

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591016

研究課題名（和文） 脳とがんを標的とするエストロゲンシグナルの共通性と特異性の解明
ならびに臨床応用研究課題名（英文） Analysis of estrogen signaling specific and/or common to brain
function and cancer, and its clinical relevance

研究代表者

池田 和博 (IKEDA KAZUHIRO)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：30343461

研究成果の概要（和文）：エストロゲンは脳機能に関与している一方で、乳がんなどの増殖を促進する。本研究では、独自のエストロゲン応答遺伝子に加え、新規のエストロゲン応答遺伝子を探索し、脳とがんにおけるエストロゲンシグナルの共通性と特異性を明らかにし、臨床への応用を探ることを目的とした。マウスの海馬、視床下部、脳幹に特異的なエストロゲン応答遺伝子を同定し、それらは乳がんとも関連していることが明らかになった。また、転写因子 FOXA1、FOXP1 がエストロゲン応答遺伝子であり、乳がんの予後予測因子となることを明らかにした。以上の成果により、脳とがんにおける新たなエストロゲン応答遺伝子とその役割が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Estrogen plays important roles in brain function and breast cancer. In this study, I aimed to explore the novel estrogen-responsive genes in brain and cancer tissues for identifying specific and/or common estrogen signaling pathway between these tissues. In addition to estrogen-responsive genes that we have previously reported, clinical relevance of these estrogen-responsive genes is also explored. We identified novel estrogen-responsive genes specific in hippocampus, hypothalamus and brain stem. These novel estrogen-responsive genes are known to be associated with breast cancer. We also demonstrated that the expression of transcription factors, FOXA1 and FOXP1 is induced by estrogen in breast cancer cells and immunoreactivities of FOXA1 and FOXP1 are positively correlated with good prognosis of breast cancer patients with tamoxifen treatment. These findings would uncover novel role of estrogen signaling in brain function and cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：エストロゲン、脳、がん、転写、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

脳神経系は女性ホルモンであるエストロゲンの標的器官であり、その分化ならびに機能がエストロゲンによって巧妙に制御されている。ヒト、マウスなどの哺乳類では、胎児期に分泌されるアンドロゲンが脳ではエストロゲンに変換されて作用することにより、脳の形態的な性差を生じさせることが知られており、このような差異に基づいて行動や内分泌動態に性差が現れると考えられている。また、エストロゲンは性成熟後において、神経細胞の興奮性を変化させ、視床下部からの性腺刺激ホルモン分泌を刺激し、性行動を誘起することが知られている。さらに、エストロゲンは海馬などに作用し、記憶・学習・情動などの高次脳機能に関与していると考えられている。特に、閉経期女性の抑うつ状態、気分の変動、不安などの症状はエストロゲン低下と関連していると考えられており、エストロゲン補充療法によってこれらの更年期症状が改善されるとともに、認知機能および脳血流などの改善やアルツハイマー病発症の予防にも効果があることが知られている。このようなエストロゲンの認知機能やアルツハイマー病の予防に対する効果については、従来一部異論のある状況であったが、最近の研究により、エストロゲン補充療法の開始時期（閉経周辺期かその後か）によって効果が分かれることが判明してきた。閉経後数年経って開始したホルモン補充療法では却ってアルツハイマー病が増加する傾向のあることが報告されている。このように、エストロゲンは脳の機能に密接に関与しているが、そのシグナル経路は十分に明らかではない。エストロゲン補充療法は一方で、乳がん、子宮がんの危険率を高めることが知られており、脳とがんにおけるエストロゲンシグナルの特異性と共通性を解明することにより、新たな内分泌療法が可能になると考えられる。

エストロゲンは標的細胞の核内に存在するエストロゲン受容体 (ER α と ER β) に結合する。ER はホルモン依存性の転写因子であり、ゲノム中のエストロゲン応答配列(ERE) に結合してその近傍の標的遺伝子の発現量を直接制御することによりエストロゲンの作用を媒介する。申請者らは乳がん・子宮内膜がんにおけるエストロゲンの作用メカニズムを明らかにする目的で新規エストロゲン応答遺伝子の同定ならびにその機能解析を行ってきた。中でも、独自に開発した Genomic binding-site (GBS) cloning 法によってエストロゲン応答配列を単離し、その近傍に新たなエストロゲン応答遺伝子として RING フィンガーを有する Efp を同定した。Efp は細胞周期のブレーキ役 14-3-3 σ の破壊

