

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18951

研究課題名(和文) ホルモン感受性乳がんにおけるエストロゲン供給経路の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanism of estrogen supply pathway in hormone-sensitive breast cancer

研究代表者

保嶋 智也 (Yasujima, Tomoya)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：50753555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：硫酸抱合エストロゲンは、細胞膜に発現する種々の有機アニオントランスポーターによって細胞内に輸送される。硫酸抱合エストロゲン自体はエストロゲンレセプターに結合できないため、細胞内でsteroid sulfatase (STS)により硫酸抱合が外される。しかし、STSは小胞体膜の内側に活性部位を有しているため、その生理活性の発現には硫酸抱合体を小胞体内に運ぶ必要がある。今回、その役割を担っているsteroid sulfate transporter 1 (SST1)の同定に成功した。SST1は甲状腺ホルモン等により阻害されることから、これらにより機能が制御される可能性があることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Sulfate-conjugated estrogens were transported into cells by various organic anion transporters localized on the cell membrane. Since sulfate-conjugated estrogen itself cannot bind to estrogen receptor, sulfate conjugation is removed by steroid sulfatase (STS) in the cell. However, since STS has an active site inside the endoplasmic reticulum membrane, it is necessary to transport sulfate conjugate into the endoplasmic reticulum to exert its physiological activity. We succeeded in identifying the steroid sulfate transporter 1 (SST1) which plays a role in regulating estrogen concentration. It was found that thyroid hormones inhibited the function of SST1, they possibly control the function of SST1.

研究分野：薬物動態制御学

キーワード：トランスポーター エストロゲン 乳がん 小胞体

1. 研究開始当初の背景

【エストロゲン感受性乳がんに対する治療の現状】

乳がんは乳腺の上皮組織から発生する悪性腫瘍であり、世界的に見て女性のがん死亡率の上位に位置している(日本においては一位)。その数は現在も増え続けていることから、乳がん治療は現代の医療において最も重要な課題のひとつである。乳がんはエストロゲン感受性と非感受性との二つのタイプに大別され、全体の約 60-70%は前者のタイプで占められている。エストロゲン感受性乳がん細胞の増殖には、エストロゲンを始めとするエストロゲンがその受容体と結合することが必須であるため、エストロゲン感受性診断に基づき、エストロゲン介在性の増殖経路を遮断することが、有効な治療戦略とされている。それゆえ、このような乳がん患者には、長年エストロゲン受容体のアンタゴニストであるタモキシフェンが標準治療薬として用いられてきた。その後、エストロゲンの産生酵素であるアロマターゼを阻害するアナストロゾールやエキセメスタンが登場し、タモキシフェンと同等以上の効果を挙げている。ただ、それぞれの治療薬の効果には個人差があることや、異なる作用点を標的とすることで、より高い治療効果が得られる可能性があり、治療薬の選択肢は出来るだけ多く存在することが望まれる。したがって、エストロゲンレベルを負に制御する新たな抗乳がん剤の開発は、乳がん治療のさらなる発展に大きく貢献すると考えられる。

【乳がん細胞へのエストロゲン供給機構】

乳がん細胞へのエストロゲンの供給は、主に血液中に存在するエストロゲンの硫酸抱合体(エストロゲン硫酸)に依存し、細胞膜に発現する有機アニオントランスポーターである organic anion transporter (OAT) や organic anion transporter polypeptide (OATP) を介して行われている。供給されたエストロゲン硫酸の多くは細胞内に滞留するが、それ自体はエストロゲン受容体の基質とならないため、エストロゲンとしての生理活性の発現には脱硫酸抱合化が必須となる。その反応を触媒する酵素として steroid sulfatase(STS)がある。STSは、乳がん組織で顕著な発現増加が認められ、その程度と予後の間には有意な相関性が見出されている。STSは分子内に膜貫通領域を有する膜蛋白質であり、小胞体膜にのみ分布する。興味深いことに、STSの基質結合部位は luminal 側(小胞体内腔側)であることから、細胞質に存在するエストロゲン硫酸は STS の活性部位と相互作用することはできず、その酵素反応においては、小胞体膜の透過過程が必須となる。小胞体膜も細胞膜と同様、脂溶性の高い膜構造であるため、高親水性であるエストロゲン硫酸は、単純拡散では、ほとんど小

