

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591502
 研究課題名（和文）乳癌におけるオーファン受容体RORによるアロマトラーゼ遺伝子発現調節機構の解明
 研究課題名（英文）Regulation of aromatase expression by ROR α in breast cancer

研究代表者
 堀口 淳 (HORIGUCHI JUN)
 群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：70272242

研究成果の概要：

我々は、retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) α がアロマトラーゼの発現増加に関連する可能性が高いことを見出し、そのメカニズムの解析を行った。その結果アロマトラーゼのプロモーターI.4領域に新規ROR応答領域を同定し、ROR α が直接アロマトラーゼの発現を活性化することを発見した。乳癌手術検体の解析にて、アロマトラーゼとROR α のmRNAの発現量に有意な相関も認めた。細胞増殖能試験ではエストロゲン受容体発現乳癌細胞株の増殖能活性化を認め、ROR α の発現によりER陽性乳癌の増殖能が変化する可能性が見出された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：乳癌，エストロゲン，アロマトラーゼ，ROR α ，ER

1. 研究開始当初の背景

我々は、核内ホルモン受容体であるステロイドアンドゼノバイオティック受容体(steroid and xenobiotic receptor; SXR)が乳癌に及ぼす影響を解析し、乳癌治療薬であるタモキシフェンがSXRに結合してタモキシフェン代謝酵素の発現を活性化させて、局所タモキシフェン代謝に影響を及ぼすこと、また、エストロゲン受容体(ER)を介する転写

を用量依存性に活性化すること、その機序はSXRによりコリプレッサーである silent mediator for retinoid and thyroid hormone (SMRT)をERから解離させることを明らかにした。ER-SXR以外にもエストロゲンの転写を活性化する核内受容体が存在することが予想された。一方、共同研究者の鯉淵らは retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) α がROR応答配列を介して

直接遺伝子発現を制御する一方、甲状腺ホルモン受容体(TR)を介する転写も活性化し、この二つの経路を介して脳発達に重要な機能を果たしていることを明らかにした。

乳腺は脂肪に富む組織であるが、2001年にROR α が乳癌に発現していることが報告された。一方、エストロゲンは乳癌の発生・分化・進展に重要である。乳癌および乳癌周囲の脂肪組織はアンドロゲンをエストロゲンに変換するアロマターゼが発現している。乳癌周囲のエストロゲン濃度は正常乳腺や血中濃度よりも高いことが分かっており、閉経後女性では特に乳癌組織内でのアロマターゼによるアンドロゲンからエストロゲンへの変換が重要となっている。最近では乳癌治療における内分泌治療の中で、抗エストロゲン剤よりもアロマターゼ阻害剤が注目されており、乳癌局所でのアロマターゼの働きは非常に重要と考えられている。

2. 研究の目的

ROR α がアロマターゼの発現に及ぼす影響を解析するために予備実験としてアロマターゼのプロモーターに対するRORの影響を解析したところ、低用量のRORで転写が10-12倍に活性化された。

そこで以下を本研究の目的とした。

- (1) ROR α がアロマターゼの発現に及ぼす影響の解析と、そのメカニズムを解明する。
- (2) 臨床検体におけるROR α の発現状況を解析し、アロマターゼの発現量や、他の乳癌予後因子との関連を解析する。

