した *GRIP1* が細胞に及ぼす影響を検討するため、siRNA 導入による *GRIP1* のノックダウンを行った。始めに *GRIP1* のノックダウン効率を確認した(図 2-a)。次に、*GRIP1* および control siRNA による Nonviable 細胞の比率を検討したところ、E2 添加の有無にかかわらず有意に *GRIP1* siRNA で Nonviable 細胞の比率が増加した(図 2-b)。さらに活動性のある細胞数の変化がアポトーシスによるものか細胞増殖によるものかを検討した。*GRIP1* siRNA により poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage の発現が上昇したことより、*GRIP1* のノックダウンでアポトーシスが增加することが示された(図 2-c)。また、*GRIP1* および control siRNA による S 期の細胞比率を確認したところ、E2 添加に関わらず細胞増殖に差はなかった(図 2-d)。

図2-a. *GRIP1* siRNAによる遺伝子ノックダウン効率

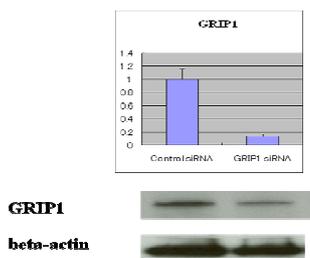


図2-b. siRNA後に死滅細胞の比率

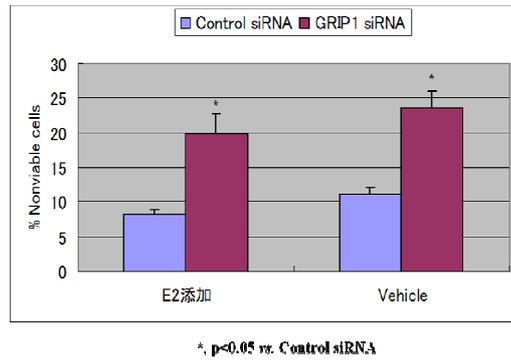


図2-c. ウェスタンブロット法によるアポトーシス発現

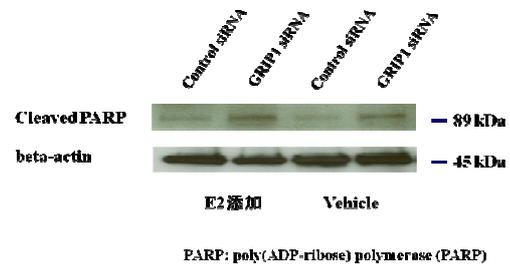
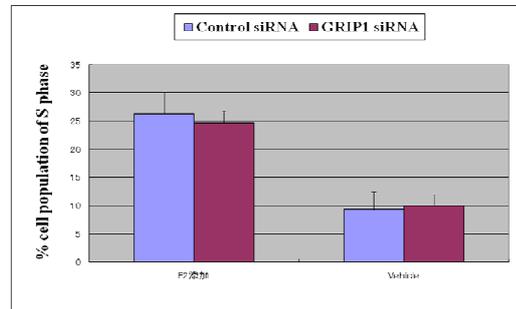


図2-d. *GRIP1* siRNAによるIshikawa細胞増殖能の変化



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 18 件)

- ① RA inhibits endometrial cancer cell growth via multiple genomic mechanism. Cheng YH, Utsunomiya H, et al. (5名中2番目) *J Mol Endocrinol*. (査読有) (In press) (2011)
- ② Total laparoscopic conservative surgery for an intramural ectopic pregnancy. Nabeshima H, Utsunomiya H, et al. (7名中3番目) *Diag Therap Endoscopy*. (査読有) (In press) (2011)
- ③ Establishment of Long-Term Model throughout Regular Menstrual Cycles in Immunodeficient Mice. Kikuchi-Arai M,

