

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：33801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08522

研究課題名(和文) ゲノム編集によるエストロゲン膜受容体欠失ラット作製と細胞増殖抑制機構の解明

研究課題名(英文) Generation of estrogen membrane receptor-deficient rat by genome editing and elucidation for the mechanism of anti-mitogenic action

研究代表者

三井 哲雄 (Mitsui, Tetsuo)

常葉大学・社会環境学部・准教授

研究者番号：20402084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：最近E2の膜受容体を介した早いシグナル伝達がE2の作用発現の一端を担っていることが示唆されている。そこで、E2の増殖抑制が核内受容体を介するものなのか、あるいは膜受容体を介する作用なのかを調べた。E2の膜受容体の一つであるGpr30の特異的アゴニストG1はIGF-1によるPRL細胞の増殖促進作用をE2と同様に用量依存性に抑制したが、E2依存性遺伝子発現には影響しなかった。このことから、E2によるPRL細胞の増殖抑制は核内受容体を介したgenomicな機構によるものであること、またG1による増殖抑制はE2による増殖抑制作用とは異なるメカニズムによるものであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、多くのエストロゲン感受性細胞において、従来増殖促進作用によってのみ説明されていた増殖調節機構の理解に新しい展開をもたらす可能性がある。エストロゲン感受性腫瘍の従来の治療戦略はエストロゲンの増殖促進作用を阻害することに限定されていたが、エストロゲンの膜受容体Gpr30を介した増殖調節機構の解明は、エストロゲンの増殖抑制作用を増強することを目指す、まったく新しい治療戦略を提唱することができる。この点において、エストロゲン感受性腫瘍に関する臨床的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Estrogen binds to nuclear estrogen receptors (ERs) to modulate transcription of target genes in estrogen-responsive cells. However, recent studies have shown that estrogen also binds to cytoplasmic membrane ERs to modulate protein kinase signaling cascades, leading to non-genomic actions. We investigated whether either nuclear or membrane ERs, including G protein-coupled receptor 30 (Gpr30), mediate the inhibitory action of estrogen on insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced proliferation of pituitary lactotrophs in primary culture. Activation of Gpr30 by its agonist G-1 inhibited IGF-1-induced proliferation in a dose-dependent manner, but it had little effect on modulation of mRNA expression of estrogen-responsive genes. Here, we demonstrate that E2 inhibition of lactotroph proliferation is due to nuclear ER-mediated genomic action. Our results suggest that activation of Gpr30 mimics, but does not mediate, the anti-proliferative action of E2 on lactotrophs.

研究分野：神経内分泌

キーワード：Estrogen Gpr30 Lactotroph Proliferation

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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典型的なエストロジェン感受性組織の細胞増殖を促進することによって生殖機能、及びこれらの組織の正常な発達を調節している。一方、エストロジェンはこれらの組織における腫瘍の発症および進展を促進することによって、乳癌や子宮内膜癌のようなエストロジェン依存性腫瘍の発症病理にも深く関与している。このため、エストロジェンの細胞増殖促進作用に関する多くの研究が従来行われ、現在、エストロジェン依存性腫瘍の治療にエストロジェン受容体阻害剤やアロマターゼ阻害剤が広く使われている。しかし、これらの治療においても薬剤耐性による腫瘍再発の問題点が依然として解決されていない。

最近、増殖促進作用とは逆の、増殖抑制作用をエストロジェンが有することが報告されている。例えば、正常血管平滑筋細胞の細胞増殖はエストロジェンによって抑制され、また本来エストロジェン受容体を持たない細胞株にエストロジェン受容体を強制発現させると、この細胞株の増殖がエストロジェンによって抑制される。このことは、エストロジェンは増殖促進作用と増殖抑制作用の両者を介して正常細胞の増殖調節を行っていることを示唆している。

さらに最近、膜受容体である Gpr30 が、エストロジェンによる細胞増殖調節に関与している事を示唆する研究結果が報告されている。エストロジェンの作用は、古典的には核内受容体(ER)を介して細胞増殖調節因子に働くと考えられて来たが、Gpr30 がエストロジェンの膜受容体である事が同定され、この系を介してもエストロジェンの作用が現れることが明らかとなっているが、エストロジェンの細胞増殖抑制作用への Gpr30 の関与は明らかでない。