を担うユビキチンリガーゼであることを解明し、細胞周期制御ならびにがん耐性獲得の新しいメカニズムを提唱した。また、乳がん組織において Efp の発現は上昇しており、予後と相関することを解明した。Efp 以外のエストロゲン応答遺伝子として、EBAG9、COX7RP、NR2D を含む複数の標的遺伝子を同定した。EBAG9 は腫瘍免疫に関わる腫瘍マーカーであることを明らかにし、その発現制御と機能解析を行ってきた。COX7RP はエネルギー代謝に関与することを明らかにしつつある。脳におけるエストロゲン応答遺伝子の解析として、グルタミン酸受容体サブユニットの1つである NR2D が、雌マウスの性行動であるロードシスに関与することを明らかにしている。また、ラットの脳部位特異的なエストロゲン応答遺伝子を同定している。本研究はこれら独自の研究成果である Efp、COX7RP、EBAG9 に加え、申請者がこの研究で新たに解析するエストロゲン応答遺伝子の脳とがんにおける共通性ならびに特異性を明らかにすることによって、内分泌治療の新しい標的を見出すことができると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、マウスの脳におけるエストロゲン応答遺伝子を網羅的に探索し、特に、性行動、記憶、アルツハイマー病などに深く関与する海馬、視床下部、脳幹に特異的なエストロゲン応答遺伝子をリストアップする。これらのエストロゲン応答遺伝子の発現調節メカニズムならびに細胞内作用メカニズムを神経細胞と乳がん細胞において解析し、特異性と共通性に着目して比較する。この解析によって導き出される脳と乳がんに共通のエストロゲン応答遺伝子については、臨床乳がんサンプルを用いて病理学的解析を行い、新たな分子標的の可能性について評価する。また、申請者らが独自に同定し、解析を進めているがんにおけるエストロゲン応答遺伝子のノックアウトマウス (Efp ノックアウトマウスなど) の性行動、不安行動、活動量、社会行動、協調運動、学習・記憶、うつ行動などに関する一連の行動解析を行って、生体レベルにおける作用を解明する。これらのがんに関係の深い独自のエストロゲン応答遺伝子の発現制御、細胞内作用メカニズムの知見に関して、神経細胞においても同様の作用を有するか検証し、脳とがんにも共通もしくは特異的な分子作用機構を解明していく。以上の脳とがんとの両面からの解析により、脳とがんの両者におけるエストロゲンシグナルの統合的な解明を目指す。本研究によって、脳とがんそれぞれ特異的な、あるいは共通の分子標的としてのエストロゲン応答遺伝

子の候補を明らかにすることができれば、内分泌治療における副作用の少ない新たな分子標的の開発に繋がると期待できる。

3. 研究の方法

脳におけるエストロゲン応答遺伝子を探索するため、卵巣除去マウスにエストロゲンを投与し、海馬、視床下部、脳幹に分けて RNA を採取し、マイクロアレイ法にてエストロゲン応答遺伝子を探索した。同定された候補遺伝子について、定量的 PCR 法を施工し、エストロゲン誘導性の脳部位特異的発現を検証した。これら候補となる遺伝子について、神経系と乳がんにも共通の、または特異的な発現制御機構を調査した。さらに、これら候補遺伝子のウイルスベクターによる過剰発現系、siRNA によるノックダウン系、および抗体を作製し、細胞増殖に対する影響などを解析した。申請者らがエストロゲン応答遺伝子として独自に単離し、乳がんなどにおいて解析を行っている Efp および COX7RP は脳においても発現していることが確かめられているが、その機能については明らかではない。これらの遺伝子については既に、発現制御と機能に関する知見が蓄積されている。これら Efp および COX7RP 遺伝子のノックアウトマウスを用いて一連の行動解析バッテリーによる検討を行い、不安行動、活動量、社会行動、協調運動、学習・記憶、うつ行動に影響が見られないか検討した。また、交配実験を行って、性行動、保育行動に影響が見られないかを併せて検討し、脳機能における新規役割を探った。