3. 研究の方法

(1) 基礎研究

乳癌細胞株にROR α 1発現プラスミドベクターを遺伝子導入し、細胞内ROR α の発現量を調節し、アロマターゼの発現量測定

(real-time RT-PCR, western blot), 細胞増殖能試験, アロマターゼ活性の測定を行った。

新規ROR応答領域の同定として, reporter gene assay, ChIP assay, EMSAを行った。

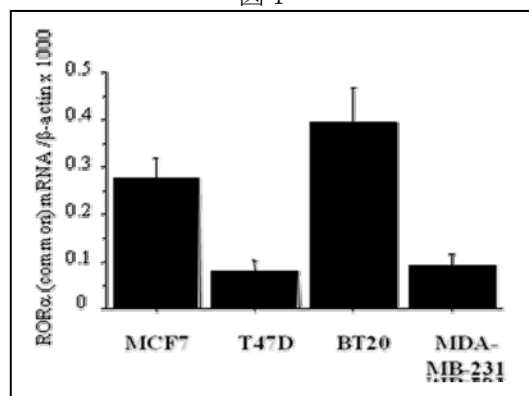
(2) 臨床研究

乳癌手術検体を用い, ROR α の発現量及びアロマターゼの発現量をreal-time RT-PCRで測定した。

4. 研究成果

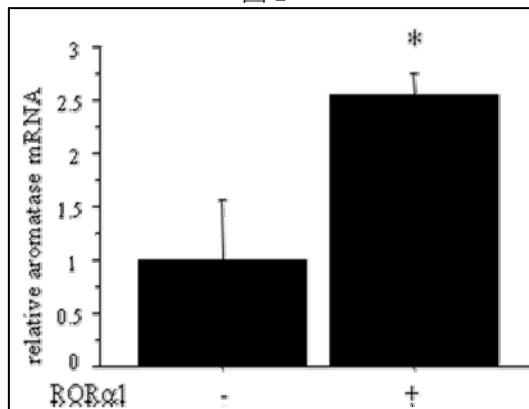
最初に、我々は乳癌細胞株におけるアロマターゼおよびROR α のmRNAレベルでの発現量を調べたところ、細胞乳癌細胞株間ごとに異なる量の発現を認めた(図1)。

図1



アロマターゼの発現量に対する影響を解析するために、ROR α 1発現ベクターを遺伝子導入したところ、ROR α 1の発現増加に伴いアロマターゼ蛋白の発現が増加(western blot), mRNAの増加(real-time RT-PCR)を認めた(図2)。

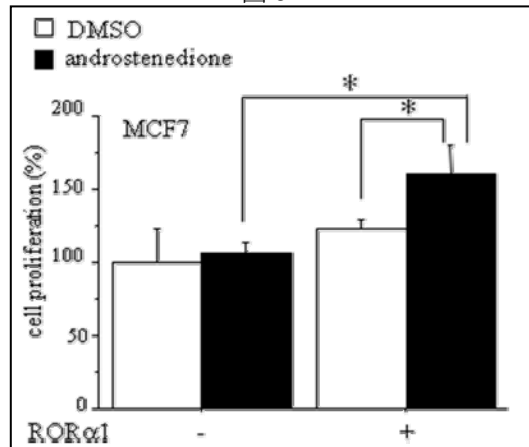
図2



また、細胞内アロマターゼ活性の増加(aromatase activity assay)を認めた。

細胞増殖能試験を行ったところ、アロマターゼの基質であるアンドロステンジオンの存在下でエストロゲン受容体発現乳癌細胞株の増殖能活性化を認めた(図3)。

図3

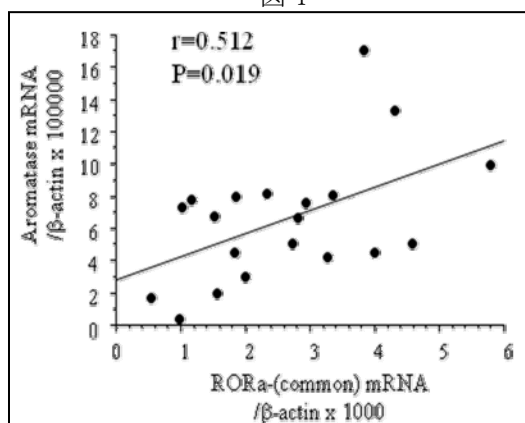


ROR α の発現によりER陽性乳癌の増殖能が変化する可能性が見出された。ROR α が乳癌の予後因子の一つとなる可能性がある。

また一方で、遺伝子制御の解析を目的とした解析も行った。アロマターゼのプロモーター領域はマルチプレックス構造を呈しているが、reporter gene assay および real-time RT-PCR 法にて、プロモーター PI. 4 の範囲内に ROR 応答領域が存在することを確認した。最終的に、変異導入実験や ChIP assay, EMSA などを行って、アロマターゼのプロモーター I. 4 領域に新規 ROR 応答領域を同定した。

