

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09811

研究課題名(和文) エストロゲン受容体 (ER) による細胞サイズの制御機序に関する研究

研究課題名(英文) Elucidating mechanism regarding regulation of cell size through estrogen receptor alpha

研究代表者

李 忠連 (Li, Zhong-Lian)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80319532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Estrogen receptor (ER) は細胞膜、細胞質および核内に存在しており、それぞれに局在するERの機能の詳細はよく分かっていない。本研究は、子宮内膜癌細胞を用いてその役割を評価した。細胞質核型ER細胞はER陰性細胞に比べ細胞サイズが有意に大きくなっていると共に、ミトコンドリア膜電位が上昇することが確認された。ウエスタンブロット法によって解析したところ、エストロゲンE2添加により、リン酸化mTOR (Ser2448) の発現量が増加することが認められた。以上の結果より、細胞質と核内に局在するERはリン酸化mTORを介して、細胞サイズの変化に関与すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜細胞の細胞サイズ制御機構についてはこれまでにほとんど解明されていない。一方で近年、細胞サイズの制御にミトコンドリアの生合成が関係していることが報告された(Yamamoto, et al, 2014)。本研究は、細胞質と核内に局在するERはリン酸化mTORとミトコンドリアを介して、細胞サイズの変化に関与することが示唆された。本研究課題の成果はこれまでに解明されなかった哺乳類の細胞サイズを制御するための分子基盤を明らかにする可能性がある。本課題により得られるデータは、医療現場における有用な基礎知見を深めながら診断・治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The effects of estrogen on cells are mediated through the estrogen receptor (ER) which localizes at the peri-membrane, cytoplasm, and the nucleus of cells. To investigate how ER plays its roles ER-negative endometrial carcinoma cells (ER-) were stably transfected with plasmid of human ER carrying a substituted phenylalanine at position 445 with alanine (ER-F445A), which was localized at the cytoplasm and nucleus. Treated with 17 β -estrogen (E2) or bazedoxifene (BDF), the cell-size and expression of kinases related to ER were observed. The cell cycle-related changes in cell-size were found in ER-F445A cells, accompanied by the increase in mitochondrial membrane potential. The expression of mammalian target of Rapamycin (mTOR) phosphorylated at serine 2448 was decreased, which was recovered in presence of E2 in the ER-F445A cells. The present results indicate that the cytonuclear ER-F445A plays an important role in regulation of cell-size.

研究分野：産婦人科

キーワード：Estrogen receptor alpha Cell size Cancer Endometrium Uterine Subcellular

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞サイズの制御機構について

子宮内膜細胞を含めて、哺乳類の細胞サイズ制御機構についてはこれまでにほとんど解明されていない(Miettinen, et al, 2016)。現在、細胞サイズ制御機構において、蛋白質の合成を制御する mTOR-S6K-pS6 経路や MEK-ERK-Myc 経路などが注目されている(Miriam, et al, 2015)。加えて、Largen という遺伝子を強制発現させた場合、ミトコンドリアを介して、細胞サイズが大きくなることが報告された(Yamamoto, et al, 2014)。

(2) 細胞サイズの制御機構における ER の役割

ER は様々な遺伝子の発現を時間的、空間的に制御することを介して、その役割を果たすと考えられている(Newbold, et al, 2006)。また、細胞膜、細胞質、および細胞の核に存在している ER は、それぞれが特異的な役割を有すると報告されている(Tecalco-Cruz, et al, 2017)。一方、ER を介する DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな制御システムが、子宮内膜組織における遺伝子の特異的な発現や、細胞の機能的な分化に関与している。それらの制御システムの異常により、癌を初めとして様々な疾病が起こることが明らかになりつつある(Siersbæk, et al, 2018)。

細胞サイズの制御機構における ER の役割に関する研究はこれまでに報告されていない。しかしながら上述した細胞サイズの制御に関わる各経路は、ER の下流に位置するか、あるいは ER とのクロストークを有することが認められている。その一方で、ER がこれらの経路に直接的にかかわっているかはこれまでに明らかになっていない。

