

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07018

研究課題名（和文）乳癌を標的とした新規アロマターゼ阻害剤の開発に向けた基盤研究

研究課題名（英文）Basic research for the development of novel aromatase inhibitors against breast cancer

研究代表者

濱田 大治（Hamada, Taiji）

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：30771480

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）：本研究は、既存のアロマターゼ阻害剤とは異なるアロマターゼの遺伝子転写の抑制を標的にした新たな作用機序を有するアロマターゼ阻害薬の基盤研究を行い、臨床上の問題の解決につなげることを目的とした。ヒト乳癌培養細胞を用いたアロマターゼ活性測定、ルシフェラーゼアッセイ、リアルタイムPCR、解析などを用いてPCP4およびアロマターゼの関連性を検討したところ、アロマターゼの発現はPCP4によって調節されており、その調節はアロマターゼ遺伝子からの転写を介した作用であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌は日本人女性で最も身近に存在する癌である。乳癌診療ガイドラインでは閉経後の乳癌治療においてアロマターゼ阻害薬を推奨しており、近年の本邦の高齢化社会と相まって、アロマターゼ阻害薬が重要な治療薬剤となっている。本研究結果から、既存のアロマターゼ阻害薬とは異なるアロマターゼ阻害の新規作用機序を明らかにしたことは学術的意義が高く、アロマターゼ阻害の新たな作用機序を提示できたことは薬剤開発につながることを期待され、本研究成果は社会的に有意義なものとなる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to conduct basic research on aromatase inhibitors with a new mechanism of action targeting the suppression of transcription of aromatase gene, which is different from existing aromatase inhibitors, and to solve clinical problems. We investigated the relationship between PCP4 and aromatase using aromatase activity assay, luciferase assay, and RT-qPCR analysis in cultured human breast cancer cells, and found that aromatase expression is regulated by PCP4, and the regulation is mediated by transcription from the aromatase gene. The results showed that the expression of aromatase is regulated by PCP4 and that the regulation is mediated by transcription from the aromatase gene.

研究分野：分子生物学

キーワード：アロマターゼ 乳癌 転写制御

1. 研究開始当初の背景

国立がん研究センター発表の本邦のがん統計によると、乳癌は日本人女性で最も身近に存在する癌である。乳癌全体の約7割はホルモン(エストロゲン)依存性であり、ホルモン療法による薬物療法が適用される。ホルモン療法は、(1) LH-RH アゴニスト製剤、(2) 抗エストロゲン剤および(3) アロマターゼ阻害薬(以下、AI)の3つに大別され、閉経前と閉経後でこれらを使い分ける。閉経後は抗エストロゲン剤及びAIが用いられ、乳癌診療ガイドラインではAIを推奨しており(グレードA)、近年の本邦の高齢化社会と相まって、AIがますます重要な治療薬剤となっている。広くAIが使われるようになった一方で、AI耐性化による乳癌再発例が報告され、再発後の治療が大きな課題となっている¹⁾。AI耐性化の発生機序は未だ不明な点が多く、再発乳癌の治療を困難にしている。現在、AI耐性化乳癌に対して行う薬物療法は、まだ使用していない別のAIや抗エストロゲン剤を用いた治療が主な治療方法であるが、全再発症例のすべてに適応されるわけではない。本邦で使用されているAIは同様な作用機序を持つわずか3種類にすぎず、治療選択の余地は少ない。このことから、AIの治療戦略の拡大は臨床上の解決すべき課題となっている。研究代表者は、小脳プルキンエ細胞で発見されたPurkinje cell protein 4(以下PCP4)がヒト乳癌で高発現しており、乳癌の悪性度と進展に関与していることを明らかにし²⁻⁴⁾、PCP4の先駆的な研究を行っている。PCP4はアロマターゼと同様のアルドステロン合成酵素の遺伝子転写を増強させる⁵⁾ことから、アロマターゼ発現とPCP4の関連性を検討した。

2. 研究の目的

本研究では、既存のAIとは異なる、アロマターゼの遺伝子転写の抑制を標的とした新たな作用機序を有するAIの基盤研究を行い、臨床上の問題の解決につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

PCP4がアロマターゼ遺伝子の転写機構に及ぼす影響を検討するため、アロマターゼの各組織特異的なプロモーター領域を含むレポーターベクターを構築し、フェノタイプの異なる複数のヒト乳癌培養細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。また、プロモーター領域特異的なアロマターゼのmRNA発現についてリアルタイムPCRで解析した。

ヒト乳癌培養細胞のPCP4発現量をRNAi法による遺伝子ノックダウンや発現ベクターによる過剰発現により変化させ、PCP4がどの組織特異的なプロモーター領域と関連しているかを検討した。加えて、PCP4と各プロモーター領域の関係を詳細に検討するため、プロモーター領域の欠失変異体を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。

さらに、アロマターゼに着目したPCP4の臨床応用の可能性を検討するため、PCP4、アロマターゼおよび関連蛋白質における臨床応用の可能性を、臨床検体(病理組織検体)の免疫組織化学をはじめとする病理組織学的検査で確認した。検査した蛋白質の発現と臨床情報を照らし合わせ、バイオマーカーとして活用できないかを検討した。

4. 研究成果

研究に用いるヒト乳癌培養細胞株の選択

ヒト乳癌培養細胞株である、エストロゲン受容体 (ER) 陰性の SK-BR-3 および ER 陽性の MCF-7 について、本研究に使用可能であるかを検討した。いずれの細胞株も PCP4 は発現しているが、MCF-7 と比較して SK-BR-3 の方が PCP4 発現量は高かった。ER 陰性および陽性細胞のいずれにおいても、PCP4 発現量はエストロゲン除去培地による培養により低下したが、それでも SK-BR-3 の方が PCP4 発現量は高かった。このことから PCP4 発現量はエストロゲンにより影響を受け、それは ER を介さない経路で調節されていると考えられる。

