

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32206

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893224

研究課題名(和文) Estrogen前駆体transporterの発現と乳がん細胞の増殖に関する研究

研究課題名(英文) Impact of transporters for uptake of estrogen precursors on progression of breast cancer cells

研究代表者

松本 准 (Jun, Matsumoto)

国際医療福祉大学・薬学部・助手

研究者番号：60709012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ER陽性乳がんにおける新規創薬ターゲットおよびバイオマーカーの確立を目指し、ER陽性乳がん細胞におけるエストロゲン前駆体の取り込みとがん細胞の増殖との関連性について明らかにすることを目的とした。エストロゲンの前駆体であるエストロン硫酸(E1S)に高い輸送活性を示す有機アニオン輸送ポリペプチド(OATP)2B1は、ER陽性乳がん細胞においてE1Sの取り込みおよび細胞増殖に重要な役割を果たしており、OATP2B1がER陽性乳がんに対する新規創薬ターゲットおよびバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the relationship between expression of transporters for estrogen precursors and cell proliferation in estrogen receptor (ER)-positive breast cancer to establish a novel target and biomarker for ER-positive breast cancer. Organic anion transporting polypeptide (OATP) 2B1 has been reported to recognize various types of organic anions as substrates and has unique substrate specificity with high affinity to several estrogen precursors, including estrone sulfate (E1S). We found that the expression level of OATP2B1 was related to progression of ER-positive breast cancers and OATP2B1 has a key role in uptake of E1S in ER-positive breast cancer cells. The findings in this study lead us to conclude that OATP2B1 is involved in cell proliferation of ER-positive breast cancer by increasing the amount of estrogens derived from E1S in breast cancer cells. Moreover, OATP2B1 may be useful as a novel target or biomarker for ER-positive breast cancer.

研究分野：薬物動態学

キーワード：有機アニオン輸送ポリペプチド エストロゲン前駆体 乳がん エストロゲン受容体

1. 研究開始当初の背景

乳がんのうち約 2/3 はエストロゲンレセプター (ER) 陽性乳がんであり、エストロゲン (主にエストラジオール、E2) が、がん細胞の増殖に重要な役割を果たしている。そのため、ER 陽性乳がん患者に対する薬物療法としては、化学療法を行うより積極的にホルモン療法を行うことが、現在の乳がん治療におけるスタンダードとなっている。しかしながら、ER 陽性乳がんは ER が高発現しホルモン療法が効果的なルミナル A タイプ、および ER 陽性であるにも関わらずホルモン療法のみでは治療が不十分なルミナル B タイプに分けられ、このルミナル A タイプおよびルミナル B タイプにおける相違に関しては未だ不明な点も多く、従来のホルモン療法の効果が期待できない患者も多い。そこで、使用薬剤選択に係る新規バイオマーカーの確立、およびより多くの異なる作用点を狙った薬剤の開発が、乳がん患者に対する質の高い医療の提供に繋がることが考えられる。

近年、エストロゲンの前駆体であり、血中に高濃度で存在するエストロン硫酸 (E1S) を活性型エストロゲンに変換するために必須な酵素であるステロイドサルファターゼ (STS) が、ER 陽性乳がん細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが報告された (Miyoshi *et al.*, *Clin Cancer Res*, 2003)。

そこで、ER 陽性乳がんに対する新規抗ホルモン剤として STS 阻害剤が開発され、第 1 相試験において有効性が高いことが報告された (Foster *et al.*, *J Endocrinol*, 2012)。

これに伴い、E1S のようなエストロゲン前駆体に関しても、乳がん細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが示唆された。一方で、E1S は硫酸基を有するために親水性であり、E1S の細胞内への取り込みには何らかのトランスポーターが関与することが考えられる。E1S に高い輸送活性を示すトランスポーターファミリーとしては、有機アニオン輸送ポリペプチド (OATP、遺伝子名 *SLCO*) ファミリーが知られており (Obaidat *et al.*, *Anni Rev Pharmacol Toxicol*, 2012) 。

そもそも E1S が STS により加水分解される以前の過程である、E1S の細胞内への取り込み量の変化が、最終的に乳がん細胞の増殖に関与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