2. 研究の目的

子宮内膜癌は、細胞サイズの不均一や形態異常などの異型性が認められているが、その発症機序については不明な部分も多い。本研究では ER が子宮内膜癌細胞において細胞サイズを制御する分子機序の同定を試みた。

3. 研究の方法

ER を発現していない Ishikawa 子宮内膜癌細胞株 (ER 陰性型) に ER 強制発現ベクターを恒久的に導入することによって、細胞膜 (細胞膜型 ER)、細胞質 (細胞質型 ER)、細胞質と細胞核 (細胞質核型 ER)、細胞膜、細胞質、および細胞核 (野生型 ER) に、それぞれ ER を発現する細胞株を作成した。これら細胞内局在の異なる ER を持つ細胞株における細胞特性の変化を解析した。

AlamarBlue アッセイによって細胞増殖能、スクラッチアッセイと IncuCyte Live-Cell Analysis System (Essen BioScience, MI, USA) によって細胞遊走能について測定した。細胞サイズの変化の検証は、FACS (BD 社) を用いて細胞周期と細胞体積を測定することによって行った。総タンパク質量定量キット (TFS 社) と Click-iT HPG Alexa Fluor 594 蛋白質合成測定 Kit (TFS 社) を使用して総タンパク質量を測定した。ER シグナルパスウェイ上の各種タンパクレベルおよびリン酸化レベルについてウエスタンブロット法によって解析を行った。ミトコンドリアの機能的な変化は、蛍光色素である TMRE を用いて、細胞のミトコンドリア膜電位を FACS (BD 社) で測定することによって評価した。

4. 研究成果

本研究は、ER を発現していない Ishikawa 子宮内膜癌細胞株 (ER 陰性型) に ER 強制発現ベクターを恒久的に導入することによって、細胞膜 (細胞膜型 ER)、細胞質 (細胞質型 ER)、細胞質と細胞核 (細胞質核型 ER)、細胞膜、細胞質、および細胞核 (野生型 ER) に、それぞれ ER を発現する細胞株を作成した。これら局在の異なる ER を持つ細胞株における、「細胞サイズ」と、細胞サイズと密接に関係することが知られている細胞増殖能、細胞周期、ミトコンドリアの活性およびタンパク合成能などを解析した。また、ER シグナル経路上の各種タンパク質レベルおよびリン酸化レベルについて検討を行った。

結果として、細胞質核型 (ER ER -F445A) では、細胞の増殖能 (図 1) と遊走能 (図 2) はエストロゲン (E2) 添加により亢進し、エストロゲン (E2) あるいはエストロゲンモジュレーターである bazedoxifene (BDF) によって抑制することが確認された。一方で ER 陰性型 (ER -) では、エストロゲンや BDF の添加によるこれらの変化は認められなかった。シグナル経路上のタンパク質およびリン酸化レベルをウエスタンブロット法によって解析したところ、両細胞において、非リン酸化 mTOR の発現量には変動が見られなかった (図 3)。一方細胞質核型 ER では E2 添加により、リン酸化 mTOR (Ser2448) の発現量が増加するが (図 3)、リン酸化 FAK (Try297) の発現量が低下すること (図 3) が認められた。また、増殖能が変化し細胞周期にも影響を与えていることから、細胞のサイズについても解析したところ、細胞質核型 ER は ER 陰性型に比べ細胞サイズが有意に大きくなっていることが確認された (図 4)。これらの変化と共に、ミト

ミトコンドリア膜電位が有意に上昇することが認められた (図5)。

本研究は、細胞質と核内に局在する ER α はリン酸化mTOR とミトコンドリアを介して、細胞サイズの変化に関与することが示唆された。本研究課題の成果はこれまでに解明されなかった哺乳類の細胞サイズを制御するための分子基盤を明らかにする可能性がある。本課題により得られるデータは、医療現場における有用な基礎知見を深めながら診断・治療法の開発につながることを期待される。