2. 研究の目的

我々は従来から代表的なエストロジェン感受性細胞であるラット下垂体前葉のプロラクチン産生細胞(PRL細胞)においてみられる、エストロジェンの細胞増殖抑制作用に着目している。DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析によってエストロジェンの増殖抑制作用に関与すると思われるエストロジェン応答性遺伝子群を先行研究により同定した。これら遺伝子の中には発現変化が非常に短時間に現れるものが認められた。このことから、PRL細胞のエストロジェンによる増殖抑制作用の発現に、エストロジェン核内受容体ではなく、エストロジェンの膜受容体 Gpr30 を介した経路が関与している可能性が考えられる。

本研究は、エストロジェンの膜受容体 Gpr30 を介した経路がエストロジェンによる増殖抑制作用の発現に重要なのかを解明する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ラット下垂体前葉初代培養細胞の調整は、雌ラットの下垂体前葉組織をトリプシン処理により単一細胞にまで分散し、血清に含まれるエストロジェンや成長因子の影響を除外するために、無血清条件下で培養した。

(2) 試薬の投与は、ラット下垂体前葉の無血清初代培養細胞の調整 2 日後に、対照群として IGF-1 (30 ng/ml) を単独投与し、実験群には IGF-1 及び estradiol (E2) (1 nM)、BSA-conjugated E2 (BSA-E2) (1 nM, 100 nM)、diethylstilbestrol (DES) (1 nM)、G-1 (Gpr30 の特異的アゴニスト) (10 nM, 100 nM, 1 μM)、G-15 (Gpr30 の特異的アンタゴニスト) (10 nM, 100 nM) をそれぞれ同時投与した。

(3) 細胞の増殖率測定は、培養 3 日目に行った。培養終了 3 時間前に bromodeoxyuridine (BrdU) を投与することにより増殖細胞を標識した後、細胞を冷メタノール固定し、プロラクチン(PRL)と BrdU の二重免疫染色を行い、PRL 陽性細胞中の BrdU 陽性細胞を同定し、その割合から PRL 細胞の増殖率を求めた。

(4) 遺伝子発現変化は、投与 3, 4, 12 時間後に培養細胞から total RNA を抽出し、SYBR™ Green を用いた real time RT-PCR 法により、先行研究で E2 投与によって発現変化した複数の遺伝子を調べた。内部標準として acidic ribosomal phosphoprotein P0 (Arbp) を用いて、2^{-ΔΔCt} 法により測定した。

(5) ERE プロモーター活性の測定は、ラット下垂体前葉の無血清初代培養細胞に、Ad-ERE.TK/Luc と Ad-TK/rLuc アデノウイルスベクターをそれぞれ 2 MOI づつ共感染させて、Dual-Luciferase Reporter Assay 法により測定した。

(6) Akt, Erk1/2 の活性化は、ラット下垂体前葉の無血清初代培養細胞に、Vehicle (対照) 投与、IGF-1 (30 ng/ml) 単独投与、IGF-1 及び G-1 (1 μM) の同時投与、G-1 (1 μM) の単独投与の 4 群を設けた。投与 5 分後、1, 4 時間後に培養細胞からタンパク質を抽出し、western blotting 法により Akt, Erk1/2 の活性化をそれぞれのリン酸化タンパク特異的抗体を用いて調べた。

4. 研究成果

(1) E2 の膜受容体にのみ作用する BSA-conjugated E2 (BSA-E2) の IGF-1 による下垂体プロラクチン(PRL)産生細胞増殖促進作用に対する影響

ラット下垂体前葉の無血清初代培養細胞に、対照群として Vehicle を投与し、実験群には IGF-1 (30 ng/ml) 単独投与、IGF-1 及び E2 (1 nM)、BSA-E2 (1 nM, 100 nM) をそれぞれ同時投与し、投与 21 時間後に、BrdU を投与することにより増殖細胞を標識した後、その 3 時間後に細胞を冷メタノール固定した。PRL と BrdU の二重免疫染色を行い、PRL 陽性細胞中の BrdU

