

平成21年5月18日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18790928
 研究課題名（和文）乳癌における核内受容体 SXR の意義と新たな治療法の開発
 研究課題名（英文）The novel mechanism of the potentiation of estrogen action by Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR) in breast cancer cells.
 研究代表者
 六反田 奈和 (ROKUTANDA NANA)
 群馬大学・医学部・助教
 研究者番号：50420097

研究成果の概要：乳癌の発生・進展にはERが深く関与する。乳癌細胞を使用しERを介するエストロゲン(E2)作用に対するタイプII核内受容体であるSXRの関与を解析した。E2による転写活性はSXRにより用量依存性に増強された。乳癌細胞にSXRが発現することによりE2の作用が増強され、乳癌の進展に影響をきたすことが推測された。乳癌細胞におけるSXR発現の有無がER陽性乳癌治療法の選択及び治療の効果予測因子として有用であることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,100,000	0	2,100,000
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	210,000	3,710,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：がん、DNA、タンパク質

1. 研究開始当初の背景

乳癌の発生、進展にはエストロゲン受容体(estrogen receptor、ER)が重要な役割を果たしている。ERはType I核内ホルモン受容体に属し、アゴニスト及び、アンタゴニストが結合し転写が調節される。ERの転写活性の調節にはコアクチベーターやコリプレッサーなどの転写共役因子複合体が関与しており、乳癌細胞においても多数のコアクチベーターやコリプレッサーが同定されている。一方、ステロイド・アンド・ゼノバイオテック受容体(steroid and xenobiotic receptor、SXR)はType II核内ホルモン受容体に属し、レチノイン酸X受容体(retinoid X receptor、RXR)と2量体を形成し薬物代謝

に重要なCytochrome P-450 3A4 (CYP3A4)のプロモーター領域にある生体異物応答配列(SXRE)に結合し作用する。SXRのリガンド結合ポケットは大きく、内因性ステロイドホルモンやリファンピシン等の外因性薬物が結合しその薬物自体の代謝を促進する。SXRは主に肝臓及び、小腸に発現しているが、近年乳癌細胞にも発現していることが報告された。SXRの発現により、内因性ステロイドホルモンや外因性薬物の作用が乳癌細胞において修飾される可能性がある。

2. 研究の目的

我々は近年タモキシフェン(tamoxifene、TAM)によりCYP3A4遺伝子の転写活性が促進

され、TAM 耐性に關与する可能性を見出した。また、核内ホルモン受容体を介する転写は他の受容体の修飾を受けることが知られている。そこで、ER と SXR の間の相互作用とその機序について解析した。

3. 研究の方法

レポーターアッセイ：エストロゲン応答配列 (ERE)レポータープラスミド、及びSXR発現ベクターを、乳癌由来細胞株MCF-7、および腎線維芽細胞由来CV-1に遺伝子導入し、 E_2 を添加後、ルシフェラーゼ活性を測定した。
Mammalian two-hybrid assay：Gal4-ER・LBD、VP16-SXR(LBD)、VP16-SMRT各発現ベクターを作成しERとSXRの結合の有無およびERと転写抑制因子 (SMRT)のligand 存在下での結合の有無とSXRの影響を検討した。
Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)： ^{32}P -標識EREとER、SXRの結合の有無を検討した。
GST-pull down assay：GST-SMRTを作成し、 ^{35}S -標識ER・とのligand 存在下での結合の有無とSXRの影響を検討した。
Liquid chemiluminescent 3-hybrid DNA pull down assay (LC3DPA)：ジゴキシゲニン (DIG)で核酸を標識し、発光基質で標識した抗DIG抗体と反応させ、ルミノメーターで発光強度を測定し、放射性同位元素なしにEMSAと同様に核酸と蛋白の結合を確認できる実験系である。グルタチオンビーズ存在下でGST-SMRT蛋白とER、SXR蛋白を結合させ、さらに標識したEREをbinding buffer内で結合させERE-ER-SMRTの結合を測定した。
real time RT-PCR：MCF-7にSXRを遺伝子導入し、 E_2 添加後totalRNAを抽出し、real time RT-PCRを行った。

4. 研究成果

(1)乳癌細胞におけるSXRによるERを介する転写の活性化

ER陽性、SXR陽性乳癌細胞株MCF-7にERE-luciferaseと、SXR発現ベクターの用量を変えて遺伝子導入し、 E_2 添加後にルシフェラーゼアッセイを行ったところ、SXRの用量依存性にエストロゲンによるEREを介した転写が活性化された。

このSXRによるERを介した転写活性増強の機序について以下の仮説をたて、この仮説に基づき以降の実験を実施した。

- ① SXR単独でのEREへの結合によるEREを介する転写活性の増強。
- ② ERとSXRとの直接結合によるSXR作用の修飾。
- ③ SXRによるERとコアクチベーターとの結合増加。
- ④ SXRによるERからのコリプレッサーの解離。