上述の背景を踏まえ、本研究では ER 陽性乳がんにおける新規バイオマーカーおよび創薬ターゲットの確立を目指し、ER 陽性乳がん細胞における E1S の取り込みと、がん細胞の増殖との関係性を明らかにすることを目的とし、具体的に (1) 乳がん組織における各 OATP の発現、(2) 乳がん組織における OATP 発現量とがんの各パラメータとの関連性、および (3) 乳がん細胞における OATP 発現量の変化とがん細胞の増殖との関連性について明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) 乳がん組織における各 OATP の発現
千葉大学医学部附属病院より正常乳房組織および乳がん組織を拾得し、各 *SLCO* mRNA 発現量を real-time PCR 法により検討した。なお、ヒト組織の利用に関しては、千葉大学倫理審査委員会の承認を得た (承認番号: 千葉大医総第 100 号)。

(2) 乳がん組織における OATP 発現量とがんの各パラメータとの関連性

乳がん組織における腫瘍径、がんのグレード、エストロゲン関連遺伝子の発現等、乳がんの各パラメータと *SLCO* mRNA 発現量との関連性を統計学的手法により検討した。各遺伝子の発現量は real-time PCR 法により検討した。

(3) 乳がん細胞における OATP 発現量の変化とがん細胞の増殖との関連性

ER 陽性乳がんのモデル細胞として汎用される MCF-7 細胞において OATP を過剰発現させ、E1S 添加後の E1S の取り込み量、ER の刺激、E2 分泌能、および細胞増殖の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 乳がん組織における各 OATP の発現
まず初めに、千葉大学医学部附属病院より正常乳房組織および乳がん組織を拾得し、各 *SLCO* mRNA の発現を検討したところ、*SLCO1A2*、*SLCO2B1*、*SLCO3A1* および *SLCO1C1* mRNA の発現が認められた。次に、正常乳房組織および乳がん組織における各 *SLCO* mRNA 発現量を比較したところ (同一患者より拾得した乳房組織 16 検体)、*SLCO1A2* および *SLCO2B1* mRNA 発現量は乳がん組織で有意に高かった (図 1)。

(2) 乳がん組織における OATP 発現量とがんの各パラメータとの関連性

正常乳房組織および乳がん組織における発現量を比較した際に最も有意な差が認められた *SLCO2B1* mRNA に関して、乳がんの各パラメータとの関連性を検討した (表 1)。

乳がんの悪性度を示すがんのグレードに関して、グレード 1 と比較しグレード 2 およびグレード 3 において *SLCO2B1* mRNA 発現量は有意に高かった ($P = 0.022$)。また、細胞の増殖活性を示すことから臨床で広く用いられる Ki-67 値と *SLCO2B1* mRNA 発現量との間に有意な正の相関が認められ ($P = 0.019$)、さらに STS mRNA 発現量と *SLCO2B1* mRNA 発現量との間においても有意な正の相関が認められた ($P = 0.001$)。また、ルミナル A タイプと比較しルミナル B タイプにおいて、*SLCO2B1* mRNA 発現量は高い傾向が認められた ($P = 0.072$)。

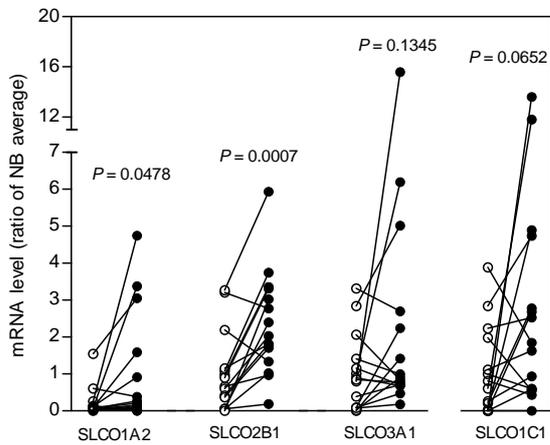


図1 正常乳房および乳がん組織における各SLCO mRNA 発現量の比較(○, 正常乳房組織; ●, 乳がん組織)