基礎研究と並行して、乳癌組織のアロマターゼと ROR α の発現量に相関を認めるかどうかを解析する目的で、乳癌手術検体を用いてそれぞれの mRNA レベルの発現を real-time RT-PCR 法にて解析した。結果、20 例の解析にて、アロマターゼと ROR α の発現量に有意な相関を認めた(図 4)。

図 4



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 25 件)

すべて査読有

1. Koibuchi N. Animal models to study thyroid hormone action in cerebellum. *Cerebellum* (in press)
2. Sajdel-Sulkowska E, Xu M, Koibuchi N. Increase in cerebellar neurotrophin-3 and oxidative stress markers in autism. *Cerebellum* (in press)
3. Kogure T, Ito K, Sato H, Ito T, Oku Y, Horiguchi J, Takeyoshi I, Tatsumi T. Efficacy of Nyoshinsan/TJ-67, a traditional herbal medicine, for

menopausal symptoms following surgery and adjuvant chemotherapy for premenopausal breast cancer. *Int J Clin Oncol* 13:185-189, 2008

4. Rokutanda N, Iwasaki T, Odawara H, Nagaoka R, Miyazaki W, Takeshita A, Koibuchi Y, Horiguchi J, Shimokawa N, Iino Y, Morishita Y, Koibuchi N. Augmentation of estrogen receptor - mediated transcription by steroid and xenobiotic receptor. *Endocrine* 33: 305-316, 2008
5. Koibuchi N. The role of thyroid hormone on cerebellar development. *Cerebellum* 7:530-533, 2008
6. Koibuchi N, Kimura-Kuroda J, Ikeda Y, Tsutsui K. *Cerebellum*, a target for hormonal signaling. *Cerebellum* 7: 499-504, 2008
7. Iwasaki T, Miyazaki W, Rokutanda N, Koibuchi N. Liquid chemiluminescent DNA pull-down assay to measure nuclear receptor-DNA binding in solution. *BioTechniques* 45: 445-448, 2008
8. Koibuchi N. Hormonal regulation of cerebellar development and plasticity. *Cerebellum* 7: 1-3, 2008
9. Miyazaki W, Iwasaki T, Takeshita A, Tohyama C, Koibuchi N. Identification of the functional domain of thyroid hormone receptor responsible for polychlorinated biphenyl-mediated suppression of its action in vitro. *Environ Health Perspect* 116: 1231-1236, 2008
10. Seki T, Shimokawa N, Iizuka H, Takagishi K, Koibuchi N. Abnormalities of vertebral formation and Hox expression in congenital kyphoscoliotic rats. *Mol Cell Biochem* 312: 193-199, 2008
11. Esmaeili-Mahani S, Shimokawa N, Javan M, Maghsoudi N, Motamedi F, Koibuchi N, Ahmadiani A. Low-dose morphine induces hyperalgesia through activation of G \cdot s, protein kinase C and L-type Ca $^{2+}$ channels in rats. *J Neurosci Res* 86: 471-479, 2008
12. 時庭英彰、堀口 淳、 鯉淵幸生、飯野佑二、 小山徹也、竹吉 泉. 乳癌 matrix-producing carcinoma の 1 例. *日臨外会誌* 69: 1892-1896, 2008
13. 小山徹也、林 光弘、長岡りん、六反田奈和、堀口 淳. 乳癌 I - 乳腺病理診断の実際 - 術中迅速診断 (原発巣・断端・リンパ節). *病理と臨床* 26: 1073-1080, 2008