(2)SXR単独ではERE-Lucレポーターを活性化しない

ER陰性CV-1細胞にERを遺伝子導入せずに、SXRの用量を変えて遺伝子導入し、Iと同様の実験を行った。ERを遺伝子導入したときはER-EREを介した転写は活性化されたが、ERを遺伝子導入しなかったときはEREを介した転写は活性化されなかった。これより、SXRはEREに作用しないことが示唆された。

(3)SXRは単独ではEREへ結合しない

EMSAを行い ^{32}P -標識EREとER、SXRの結合の有無を検討したところ、SXRはEREへin vitroで結合しないことが分かった。これよりIIと合わせ仮説①は否定的であった。

(4)ERとSXRは直接結合しない

Gal4-ER α LBD、VP16-SXR LBDを作製しCV-1細胞を用いてMammalian two hybrid assayを行ったところ、ERとSXRは結合しないか極めて弱いことが示唆された。一方、GST pull down法及び、EMSAでも同様の結果が得られた。以上よりERとSXRは直接結合しないこと(仮説②は否定的)が示唆された。

(5)SXRによりERとコアクチベーターとの結合は増加しない

乳癌細胞に多く発現するコアクチベーターとしてp300/CBP interacting protein (p/CIP) (AIB-1/SRC-3/TRAM-1ともよばれる)が報告されており、今回ERとp/CIPの結合がSXRによって増加するか検討した。Gal4-p/CIPとVP16-ER α -LBDを作成し、CV-1細胞を用いてMammalian two hybrid assayを行ったところ、SXRによりGal4-p/CIPとVP16-ER α -LBDの転写は活性化されなかった。これより、CV-1細胞においてERとp/CIPの結合はSXRにより増加しないことがわかった。一方、GST pull down法及び、EMSAでも同様の結果が得られた。

以上より以上よりSXRによりERとp/CIPの結合は増加しなかった。仮説③は否定的と考えられた。

(6)SXRによるERからのコリプレッサーの解離。

ERはリガンド非依存性にコリプレッサー(nuclear receptor corepressor (N-CoR)や、silencing mediator for retinoid and thyroid receptors (SMRT))と結合することが知られている。一方我々は、SXRはN-CoRと結合せず、SMRTのみと結合することを報告した。また、この結合はリガンド存在下で増強されることを報告した。そこで、我々はSMRTのER及びSXRに対する関与を検討した。

Gal4-ER α -LBD、VP16-SMRTを作成しMammalian two-hybrid assayを行い、ERと

SMRTの結合の有無とSXRの影響を検討した。また、GST-SMRTを作成し、GST-pull down assayを用いて³⁵S-標識ER α とのligand存在下での結合の有無とSXRの影響を検討した。その結果、どちらのアッセイ法においてもERとSMRTの結合がSXRの用量依存的に解離した。さらに、LC3DPAにより、ERE存在下でもERに結合していたSMRTがSXRにより解離することが明らかとなった。

(7)乳癌細胞における SXR によるエストロゲン応答遺伝子の発現の促進

SXRによりERを介するエストロゲン応答遺伝子の発現が促進されるか real time RT-PCR法を用いて検討した。MCF7において、プロゲステロン受容体の mRNA 発現が SXR により増加することが確認された。

まとめ

以上より、SXR と SMRT が結合し ER から SMRT が解離することにより ER の転写が増強されたと考えられた。したがって、SXR の発現そのものがエストロゲン作用増強をきたすと推測される。また、我々は既に乳癌細胞においてタモキシフェンがSXRのリガンドとしてCYP3A4 転写活性を上昇させる事を報告しており、本研究と併せて乳癌細胞における SXR 発現の有無が ER 陽性乳癌治療法の選択及び治療効果の推測に有用である可能性が示唆された。

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6件)

- ① Rokutanda N, (他 8 名, 1 番目) Isolated retromammary lymph node metastasis of breast cancer without axillary lymph node involvement: a case report with a false-negative sentinel lymph node biopsy. *Breast Cancer*, 16 巻, 162-165, 2009. 査読有
- ② Iwasaki T, Miyazaki W, Rokutanda N, Koibuchi N. Liquid chemiluminescent DNA pull down assay to measure nuclear receptor-DNA binding in solution. *Biotechniques*, 45 巻, 445-448, 2008, 査読有
- ③ Rokutanda N, (他 11 名, 1 番目) Augmentation of estrogen receptor - mediated transcription by steroid and xenobiotic receptor. *Endocrine*, 33 巻, 305-316, 2008. 査読有