表1 乳がん組織49検体におけるSLCO2B1 mRNA 発現量とがんの各パラメータとの関連性

Clinical parameter	n	SLCO2B1 mRNA expression (mean ± SE)	P value
Age			
<50 years	23	2.30 ± 0.47	0.220
≥50 years	26	3.60 ± 0.93	
Tumour size			
≤2 cm	18	3.16 ± 0.75	0.795
>2 cm	31	2.89 ± 0.75	
Lymph node status			
Positive	27	2.19 ± 0.41	0.132
Negative	22	3.97 ± 1.08	
Histological grade			
1	14	1.66 ± 0.26	0.022
2 + 3	35	3.52 ± 0.74	
ER			
Positive	40	3.71 ± 1.35	0.563
Negative	9	2.83 ± 0.60	
PgR			
Positive	37	5.10 ± 1.88	0.169
Negative	12	2.30 ± 0.34	
HER2			
Positive	7	2.67 ± 0.70	0.693
Negative	42	3.04 ± 0.62	
Subtype			
Luminal A-like	16	1.79 ± 0.28	0.072
Luminal B-like	19	4.19 ± 1.29	
Ki-67 labelling index			
	49	$r = 0.335$	0.019
Estrogenic genes			
Steroid sulfatase	49	$r = 0.442$	0.001
ERα	49	$r = -0.030$	0.840
Cyclin D ₁	49	$r = 0.177$	0.223
Aromatase	49	$r = 0.009$	0.954

(3) 乳がん細胞における OATP 発現量の変化とがん細胞の増殖との関連性

ER 陽性乳がん由来 MCF-7 細胞において OATP2B1 を過剰発現させ、Western blot 分析を行ったところ、発現のポジティブコントロールとして用いた HEK293 細胞(トランスポーターの過剰発現で広く用いられる細胞株)において発現させた OATP2B1 とは分子量が異なっていた(図 2A)。そこで、MCF-7 細胞および HEK293 細胞において発現させた OATP2B1 をグリコシダーゼにより脱グリコシル化したところ、両者で分子量は同等であった(図 2B)。以上より、両細胞間における OATP2B1 の分子量の差はグリコシル化によるものであり、糖付加の程度は異なるものの、MCF-7 細胞において OATP2B1 を過剰発現させることに成功した(以降、

OATP2B1 を過剰発現させた MCF-7 細胞を MCF-OATP2B1、コントロールベクターを組み込んだ MCF-7 細胞を MCF-pcDNA3 とする)。

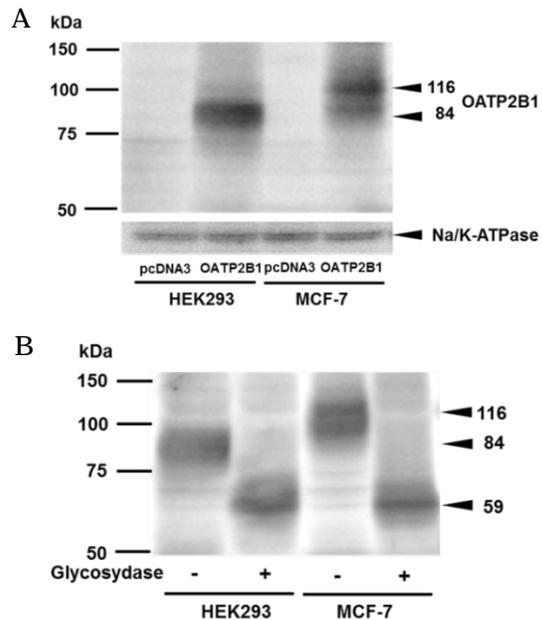


図2 MCF-7細胞におけるOATP2B1の過剰発現(A)およびグリコシル化がOATP2B1の分子量に及ぼす影響(B)

構築した細胞を用いて、E1S 添加後の E1S の取り込み量をトリチウムラベル化した E1S を用いて検討したところ、MCF-pcDNA3 と比較し MCF-OATP2B1 において E1S の取り込み量は顕著に高かった(図 3)。

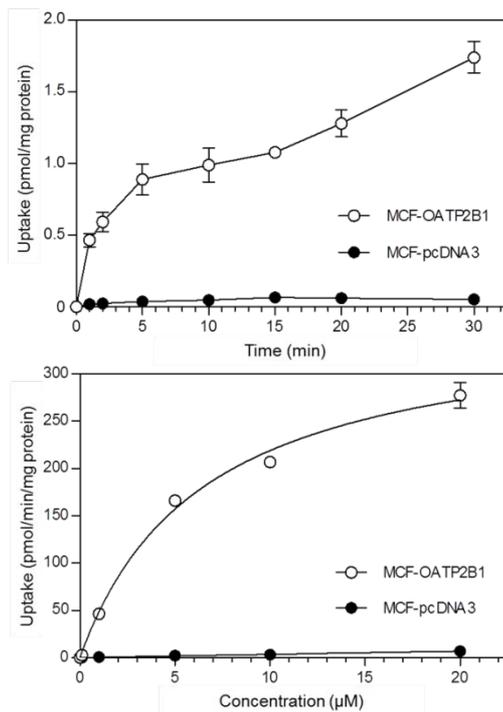


図3 MCF-7細胞におけるOATP2B1の過剰発現がE1Sの取り込み量に及ぼす影響

次に、OATP2B1 の過剰発現が ER の刺激に及ぼす影響に関して、エストロゲン応答配列を含んだレポータープラスミドを用いてレポータージーンアッセイを行ったところ、MCF-pcDNA3 と比較し MCF-OATP2B1 において ER の刺激は有意に高かった (図 4A)。また、ER の刺激の亢進が、細胞内に取り込まれた E1S が E2 へと変換された後に生じるかを検討するため、E1S 添加後の E2 分泌能を ELISA により検討した。E2 分泌能に関しても、MCF-pcDNA3 と比較し MCF-OATP2B1 において、E1S の生理学的血中濃度を含む 4 つの濃度域で有意に高かった (図 4B)。さらに、OATP2B1 の過剰発現が細胞増殖に及ぼす影響を検討したところ、E1S 添加後の細胞数は MCF-pcDNA3 と比較し MCF-OATP2B1 において有意に高かった (図 4C)。以上より、ER 陽性乳がん細胞における OATP2B1 発現量の変化は、細胞内 E1S 取り込み量および ER の刺激の変化を介して、細胞増殖に及ぼす影響を示唆された。

乳房組織を用いた臨床的検討および培養細胞を用いた基礎的検討の双方において、ER 陽性乳がん細胞における OATP2B1 発現量の変化は、がん細胞の増殖に及ぼす影響を示唆された。その中で、ルミナル A タイプと比較しルミナル B タイプにおいて、SLCO2B1 mRNA 発現量が高い傾向が認められた。一般的にルミナル B タイプはルミナル A タイプと比較し ER の発現量が低く、また Ki-67 値は高いことが知られている。そこで、E1S の取り込みと、ER および Ki-67 発現量との関連性を検討する目的で、MCF-7 細胞において E1S を添加し、両タンパク質の発現量の変化を検討した (図 5)。MCF-7 細胞における E1S の取り込みは、ER の発現量を減少させ、一方で Ki-67 発現量を顕著に増加させた。これらの作用は、OATP の阻害剤として広く用いられるプロモスルホフタレイン (BSP) により阻害された。

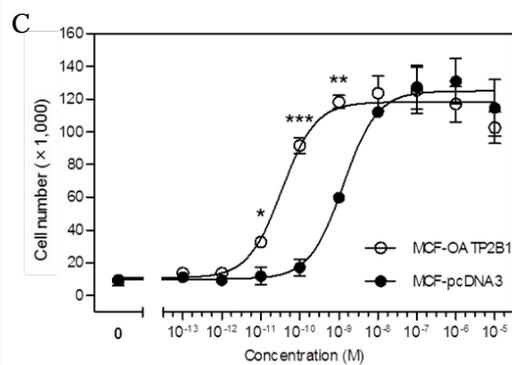
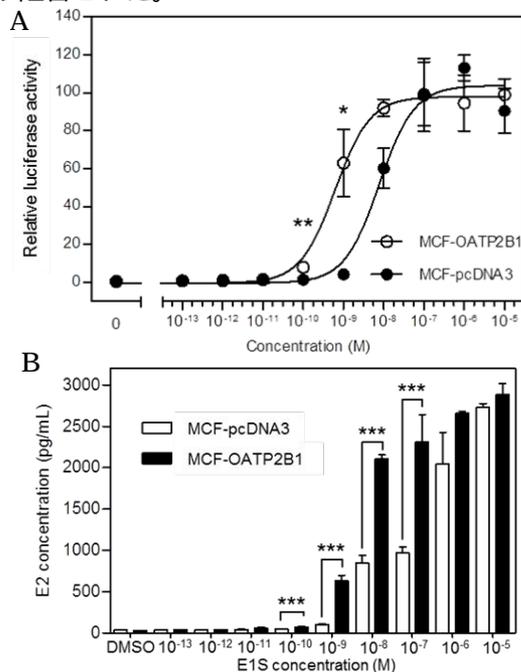


図 4 MCF-7 細胞における OATP2B1 の過剰発現が ER の刺激 (A)、E2 分泌能 (B) および細胞増殖 (C) に及ぼす影響 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