陽性細胞を同定し、その割合から PRL 細胞の増殖率を求めた。

その結果、PRL 細胞の増殖率は、IGF-1 投与により約 12 倍に増加したが E2 1 nM の同時投与により、増殖率は約 4.5 倍となり、著明に IGF-1 による細胞増殖促進作用を抑制した。また、BSA-E2 1nM では IGF-1 による増殖促進作用に影響はなかったが、BSA-E2 100 nM の同時投与では、増殖率は約 5.5 倍となり、著明に IGF-1 による細胞増殖促進作用を抑制し、E2 1nM と同程度の増殖抑制作用が認められた (Fig. 1)。

(2) E2, BSA-E2 の ERE プロモーター活性に対する影響

E2 1nM によりラット下垂体前葉の無血清初代培養細胞の ERE プロモーター活性は、約 2.2 倍に上昇した。BSA-E2 1nM では ERE プロモーター活性の上昇は認められなかったが、濃度依存的に ERE プロモーター活性は上昇し、BSA-E2 100 nM では E2 1nM と同程度の ERE プロモーター活性の上昇が認められた (Fig. 2)。

Fig. 1

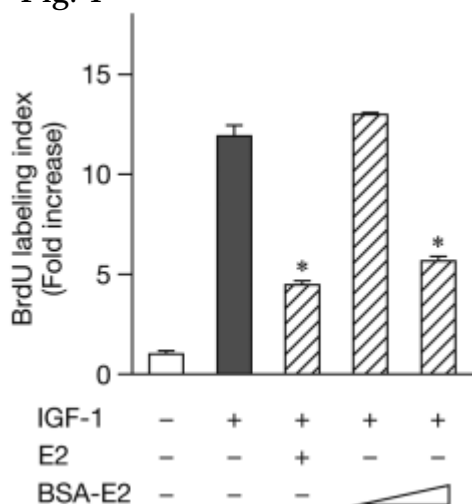
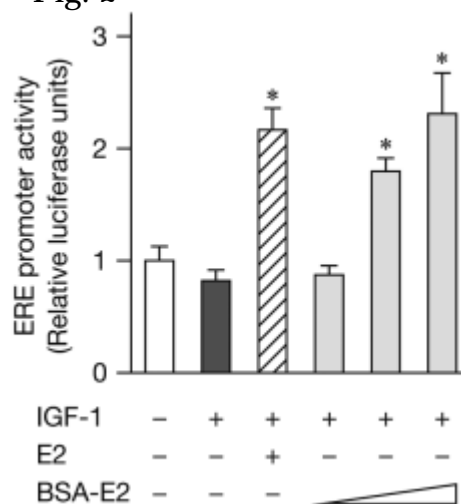


Fig. 2



(3) BSA-E2 のエストロゲン反応性遺伝子変化の解析

ラット下垂体前葉の無血清初代培養細胞に、対照群として IGF-1 (30 ng/ml)のみを、実験群には IGF-1 と E2 (1 nM), BSA-E2 (1 nM, 100 nM)をそれぞれ同時投与した。投与 4 時間後に培養細胞から total RNA を抽出し、real time RT-PCR 法により、先行研究で E2 投与により発現変化した遺伝子 (E2 により発現が増加した遺伝子 8 種類、発現が減少した遺伝子 8 種類) を調べた。内部標準として acid ribosomal phosphoprotein P0 (ARBP)を用いて $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法により測定した。

その結果、E2 1nM により発現が増加した遺伝子 8 種類のうち 7 種類では、BSA-E2 1nM では発現変化が認められなかった。唯一、Wnt4 のみ BSA-E2 1nM で約 2 倍に発現量が増加した。BSA-E2 100 nM では、すべての遺伝子で E2 1nM と同程度に発現量が増加した。

また、E2 1nM により発現が減少した遺伝子 8 種類すべてで、BSA-E2 1nM では発現変化が認められなかったが、BSA-E2 100 nM では、すべての遺伝子で E2 1nM と同程度に発現量が減少した。

(4) 核内受容体に作用する diethylstilbestrol (DES) の IGF-1 による PRL 細胞増殖促進作用に対する影響

ラット下垂体前葉の無血清初代培養細胞に、対照群として Vehicle を投与し、実験群には IGF-1 (30 ng/ml) 単独投与、IGF-1 及び E2 1 nM, DES 1 nM をそれぞれ同時投与し、BSA-E2 の IGF-1 による PRL 細胞増殖促進作用に対する影響を調べた時と同様に PRL 細胞の増殖率を調べた。