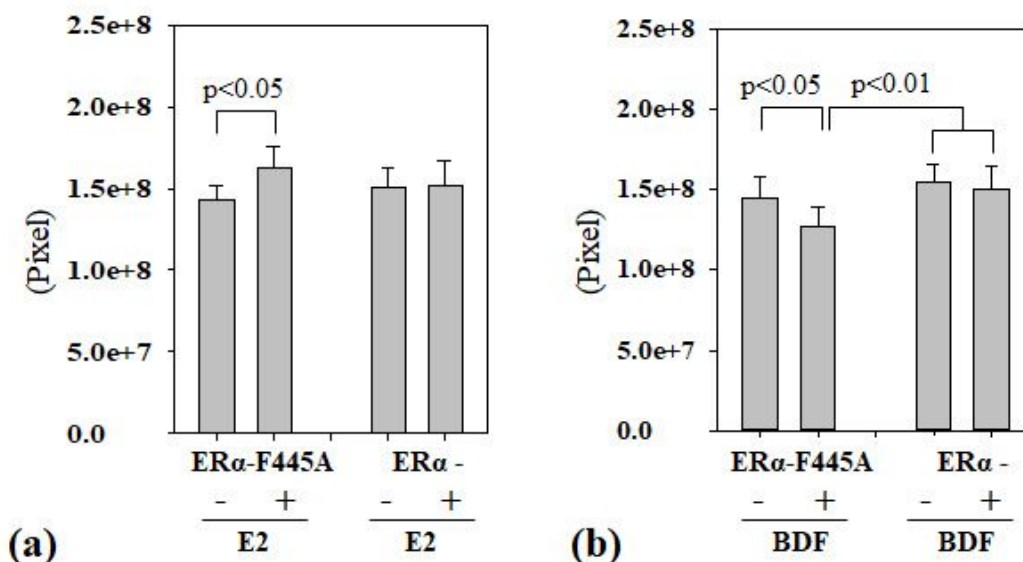


図1. AlamarBlue assay of ER α -negative endometrial carcinoma (ER α -) cells transfected with plasmid of human ER α carrying a substituted phenylalanine at position 445 with alanine (ER α -F445A). The effects of ER α -F445A on cell proliferation were observed without (-) or with (+) addition of 40 nM E2 (a) or 40 μ M bazedoxifene (BDF) (b) to culture medium for 24 hours.

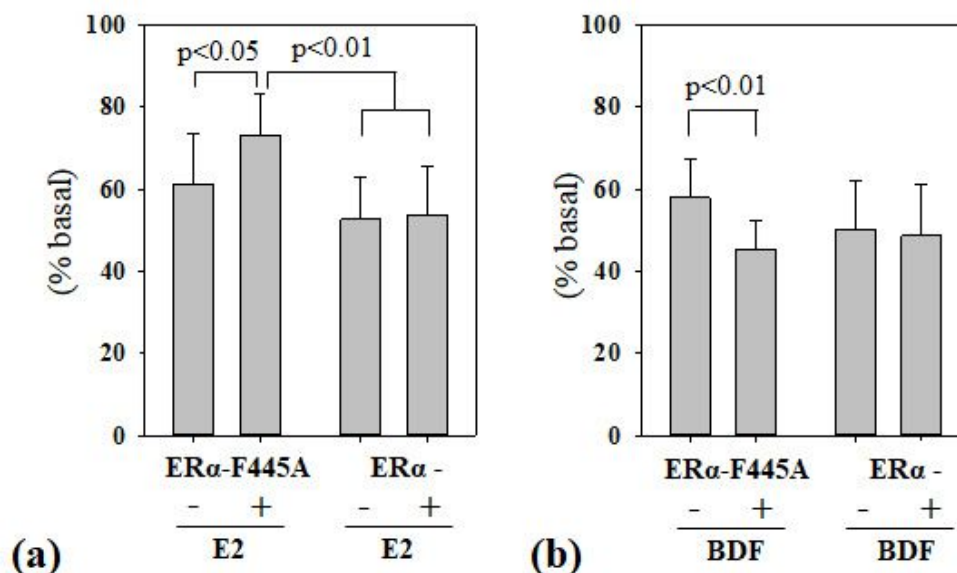


図2. Scratch assay of ER α -negative endometrial carcinoma (ER α -) cells transfected with plasmid of human ER α carrying a substituted phenylalanine at position 445 with alanine (ER α -F445A). The wound-healing effects were observed for 24 hours (hr) without (-) or with (+) or addition of 40 nM 17 β -estradiol (E2- or +) or 40 μ M bazedoxifene (BDF- or +). The percentages of wound-healing area in 24 hr against basal area at 0 hr are presented for ER α -F445A and ER α - cells treated without or with E2 (a) or BDF (b).

