

機関番号：13501
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791547
 研究課題名（和文） エストロジェン受容体をヘテロに発現する株化細胞を用いた細胞増殖機構の解明
 研究課題名（英文） Paracrine regulation of cell proliferation between ER (+) and ER (-) cell line cells
 研究代表者
 石田 真帆（ISHIDA MAHO）
 山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
 研究者番号：80362086

研究成果の概要（和文）：エストロジェン（E2）によるエストロジェン受容体（ER α ）発現細胞を介した傍分泌的細胞増殖促進機構を調べるため、乳癌細胞株MDA-MB-231、およびこれにER α を安定的に発現させたMDA-ER細胞を用いて、MDA-ERが50%、70%、90%を占める共培養系を構築した。48時間の10 nM E2処置によりER α 強制発現細胞の増殖率が低下した一方で、ER α 非発現細胞の増殖率は上昇しなかった。

研究成果の概要（英文）：Using MDA-MB-231 cells stably transfected with estrogen receptor α (ER α), co-culture system with ER (+) and ER (-) MDA-MB-231 cells was established. The ratios of ER (+) and ER (-) cells were 1:1, 4:1, and 10:1. In all cases, treatment with 10 nM 17 β -estradiol for 48 h inhibited the cell proliferation of ER (+) cells but had no effect to promote the cell proliferation of ER (-) cells in a paracrine manner through the neighboring ER (+) cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：エストロジェン受容体、エストロジェン、乳腺株化細胞、細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

女性ホルモンであるエストロジェンは、エストロジェン受容体（ER）を介して、標的組織の正常な発達を促進すると共に、乳癌などの腫瘍の発症および進行を促進する。

ERを介したエストロジェンによる細胞増殖制御作用について以下のような知見がある。一部のER発現乳癌細胞やER発現乳腺株化細胞ではエストロジェン反応性に増殖が促進されるが、元々ERを発現しない乳癌細胞に安定的にERを強制的に発現させた場合に

はむしろ増殖は抑制される。また正常の乳腺や子宮組織においては、エストロジェン反応性に増殖するのはER非発現細胞であることが観察されている。この現象は、「エストロジェンはER発現細胞に作用して、その増殖を抑制すると共に、増殖因子の産生分泌を介して、隣接するER非発現細胞の増殖を促進する」という傍分泌説により説明されている。さらに、ERを一過性に強制発現させた場合には、細胞増殖に対するエストロジェンの作用は促進と抑制のいずれも報告されている。

2. 研究の目的

安定的 ER 強制発現細胞を使った研究では細胞集団を構成する細胞は全て ER を発現するが、一過性 ER 強制発現の細胞を使った研究では遺伝子導入効率の違いによって細胞集団に占める ER 強制発現細胞の割合が異なることが考えられる。そこで、一過性 ER 強制発現実験における結果の不一致を説明するものとして、「エストロゲンによって増殖抑制される ER 発現細胞の割合が高ければ細胞集団全体の増殖率は抑制され、ER 強制発現細胞から分泌された増殖因子によって増殖促進される ER 非発現細胞の割合が高ければ細胞集団全体の増殖率は促進される」という仮説を立てた。本研究ではこの仮説に基づき、エストロゲンにより ER 強制発現細胞から分泌される傍分泌性増殖因子に特に焦点をあて、以下のことを明らかにすることを目的とする。

(1) 本来 ER を発現しない乳腺株化細胞と、これに由来する安定的 ER 強制発現細胞とを様々な割合で共培養した実験モデルを用いて、その割合に応じてエストロゲン刺激により細胞集団全体の増殖率が変化するかどうかを調べる。さらに、両者の細胞を区別して増殖率を測定し、エストロゲンによって ER 強制発現細胞は増殖抑制される一方で、ER 非発現細胞は増殖促進されるかどうかを調べる。

(2) 正常組織の傍分泌説の場合と同様に、ER 非発現細胞のエストロゲンによる増殖促進は、共培養した ER 強制発現細胞からエストロゲン刺激によって分泌される傍分泌性増殖因子が引き起こす可能性が考えられるので、この傍分泌性増殖因子を同定する。

(3) ER 強制発現細胞では、この傍分泌性増殖因子に対する増殖促進反応が抑制されていることが想定されるので、ER 強制発現細胞において傍分泌性増殖因子の受容体発現が抑制されていないか、また受容体下流シグナル活性が低下しているか否かを調べる。

3. 研究の方法

(1) MDA-MB-231 乳腺株化細胞を用いた安定的 ER 強制発現細胞株の樹立

ER 強制発現細胞と ER 非発現細胞を共培養下において識別するため、ER 強制発現細胞を蛍光蛋白 GFP で標識する。遺伝子導入に用いる DNA コンストラクトとして、ER と GFP をポリシストロン性に発現させるため、CMV promoter 下流に ER 遺伝子と GFP 遺伝子を internal ribosomal entry site (IRES) で挟んで接続したプラスミドベクター、及び比較対照用として ER 遺伝子の代わりに luciferase 遺伝子を挿入したベクターを作成した。

先行研究で広く用いられている乳腺株化細胞 MDA-MB-231 に、遺伝子導入ベクターをトランスフェクションし、G418 薬剤選択および GFP 蛍光を指標にして安定的に ER と GFP を発現する ER 強制発現細胞株 (MDA-ER) を樹立する。同様に、luciferase 遺伝子を用いた Luc 強制発現細胞株 (MDA-Luc) も樹立し、ER 発現の比較対照として使用する。さらに ER 非発現細胞として、薬剤耐性遺伝子のみ安定的に発現する細胞株 (MDA-C) も樹立する。

(2) MDA-ER および MDA-C におけるエストロゲン応答性の増殖率の検討

MDA-ER および MDA-C を単独培養および様々な割合で共培養した後、エストロゲン

(17β -estradiol) を 10 nM の濃度になるように添加し 48 時間培養する。増殖マーカーとして bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を添加し、2 時間培養後、免疫染色法により BrdU 陽性細胞を検出し、培養細胞全体に対する BrdU 陽性細胞の割合を増殖率として求める。これにより、単独培養及び共培養条件においてエストロゲンを処置した場合の、培養細胞集団全体としての増殖率の変化を調べる。次に、共培養条件において培養後、GFP 抗体と BrdU 抗体を用いて蛍光二重免疫染色法により、GFP 抗体反応陽性細胞を MDA-ER、GFP 抗体反応陰性細胞を MDA-C として識別して検出し、各々の細胞に関してエストロゲン反応性の増殖率を測定し、エストロゲンが ER 発現細胞の増殖を抑制する一方で、ER 非発現細胞の増殖を促進するかどうかを調べる。

(3) 傍分泌性増殖因子の同定

エストロゲンによる MDA-C の増殖が MDA-ER 依存的に促進され、MDA-ER の増殖は抑制されることが確認されれば、エストロゲン刺激を受けて MDA-ER から分泌され、MDA-C の増殖を促進する増殖因子の存在が仮定される。既報の研究を元にした候補因子の MDA-ER における発現動態を、quantitative real time PCR (QPCR) 法によって検討する。エストロゲンによって発現誘導が見られた因子について、MDA-C に対する増殖促進作用の有無を調べる。さらに共培養系においてその因子の中和抗体がエストロゲンによる MDA-C の増殖促進を阻止するかどうかを調べる。

(4) 傍分泌性増殖因子の MDA-ER に対する増殖抑制作用のメカニズムの検討

同定された傍分泌性増殖因子が MDA-C の増殖を促進するのに対して、MDA-ER の増殖を促進できない原因を解明する。まず MDA-ER における傍分泌性増殖因子受容体発現の有無を、QPCR 法及びウェスタンブロッティング法により調べる。受容体が発現している場合には、さらに受容体下流シグナル伝達経路の活性化の有無を調べる。とくに extracellular regulated kinase および phosphoinositide

3-kinase/Akt の活性が、MDA-ER において低下しているかどうかを、リン酸化抗体を用いたウェスタンブロッティング法により調べる。

4. 研究成果

(1) 安定的遺伝子導入乳腺細胞株の樹立

当初、pIRES2-AcGFP1 vector を用いて、CMV promoter 制御下で ER α 遺伝子と GFP 遺伝子をポリシストロン性に接続した遺伝子コンストラクト (pIRES2-AcGFP1-ER α) を遺伝子導入することで、安定発現細胞株の樹立を試みたが、クローン化した G418 薬剤耐性細胞株には GFP 発現は認められたものの ER α の発現は認められず目的の細胞株樹立を達成できなかった。

そこでトランスフェクション試薬を変更して遺伝子コンストラクトの細胞への取り込みを促進すると共に、チャコール処理済培養血清を牛胎児血清から牛血清に変更することで細胞の増殖率を高める対策を行い、AcGFP1 よりも EGFP を用いた方が強い蛍光を検出可能であったことから、EGFP を遺伝子導入マーカーとすることとした。最終的には、遺伝子導入ベクターは、pIRESneo3 vector を用いて作成した pIRESneo3-ER α および、pcDNA3.1Zeo(+)-EGFP に変更し、EGFP と ER α あるいは Luc を独立して異なるベクターを使って導入することにした (図 1)。

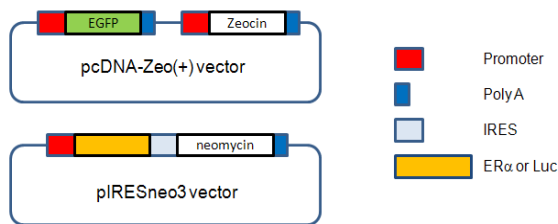


図 1. 遺伝子導入コンストラクト

G418 および Zeocin の 2 つの薬剤に耐性を示すクローンを選別し、MDA-ER として 6 クローンを樹立した (図 2)。

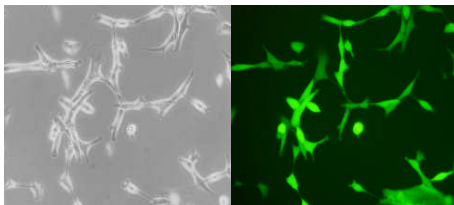


図 2. ER 強制発現細胞の一つ MDA-ER#3 における GFP 蛍光

これらのクローンにおける ER の発現は、エストロゲン受容体抗体 Ab-14 (希釈倍率 1:500) を用いたウェスタンブロッティングにより確認した (図 3)。また遺伝子導入した ER がエストロゲン応答配列 (ERE) を介して転写促進能を有するかどうかをレポーター

アッセイにより確認した。ERE を介する転写活性は、2 \times ERE を minimum thymidine kinase promoter (tk) 上流に配置した制御領域に由来する転写活性を、tk のみの制御領域に由来する転写活性で補正して評価した。レポーター遺伝子は luciferase 遺伝子を用い、アデノウイルスベクターで遺伝子導入後、Dual luciferase assay を行った。アデノウイルスベクター Ad-2ERE-tk-firefly luciferase および Ad-tk-Renilla luciferase を遺伝子導入し、1 nM のエストロジェンを 24 時間処置し、firefly luciferase の活性を、Renilla luciferase の活性で除して補正した結果、ERE 活性が、vehicle 処置群に比べて上昇することを確認した (図 4)。



図 3. MDA-ER#1-#7 における ER 発現をウェスタンブロッティングで検出した。MDA: MDA-MB-231 細胞

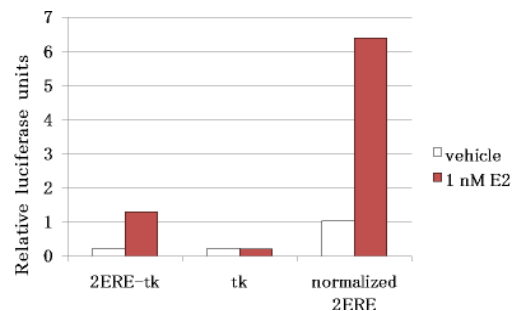


図 4. MDA-ER#3 におけるエストロゲンによる ERE レポーターアッセイ

さらに、MDA-ER 樹立と同様の手法で、対照用の MDA-luc を 8 クローン、MDA-C を 5 クローン樹立した。

(2) MDA-ER および MDA-C におけるエストロゲン応答性の増殖率の検討

① 単独培養系におけるエストロゲン応答性の増殖率の変化 (図 5)

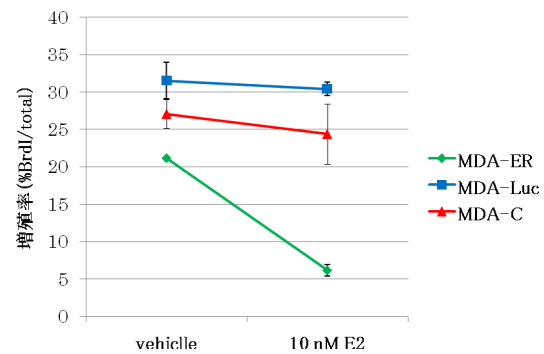


図 5

MDA-ER において、Vehicle 処置群で見られ

た約 20%の増殖率は、10 nM E2 処置によって少なくとも 48 時間後には約 10%-20%にまで低下した。このうち 24 時間の E2 処置によっても約 5%にまで増殖率が低下するクローン MDA-ER#3 を ER 強制発現細胞株として採用した。MDA-Luc および MDA-C の増殖率は Vehicle 処置群では約 30%であったが、24 時間の 10 nM E2 処置によって有意な増減は認められなかった。図 5 には各細胞株を 10 nM エストロジェンで 24 時間処置した場合の増殖率の変化を示した。

② 共培養系における培養集団全体としてのエストロジェン応答性の増殖率の変化 (図 6)

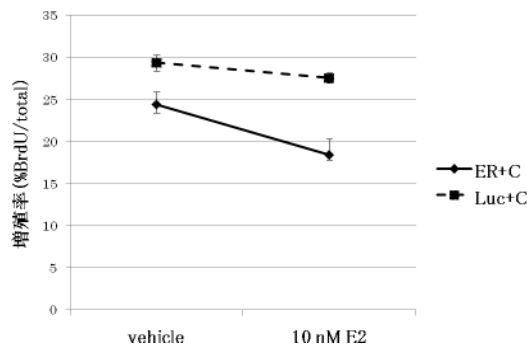


図 6

MDA-ER と MDA-C を、1:1、4:1、10:1 の割合で共培養し、10 nM のエストロジェンを 24 時間処置し、共培養集団全体としての増殖率の変化を検討した結果、いずれの割合においても、培養集団全体としての増殖率の上昇は認められなかった。図 6 には MDA-ER と MDA-C を 4:1 の割合で共培養した場合の増殖率の変化を代表として示す。

③ 共培養系における MDA-ER と MDA-C のエストロジェン応答性の増殖率の変化 (図 7A、B)

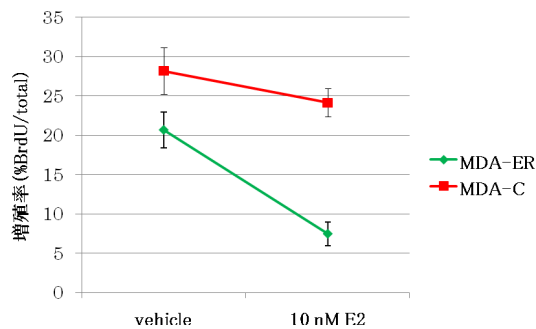


図 7A

MDA-ER と MDA-C を、1:1、4:1、10:1 の割合で共培養し、10 nM のエストロジェンを 24 時間処置した。いずれの割合においても MDA-ER の増殖率が低下した一方で、MDA-C の増殖率の上昇は認められなかった。図 7A には、MDA-ER と MDA-C を 4:1 の割合で共培養し、GFP 蛍光を指標に区別して検出した各細胞の増殖率を示した。図 7B には、対照群として MDA-Luc と MDA-C を 4:1 の割合で共培養し、

同じく GFP 蛍光を指標に区別して検出した各細胞の増殖率を示した。

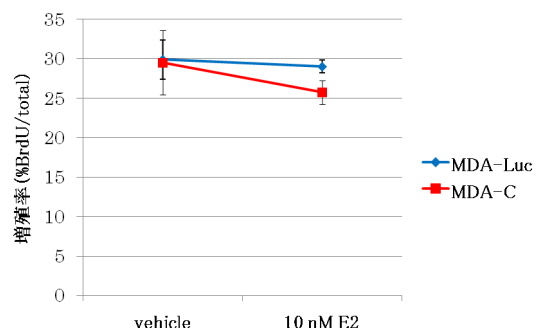


図 7B

(3) エストロジェンによる傍分泌的細胞増殖制御作用について

乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞を用いた本研究では、ER α 発現細胞と共培養した ER α 非発現細胞の増殖率は、エストロジェンによって上昇しなかったことから、エストロジェンが、ER α 発現細胞に作用して増殖因子を産生分泌させ、傍分泌的に ER α 非発現細胞の増殖を刺激するという傍分泌的増殖制御機構は認められなかった。そのため、研究方法 (3) 傍分泌性増殖因子の同定、(4) 傍分泌性増殖因子の MDA-ER に対する増殖抑制作用のメカニズムの検討には至らなかった。

MDA-MB-231 細胞では ER の発現により、増殖因子 epidermal growth factor (EGF) の受容体発現が抑制されることから、傍分泌性増殖因子が EGF 受容体に作用する因子であった場合には、本研究の仮説は成立しないと考えられる。本研究結果は、他の乳腺細胞株におけるエストロジェンによる傍分泌性細胞増殖制御作用の存在を否定するものではない。

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)
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 真帆 (ISHIDA MAHO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：80362086

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし