

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08637

研究課題名(和文) 特異的なナノビーズを用いる乳癌個別化エストロゲンシグナルバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Investigation of biomarkers for membrane-associated estrogen receptor signaling pathway in breast cancer cells using selective nano-ligand

研究代表者

丹羽 俊文 (NIWA, Toshifumi)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90218248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン依存性乳癌において、その存在が示唆されながらも依然詳細が不明である膜型エストロゲン受容体(ER)の機能・動態について、新規選択的リガンドを用いて解析した。その結果、膜型ERが細胞内リン酸化経路であるMAPK系、PI3K-akt-mTOR系の双方を活性化していることが判明した。また核内ERが膜に移動、局在したものであり、核内ERを維持しているホルモン療法耐性株にも発現していることが解った。さらにマイクロアレイを用いた網羅的解析により膜型ERと核内ERでは応答遺伝子が大きく異なることが明らかとなり、膜型ER信号系に特異的なバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The function of membrane-associated estrogen receptor (mER) in breast cancer cells and relation to hormone therapy resistance were investigated using a novel selective ligand, Qdot-6-E2. It was demonstrated that Qdot-6-E2 stimulated both MAPK and PI3K-akt-mTOR phosphorylation pathways resulting cell growth. Among the estrogen depletion resistant cells with different mechanisms, only the cells maintaining nuclear ER function were sensitive to Qdot-6-E2. This suggests that mER is probably a localized form of nuclear ER. The target genes of mER were markedly different from those of nuclear ER and we found some candidates for the specific biomarker of mER signaling pathways.

研究分野：臨床化学

キーワード：乳癌 細胞・組織 シグナル伝達 エストロゲン 特異的リガンド ホルモン療法耐性
バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

乳癌の多くはエストロゲン依存性であり、現在のホルモン療法においてはエストロゲン拮抗薬とアロマターゼ阻害薬が治療の第一選択となっているが、しばしば不応例や耐性獲得がみられ問題となっている。ホルモン療法の要となるのはエストロゲン受容体(ER)であり、エストロゲンシグナルの伝達(応答遺伝子の発現)は、エストロゲンがERに結合し遺伝子発現が活性化する経路と、エストロゲンに依存せずERが直接リン酸化を受け活性化するルートが知られている。当該の癌がどの信号経路に依存するかを知ることは治療法を選択・決定する上で重要な情報となる。

従来、ERは細胞核内にあり、細胞膜表面から核内まで浸透したエストロゲンが結合することにより遺伝子が活性化されると考えられてきたが、近年、同様のはたらきをする受容体(膜型ER)が細胞膜近傍にも存在する可能性が示唆されている。しかし、この膜型ERが核内ERと同じものであるのか、新規の蛋白質であるのか、さらにはどのような遺伝子が応答するのか等、その実態はほとんど知られていない。この理由として、両者の信号経路を明確に区別し得る信頼性の高い方法が確立されていないことがあげられる。

先に我々は不溶性担体にエストロゲンを結合させた膜型ERに選択的なりガンド Qdot-6-E2 を新たに合成した(図1)。

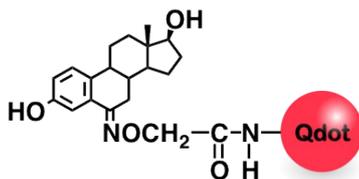


図1 Qdot-6-E2の構造;直径10nmの蛍光粒子に80-100分子のestradiol(E2)が結合している

蛍光マーカーとしてGFPを組込んだ培養乳癌細胞を用いた実験から、このQdot-6-E2が細胞内に侵入することなく細胞内エストロゲンシグナル経路を活性

化し、核内ERにも信号が伝達されることを証明した。この新規リガンドを活用することで、膜型ERシグナル経路に関わる関連分子やホルモン療法耐性との関連の解析、さらには膜型ERシグナル経路活性化に特有なバイオマーカーの探索が進展すると期待された。