その結果、PRL 細胞の増殖率は、IGF-1 投与により約 12 倍に増加したが、DES 1nM により、E2 1nM と同様に著明に IGF-1 による PRL 細胞の増殖促進作用の抑制が認められた。

(5) DES のエストロゲン反応性遺伝子変化の解析

ラット下垂体前葉の無血清初代培養細胞に、対照群として vehicle を投与し、実験群には E2 (1 nM)あるいは DES (1nM)を投与した。投与 3, 12 時間後に培養細胞から total RNA を抽出し、real time RT-PCR 法により、先行研究により E2 投与で発現変化した遺伝子 (c-myc, Rasd1, Wnt4, Giot1, Batf3, Ccna2, Palmd) を調べた。

その結果、投与 3 時間後に E2 (1 nM)により発現が誘導された c-myc, Rasd1, Wnt4 はいずれも DES (1 nM)により同程度に発現誘導された。また発現が抑制された Giot1 も DES (1 nM)により同程度に発現が抑制された。投与 12 時間後に E2 (1 nM)により発現が誘導された Batf3, Rasd1 はいずれも DES (1 nM)により同程度に発現誘導された。また発現が抑制された Ccna2,

Palmd はいずれも DES (1 nM)により同程度に発現が抑制された。

(6) G-1 (Gpr30 の特異的アゴニスト)の IGF-1 による PRL 細胞増殖促進作用に対する影響

ラット下垂体前葉の無血清初代培養細胞に、対照群として Vehicle を投与し、実験群には IGF-1 (30 ng/ml)単独投与、IGF-1 及び E2 (1 nM), G-1 (10 nM, 100 nM, 1 μ M)をそれぞれ同時投与し、BSA-E2 の IGF-1 による PRL 細胞増殖促進作用に対する影響を調べた時と同様に PRL 細胞の増殖率を調べた。

その結果、G-1 用量依存的に IGF-1 による細胞増殖促進作用を抑制した (Fig. 3)。

(7) G-1 のリン酸化タンパク質、Akt, Erk1/2 活性化に対する影響

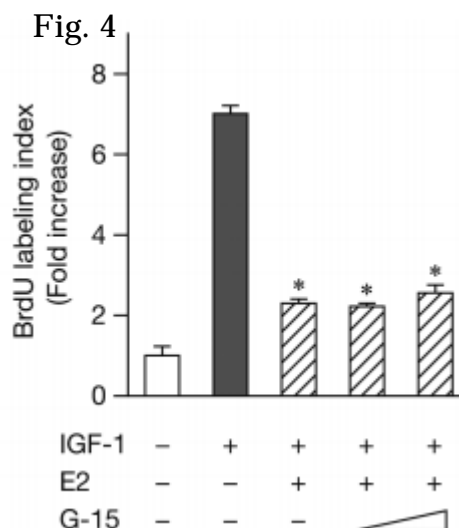
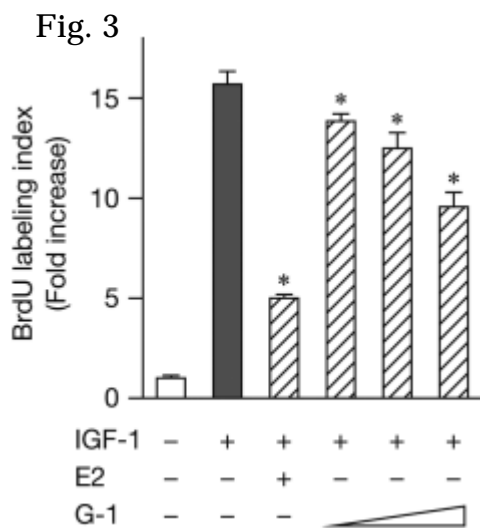
ラット下垂体前葉の無血清初代培養細胞に、対照群として vehicle を投与し、実験群には IGF-1 (30 ng/ml)単独投与、IGF-1 及び G-1 (1 μ M)の同時投与、G-1 (1 μ M)の単独投与の 4 群を設け、投与 5 分後、1, 4 時間後に培養細胞からタンパク質を抽出し、western blotting 法により Akt, Erk1/2 の活性化をそれぞれのリン酸化タンパク特異的抗体を用いて調べた。

その結果、Erk1/2 は、IGF-1 投与 5 分後には活性化し、1 時間後には平常レベルに戻っていた。Akt も IGF-1 投与 5 分後には活性化していたが、4 時間後でもやや度合いは下がるが活性化が持続していた。一方で、Erk1/2, Akt の IGF-1 による活性化に対して、G-1 の同時投与、あるいは G-1 の単独投与による影響は認められなかった。

(8) G-15 (Gpr30 の特異的アンタゴニスト)による下垂体プロラクチン(PRL)産生細胞増殖促進作用に対する影響

ラット下垂体前葉の無血清初代培養細胞に、対照群として Vehicle を投与し、実験群には IGF-1 (30 ng/ml)単独投与、IGF-1 及び E2 (1 nM)を同時投与、さらに G-15 (10 nM, 100 nM)をそれぞれ同時投与し、BSA-E2 の IGF-1 による PRL 細胞増殖促進作用に対する影響を調べた時と同様に PRL 細胞の増殖率を調べた。

その結果、IGF-1 と E2 (1 nM)の同時投与による IGF-1 の細胞増殖促進作用の抑制作用は Gpr30 の特異的アンタゴニストである G-15 により減弱されなかった (Fig. 4)。



以上より、E2 の IGF-1 による PRL 細胞増殖促進作用に対する抑制作用は、エストロジェンの膜受容体 Gpr30 を介した経路よりも核内受容体を介した genomic な機構によるものが優位であることが示唆された。

また Gpr30 の特異的アゴニストである G-1 は、用量依存的に IGF-1 による PRL 細胞増殖促進作用を E2 と同様に減弱したが、Gpr30 の特異的アンタゴニストである G-15 は E2 の IGF-1 による PRL 細胞増殖促進作用に対する抑制作用を減弱しないことから、G1 による PRL 細胞の増殖抑制は E2 による増殖抑制作用とは異なるメカニズムによるものであることが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Linghong Wang, Tetsuo Mitsui, Maho Ishida, Michi Izawa, Jun Arita	4. 巻 64
2. 論文標題 Rasd1 is an estrogen-responsive immediate early gene and modulates expression of late genes in rat anterior pituitary cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1063-1071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ17-0148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tetsuo MITSUI, Maho ISHIDA, Michi IZAWA, Jun ARITA	4. 巻 64
2. 論文標題 Activation of G protein-coupled estrogen receptor 1 mimics, but does not mediate, the anti-proliferative action of estradiol on pituitary lactotrophs in primary culture	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 103-115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ16-0079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三井哲雄、石田真帆、有田順
2. 発表標題 Rasd1はエストロゲン応答性初期遺伝子でありラット下垂体前葉細胞において後期遺伝子発現を調節する
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三井哲雄、石田真帆、有田順、宇賀貴紀
2. 発表標題 エストロジェンの増殖抑制作用に関与する遺伝子発現解析
3. 学会等名 第64回中部日本生理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石田真帆、三井哲雄、有田順、宇賀貴紀
2. 発表標題 エストロゲンによるMDA-ER細胞の増殖抑制作用に対するBCAR3およびFOSL1遺伝子の関与の検討
3. 学会等名 第64回中部日本生理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三井 哲雄、石田 真帆、有田 順、宇賀 貴紀
2. 発表標題 Gpr30の活性化は、非ゲノムの作用により下垂体前葉のプロラクチン産生初代培養細胞に対するエストラジオールの増殖抑制作用を模倣する
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三井 哲雄、石田 真帆、有田 順
2. 発表標題 エストロジェンの膜受容体Gpr30を介した細胞増殖調節機構
3. 学会等名 第63回中部日本生理学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 三井 哲雄、石田 真帆、有田 順
2. 発表標題 エストロジェンの増殖抑制作用にGPCRスーパーファミリーのメンバーであるGPR30は関与するのか
3. 学会等名 第13回GPCR研究会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----