14. 堀口 淳、鯉淵幸生、六反田奈和、長岡りん、菊地麻美、佐藤亜矢子、小田原宏樹、石川裕子、時庭英彰、飯野佑一、竹吉 泉. 手術不能または再発乳癌に対するCapecitabine (Xelode)とWeekly Paclitaxel (Taxol)の併用化学療法における用量設定試験. 癌と化学療法 35: 1877-1881, 2008
 15. 飯野佑一、鯉淵幸生. 抗ステロイドホルモン薬の臨床応用 乳癌. 日本臨床 66: 168-173, 2008
 16. Qiu C-H, Shimokawa N, Iwasaki T, Parhar IS, Koibuchi N. Alteration of cerebellar neurotrophin messenger ribonucleic acids and the lack of thyroid hormone receptor augmentation by staggerer- type retinoic acid receptor-related orphan receptor- mutation. Endocrinology 148: 1745-1753, 2007
 17. Toya H, Oyama T, Ohwada S, Togo N, Sakamoto I, Horiguchi J, Koibuchi Y, Adachi S, Jigami T, Nakajima T, Akikyama T. Immunohistochemical expression of the beta-catenin-interacting protein B9L is associated with histological high nuclear grade and immunohistochemical ErbB2/HER-2 expression in breast cancers. Cancer Sci 98: 484-490, 2007
 18. Ohwada S, Izumi M, Kawate S, Hamada K, Toya H, Togo N, Horiguchi J, Koibuchi Y, Takahashi T, Yamada M. Surgical outcome of stage III and IV adenocortical carcinoma. Jpn J Clin Oncol 37: 108-113, 2007
 19. Oyama T, Ishikawa Y, Hayashi M, Arihiro K, Horiguchi J. The effects of fixation, processing and evaluation criteria on immunohistochemical detection of hormone receptor in breast cancer. Breast Cancer 14: 182-188, 2007
 20. Horiguchi J, Koibuchi Y, Rokutanda N, Nagaoka R, Ishikawa Y, Odawara H, Iino Y, Sakurai H, Oyama T, Takeyoshi I. True local recurrence or new primary tumors after breast-conserving surgery and radiation therapy. Kitakanto Med J 57:221-224, 2007
 21. Miyazaki W, Iwasaki T, Koibuchi N. PCB affects on DNA binding domain of thyroid hormone receptors. Organohalogen Compounds 69: 1773-1775, 2007
 22. Londono MB, Shimokawa N, Miyazaki W, Iwasaki T, Koibuchi N. Low dose hydroxylated PCB disrupt Ca²⁺ homeostasis and plasma membrane potential. Organohalogen Compounds 69: 1776-1778, 2007
 23. 堀口 淳、飯野佑一、小山徹也. ERおよびHER2発現と内分泌療法感受性. 乳癌の臨22(1): 20-26, 2007
 24. 堀口 淳. 乳癌—基礎・臨床研究のアップデート—、分子標的治療. 日本臨床 65: 415-421, 2007
 25. 小山徹也、石川裕子、多賀谷信美、堀口 淳. 乳癌—基礎・臨床研究のアップデート—、エストロゲンレセプター. 日本臨床 65: 74-80, 2007
- [学会発表] (計 38 件)
1. 岩崎俊晴. PCBのTRシグナリングに対する影響の性差. 第11回環境ホルモン学会研究発表会, 2008年12月13-14日, 東京
 2. 鯉淵幸生. 名古屋乳癌集団検診と任意の検診(人間ドック)の相違点の検討. 第17回日本乳癌検診学会総会, 2008年12月5-6日, 名古屋
 3. 鯉淵典之. 神経細胞発達に及ぼす甲状腺ホルモンの作用と環境化学物質による修飾. 第51回日本甲状腺学会, 2008年11月21-23日, 宇都宮(鎮目レクチャー)
 4. 岩崎俊晴. 新規転写抑制因子 brain-derived repressive modulator (B-ReM)の同定. 第51回日本甲状腺学会, 2008年11月21-23日, 宇都宮
 5. 堀口 淳. HER2 陽性乳癌に対するアントラサイクリンを省略した paclitaxel+trastuzumabによる術前化学療法の現状と展望. 第46回日本癌治療学会(シンポジウム), 2008年10月30日-11月1日, 名古屋
 6. 鯉淵幸生. 群馬大学における外来化学療法センターの運用状況. 第46回日本癌治療学会総会, 2008年10月30日-11月1日, 名古屋
 7. 鯉淵典之. 環境ホルモン研究—最近の進歩—. 第23回日本医科大学内分泌懇話会, 2008年10月30日 東京(特別講演)
 8. 小田原宏樹. 核内受容体ROR α によるアロマターゼ遺伝子の活性化とその影響. 第16回日本乳癌学会総会, 2008年9月26-27日, 大阪
 9. 堀口 淳. 進行乳癌に対する術前化学療法としてのpaclitaxel単独療法またはpaclitaxelとtrastuzumabの併用療法の成績. 第16回日本乳癌学会総会, 2008年9月26-27日, 大阪
 10. 鯉淵幸生. 年代ごとの若年者乳癌の変遷. 第16回日本乳癌学会総会, 2008年9月