2. 研究の目的

核内ERを持たず、膜型ERのみを発現させたモデル細胞を作製し、膜型ER固有の応答分子の探索、シグナル経路の解析を行う。

本来のリガンドであるestradiol(E2)とQdot-6-E2による応答出力を比較することで、信号伝達経路に関与する因子や遺伝子応答の違いを明らかにする。

当研究室で樹立された複数のメカニズムによるホルモン療法耐性モデル細胞株を材料として、耐性獲得時における膜型ERの関与について検討する。

膜型ERがホルモン療法耐性時に二次治療を選択する際の情報を提供し、個別化治療のためのマーカーとなる可能性を持つ因子を探索する。

3. 研究の方法

(1)膜型ER発現細胞株の樹立

ER遺伝子上から核移行時に必要なドメイン(NLS)を除去し、さらに脂肪酸が付加しやすい配列を挿入したコンストラクトを調製した。このコンストラクトを本来核内ER陽性(ルミナル型)で核内ERを消失したfulvestrant耐性株(MFR)に導入し、mER発現安定細胞株を樹立した。

(2)乳癌細胞株における膜型ERシグナル系の関与

核内ER活性化を生細胞でモニタできるようERE-GFPが安定導入されたMCF-7-E10細胞およびE10を親株として樹立された各種ホルモン療法耐性モデル(枯渇耐性)細胞株(核内ER発現維持株、消失株、各2種)を用い、エストロゲン枯渇培地で4日間培養後にリガンドを添加し、さらに2日後、GFP陽性細胞をカウントして核内ER活性を評価した。同様に設定した培養条件下で細胞数をカウントして増殖の評価を行った。

(3)細胞内シグナル経路の検索

同様の培養条件にてリガンドを添加し一定時間経過後に細胞を溶解、タンパク質を

抽出。濃度調整後ウエスタンブロットに付し、各タンパクを検出した。また、細胞内リン酸化経路の各種阻害剤を加え、Qdot-6-E2 による増殖に対する抑制効果を評価した。

(4)膜型 ER シグナル系バイオマーカーの探索

同様の培養条件にてリガンドを添加して18時間経過後にRNAを抽出し、マイクロアレイ解析に付した。

4. 研究成果

(1) 膜型 ER 発現細胞株の樹立

当初、調製したER膜移行型コンストラクトを核内ER陰性の細胞に感染させ、膜型ERのみを発現した安定細胞株の樹立を試みたが、空ベクターでは問題がないものの、発現ベクターでは困難であった。そこで、宿主細胞側に問題がある可能性を考慮し、本来核内ER陽性であるMCF-7細胞でfulvestrant長期処理によってERを消失した耐性株(MFR細胞)を宿主として利用したところ、安定導入株を得ることができた。細胞分画によりERの局在を確認したところ、核にも存在が認められるものの、細胞質、細胞膜に多く分布が認められた。しかし、Qdot-6-E2、E2いずれによっても増殖は亢進せず、抗エストロゲン剤の効果も認められなかった。このことからMFR細胞ではERのみならず、活性発現に必要な共役因子も消失してしまっていることが示唆された。そこで内因性ER陽性株を用いて以下の研究を続行した。

一方、上記とは逆に脂質付加阻害剤である2-bromopalmitate (2-BP)を培地に添加したところ、増殖抑制効果がみられた。この2-BPに対してはER陰性株よりもER陽性、すなわちQdot-6-E2に应答する株において感受性がより高く、ERの膜移行に脂質付加が重要であることが示唆された(図2)。また、ER発現を維持している各種エストロゲン枯渇耐性株間での差は認められなかった。

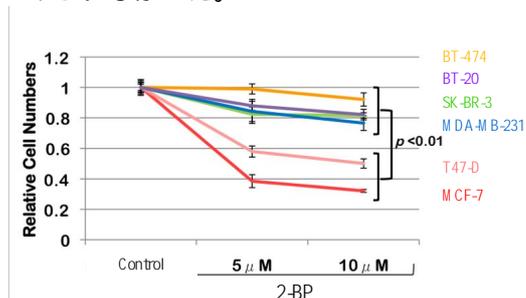


図2 各種細胞株に対する2-BPの増殖阻害効果；細胞株名を上から順に右に示す

(2)細胞内シグナル経路の探索

膜型ERはリン酸化経路を介して核内ERその他を刺激していると考えられた。代表

的なリン酸化経路であるPI3K-akt-mTOR系、MAPK系の因子活性化について、Western blot法により解析した。その結果、いずれの経路についても亢進が認められ、各主要因子に対する阻害剤で細胞増殖の抑制がみられた(図3)。さらに膜型ERシグナル経路に関与しているとされるsrcに対する阻害剤によっても増殖抑制がみられた。これらの結果より、膜型ERに対する刺激はPI3K-akt-mTOR系、MAPK系の両経路を経由して増殖に寄与していることが示された。このことから膜型ERがホルモン療法耐性に関与している場合、PI3K-akt-mTOR系に対する分子標的薬のみでは十分な効果が得られない可能性が示唆された。

