

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31日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591819

研究課題名（和文） エストロジェンの増殖抑制作用の発現に関与する microRNA の同定

研究課題名（英文） Identification of the microRNA which is involved in the anti-proliferative 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（和文）：エストロジェンは、子宮、乳腺、下垂体といったエストロジェン感受性組織の細胞増殖を促進する。最近、我々は、エストロジェンがラット下垂体前葉のプロラクチン産生細胞の増殖に対して、insulin-like growth factor-1等の成長因子の存在下では、エストロジェン受容体を介した細胞増殖抑制作用を持つ事を見出した。しかしながら、どのような分子機構を介してエストロジェンの増殖抑制作用が発現するかは、未だ明らかにされていない。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 microRNA を見出した。

研究成果の概要（英文）：Estrogens stimulate cell proliferation of estrogen-responsive organs including the uterus, mammary gland, and anterior pituitary gland. Recently, we have found that 17- β estradiol (E2) had estrogen receptor-mediated anti-mitogenic action in presence of growth factors such as insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on rat lactotroph primary cell culture. However, at present, the cellular and molecular mechanisms underlying the IGF-1-dependent anti-mitogenic action of estrogen upon lactotroph remain unknown. In this study, we have found the microRNA which might be involved in the anti-proliferative action of estrogens.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
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：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：エストロジェン・下垂体・細胞増殖・microRNA・シグナル伝達

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。このことは、エストロジェンによる細胞増殖の変化はエストロジェンの促進作用と抑制作用の両者のバランスを反映していることを示唆している。さらに、エストロジェンによって下垂体前葉の PRL 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、細胞増殖に関与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一つである Bcl3 の発現量が、エストロジェンの細胞増殖抑制作用に伴い、低下している事を見出した。そこで、この Bcl3 をアデノウィルスベクターを用いて PRL 細胞に過剰発現させると、PRL 細胞のエストロジェンによる増殖抑制作用が消失することを見出した。このことは、転写因子 Bcl3 がエストロジェンの細胞増殖抑制作用に関与していることを示唆している。

2. 研究の目的

近年、タンパク質をコードしていない RNA として発見された microRNA (miRNA)が、遺伝子発現を mRNA レベルだけでなく翻訳レベルにおいても抑制することが明らかにされている。さらに、エストロジェンにより発現が誘導、あるいは抑制される miRNA が存在することが報告されており、これら miRNA が癌抑制遺伝子 PTEN といった遺伝子の発現を抑制することが示されている。そこで、『エストロジェンの増殖抑制作用に関与する Bcl3 遺伝子の発現の低下は、microRNA によって誘起される』という仮説を提唱し、本研究において、この miRNA を同定するため、下垂体前葉初代培養細胞を実験モデルとして用いて以下のことを調べる。

- (1) エストロジェンにより、細胞増殖に関与するリン酸化タンパク (Erk, Akt など) の活性化に対する影響を western blotting 法により調べる。
- (2) 先行研究により見出した、エストロジェンによる増殖抑制作用に伴い発現変化する遺伝子について、real-time reverse transcription (RT)-PCR 法を用いて、遺伝子発現の経時的な変化を詳細に調べる。
- (3) エストロジェンによる増殖抑制作用に伴い発現変化する miRNA 遺伝子を DNA マイクロアレイ法によって網羅的に調べる。
- (4) DNA マイクロアレイ法による網羅的解析の結果、エストロジェン投与により発

現に変化することがわかった miRNA 遺伝子候補の中から、細胞増殖に関与すると考えられるものについて詳細な発現変化を real-time RT-PCR により調べる。

従来、多くの研究によって、エストロジェン感受性腫瘍との関連からエストロジェンの増殖促進作用が精力的に調べられてきたが、残念ながらその作用機構は十分に解明されたとはいえない。一方、増殖抑制作用はただ単に正常細胞の増殖調節に関与するだけでなく、この抑制作用の破綻が腫瘍発症に関与する可能性が示唆される。このため、このエストロジェンの増殖抑制作用発現の分子機構の解明は、従来とは全く異なる切り口からエストロジェン依存性腫瘍の発症メカニズムの解明に寄与すると考えられる。さらに、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プシ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 (30 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 1, 2, 4, 8, 24 時間後に培養細胞から total RNA を抽出し、real time RT-PCR 法により、DNA マイクロアレイ実験の結果、E2 により発現変化した遺伝子の経時的な変化を調べた。
- (3) 下垂体前葉培養細胞に、Vehicle (対照)投与、IGF-1 (30 ng/ml)単独投与、IGF-1 及び E2 (1 nM)の同時投与の 3 群を設けた。投与 5 分後、1, 4 時間後に培養細胞からタンパク質を抽出し、western blotting 法により Akt, Erk1/2 の活性化をそれぞれのリン酸化タンパク特異的抗体を用いて調べた。
- (4) 下垂体前葉培養細胞に、対照群として IGF-1 (30 ng/ml)を単独投与し、実験群には IGF-1 及び E2 (1 nM)を同時投与した。投与 3, 12 時間後に培養細胞から miRNA を抽出し、EXIQON 社の miRCURY LNA microRNA Array により発現変化する miRNA を網羅的に調べた。
- (5) 細胞の増殖率測定は、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。

4. 研究成果

(1) real-time RT-PCR 法による E2 依存性遺伝子発現の経時的変化

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 (30 ng/ml)のみを、実験群には IGF-1 と E2 (1 nM)を同時投与し、1, 2, 4, 8, 24 時間後と経時的に Total RNA を抽出して、real time RT-PCR 法により、DNA マイクロアレイ実験の結果、E2 により発現変化していた遺伝子の経時的な変化を調べた。その結果、E2 投与により、Abcg2, Wnt4, Pdlim3 は、時間経過とともに発現量が増加していた。また、Mybl1, Nfkb2, Bcl3 は、時間経過とともに、発現量が減少していた。さらに、4 時間後に発現量の増加のピークがあり、24 時間後には変化が無い、Ephb2, Batf3 や、逆に発現量の減少のピークが 4-8 時間後にある、Nptx1, Phlda1, Giot1 等がある事を見出した。

(2) エストロジェンのリン酸化タンパク質、Akt, Erk1/2 活性化に対する影響

ラット下垂体前葉の無血清初代培養細胞に、Vehicle (対照)投与、IGF-1 (30 ng/ml)単独投与、IGF-1 及び E2 (1 nM)の同時投与の 3 群を設け、投与 5 分後、1, 4 時間後に培養細胞からタンパク質を抽出し、western blotting 法により Akt, Erk1/2 の活性化をそれぞれのリン酸化タンパク特異的抗体を用いて調べた。その結果、Erk1/2 は、IGF-1 投与 5 分後には活性化し、1 時間後には平常レベルに戻っていた。Akt も IGF-1 投与 5 分後には活性化していたが、4 時間後でもやや度合いは下がるが活性化が持続していた。一方で、Erk1/2, Akt の IGF-1 による活性化に対して、E2 の同時投与による影響は認められなかった。

(3) microRNA Array によるエストロジェン反応性 miRNA の網羅的な解析

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 (30 ng/ml)を単独投与し、実験群には IGF-1 及び E2 (1 nM)を同時投与した。投与 3, 12 時間後に培養細胞から miRNA を抽出し、EXIQON 社の miRCURY LNA microRNA Array により発現変化する miRNA を網羅的に調べた。その結果、大きく発現量が変動している miRNA はそれほど見出せなかったものの、IGF-1 投与 3 時間後に、miR-872, miR-325-3p が約 2.5 倍に発現量が増加していた。また、E2 投与 3 時間後に、mir-29b, mir-196b が、12 時間後に、miR-214, miR-138, miR-34c が約 2 倍に発現量が増加していた。さらに、IGF-1 単独投与に対して、E2 の同時投与により、3 時間後に、miR-34b, miR-184 が約 0.4 倍に、投与 12 時間後には、miR-26a が約 0.5 倍に発現量が減少している事が明らかとなった。さらに、この結果を確認するた

めに、Taqman microRNA Assay による解析を行った。

(4) エストロジェンの IGF-1 による下垂体プロラクチン(PRL)産生細胞増殖促進作用に対する影響

ラット下垂体前葉の無血清初代培養細胞に、Vehicle (対照)投与、IGF-1 (30 ng/ml)単独投与、IGF-1 及び E2 (1 nM)の同時投与の 3 群を設け、投与 21 時間後に、BrdU を投与することにより増殖細胞を標識した後、その 3 時間後に細胞を冷メタノール固定した。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。その結果、PRL 細胞の増殖率は、IGF-1 投与により約 4 倍に増加したが、エストロジェンの同時投与により、増殖率は約 1.5 倍となり、著明に IGF-1 による細胞増殖促進作用を抑制した。

これらのことから、microRNA Array 実験により同定した、これら miRNA がエストロジェンによる細胞増殖抑制作用に関与している可能性が考えられる。

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 5 件)

- ①. Mitsui T, Ishida M, Arita J, Mechanism for the anti-proliferative action of estrogen on lactotroph proliferation, *J. Physiol. Sci.*, 62, S33, 2012. 査読無し
- ②. Mitsui T, Ishida M, Izawa M, Kagami Y, Arita J, Inhibition of Bcl3 gene expression mediates the anti-proliferative action of estrogen in pituitary lactotrophs in primary culture. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 345, 68-78, 2011. 査読有り
- ③. Iguchi H, Mitsui T, Ishida M, Kanba S, Arita J, cAMP response element-binding protein (CREB) is required for epidermal growth factor (EGF)-induced cell proliferation and serum response element activation in neural stem cells isolated from the forebrain subventricular zone of adult mice. *Endocr. J.*, 58, 747-59, 2011. 査読有り
- ④. Mitsui T, Taniguchi N, Kawasaki N, Kagami Y, Arita J, Fetal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induces expression of the chemokine genes Cxcl4 and Cxcl7 in the perinatal mouse brain. *J. Appl. Toxicol.*, 31, 279-284, 2011. 査読有り

- ⑤. Ishida M, Mitsui T, Izawa M, Arita J, Absence of ligand-independent transcriptional activation of the estrogen receptor via the estrogen response element in pituitary lactotrophs in primary culture. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 118, 93-101, 2010.査読有り

〔学会発表〕(計4件)

- ①. 三井哲雄、石田真帆、有田順、プロラクチン産生細胞の細胞増殖に対するエストロジェンの抑制作用の発現機構、第89回日本生理学会大会、2012年3月30日、松本
- ②. 三井哲雄、石田真帆、有田順、IGF-1依存性のエストロジェンによる増殖抑制作用には Bcl3 遺伝子発現の抑制が関与する、第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会、2011年3月29日、横浜
- ③. 有田順、石田真帆、三井哲雄、Wistar系及び Wistar/Kyoto 系ラットにおけるプロラクチン産生細胞増殖及び遺伝子発現に対するエストラジオール及び IGF-1 の作用、第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会、2011年3月29日、横浜
- ④. Ishida M, Mitsui T, Izawa M, Arita J, Absence of ligand-independent transcriptional activation of the estrogen receptor via the estrogen response element in pituitary lactotrophs in primary culture, 14th International Congress of Endocrinology, 2010年3月29日、京都

〔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