- ④ Horiguchi J, Koibuchi Y, Yoshida T, Takata D, Kikuchi M, Rokutanda N (他 4 名, 6 番目) Significance of local recurrence as a prognostic factor in the treatment of breast cancer. *Anticancer Res*, 26 巻, 569 -574, 2006, 査読有

- ⑤ Yoshida T, Koibuchi Y, Horiguchi J, Iijima K, Kikuchi M, Takata D, Rokutanda N (他 5 名, 7 番目) Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma: A case report. *Kitakanto Med J*, 56 巻, 237-239, 2006, 査読有

- ⑥ Nagaoka R, Iwasaki T, Rokutanda N (他 7 名, 3 番目) Tamoxifen activates CYP3A4 and MDR-1 genes through steroid and xenobiotic receptor in breast cancer cells. *Endocrine*, 30 巻, 261-268, 2006, 査読有

[学会発表] (計16件)

- ① 六反田奈和, 「乳癌外来化学療法におけるチーム医療の現状」～アンケート結果より～. 第5回乳癌学会関東地方会 2008年12月13日、大宮
- ② 六反田奈和, (他11名, 1番目) complex sclerosing lesionを合併した両側乳癌の1例、第18回日本乳癌検診学会総会 2008年12月5-6日、名古屋
- ③ 六反田奈和, (他9名, 1番目) Trastuzumab+Paclitaxel併用術前化学療法後に再発したHER2 陽性乳癌の検討. 第46回日本癌治療学会総会学術集会 2008年10月30-11月1日、名古屋
- ④ 六反田奈和, (他9名, 1番目) 機能性結節を合併したBasedow病 (Marine-Lenhart 症候群) の一例、第41回甲状腺外科学会総会 2008年10月16-17日、東京
- ⑤ 六反田奈和, (他7名, 1番目) センチネルリンパ節生検 (SNB) 省略可能な乳癌症例の検討、第16回日本乳癌学会学術総会、2008年9月26-27日、大阪
- ⑥ 六反田奈和, (他7名, 1番目) 異時的に診断された副腎褐色細胞腫と paragangliomaの合併例 第20回日本内分秘外科学会総会 2008年6月12-13日、仙台

- ⑦ 六反田奈和, (他 9 名、1 番目) steroid and xenobiotic receptor (SXR) の乳癌の発生・進展への影響 ～ERを介した転写活性の増強作用～、第 108 回日本外科学会定期学術集会 2008 年 5 月 15-17 日 長崎
- ⑧ 六反田奈和, (他 8 名、1 番目) 検診発見乳癌における病理組織型別マンモグラフィ像の検討 第 17 回日本乳癌検診学会総会、2007 年 11 月 21-22 日、横浜
- ⑨ 六反田奈和, (他 9 名、1 番目) 術前化学療法としてFECを施行しpCRを得られた一例. 第 4 回乳癌学会関東地方会、2007 年 11 月 16 日、大宮
- ⑩ 六反田奈和, (他 9 名、1 番目) 術前化学療法施行した原発性両側乳癌の 4 例. 第 45 回日本癌治療学会総会学術集会、2007 年 10 月 24-26 日、京都
- ⑪ 六反田奈和, (他 9 名、1 番目) 腎機能障害を伴った上皮小体癌の 1 例. 第 40 回甲状腺外科学会総会、2007 年 10 月 18 日、東京
- ⑫ 六反田奈和, (他 9 名、1 番目) 術前画像診断によるセンチネルリンパ節転移の検討. 第 15 回日本乳癌学会学術総会 2007 年 6 月 29-30 日、横浜
- ⑬ 六反田奈和, (他 8 名、1 番目) 乳癌術前リンパ節転移診断における超音波の有用性. 第 107 回日本外科学会定期学術集会、2007 年 4 月 11-13 日、大阪
- ⑭ 六反田奈和, (他 10 名、1 番目) 管状癌の臨床病理学的検討～マンモグラフィ所見を中心に～第 16 回日本乳癌検診学会総会、2006 年 11 月 17-18 日、仙台
- ⑮ 六反田奈和, (他 10 名、1 番目) 術前 NO 症例に対するリンパ節超音波診断の有用性の検討、第 14 回日本乳癌学会学術総会、2006 年 7 月 7-8 日、金沢
- ⑯ Rokutanda Nana, (他 10 名、1 番目) The novel mechanism of the potentiation of estrogen action by steroid and xenobiotic receptor (SXR) in breast cancer cells. The Endocrine Society's 88th Annual Meeting, MA, 24 - 27 June, 2006, Boston

(1) 研究代表者
六反田 奈和 (ROKUTANDA NANA)
群馬大学・医学部・助教
研究者番号：50420097

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

6. 研究組織