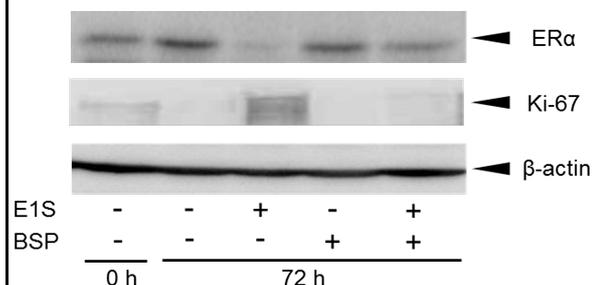


図 5 MCF-7 細胞における E1S の取り込みが ER および Ki-67 発現量の変化に及ぼす影響

本研究より、ER 陽性乳がん細胞における E1S 取り込みトランスポーター、特に OATP2B1 発現量の変化は、細胞内 E1S 取り込み量を変化させることで、がん細胞の増殖に及ぼす影響が明らかとなった。また、OATP2B1 が ER 陽性乳がん細胞、特にルミナル B タイプにおける新規創薬ターゲットおよびバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された (図 6)。

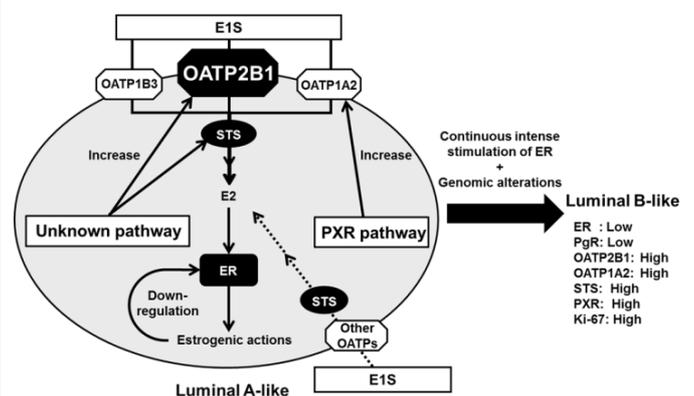


図 6 本研究および過去の報告より考えられる ER 陽性乳がん細胞における OATP の発現と E1S の取り込みに関する概略図

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 1 件)

Jun Matsumoto, Noritaka Ariyoshi, Masahiro Sakakibara, Takeo Nakanishi, Yoshiyuki Okubo, Itsuko Ishii, *et al.*, Organic anion transporting polypeptide 2B1 expression correlates with uptake of estrone-3-sulfate and cell proliferation in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Drug Metab Pharmacokinet* **30** (2): 133-41 (2015) 査読有

[学会発表](計 3 件)

Jun Matsumoto, Noritaka Ariyoshi, Masahiro Sakakibara, Takeo Nakanishi, Yoshiyuki Okubo, Itsuko Ishii, *et al.*, Uptake of an Estrogen Precursor in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells: Focusing on Organic Anion Transporting Polypeptide 2B1. World congress on Pharmacology, Brisbane, Australia, July 21 (2015)

松本准、有吉範高、榊原雅裕、中西猛夫、石井伊都子、山田治美ら、新規創薬ターゲットおよびバイオマーカーの確立を目指した乳がんにおける estrogen 前駆体取り込み機構の解明、第 4 回国際医療福祉大学学会学術大会、栃木、8 月 31 日 (2014 年)

Jun Matsumoto, Noritaka Ariyoshi, Masahiro Sakakibara, Takeo Nakanishi, Ikumi Tamai, Itsuko Ishii, *et al.*, Impact of OATP2B1 expression on cell proliferation in ER-positive breast cancer. 10th International ISSX Meeting, Toronto, Canada, October 2 (2013)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 准 (Jun MATSUMOTO)
国際医療福祉大学・薬学部・助手
研究者番号：60709012

(2) 連携研究者

石井 伊都子 (Itsuko ISHII)
千葉大学医学部附属病院・薬剤部・教授
研究者番号：00202929

有吉 範高 (Noritaka ARIYOSHI)
千葉大学医学部附属病院・薬剤部・准教授
研究者番号：00243957

(3) 研究協力者

玉井 郁巳 (Ikumi TAMAI)
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号：20155237

中西 猛夫 (Takeo NAKANISHI)
金沢大学・薬学系・准教授
研究者番号：30541742

長嶋 健 (Takeshi NAGASHIMA)
千葉大学医学部附属病院・臓器制御外科学・
准教授
研究者番号：60292710

榊原 雅裕 (Masahiro SAKAKIBARA)
千葉大学医学部附属病院・臓器制御外科学・
助教
研究者番号：70375632