胞体内に移行しないと考えられる。したがって、小胞体膜においてエストロゲン硫酸を輸送するトランスポーターの存在が予想されるが、その分子実体についての報告はほとんど皆無であるのが現状である。

2. 研究の目的

女性のがん死亡率の上位に位置する乳がんは、その 60-70%はエストロゲン感受性であるため、生体におけるエストロゲン濃度の制御メカニズムの把握は、乳がんの予防・治療に対して有用な知見となる。エストロゲンはその不活性化体である硫酸抱合体(エストロゲン硫酸)から、小胞体内の脱硫酸化酵素の働きによって供給される。そのため、エストロゲン供給経路の一つとして小胞体内へのエストロゲン硫酸輸送が重要となる。その輸送を担う分子実体とみられる steroid sulfate transporter 1 (SST1)の同定に成功した。本研究では、その詳細な機能を把握するとともに、エストロゲン受容体との関連性も視野に入れ、SST1の生理的役割を探る。さらに、SST1を標的とした新たな薬理作用点を有する抗乳がん剤開発のための基礎的知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

【SST1の細胞内局在の確認】

SST1の機能解析にあたって、HEK293細胞での過剰発現系を用いる。そのため、HEK293細胞における細胞内局在を調べる。方法として、EGFPを付加したSST1と、各種細胞小器官局在マーカー(ライソソーム、ゴルジ体、ミトコンドリア、小胞体)との重ね合わせ画像を共焦点顕微鏡で撮影することで、局在場所の検討を行った。

【SST1の簡易機能評価法の確立】

SST1の機能解析にあたって、現状では、界面活性剤であるジキトニンで細胞表面を処理する方法を用いているが、ジキトニン処理の条件設定は難しく、再現性や安定性に問題がある。そのため、各種蛍光物質を用いて簡易的な機能評価法の確立を行う。

【SST1の輸送機能解析】

乳がん細胞におけるエストロゲン硫酸抱合体の輸送解析(エストロゲン硫酸)を行うのに先立ち、その分子実体と推定されるSST1の機能を十分把握しながら、その機能と比較検討する必要がある。ヒトSST1を一過性発現させたHEK293細胞を用いて、分子レベルでの機能解析に取り組む。

【ヒトSST1の輸送特性の把握】

SST1は小胞体膜に局在するため、界面活性剤であるジキトニンで細胞表面を処理す

ることにより細胞膜透過性を上昇させ、エストロン硫酸を細胞質内へ移行させて小胞体への輸送を評価している。予備的検討でヒト SST1 によるエストロン硫酸輸送が認められているものの、その詳細な輸送特性に関しては未確認であるため、速度論的特性、イオン要求性等の観点から解析を行う。

SST1 の阻害剤の探索

SST1 を介したエストロン硫酸輸送に対する阻害剤の探索を行う。探索対象としては、ステロイド骨格を有する化合物及び各種硫酸抱合体に重点を置くが、それ以外に対しても広く検討を行う。その例として、甲状腺ホルモンや副腎髄質ホルモン等の生理活性物質、さらには環境ホルモンを始めとする毒性物質等を対象とする。以上の検討により見出された阻害剤に関しては、最終的に乳がん由来細胞に対する検討で、その効果を検証する予定である。

4. 研究成果

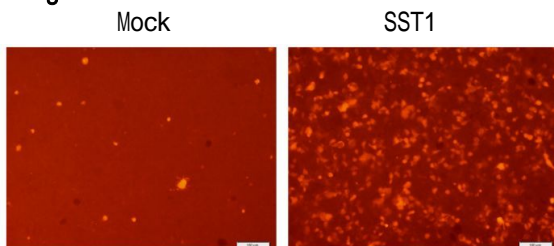
【SST1 の細胞内局在の確認】

HEK293 細胞に EGFP を付加した SST1 を一過性に発現させ観察した細胞内局在と、各種細胞小器官局在マーカー(ライソソーム、ゴルジ体、ミトコンドリア、小胞体)の重ね合わせ画像を解析した。その結果、SST1 は、小胞体とゴルジ体に多く局在していることが分かった。またそれ以外にも、細胞膜での発現が認められた。小胞体やゴルジ体に比較すると局在する量は低かったが、HEK293 細胞においては、細胞膜輸送系で SST1 の機能評価が可能であることが分かった。

【SST1 の簡易機能評価法の確立】

SST1 を HEK293 細胞に一過性に発現させ、rhodamine 系、fluorescein 系を中心とした蛍光性物質の輸送評価を行った。その結果、SST1 が sulforhodamine B の輸送活性を示すことを見出した (Fig. 1)。Sulforhodamine B は分子量 558.7 の rhodamine 誘導体で、520 nm の励起波長により 570 nm の赤色蛍光を発する蛍光物質である。通常 sulforhodamine B は細胞毒性を調べるときに用いられる試薬として用いられ、細胞毒性により障害を示した細胞に対して染色する特性をもつ。

Fig. 1



Uptake of sulforhodamine B in HEK293 cells transiently expressing SST1

SST1 was transiently transfected in HEK293 cells; uptake of sulforhodamine B (1 μ M) at 37°C for 10 min.

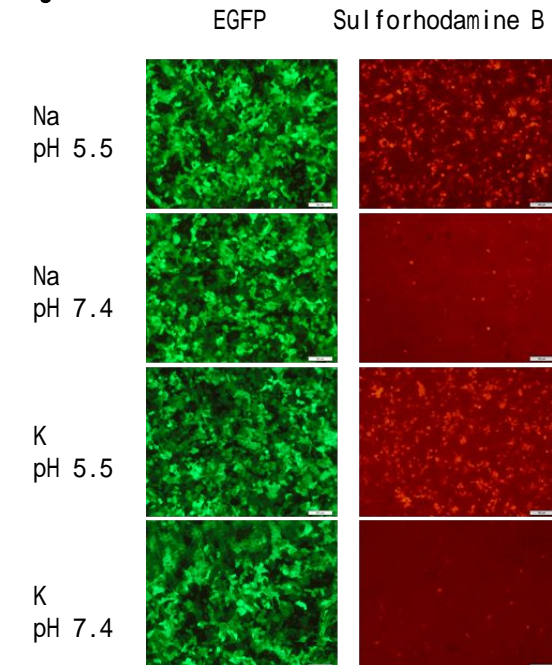
SST1 による sulforhodamine B の輸送量を定量的に量るため、蛍光プレートリーダーを用いて蛍光強度の測定を行った。しかしながら、Mock 細胞との取り込み量に有意差はなく、定量的な評価は不可能であった。原因として、SST1 の細胞膜における存在量が少なく、定量的な評価が不可能であったと考察した。以下の評価は、定性的な評価(画像)で SST1 の機能を解析する。

【SST1 の輸送機能解析】

ヒト SST1 の輸送特性の把握

SST1 による sulforhodamine B の至適輸送条件を調べるために、取り込みの Na の影響、pH の影響について検討した。SST1 と pEGFP のプラスミドを同時トランスフェクションすることにより共発現させ、SST1 を介して sulforhodamine B を取り込んでいる生細胞が、GFP の蛍光により判別できるようにした。この手法により、sulforhodamine B の蛍光と GFP の蛍光がオーバーラップして観察することが出来れば、SST1 が sulforhodamine B を輸送していると判断できる。その結果 sulforhodamine B の取り込みは Na の存在下、非存在下においても低 pH 条件でのみ強い取り込み活性を示した (Fig. 2)。