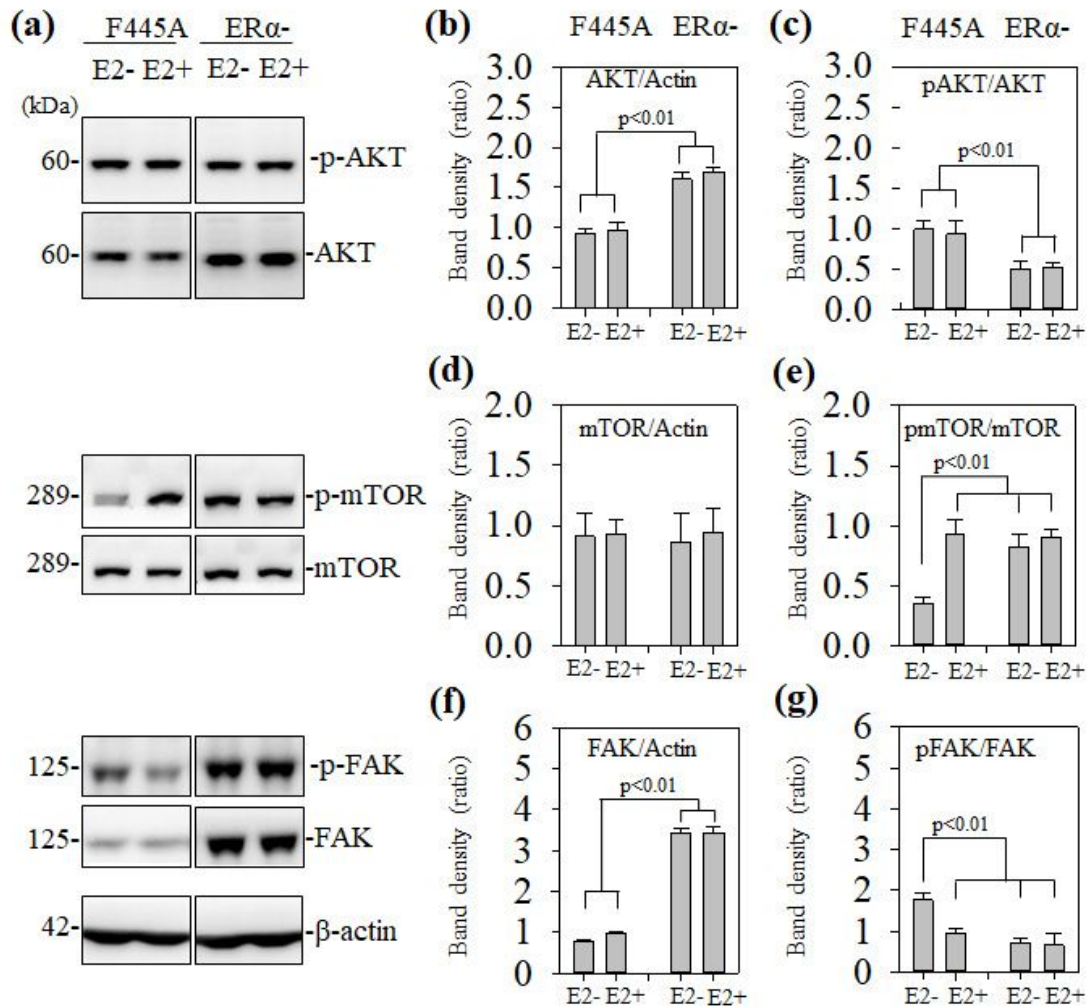


图 3. Western blot analysis (a) of ER α -negative endometrial carcinoma (ER α -) cells transfected with plasmid of human ER α substituted phenylalanine at position 445 with alanine (ER α -F445A). ER α -F445A and ER α - cells were treated without (-) or with (+) 40 nM 17 β -estradiol (E2- or +) for 24 hours. The amount of expression is shown in the relative intensity of immunoblot bands for the nonphosphorylated AKT (b), mTOR (d), and FAK (f) normalized to actin, respectively. The amount of the phosphorylated molecule was normalized to that of its non-phosphorylated one: p-AKT (c), for AKT phosphorylated at serine 473 (Ser473); p-mTOR (e), mTOR phosphorylated at serine 2448 (Ser2448); and p-FAK (g), FAK phosphorylated at tyrosine 397 (Tyr397).