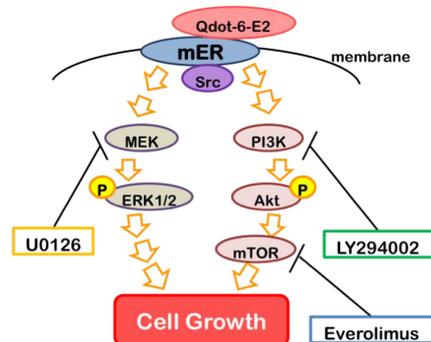
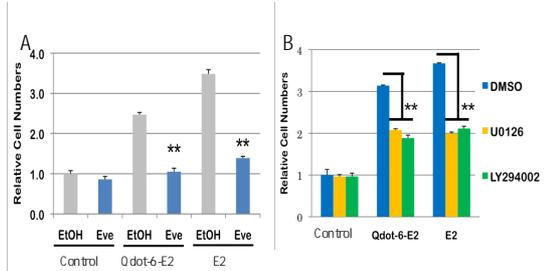


図3 リン酸化経路阻害剤の効果；(A) mTOR 阻害剤, (B) PI3K 阻害剤とMEK阻害剤, ** $p < 0.01$

(3) 各種ホルモン療法耐性モデル株における膜型ERシグナル系の関与

これまで我々が確立した各種耐性株について、膜型ERの関与を検討したところ、核内ERの機能を維持している細胞株はいずれもQdot-6-E2に应答した。これに対して核内ER蛋白あるいはその機能を消失した細胞では应答が見られなかった(図4)。

また、トリプルネガティブ型、HER2型、ルミノール型(各種耐性株を含む)について、これまで膜型ERの候補として議論されているERα66(野生型)、ERα36(スプライシングバリエーション)、GPR30の発現を観察したところ、ERα66の発現のみがQdot-6-E2に対する应答と一致しており、他の分子は不应答株でも発現が認められた(図5)。この結果は膜型ERとして应答しているのはERα66であることを支持している。

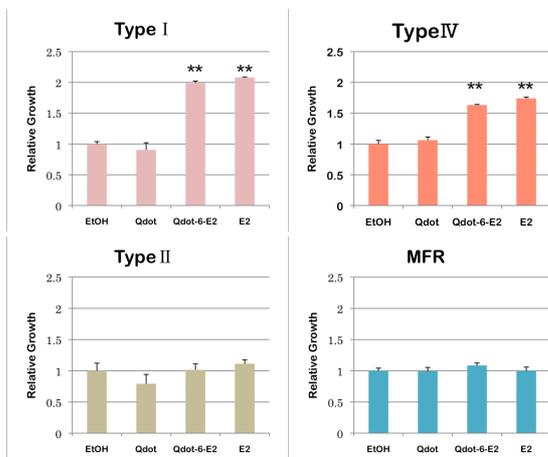


図4 ホルモン療法耐性モデル細胞における膜型 ER の関与；Type I, Type IV は核内 ER 機能維持，Type II, MFR は核内 ER 機能低下または消失，** p<0.01