PCP4 のアロマターゼ発現量に対する影響

ER 陰性である SK-BR-3 では、RNA 干渉法により細胞内 PCP4 の発現量を低下させるとアロマターゼ mRNA 量が減少し、過剰発現プラスミドを細胞内に導入して細胞内 PCP4 発現量を増加させると、アロマターゼ mRNA 量も増加するといった PCP4 発現量に関連したアロマターゼ mRNA 量の変動がみられた。しかしながら、ER 陽性 MCF-7 ではこのようなアロマターゼ mRNA 量の増減は認められなかった。これらの現象が ER に関連しているかどうかを確認するため、MCF-7 の ER 発現量を RNA 干渉法により減少させ、アロマターゼ mRNA 量を定量した。ER 発現量の減少に伴い、アロマターゼ mRNA 量の増加がみられた。このアロマターゼ mRNA 量の増加は PCP4 ノックダウンおよび過剰発現では抑制されず、PCP4 とアロマターゼの関係性は ER 関連経路とは独立したものであると考えられ、SK-BR-3 における PCP4 とアロマターゼの関連性は非常にユニークなものであると考えられる。

PCP4 のアロマターゼ活性に対する影響

アロマターゼはアンドロステンジオンおよびテストステロンから女性ホルモン (エストロゲン) のエストロン (E1) やエストラジオール (E2) を合成する酵素である。PCP4 のアロマターゼ活性に及ぼす影響を検討するため、SK-BR-3 細胞内のエストロンおよびエストラジオールを ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法で定量し、それらエストロゲン合成量からアロマターゼ活性を解析した。これらの結果では、PCP4 ノックダウンおよび過剰発現に伴う E1 および E2 合成量の増減がみられ、PCP4 はアロマターゼ活性に対しても影響を及ぼしていた。なお、E1 および E2 を起点とする他の合成経路では合成産物量 (17 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、スルホトランスフェラーゼおよびスルファターゼ) に変化は認められず、E1 および E2 合成量の変化はアロマターゼ活性に起因した変化であることを確認した。

プロモーター特異的アロマターゼの定量

アロマターゼは多重プロモーター/エクソン 1 構造を持ち、それらにより選択的スプライシングを介して組織特異的な発現調節がなされている⁶⁾。特に乳癌においては、正常組織で使用される I.4 プロモーター/エクソン 1 以外にも I.3 および II プロモーター/エクソン 1 も活性が高く、アロマターゼの発現の増大が乳癌を悪性化させている⁷⁾。そこで、プロモーター/エクソン 1 を選択的に定量できる RT-PCR を用いて、プロモーター特異的発現調節に対する PCP4 の影響を解析した。複数あるプロモーター/エクソン 1 のうち、SK-BR-3 では I.1 プロモーター/エクソン 1 の発現が最も高く、I.1 プロモーター/エクソン 1 の発現量は PCP4 に連動した変化を示した。乳癌でよく知られる I.3 および II プロモーター/エクソン 1 の発現は非常に低かった。また、各プロモーター配列を構築したルシフェラーゼベクターを用いてプロモーター活性の定量を行った。このアッセイでも SK-BR-3 は I.1 プロモーター活性が最も高く、PCP4 の発現に連動した活性変化が認められた。PCP4 発現量増加に伴うプロモーター活性の増加は、I.1 だけでなく I.3/II および I.4 プロモーター活性でもみられた。

ヒト乳癌組織における PCP4 およびアロマターゼの免疫組織化学

アロマターゼおよび PCP4 抗体を用いた免疫組織化学において、標本 44 例のうち 75%および 52% でアロマターゼならびに PCP4 が陽性であり、アロマターゼおよび PCP4 のいずれも陽性だったのは 34% (15/44 例) であった。アロマターゼと PCP4 の発現パターンに傾向はなく、ER 陽性との関連性も認められなかった。PCP4 は核および細胞質のいずれも染色されたが、アロマターゼは細胞質のみ染色された。

引用文献

- 1) 林慎一. 内分泌甲状腺外会誌. 2015 32(2):68-73.
- 2) Souda M. Int J Cancer. 2009 Sep 15;125(6):1285-97.
- 3) Hamada T, Tanimoto A. Oncotarget. 2014 Aug 15;5(15):6076-86.
- 4) Yoshimura T, Hamada T, Tanimoto A. Oncotarget. 2016 Aug 2;7(31):49065-49074.
- 5) Felizola SJ. J Mol Endocrinol. 2014 Feb 24;52(2):159-67.
- 6) 原田 信広. 日本比較内分泌学会ニュース. 2002 106:4-14.
- 7) Hong Zhao. J Mol Endocrinol. 2016 Jul;57(1):R19-33.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Honjo Kie, Hamada Taiji, Yoshimura Takuya, Yokoyama Seiya, Yamada Sohsuke, Tan Yan-Qin, Leung Lai K., Nakamura Norifumi, Ohi Yasuyo, Higashi Michiyo, Tanimoto Akihide	4. 巻 9
2. 論文標題 PCP4/PEP19 upregulates aromatase gene expression via CYP19A1 promoter 1.1 in human breast cancer SK-BR-3 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 29619-29633
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25651	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	谷本 昭英 (Tanimoto Akihide) (10217151)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	
研究分担者	飛田 陽 (Hida Akira) (10435026)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授 (17701)	
研究分担者	横山 勢也 (Yokoyama Seiya) (20569941)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教 (17701)	
研究分担者	東 美智代 (Higashi Michiyo) (60315405)	鹿児島大学・医歯学域附属病院・准教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------