- 26-27 日, 大阪
11. Koibuchi N. SXR, a new predictive factor for the prognosis of breast cancer. III Curso de biologia, molecular y symposio patologias endocrinas de enfoque multidisciplinario. Aug 15-17, 2008. Bogota, Colombia (Invited Speaker)
 12. Koibuchi N. The effect of thyroid hormone on brain development and its disruption by environmental factors. XVII Seminar National Ikatan Ahli Ilmu Faal Indonesia (インドネシア生理学会) Aug. 6-8, 2008, Medan, Indonesia (Plenary Lecutre)
 13. Koibuchi N. Effects of brominated compound on thyroid hormone receptor-mediated transcription. 6th Forum of European Neuroscience July 12-16, 2008. Geneva, Switzerland
 14. Iwasaki T. Effect of polychlorinated biphenyl (PCB) on thyroid hormone receptor (TR) - retinoic acid-related orphan receptor (ROR) crosstalk and its mechanism in developing brain. 6th Forum of European Neuroscience July 12-16, 2008. Geneva, Switzerland
 15. Koibuchi N. The role of thyroid hormone on cerebellar development. Inaugural Cerebellar Symposium. July 11, 2008. Geneva, Switzerland (Symposist)
 16. 小田原宏樹. 乳癌におけるROR α の発現とその影響-アロマターゼ遺伝子の活性化-. 第9回ホルモンと癌研究会, 2008年6月20-21日, 岐阜
 17. 堀口 淳. 手術検体のERおよびHER2の発現形式による乳癌内分泌療法の効果予測についての検討. 第20回日本内分泌外科学会総会(シンポジウム), 2008年6月12-13日, 仙台
 18. 堀口 淳. 乳癌の術前病理学的診断はどこまで必要か. 第33回日本外科系連合学会(ラウンドテーブルディスカッション), 2008年6月12-13日, 東京
 19. 岩崎俊晴. 新たな機序による核内ホルモン受容体を介する転写の抑制. 第81回日本内分泌学会学術総会, 2008年5月16日-18日, 青森
 20. 堀口 淳. 抗癌剤感受性試験結果を乳癌の個別化治療にむすびつけられるか-triple negativeと非triple negative症例の抗癌剤感受性の違いについて- 第108回日本外科学会(パネルディスカッション), 2008年5月15-17日, 長崎
 21. 小田原宏樹. 乳癌におけるROR α によるアロマターゼ遺伝子発現の活性化. 日本外科学会 第108回総会, 2008年5月15-17日, 長崎
 22. 堀口 淳. 手術不能または再発乳癌に対するcapecitabineと毎週paclitaxelの併用化学療法における用量設定試験. 第6回日本臨床腫瘍学会, 2008年3月20-21日, 福岡
 23. 岩崎俊晴. 甲状腺ホルモン受容体及び, retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR)を介する転写へのPCBの影響. 環境ホルモン学会第10回研究発表会, 2007年12月10-11日, 大宮
 24. Koibuchi N. Current trends and perspectives for in vivo/in vitro researches of environmental chemicals. (Invited Speaker) International symposium on the environmental risks of chemicals. Dec 9-10, 2007. Ohmiya, Japan
 25. 鯉淵幸生. 化学療法外来におけるチーム医療の導入. 第69回日本臨床外科学会, 2007年11月29日-12月1日, 横浜
 26. 鯉淵幸生. 拡散強調MRI画像による乳癌病変検出感度の検討. 第17回日本乳癌検診学会, 2007年11月21-22日, 横浜
 27. 堀口 淳. 抗癌剤感受性試験より見た triple negativeとnon-triple negative乳がんの個別化治療. 第45回日本癌治療学会, 2007年10月24-26日, 京都
 28. 鯉淵幸生. 群馬大学における外来化学療法の実状 乳癌患者を中心に. 第45回日本癌治療学会, 2007年10月24-26日, 京都
 29. Koibuchi N. PCB and thyroid hormone action. (Invited Speaker) 8th International Workshop on Resistance to Thyroid Hormone and Action. Oct 9-11, 2007. Portugal
 30. Koibuchi N. Effect of environmental chemicals (environmental hormones) on nuclear hormone receptor signaling. (Symposist) XVI Seminar National Ikatan Ahli Ilmu Faal Indonesia (インドネシア生理学会) July 26-28, 2007. Indonesia
 31. 堀口 淳. HER2陽性進行乳癌に対するタキソールとハーセプチン術前治療. 第15回日本乳癌学会総会, 2007年6月29-30日, 横浜
 32. 鯉淵幸生. 若年者乳癌発見におけるMRI拡散強調画像の有用性の検討. 第15回日本乳癌学会総会, 2007年6月29-30日, 横浜
 33. 小田原宏樹. 乳癌細胞におけるPCBによる核内ホルモン受容体を介する転写の

- 活性化－. 第15回日本乳癌学会総会, 2007年6月29-30日, 横浜
34. 鯉淵典之. げっ歯類小脳における周産期甲状腺機能低下症による発達異常とその分子機構. 第80回日本内分泌学会学術総会, 2007年6月14-16日, 東京
 35. 岩崎俊晴. 発光標識核酸による「タンパク-タンパク-DNA結合」検出のためのin vitroアッセイの開発とそれを用いたER-SMRT結合の解析. 第80回日本内分泌学会学術総会, 2007年6月14-16日, 東京
 36. Horiguchi J. Combined neoadjuvant weekly paclitaxel and trastuzumab for HER2-overexpressing breast cancer. American Society of Clinical Oncology June 1-5, 2007. Chicago
 37. 堀口 淳. 原発性乳癌の腫瘍部と非腫瘍部におけるdihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) とthymidine phosphorylase (TP)の発現－化学療法の腫瘍部および非腫瘍部のDPD, TPの影響について－. 第107回日本外科学会, 2007年4月11-13日, 大阪
 38. 鯉淵幸生. 外来化学療法チーム医療における乳腺外科医の役割. 第107回日本外科学会総会, 2007年4月11-13日, 大阪

[図書] (計7件)

1. 岩崎俊晴. 現代人を取り巻く疾病生物の事典 (石原、坂井他編). 朝倉書店, in press
2. 飯野佑一, 鯉淵幸生. 特集: 合成ステロイドホルモン－乳癌－. 日本臨床 66, pp168-173, 2008
3. 鯉淵典之. 乳房 In: 岡田隆夫 (編) カラーイラストで学ぶ集中講義生理学. メジカルビュー, pp. 290-291, 2008
4. 鯉淵典之. 内分泌、栄養、代謝系 In: 岡田隆夫 (編) カラーイラストで学ぶ集中講義生理学. メジカルビュー, pp. 292-319, 2008
5. 鯉淵典之. 栄養の消化と吸収解剖生理学クリアブック (日本生理学会教育委員会編). 医学書院, pp14-33, 2007
6. 飯野佑一. 乳腺の腫瘍性疾患－乳腺Paget病－外科治療増刊－. 腫瘍外科治療の最前線－96, pp373-377, 2007
7. 飯野佑一. 乳腺炎の診断と治療－産褥性以外の慢性乳腺炎－. 産婦人科治療別冊 97, pp517-521, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀口 淳 (HORIGUCHI JUN)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 70272242

(2) 研究分担者

鯉淵 幸生 (KOIBUCHI YUKIO)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号: 10323346

岩崎 俊晴 (IWASAKI TOSHIHARU)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 80375576

鯉淵 典之 (KOIBUCHI NORIYUKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 80234681

飯野 佑一 (IINO YUICHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 50124649

小田原 宏樹 (ODAWARA HIROKI)

群馬大学・医学部・医員

研究者番号: 10420134