

平成21年 5月27日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791144

研究課題名（和文） エストロジェンの増殖抑制作用の発現メカニズムの解明

研究課題名（英文） Study on the mechanisms for the antimitogenic action of estrogens

研究代表者

三井 哲雄 （MITSUI TETSUO）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：20402084

研究成果の概要：

エストロジェンはエストロジェン感受性組織において、細胞増殖を促進することによって、これらの組織の正常な成長、発達を調節している。一方で、我々は、下垂体前葉のプロラクチン産生細胞の増殖に対するエストロジェンの作用について検討した結果、insulin-like growth factor-1等の成長因子の存在下では、エストロジェンが細胞増殖を逆に抑制するという興味深い現象を見出した。本研究課題では、このエストロジェンの増殖抑制作用に関与している可能性のある遺伝子を見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：(1) マイクロアレイ (2) 遺伝子 (3) シグナル伝達 (4) 細胞増殖 (5) エストロジェン

1. 研究開始当初の背景

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において、エストロジェンは細胞増殖を促進することによって生殖機能、およびこれらの組織の正常な成長、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、エストロジェン依存性腫瘍の発症病理にも関与しており、従来からこのエストロジェンの細胞増

殖促進作用について、多くの研究が行われている。これに対して、我々は、下垂体前葉のプロラクチン(PRL)産生細胞の増殖に対するエストロジェンの作用について検討した結果、insulin-like growth factor-1 (IGF-1)等の成長因子の存在下では、エストロジェンが細胞増殖を逆に抑制するという興味深い現象を見出した。さらに、このエストロジェンの細胞増殖抑制作用に関与する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により調べた結果、細胞増殖に

関与する転写因子である、nuclear factor | B (NF-| B)ファミリー遺伝子が複数含まれている事を見出した。

このことから、これらの転写因子がエストロジェンの細胞増殖抑制作用に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

エストロジェンによって下垂体前葉のプロラクチン(PRL)産生細胞の増殖が抑制される時に、その発現が変化する遺伝子を DNA マイクロアレイ法によって網羅的に調べた結果、複数の候補遺伝子を見出した。

このことから、

- (1) これら候補遺伝子について real-time reverse transcription (RT)-PCR 法を用いて、エストロジェンの増殖抑制作用に伴って変化する遺伝子を同定する。
- (2) さらに、同定した遺伝子について、これを強制発現、あるいは発現抑制させて、エストロジェンの増殖抑制作用に対して、どのような影響があるかを調べる。

このエストロジェンの増殖抑制作用に関与する遺伝子を同定する事は、未だ明らかではないエストロジェンの増殖抑制作用の細胞内情報伝達経路の解明への第一歩となるのみならず、エストロジェン依存性腫瘍の発症メカニズムの解明と、これらの腫瘍に対する治療薬の開発にも大きく貢献すると考えられる。

3. 研究の方法

- (1) 雌ラットの下垂体前葉組織をトリピ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) 下垂体前葉培養細胞に、対照群として IGF-1 (50 ng/ml)を単独投与し、実験群には IGF-1 及び estradiol (E2) (1 nM)を同時投与した。投与4時間後に培養細胞から total RNA を抽出し、これらの対照群と実験群の間で real time RT-PCR 法で調べ、DNA マイクロアレイ実験の結果を確認した。
- (3) エストロジェンの増殖抑制作用に伴い、発現量が低下した、nuclear factor | B (NF-| B)ファミリー遺伝子の一つである、Bcl-3 を強制発現させるために、非増殖性アデノウィルスから、テトラサイクリン誘導性に Bcl-3 を発現するベクターを作製した。また、コントロールとして β -gal を発現するベクターも作成し、これらアデノウィルスベクターをラット無血清培養下垂体細胞に感染させた。IGF-1

あるいは E2 の投与直前に、Doxycycline を投与し、24 時間後におけるプロラクチン産生細胞の増殖率を調べた。

- (4) 細胞の増殖率測定には、培養終了前に 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、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。この実験方法によりアデノウィルスベクターを介して発現させた遺伝子がエストロジェンの増殖抑制作用に対してどのように影響するかを調べた。

4. 研究成果

- (1) real-time reverse transcription (RT)-PCR 法による DNA マイクロアレイ実験の確認
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 (50 ng/ml)のみを、実験群には IGF-1 と E2 (1 nM)を同時投与し、4 時間後に Total RNA を抽出して、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った結果、E2 投与により、79 個の遺伝子発現が増加し、88 個の遺伝子発現が減少していた。これら発現量が増加した遺伝子 (Pdlim3, Rasd1, Ephb2, Pim3, Nfix 等)、また減少した遺伝子 (Nptx1, mybl1, Nfkb2, Sepine1, Bcl3 等) それぞれ 12 個ずつ real time RT-PCR により調べた結果、いずれも DNA マイクロアレイによる遺伝子発現変化と同様に遺伝子発現が変化している事を確認した。

- (2) エストロジェンの増殖抑制作用に伴う遺伝子発現変化の増殖刺激特異性に関する検討

さらに、上で調べた遺伝子について、非投与群、IGF-1 単独投与群、E2 単独投与群、IGF-1 及び E2 同時投与群を設け、得られた total RNA を real time RT-PCR 法によって調べた。その結果、IGF-1 存在下で E2 投与により発現量が増加した遺伝子の中には、IGF-1 と相乗的に発現量が増加する遺伝子、独立して増加する遺伝子、及び拮抗して増加する遺伝子に分類されることが示された。これらの結果から、E2 投与により発現量が増加した遺伝子の一部が、プロラクチン産生細胞に対する E2 の増殖抑制作用と関係していることが示唆された。