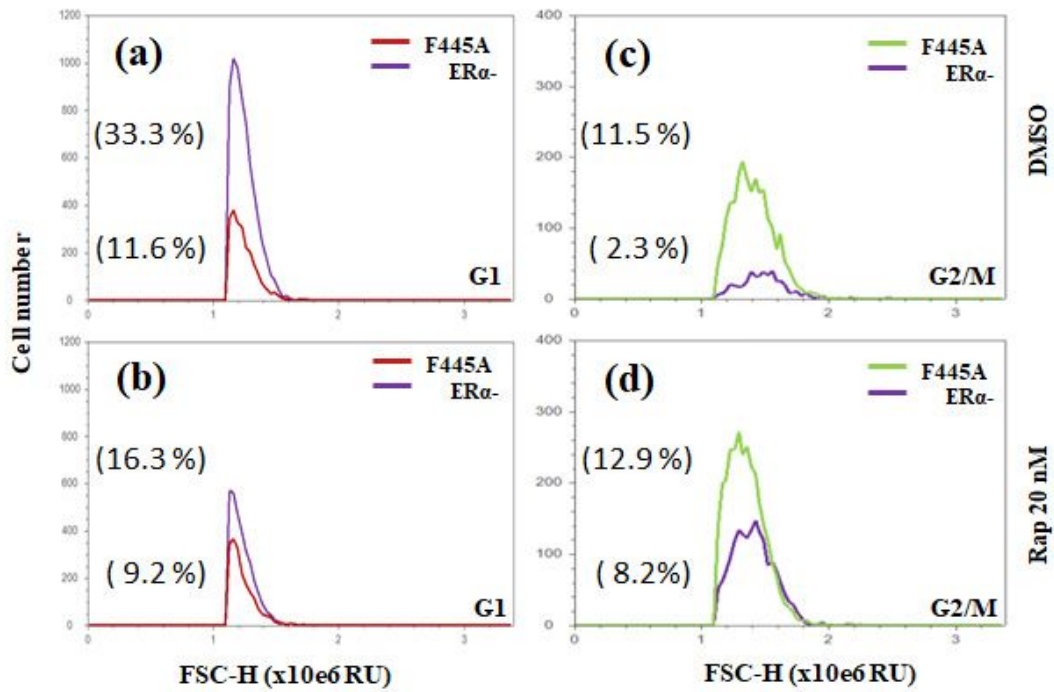


Fig 4. FACS analysis of ER α -negative endometrial carcinoma (ER α -) cells transfected with plasmid of human ER α carrying a substituted phenylalanine at position 445 with alanine (ER α -F445A). Cell cycle was observed using for 24 hours (hr) without (a, c) or with (b, d) addition of 20 nM rapamycin (DMSO or Rap). The percentage of cells and cell size in G1 or G2/M phase are shown.