Fig. 2



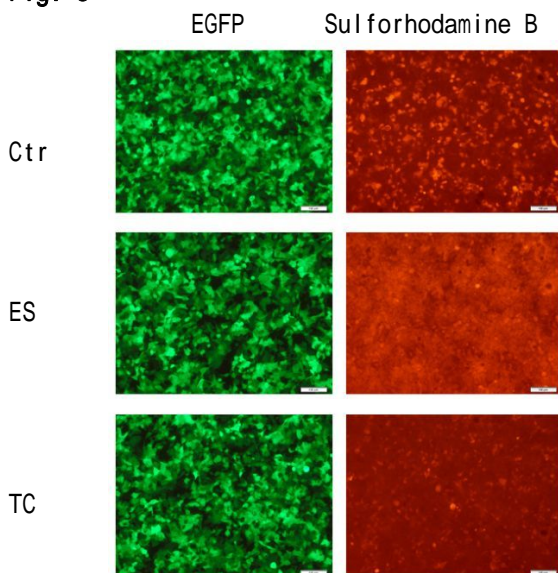
Uptake of sulforhodamine B in HEK293 cells transiently expressing SST1

SST1 and pEGFP-C1 (10 : 1) were transiently transfected in HEK293 cells; uptake of sulforhodamine B (1 μ M) at 37°C for 10 min.

SST1 の阻害剤探索

SST1 の基質認識性を解明するにあたり、まず生体内において多く存在する硫酸抱合体を阻害剤として検討した。その結果、エストロゲンの一種であるエストロン硫酸と主要な胆汁酸成分であるタウロコール酸が強く阻害した (Fig. 3)。このことから、sulforhodamine B を用いた定性的な評価から、SST1 の阻害剤を探索することが可能であることが示された。

Fig. 3



Effect of Compounds on SST1-Mediated Sulforhodamine B Uptake in HEK293 Cells

SST1 and pEGFP-C1 (10 : 1) were transiently transfected into HEK293 cells; uptake of sulforhodamine B (1 μ M) for 10 min at 37°C and pH 5.5 in the presence of a test compound or in its absence. Ctr; control, ES; estrone sulfate (200 μ M), TC; taurocholate (200 μ M).

次に、92 種類の化合物を選び出し、SST1 による sulforhodamine B の輸送に対し阻害効果を示す化合物の探索を試みた。その結果、甲状腺ホルモンの一種であるチロキシンや、鉄吸収に重要なヘムが強い阻害効果を有していることを見出した (Table 1)。

Table 1

SST1 阻害効果あり	SST1 阻害効果なし
エストロン硫酸	ロイコトリエン類
タウロコール酸	プロスタグランジン類
ヘム	核酸類
チロキシン	各種水溶性ビタミン
コルチコステロン	
BSP	など
など	

このことから、チロキシンやヘムが生体内におけるエストロゲン量の調節に関わっていることが考えられる。今後、SST1 の活性を調節する化合物や因子の同定により、ホルモン感受性乳がんの新規治療薬の開発に貢献できると考えられる。また、SST1 の活性調節する機能性食品成分の探索等により、乳がんの予防に効果的な食生活の提案に繋がることも期待される。

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 2 件)

1. Mimura Yoshihisa, Yasujima Tomoya, Ohta Kinya, Inoue Katsuhisa, Yuasa Hiroaki: Functional Identification of Plasma Membrane Monoamine Transporter (PMAT/SLC29A4) as an Atenolol Transporter Sensitive to Flavonoids Contained in Apple Juice *J. Pharm. Sci.*, **106**, 2592-2598, 2017
2. Yamashiro Takahiro, Yasujima Tomoya, Ohta Kinya, Inoue Katsuhisa, Yuasa Hiroaki: Specific inhibitory effect of myricetin on human proton-coupled folate transporter: comparison with its effects on rat proton-coupled folate transporter and human riboflavin transporter 3 *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **32**, 311-314, 2017

[学会発表](計 2 件)

1. 保嶋智也, 細馬あかね, 太田欣哉, 井上勝央, 湯浅博昭: 6-mercaptopurine のがん細胞取り込みにおける ENBT1 の役割
日本薬剤学会第32年会, 2017年5月11日 - 13日(大宮)
2. 保嶋智也, 古川純土, 細馬あかね, 太田欣哉, 井上勝央, 湯浅博昭: 核酸塩基類縁医薬品の生体膜透過過程における ENBT1 の役割.
第 39 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2017年10月26日 - 27日(金沢)

[図書](計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

研究成果をホームページで公表
(<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/yzg/index.html>)

6．研究組織

(1) 研究代表者

保嶋 智也 (YASUJIMA TOMOYA)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：50753555

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力

該当なし