4. 研究成果

脳におけるエストロゲン応答遺伝子を探索するため、卵巣除去マウスにエストロゲンを投与し、海馬、視床下部、脳幹に分けて RNA を採取し、マイクロアレイ法にてエストロゲン応答遺伝子を網羅的に探索した。このエストロゲン応答遺伝子を検証するため、エストロゲン受容体 (ER α) ノックアウトマウスの海馬、視床下部、脳幹を用いてマイクロアレイ法を行い、発現抑制されている遺伝子を探索した。その結果、これらの3部位で特異的に発現上昇および発現減少を示す遺伝子が同定された。また、これら3部位に共通して発現上昇または発現低下する遺伝子も検出された。これらの遺伝子の中で、海馬に特異的なエストロゲン応答遺伝子として RAMP2 が同定された。RAMP2 は、アドレノメデュリンレセプターとして機能することが知られている。アドレノメデュリンは血管拡張作用を示すペプチドホルモンであるが、脳でも機能している。特に、ノックアウトマウスの解析から運動協調性、多動、過剰不安に関与することが示されている。また、視床下部では乳

がんで過剰発現していることが知られている GREB1 が同定され、脳とがんに共通のエストロゲン応答遺伝子である可能性が示唆された。このように、本研究で同定された新しいエストロゲン応答遺伝子は脳の機能に深く関与することが示唆された。また、エストロゲン応答遺伝子として独自に単離し、乳がんなどにおいて解析を行っている Efp および COX7RP の脳における機能については明らかではない。これら遺伝子のノックアウトマウスを用いて一連の行動解析バッテリーによる検討を行い、不安行動、活動量、社会行動、協調運動、学習・記憶などの解析を行った。以上の解析により、脳とがんにおける新たなエストロゲン応答遺伝子とその役割が示唆された。

次に、乳がんにおけるフォークヘッド転写因子群 (FOX) の1つである FOXA1 の発現機能調節と病理学的解析を行った。ER α 陽性乳がん細胞株 MCF7 において、エストロゲン処理により FOXA1 mRNA の発現が亢進し、この発現亢進はエストロゲンのアンタゴニストである 4-OH タモキシフェン処理により抑制されることが明らかになった。MCF7 細胞を対象に、特異的 siRNA により FOXA1 のノックダウンを行ったところ、細胞増殖能ならびに遊走能の低下が観察された。さらに、エストロゲン応答配列 (ERE) を上流に持つレポーターコンストラクトを MCF7 細胞に導入したところ、FOXA1 のノックダウンにより、レポーター活性の低下ならびに既知のエストロゲン応答遺伝子の mRNA 発現レベルの低下が観察された。これらのことから、FOXA1 は ER を介する転写に対して促進的に働き、乳がん細胞の増殖と遊走を亢進することが示唆された。さらに、埼玉医科大学で収集された乳がん組織パラフィン切片を対象に、FOXA1 の病理組織学的解析を行った。FOXA1 の細胞核における染色は約 74% の症例で観察された。また、FOXA1 免疫反応性との負の相関がグレードと腫瘍径で観察され、一方で正の相関が ER α 発現、PgR 発現ならびに FOXP1 発現との間で観察された。

続いて、予後情報ならびに治療経過の判明している、国立がんセンター、国立病院機構四国がんセンターならびに都立駒込病院の3施設より収集された乳がん組織パラフィン切片を対象に、FOXA1 ならびに FOXP1 の免疫組織学的解析を行い、タモキシフェン治療効果との関連について検討した。生存曲線解析ならびに多変量解析から、FOXA1 ならびに FOXP1 の免疫染色性は、いずれも Relapse-free 群で有意に多く観察され、Relapse-free survival、Overall survival のいずれの予後との間にも有意な相関を示すことが明らかとなった。さらに興味深いことに、FOXA1 と FOXP1 の共陽性場合はそれ