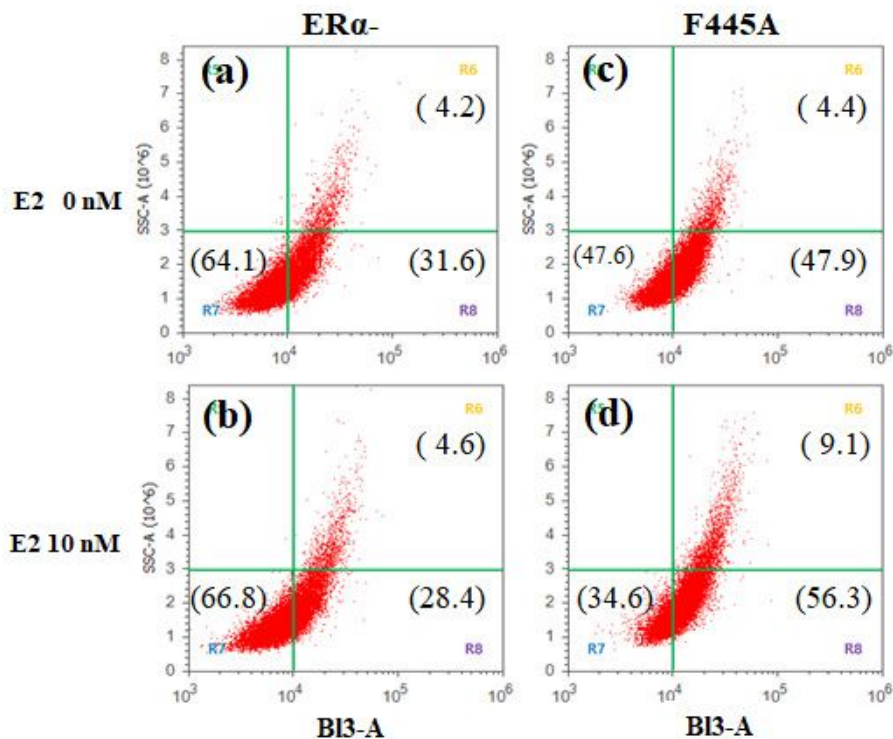


Fig 5. FACS analysis of ER α -negative endometrial carcinoma (ER α -) cells transfected with plasmid of human ER α carrying a substituted phenylalanine at position 445 with alanine (ER α -F445A). The mitochondrial membrane potential was observed using MitoTracker Deep Red FM for 24 hours (hr) without (a, c) or with (b, d) addition of 10 nM 17 β -estradiol (E2). The percentage of cells in each gate are shown, which represent changes in mitochondrial membrane potential.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Semi M, Moriya S, Li ZL, Miyaso H, Nagahori K, Kawata S, Omotehara T, Ogawa Y, Hino H, Miyazawa K, Sakabe K, Itoh M	4. 巻 46
2. 論文標題 Cytonuclear estrogen receptor alpha regulates proliferation and migration of endometrial carcinoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tokai J Exp Clin Med	6. 最初と最後の頁 7-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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
1. 著者名 Miyaso H, Nagahori K, Takano K, Omotehara T, Kawata S, Li ZL, Kuramasu M, Wu X, Ogawa Y, Itoh M	4. 巻 31
2. 論文標題 Neonatal maternal separation causes decreased numbers of Sertoli cell, spermatogenic cells, and sperm in mic	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicol Mech Methods	6. 最初と最後の頁 56-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15376516.2020.1841865	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Koga S Sato I, Li ZL, Miyaso H, Kawata S, Itoh M	4. 巻 7
2. 論文標題 Analysis of the mylohyoid nerve in elderly Japanese cadavers for dental implant surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Exp Dent Res	6. 最初と最後の頁 20-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cre2.341	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
1. 著者名 Pieroh P, Li ZL, Kawata S, Ogawa Y, Josten C, Steinke H, Dehghani F, Itoh M	4. 巻 234
2. 論文標題 The arterial blood supply of the symphysis pubis - Spatial orientated and highly variable	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Anat	6. 最初と最後の頁 151649-151657
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aanat.2020.151649	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsuda H, Sato H, Asaumi R, Omotehara T, Kawata S, Nagahori K, Li ZL, Itoh M	4. 巻 65
2. 論文標題 Comparison of CGRP distributions in the maxillary sinus and trigeminal ganglion between elderly dentulous and edentulous humans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur J Histochem	6. 最初と最後の頁 3234-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4081/ejh.2021.3234	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

1. 著者名 Uchida S, Saimi M, Li ZL, Miyaso H, Nagahori K, Kawata S, Omotehara T, Ogawa Y, Itoh M	4. 巻 95
2. 論文標題 Effects of phosphorylated estrogen receptor alpha on apoptosis in human endometrial epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 240-250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-019-00515-0	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 -