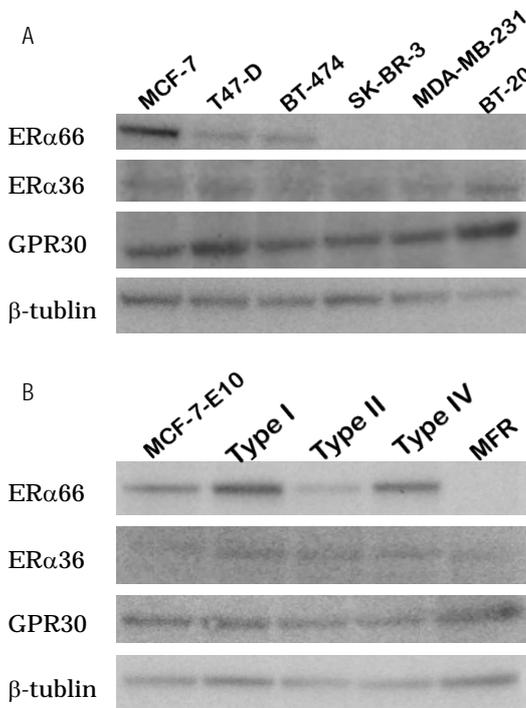


図5 各種細胞における膜型 ER 候補分子の発現；(A) 通常細胞株，(B) MCF-7-E10(親株)とホルモン療法耐性モデル株

(4) 膜型 ER シグナル系バイオマーカーの探索

マイクロアレイを用いてエストロゲン応答遺伝子発現の網羅的解析を行った。Qdot-6-E2(膜型 ER のみを刺激) E2(細胞内に侵入し膜型 ER, 核内 ER 双方を刺激し得るが、量的には核内 ER がメインとなる)によって発現が 10 倍以上上昇した遺伝子を比較したところ、両者で応答遺伝子は大きく異なることが明らかとなった。共

通に上昇がみられた遺伝子は各々で上昇がみられた遺伝子のうち 20-25%に過ぎなかった(図 6)。Qdot-6-E2 によってのみ上昇がみられた遺伝子のいくつかについてバイオマーカーとしての可能性が期待できるものを選び、引き続き検討を進めている。

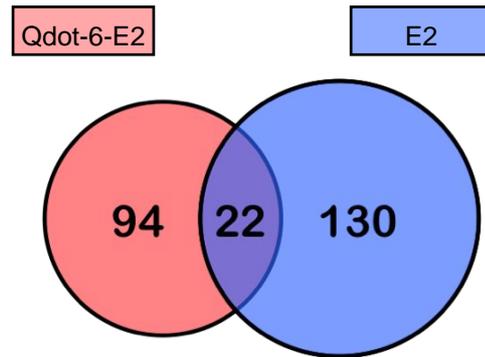


図6 Qdot-6-E2, E2 による応答遺伝子の発現；マイクロアレイ解析の結果，それぞれのリガンドにより 10 倍以上の発現上昇がみられた遺伝子数を示す

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)

Kouki Tsuboi, Takamasa Nagatomo, Tatsuyuki Gohn, Toru Higuchi, Shunta Sasaki, Natsu Fujiki, Masafumi Kurosumi, Hiroyuki Takei, Yuri Yamaguchi, Toshifumi Niwa, Shin-ichi Hayashi, Single CpG site methylation controls estrogen receptor gene transcription and correlates with hormone therapy resistance. , *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **171**, 209-217 (2017) 査読有 DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.04.001

〔学会発表〕(計 6 件)

坪井洸樹, 佐々木駿太, 長友隆将, 郷野辰幸, 樋口 徹, 藤井里圭, 花村 徹, 山口ゆり, 丹羽俊文, 林 慎一, ホルモン療法耐性乳癌における ER 発現変動とエピゲノム制御解析, 第 25 回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 2017 年

小松隆幸, 中村美紗都, 徳田恵美, 丹羽俊文, 林 慎一, ER 陽性乳癌細胞における PI3K 経路の重要性と阻害による効果検討, 第 25 回日本乳癌学会学術総会, 2017 年

佐々木駿太, 坪井洸樹, 徳田恵美, 丹羽俊文, 林 慎一, ホルモン療法耐性乳癌細胞モデルにおけるエピゲノム制御による ER 陰転化機構, 第 18 回ホルモンと癌研究会, 2017 年

鈴木奏絵，高信純子，丹羽俊文，林慎一，
Investigation of membrane-associated
estrogen receptor molecule utilizing specific
ligand in breast cancer cell.，第39回日本分
子生物学会年会，2016年

鈴木奏絵，高信純子，丹羽俊文，林慎一，
Function of membrane-associated estrogen
receptor and effect on molecular targeted
drugs of breast cancer.，第38回日本分子生物
学会年会/第88回日本生化学会大会合同大会，
2015年

鈴木奏絵，高信純子，丹羽俊文，林慎一，
The function and potential to impact of
membrane-type estrogen receptor on
molecular targeted therapy of breast
cancer.，第74回日本癌学会学術総会，2015
年

〔図書〕(計0件)

〔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0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.mfd.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 俊文 (NIWA, Toshifumi)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90218248

(2) 研究分担者

林 慎一 (HAYASHI, Shin-ichi)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60144862

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()