- Utsunomiya H, et al. (10名中3番目) *Am J Reprod Immunol*. (査読有) 64(5):324-32 (2010)
- ④ 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase-2 Deficiency and Progesterone Resistance in Endometriosis. Bulun SE, Utsunomiya H, et al. (13名中6番目) *Semin Reprod Med*. (査読有) 28:44-50 (2010)
- ⑤ Estrogen receptor-beta, estrogen receptor-alpha, and progesterone resistance in endometriosis. Bulun SE, Utsunomiya H, et al. (15名中8番目) *Semin Reprod Med*. (査読有) 28:36-43 (2010)
- ⑥ Malignant Transformation Arising From Mature Cystic Teratoma of the Ovary, A Retrospective Study of 20 Cases. Sakuma M, Utsunomiya H, et al. (9名中4番目) *Int J Gynecol Cancer*. (査読有) 20:766-771 (2010)
- ⑦ Risk factors for recurrence and re-recurrence of ovarian endometriomas after laparoscopic excision. Hayasaka S, Utsunomiya H, et al. (10名中5番目) *J Obstet Gynaecol Res*. (査読有) 12:1-5 (2010)
- ⑧ Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR) as a possible prognostic marker in epithelial ovarian cancer. Yue X, Utsunomiya H, et al. (10名中3番目) *Pathol Int*. (査読有) 60:400-406 (2010)
- ⑨ 「子宮内膜癌と臨床的問題」宇都宮裕貴、八重樫伸生。実験医学(査読無) 28巻:108-114 (2010)
- ⑩ Local biosynthesis of estrogen in human endometrial carcinoma through tumor-stromal cell interactions. Takahashi-Shiga N, Utsunomiya H, et al. (9名中2番目) *Clin Cancer Res*. (査読有) 15:6028-6034 (2009).
- ⑪ Steroidogenic factor-1 and endometriosis. Bulun SE, Utsunomiya H, et al. (15名中2番目) *Mol Cell Endocrinol*. (査読有) 300:104-108 (2009).
- ⑫ 「ジェノゲストがヒト子宮内膜症病変における細胞増殖および血管新生に与える影響」荒井真衣子、宇都宮裕貴、他 (9名中2番目) エンドメトリオーシス研究会会誌 (査読無) 30巻:96-98 (2009)
- ⑬ Upstream Stimulatory Factors Regulate Steroidogenic Factor-1 Expression in Endometriosis. Utsunomiya H, Bulun SE et al. (10名中1番目) *Mol Endocrinol*. (査読有) 22:904-914 (2008).
- ⑭ The expression of retinoic acid receptors in human endometrial carcinoma. Tanabe K, Utsunomiya H, et al. (10名中2番目) *Cancer Sci*. (査読有) 99:267-271 (2008).
- ⑮ Clinicopathological significance of circadian rhythm-related gene expression levels in patients with epithelial ovarian cancer. Tokunaga H, Utsunomiya H, et al. (10名中3番目) *Acta Obstet Gynecol Scand*. (査読有) 87:1060-1070. (2008).
- ⑯ 「子宮内膜症における Steroidogenic Factor-1 (SF-1) 過剰発現のメカニズム」宇都宮裕貴、八重樫伸生、他 (10名中1番目) エンドメトリオーシス研究会会誌 (査読無) 29巻:35-41 (2008)
- ⑰ 「子宮内膜癌における新規エストロゲンレセプターα 標的遺伝子の同定およびその機能解析」宇都宮裕貴、Bulun SE 日本更年期学会雑誌 (査読有) 16巻:213-219 (2008)
- ⑱ 「婦人科腫瘍とエストロゲン」伊藤潔、宇都宮裕貴、他、日本産科婦人科学会雑誌 (査読無) 60:1611-1617 (2008)
- [学会発表] (計3件)
- ① 宇都宮裕貴 「クラミジア感染を伴う卵管性不妊に対する腹腔鏡併用卵管鏡下卵管形成術の有用性」東北生殖医学会、盛岡、平成22年10月23日
- ② Utsunomiya H. Identification of novel estrogen receptor α target gene and its function in endometrial cancer. 第59回日本癌学会総会、大阪、平成22年9月25日
- ③ 宇都宮裕貴 「meet the top researchers」第62回日本産科婦人科学会総会 (招待講演) (平成22年4月24日) 東京
- [図書] (計1件)
- ① 宇都宮裕貴 「子宮 (子宮体癌)」更年期医療ガイドブック、金原出版 (2008) p 145-150
- [産業財産権]
- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)
- [その他]
- ホームページ等 なし
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
宇都宮 裕貴 (UTSUNOMIYA HIROKI)
東北大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号:10359507
- (2) 研究分担者
高野 忠夫 (TAKANO TADAO)
東北大学・未来医工学治療開発センター・

准教授

研究者番号：40282058

八重樫 伸生 (YAEGASHI NOBUO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00241597

小林 里香 (KOBAYASHI RIKA)

東北大学・病院・技能補佐員

研究者番号：80451582

(2008年4月～2010年2月)

山崎 幸 (YAMAZAKI MIYUKI)

東北大学・病院・技能補佐員

研究者番号：90451583

(2008年4月～2008年9月)

高林 俊文 (TAKABAYASHI TOSHIFUMI)

東北大学・医学部・教授

研究者番号：30124598

(2008年4月～2008年7月)