1. 著者名 Saito T, Steinke H, Hammer N, Li ZL, Kawata S, Yasuda M, Wakao N, Koyasu H, Itoh M	4. 巻 41
2. 論文標題 Third primary branch of the posterior ramus of the spinal nerve at the thoracolumbar region: a cadaveric study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgical and Radiologic Anatomy	6. 最初と最後の頁 951-961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00276-019-02258-z	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 -

1. 著者名 永堀健太, 平井宗一, 倉升三幸, 表原拓也, 宮宗秀伸, 李忠連, 小川夕輝, 伊藤正裕	4. 巻 43
2. 論文標題 免疫寛容を受けていない精巢抗原遺伝子の同定	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本生殖免疫学会誌	6. 最初と最後の頁 27-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永堀 健太, 平井 宗一, 倉升三幸, 表原拓也, 河田晋一, 小川夕輝, 宮宗秀伸, 李忠連, 伊藤正裕
2. 発表標題 熱ショックタンパク質(HSP)免疫によるマウス自己免疫精巢
3. 学会等名 第35回日本生殖免疫学会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本間宙, 谷野雄亮, 小西浩之, 佐野秀史, 新井隆男, 織田順, 河田晋一, 宮脇誠, 李忠連, 伊藤正裕
2. 発表標題 若手医師に対する「献体による外傷手術臨床解剖学的研究会」の受講効果
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李忠連, 森谷昇太, 宮宗秀伸, 永堀健太, 河田晋一, 表原拓也, 日野浩嗣, 宮澤啓介, 阪部貢, 伊藤正裕
2. 発表標題 細胞質・核内に局在のエストロゲンリセプタ による子宮内膜癌細胞の増殖と遊走の制御機構
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 李忠連, 森谷昇太, 宮宗秀伸, 永堀健太, 河田晋一, 表原拓也, 日野浩嗣, 宮澤啓介, 阪部貢, 伊藤正裕
2. 発表標題 細胞質と核内に局在するエストロゲン受容体 は子宮内膜癌細胞の増殖と遊走を制御する
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮宗秀伸, 高野海哉、永堀健太、李忠連、表原拓也、河田晋一、倉升三幸、呉曦、小川夕輝、伊藤正裕
2. 発表標題 Early life stressと雄性生殖器系の発育—Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) から見た生殖毒性
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ミリシャット・セミ, 李忠連, 宮宗秀伸
2. 発表標題 細胞内局在の異なるエストロゲンリセプター (ER) による細胞死の制御機序
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Omotehara, Xi Wu, Miyuki Kuramasu, Kenta Nagahori, Yuki Ogawa, Shinichi Kawata, Zhong-Lian Li, Hidenobu Miyaso, Masahiro Itoh
2. 発表標題 Connection between seminiferous tubules and epididymal duct is induced before the sex differentiation
3. 学会等名 第42回日本分子生物学学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Omotehara, Miyuki Kuramasu, Kenta Nagahori, Xi Wu, Shinichi Kawata, Zhong-Lian Li, Hidenobu Miyaso, Masahiro Itoh
2. 発表標題 Immunohistological study for the connection between the testis and epididymis
3. 学会等名 第59回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 表原拓也, 倉升三幸, 呉曦, 永堀健太, 小川夕輝, 河田晋一, 李忠連, 宮宗秀伸, 伊藤正裕
2. 発表標題 Sequential immunohistochemistry法による精細管と精巢上体管の接続過程の検討
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 石村和敬 伊藤裕之 岡野純子 岡野高之 河田光博 千田隆夫 滝川俊也 三浦岳 由留木裕子 李忠連 渡辺正仁 訳 塩田浩平(監訳)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 丸善出版株式会社	5. 総ページ数 521
3. 書名 イラストレイテッド解剖学 (リップンコットシリーズ)	

〔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	伊藤 正裕 (Itoh Masahiro) (00232471)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	
研究分担者	表原 拓也 (Omotehara Takuya) (40800545)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	
研究分担者	永堀 健太 (Nagahori Kenta) (50759561)	東京医科大学・医学部・助教 (32645)	

6. 研究組織（つづき）

	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	宮宗 秀伸 (Miyaso Hidenobu) (80422252)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	
研究分担者	矢倉 富子 (Yakura Tomiko) (20722581)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	

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