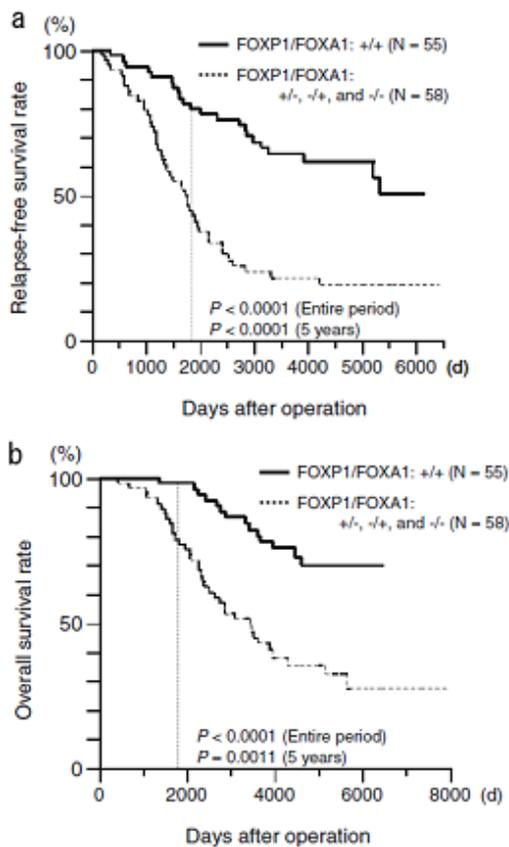


図1 FOXA1とFOXP1の免疫染色性はタモキシフェン治療を受けた乳がんの無再発生存率(a)および全生存率(b)と正の相関を有する

それぞれ単独の場合に比べ、より強い有意差をもって予後良好性を示した(図1)。これらの結果から、FOXA1とFOXP1の両方の免疫染色性が、再発乳がんのタモキシフェン治療効果規定因子として有用であ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 20 件)

① Yamaga R, Ikeda K, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Suzuki Y, Inoue S: A-sequencing of MCF-7 breast cancer cells identifies novel estrogen-responsive genes with functional estrogen receptor-binding sites. *Horm Cancer* (in press) DOI: 10.1007/s12672-013-0140-3. 査読有

② Ikeda K, Tsukui T, Imazawa Y, Horie-Inoue K, Inoue S: Conditional expression of constitutively active estrogen receptor α in chondrocytes impairs longitudinal bone growth in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 425, 912-917, 2012. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.170. 査読有

③ Abe Y, Ijichi N, Ikeda K, Kayano H, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S: Forkhead box transcription factor, forkhead box A1, shows negative association with lymph node status in endometrial cancer, and represses cell proliferation and migration of endometrial cancer cells. *Cancer Sci* 103, 806-812, 2012. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02201.x. 査読有

④ Takayama K, Horie-Inoue K, Suzuki T, Urano T, Ikeda K, Fujimura T, Takahashi S, Homma Y, Ouchi Y, Inoue S: TACC2 is an androgen-responsive cell cycle regulator promoting androgen-mediated and castration-resistant growth of prostate cancer. *Mol Endocrinol* 26, 748-761, 2012. DOI: 10.1210/me.2011-1242. 査読有

⑤ Ikeda K, Tsukui T, Tanaka D, Maruyama Y, Horie-Inoue K, Inoue S: Conditional expression of human bone Gla protein in osteoblasts causes skeletal abnormality in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 424, 164-169, 2012. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.098. 査読有

⑥ Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S: Association of double-positive FOXA1 and FOXP1 immunoreactivities with favorable prognosis of tamoxifen-treated breast cancer patients. *Horm Cancer* 3, 147-159, 2012. DOI: 10.1007/s12672-012-0111-0. 査読有

⑦ Ikeda K, Tsukui T, Horie-Inoue K, Inoue S: Conditional expression of constitutively active estrogen receptor α in osteoblasts increases bone mineral density in mice. *FEBS Lett* 585, 1303-1309, 2011. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.03.038. 査読有

⑧ Shigekawa T, Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S: FOXP1, an estrogen-inducible transcription factor, modulates cell proliferation in breast cancer cells and 5-year recurrence-free survival of patients with tamoxifen-treated breast cancer. *Horm Cancer* 2, 286-297, 2011. DOI: 10.1007/s12672-011-0082-6. 査読有

⑨ Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Fujimura T, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S: Estrogen-related receptor γ modulates cell proliferation and estrogen signaling in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 123, 1-7, 2011. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2010.09.002. 査読有

- ⑩ Oyama M, Nagashima T, Suzuki T, Kozuka-Hata H, Yumoto N, Shiraishi Y, Ikeda K, Kuroki Y, Gotoh N, Ishida T, Inoue S, Kitano H, Okada-Hatakeyama M: Integrated Quantitative Analysis of the Phosphoproteome and Transcriptome in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer. *J Biol Chem* 286, 818-829, 2011. DOI: 10.1074/jbc.M110.156877. 査読有
- ⑪ Takayama K, Tsutsumi S, Katayama S, Okayama T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Kawazu C, Hasegawa A, Ikey K, Gojyobori T, Ouchi Y, Hayashizaki Y, Aburatani H, Inoue S: Integration of cap analysis of gene expression and chromatin immunoprecipitation analysis on array reveals genome-wide androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Oncogene* 30, 619-630, 2011. DOI: 10.1038/onc.2010.436. 査読有
- ⑫ Ueyama K, Ikeda K, Sato W, Nakasato N, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S: Knock-down of Efp by DNA-modified small interfering RNA inhibits breast cancer cell proliferation and in vivo tumor growth. *Cancer Gene Ther.* 17, 624-632, 2010. DOI: 10.1038/cgt.2010.19. 査読有

[学会発表] (計 22 件)

- ① 池田和博、堀江公仁子、井上聡 : Cytochrome c oxidase subunit 7 related protein はミトコンドリアの呼吸活性を制御し、生体におけるエネルギー代謝に関与する 第 85 回日本生化学会大会 2012.12.14-16、福岡市
- ② Ikeda K, Horie-Inoue K, Mano H, Inoue S: MicroRNA profiling of tamoxifen-sensitive and -resistant breast cancer MCF-7 cells analyzed by deep sequencing. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, 2012.11.15-17, Ishikawa, Japan.
- ③ 池田和博、宮崎利明、堀江公仁子、岡本康司、井上聡 : 前立腺がん細胞における内分泌療法耐性獲得に関与するマイクロ RNA の探索 第 20 回日本ステロイドホルモン学会 2012.11.18、石川市
- ④ 池田和博、山賀亮之介、堀江公仁子、井上聡 : 乳がん細胞における全ゲノムレベルでのエストロゲン応答性転写開始点の探索と応答因子の機能解析 第 19 回日本ステロイドホルモン学会学術集会 2011.11.26、福岡市
- ⑤ 伊地知暢広、重川崇、阿部弥生、池田和博、堀江公仁子、茅野秀一、津田均、大崎昭彦、竹田省、佐伯俊昭、井上聡 : 乳がんならびに子宮内膜がんにおけるフォークヘッド転写

因子 FOXA1 の機能と臨床的意義 第 19 回日本ステロイドホルモン学会学術集会 2011.11.26、福岡市

⑥ Ikeda K, Yamaga R, Horie-Inoue K, Suzuki Y, Inoue S: Estrogen-dependent transcriptome analysis in breast cancer MCF-7 cells by RNA-sequencing. EMBO Conference, Nuclear Receptors, 2011.9.16-20, Sitges, Barcelona, Spain.

⑦ 池田和博、堀江公仁子、井上聡 : 活性型エストロゲン受容体はコンディショナルトランスジェニックマウスの骨芽細胞ならびに軟骨細胞において異なる in vivo 作用を示す 第 28 回日本骨代謝学会学術集会 2011.7.28-30、大阪市

⑧ 池田和博、津久井通、堀江公仁子、井上聡 : 骨芽細胞において活性型エストロゲン受容体を過剰発現するマウスは骨密度の増加を示す 第 33 回日本分子生物学会年会 2010.12.7-10、神戸市

⑨ 池田和博、津久井通、堀江公仁子、井上聡 : 活性型エストロゲン受容体を軟骨細胞で発現するトランスジェニックマウスの解析 第 18 回日本ステロイドホルモン学会 2010.11.27、名古屋市

⑩ 伊地知暢広、重川崇、池田和博、堀江公仁子、津田均、大崎昭彦、佐伯俊昭、井上聡 : エストロゲン関連受容体 ERRg は乳がんにおける細胞増殖とエストロゲンシグナル経路を調節する 第 18 回日本ステロイドホルモン学会 2010.11.27、名古屋市

[その他]

ホームページ等

http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div02_GRST/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 和博 (IKEDA KAZUHIRO)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 30343461

(3) 連携研究者

井上 聡 (INOUE SATOSHI)
埼玉医科大学・医学部・客員教授
研究者番号 : 40251251