- (3) プロラクチン産生初代培養細胞の増殖に対するアデノウィルス感染の影響の検討

上の結果から、E2 投与により発現量が減少した遺伝子を、下垂体細胞に過発現させるために、初代培養細胞において効率よく感染し、

テトラサイクリン誘導性に目的遺伝子を発現させるため、非増殖性アデノウイルス (Δ E1, E3) ベクターを用いる事にした。この予備実験として、テトラサイクリン誘導性に β -gal を発現するベクター (Ad-Tet.On + Ad-TRE/ β -gal)、蛋白非発現ベクター (Ad-emp) を作製し、下垂体細胞に感染させ、細胞増殖に対する影響について検討した。その結果、Ad-Tet.On + Ad-TRE/ β -gal の感染は、PRL 細胞の基礎増殖を促進したが、増殖に対する forskolin、IGF-1 単独の作用及び IGF-1 存在下の estradiol の増殖抑制作用には影響を及ぼさなかった。一方で、基礎増殖の促進は、Ad-emp 感染によっても見られたことから、アデノウイルス感染自身によることが示された。

(4) 薬理的な NF- κ B シグナル伝達系の抑制による下垂体プロラクチン産生細胞の増殖に対する影響

エストロジェンの細胞増殖抑制作用に関する遺伝子を DNA マイクロアレイ法、及び Real-time RT-PCR 法により調べた結果、細胞増殖に関する転写因子である、nuclear factor κ B (NF- κ B) ファミリー遺伝子のいくつかの遺伝子発現が減少している事を見出した。このことからエストロジェンの細胞増殖抑制作用に NF- κ B シグナル伝達系の抑制が関与している可能性が考えられた。このため、薬理的な NF- κ B シグナル伝達系の抑制剤である BAY 11-7082 を IGF-1 投与の直前に、0~100 μ M 投与し、プロラクチン産生細胞増殖に対する影響を調べた。その結果、BAY 11-7082 用量依存的に IGF-1 依存的なプロラクチン産生細胞の増殖が抑制される事が分かった。

(5) Bcl-3 遺伝子の過発現によるエストロジェンの細胞増殖抑制作用に対する影響

上の薬理的な NF- κ B シグナル伝達系の抑制の結果、さらに、遺伝子発現解析の結果から、NF- κ B ファミリー遺伝子の一つである、Bcl-3 遺伝子発現の低下に着目した。エストロジェン作用時のこの遺伝子発現低下を、アデノウイルスベクターを介して Bcl-3 遺伝子発現を補うことでエストロジェンによる増殖抑制作用が阻害されるかどうかを調べた。テトラサイクリン誘導性に Bcl-3 を発現するアデノウイルスベクター (Ad-Tet.On + Ad-TRE/Bcl3) を作製し、またコントロールとしては、 β -gal を発現するアデノウイルスベクター (Ad-Tet.On + Ad-TRE/ β -gal) を、下垂体細胞に感染させた。Doxycycline 投与によりコントロールとして β -gal を過剰発現させた場合には、エストロジェンによるプロラクチン産生細胞増殖抑制作用に対する影響は見られなかった。一方で、Ad-TRE/Bcl-3 を感染

させても Doxycycline 非投与時にはエストロジェンによるプロラクチン産生細胞増殖抑制作用に対する影響は見られなかったが、Doxycycline 投与によって Bcl-3 を過剰発現させると、その抑制作用が消失した。

以上のことから、エストロジェンによる IGF-1 誘導性のプロラクチン産生細胞増殖に対する抑制作用の発現には、少なくとも Bcl-3 遺伝子発現の抑制が関与することが示唆された。

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 2 件)

- ①. Z. Wang, T. Mitsui, M. Ishida, J. Arita, Adenovirus vectors differentially modulate proliferation of pituitary lactotrophs in primary culture in a mitogen and infection time-dependent manner. J. Endocrinol. 198 (1) 209-217, 2008. 査読有り
- ②. M. Ishida, T. Mitsui, K. Yamakawa, N. Sugiyama, W. Takahashi, H. Shimura, T. Endo, T. Kobayashi, J. Arita, Involvement of cAMP response element-binding protein in the regulation of cell proliferation and the prolactin promoter of lactotrophs in primary culture, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 293 (6) E1529-E1537, 2007. 査読有り

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ①. 石田真帆、三井哲雄、有田順、プロラクチン産生細胞の増殖制御に関するエストロジェン作用、公募シンポジウム「下垂体前葉細胞の分化制御の新展開」第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009 年 4 月 24 日、前橋
- ②. 三井哲雄、王振華、石田真帆、有田順、下垂体プロラクチン産生細胞の増殖に対するアデノウイルス感染の影響、第 54 回中部日本生理学会、2007 年 10 月 20 日、三重
- ③. 三井哲雄、王振華、石田真帆、有田順、下垂体プロラクチン産生細胞の増殖に対するアデノウイルス感染の影響、第 34 回日本神経内分泌学会、2007 年 8 月 5 日、前橋

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/physio01/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 哲雄 (MITSUI TETSUO)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・
助教
研究者番号：20402084

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし