

平成 2 6 年 5 月 1 4 日現在

機関番号： 1 1 3 0 1

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2011 ~ 2013

課題番号： 2 3 5 9 0 6 5 8

研究課題名 (和文) 乳癌個別化診断を目標とする新規エストロゲンシグナル経路の解析と検査法の開発

研究課題名 (英文) Characterization of membrane-associated estrogen receptor signaling pathway in breast cancer cells using selective ligand.

研究代表者

丹羽 俊文 (NIWA, Toshifumi)

東北大学・医学 (系) 研究科 (研究院) ・准教授

研究者番号： 9 0 2 1 8 2 4 8

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,700,000 円、(間接経費) 1,110,000 円

研究成果の概要 (和文) : エストロゲン依存性乳癌において、その存在が示唆されながらも詳細が不明であった膜型エストロゲン受容体(ER)の信号経路を解析するために選択的リガンドを開発した。このリガンドにより刺激された膜型ERの信号系にはERK系のリン酸化経路が関与しており、核内ERをリン酸化して活性化するほか、Elk-1など他の転写因子をも活性化していることが示唆された。さらにエストロゲン枯渇耐性株を用いた研究から、耐性株では極微量のエストロゲンを効率よく利用するために膜型ERの発現が増加し、より低濃度で増殖可能であるなど、膜型 ERはホルモン療法耐性に一定の関与をしていることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : The existence of membrane-associated ER (mER) in breast cancer cells and relation to hormone therapy resistance has been suggested. However, it is uncertain because of difficulty in distinguishing the signals from nuclear ER (nER) and mER. We developed a selective ligand to mER, Qdot-6-E2. mER is related to cell proliferation in nER positive breast cancer cells via phosphorylation pathway such as ERK and activate nER function. We visually confirmed Qdot-6-E2 diffused in plasma membrane by confocal fluorescence microscopy. nER positive estrogen-depletion resistant cells established from MCF-7 (nER+) treated by Qdot-6-E2 showed dose dependent growth in lower dose than parental cells. These results suggest that ER certainly exists at plasma membrane and makes some contribution to cell growth in nER+ estrogen-depletion resistant cells.

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 境界医学・病態検査学

キーワード： 乳癌 細胞・組織 シグナル伝達 エストロゲン 機能性リガンド ホルモン療法耐性 臨床検査マーカー

1. 研究開始当初の背景

乳癌の多くはエストロゲン依存性であり、現在のホルモン療法においてはエストロゲン拮抗薬とアロマターゼ阻害剤が治療の主流となっているが、しばしば不応例や耐性獲得がみられ問題となっている。ホルモン療法の要となるのはエストロゲン受容体(ER)であり、エストロゲンジグナルの伝達（応答遺伝子の発現）は、エストロゲンがERに結合し遺伝子発現が活性化する経路と、エストロゲンに依存せずERが直接リン酸化を受け活性化するルートが知られている。当該の癌がどの信号経路に依存するかを知ることは治療法を選択・決定する上で重要な情報となる。

従来、ERは細胞核内にあり、細胞膜表面から核内まで浸透したエストロゲンが結合することにより遺伝子が活性化されると考えられてきたが、近年、同様のはたらきをする受容体（膜型ER）が細胞膜表面にも存在する可能性が示唆されている。しかしながら、この膜型ERが核内ERと同じものであるのか、新規の蛋白質であるのか、さらにはどのような遺伝子が応答するのか等、その実態はほとんど知られていない。この理由として、両者の信号経路を明確に区別し得る信頼性の高い方法が確立されていないことがあげられる。

我々は不溶性担体にエストロゲンを結合させた新規リガンドを数種試作し、蛍光マーカーとしてGFPを組込んだ培養乳癌細胞を用いた予備実験を行い、細胞内エストロゲンジグナル経路を活性化するリガンドの合成に成功した。今後担体との結合位置による立体配位、流動性・作用効率などさらに改良を施し、膜型ERを選択的に刺激することでこの新規シグナル経路に関わる関連分子の解析に有用なツールとなることが期待された。

2. 研究の目的

膜型ERを特異的に刺激することで核内ERとのシグナル伝達経路を区別し得る機能性リガンドを開発・改良し、これらを用いて信号伝達経路に関与する因子や遺伝子応答の違いを明らかにする。

当研究室で樹立されたホルモン療法耐性モデル細胞株を材料として、ホルモン療法耐性における膜型ERの関与について検討する。

膜型ERがホルモン療法耐性時に二次治療を選択する際の情報を提供する、個別化治療のためのマーカーとなり得る可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1)膜型ER選択的リガンドの合成

6-oxoestradiol 6-O-carboxymethylximeと量子ドット Qdot® amino(1粒子当たり80-100 アミノ基)をカルボジイミド法により結合させ、Qdot-6-estradiol (Qdot-6-E2)を合成した(図1)。

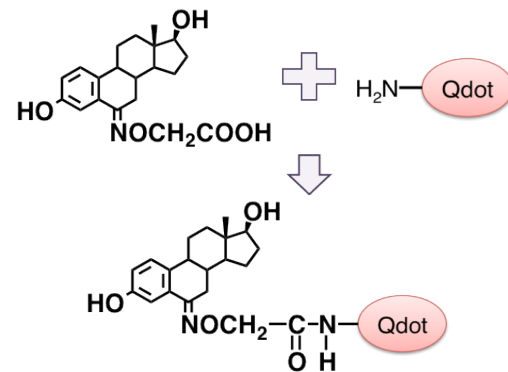


図1 Qdot-6-E2の合成

(2)乳癌細胞株に対するQdot-6-E2の効果

核内ER活性化を生細胞でモニタできるようERE-GFPが安定導入された各種細胞株を用い、エストロゲン枯渇培地で4日間培養後にリガンドを添加し、さらに2日後、EFP陽性細胞をカウントして核内ER活性を評価した。同様に設定した培養条件下で細胞数をカウントして増殖の評価を行った。

(3)細胞内シグナル経路の検索

同様の培養条件にてリガンドを添加し一定時間経過後に細胞を溶解、タンパク質を抽出。濃度調整後ウエスタンブロットに付し、各タンパクを検出した。

(4)細胞とQdot-6-E2の作用部位

培養した細胞をHoechst色素で核染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてHoechstの青、GFPの緑、Qdotの赤色蛍光を観察

した。

4. 研究成果

(1) 乳癌細胞株に対する Qdot-6-E2 の効果

核内 ER 活性化を生細胞でモニタできるよう ERE-GFP レポーター遺伝子が安定導入された MCF-7-E10 細胞にエストロゲン枯渇培養下で Qdot-6-E2 を加えた。その結果、遊離の(soluble)E2 よりは弱いものの、濃度依存的に増殖刺激効果が認められ、また ERE 活性が増大した(図 2A,B)。

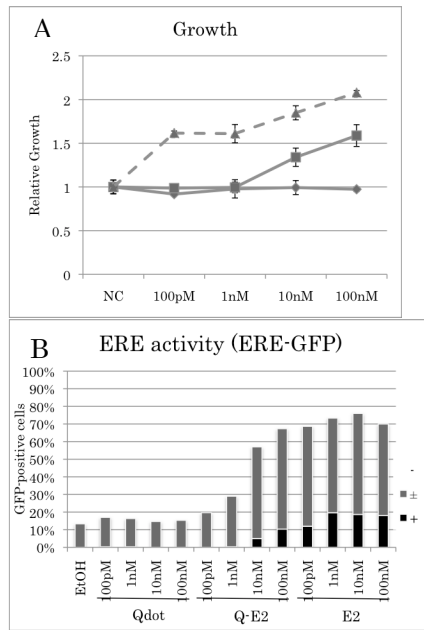


図 2 膜型 ER 選択的リガンド Qdot-6-E2 による増殖刺激(A)と核内 ER への信号伝達(B)

これらの効果は同じ ER 陽性の T-47D-TE8 (ERE-GFP 安定導入株)でも観察されたが、ER 陰性株では認められなかった。ER 陽性細胞を分画し、Western blot 法で解析したところ、膜画分にも少量の ER α の存在が確認されたため、Qdot-6-E2 と細胞の相互作用を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。E2 を結合していない担体 Qdot のみを培地に添加した場合、その赤色蛍光はまばらで集塊状に分布していたのに対し、Qdot-6-E2 添加時には GFP 陽性細胞の細胞膜に沿って蛍光が確認された(図 3)。

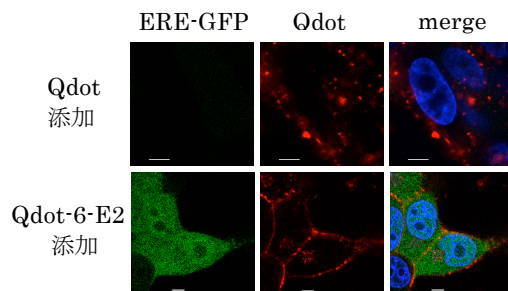


図 3 Qdot-6-E2 と GFP 陽性細胞(MCF-7-E10)の相互作用。緑:GFP(ERE 活性化),

赤:Qdot, 青:Hoechst 色素(核染色)

さらに、Qdot-6-E2 添加により核内 ER の標的遺伝子であるプロゲステロン受容体 PgR および pS2 の mRNA 発現の上昇が確認された。

これらの結果より、核内 ER 陽性細胞では ER α が細胞膜にも sublocalize しており、Qdot-6-E2 は膜型 ER を刺激することによって細胞増殖等に関与していることが示唆された。

(2) Qdot-6-E2 が細胞内へ移行しないことの確認

核内 ER α は A~F の 6 つのドメインから校正されており、A/B ドメインはリン酸化シグナルなどにより刺激を受けるリガンド非依存的な活性化領域、E/F ドメインは E2 などによって刺激を受けるリガンド依存的な活性化領域であることが知られている。そこで、ER 遺伝子より E/F ドメインを切り出し、GAL4 DBD と結合させて作製したイフェクタプラスミドと、GAL4-Luciferase を組み込んだレポータープラスミドを cotransfection させる mammalian one-hybrid assay を実施した。その結果、脂溶性で細胞内へ移行可能な E2 添加時には E/F ドメインが活性化されたのに対し、Qdot-6-E2 添加では活性化はみられず、Qdot-6-E2 は細胞内へ移行しておらず、また E2 が切断されて細胞内へ移行する可能性もないことが確認された。このことは、Qdot-6-E2 が膜型 ER に結合し、リン酸化カスケードなどによって細胞内部に信号を伝達していることを示している。

(3) 膜型 ER シグナル経路の探索

膜型 ER はリン酸化経路を介して核内 ER その他を刺激していると考えられた。そこで、代表的なリン酸化経路の因子 ERK1/2, Akt およびこれらによってリン酸化を受ける ER の A/B ドメインのリン酸化領域について、Western blot 法により解析した。その結果、ERK1/2 の活性化(リン酸化)とともに、ERK1/2 によってリン酸化を受けるとされている核内 ER の Ser118 のリン酸化亢進が確認された(図 4)。

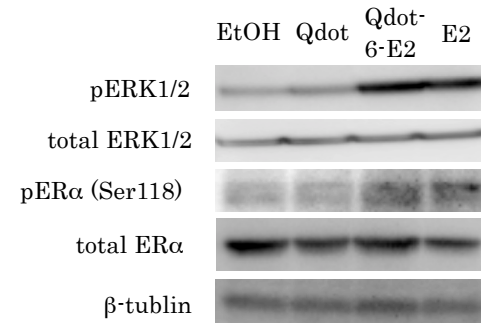


図 4 膜型 ER シグナル経路に関わる因子

これに対して Akt およびその下流である ER の Ser168 のリン酸化には変化が見られなかった。これにより膜型 ER シグナルは ERK 経路を介して核内 ER のリン酸化に関与していることが示唆された。さらに ER 以外で ERK シグナルによって活性化を受け、乳癌の進行に関与しているとされる転写因子 Elk-1 の活性化やその標的遺伝子との報告があるヒストン脱メチル化酵素 EZH2, EMT 関連遺伝子 Snail の mRNA 発現量の上昇が観測され、膜型 ER のシグナルは核内 ER のみならず種々の転写因子の活性化に関与していることが示唆された。

(4) 膜型 ER のホルモン療法耐性への関与

引き続き、近年示唆されながらも未だ統一の見解が得られていない膜型 ER とホルモン療法耐性の関連について検討を行った。先に当研究室ではホルモン療法を擬したエストロゲン枯渇条件下で MCF-7-E10 細胞を長期に培養することで、同じ親株から耐性機序の異なる 2 種の枯渇耐性株を得ている。これらのうち核内 ER の発現が恒常的に亢進しており、リン酸化経路に依存して増殖している A1 細胞では Qdot-6-E2 および E2 添加時に細胞増殖の亢進、ERE 活性の増加がみられたが、核内 ER が陰転化し ER 非依存的増殖をする細胞ではこのような変化はみられなかった。そこで、膜型 ER の関与が示唆された A1 細胞について、分画を行い ER α の発現を Western blot 法により解析したところ、発現が増加していたばかりか、核画分に対する細胞膜、細胞質画分での発現量が亢進していた(図 5)。

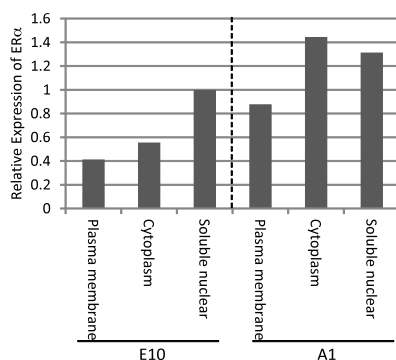


図 5 MCF-7-E10 細胞(親株)と枯渇耐性 A1 細胞(ERE 活性を保持)における ER α の発現。Western blot 法でタンパクを検出後、化学発光法により数値化した。

このような現象は同じ親株から同時に樹立された核内 ER 陰転化細胞では見られなかった。エストロゲン枯渇培地には添加する牛胎児血清中のエストロゲン除去を目的としたチャコール処理する際に除去しきれなかった極微量のエストロゲンが含まれている。この細胞外の極微量のエ

ストロゲンを最大限に利用するため、膜型 ER が関与していると考えられた。そこで、細胞増殖に対するエストロゲン濃度依存効果について検討した。その結果、膜型 ER を特異的に刺激する Qdot-6-E2 添加では親株に比べ枯渇耐性株においてより低濃度での増殖応答が観察された(図 6)。これに対し細胞内に取り込まれ得る遊離 E2 添加時に両者の応答性に差は見られなかった。

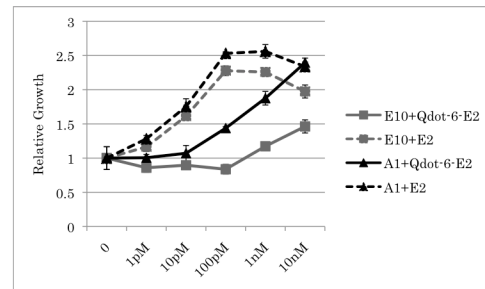


図 6 MCF-7-E10 細胞(親株)と枯渇耐性 A1 細胞における Qdot-6-E2 添加時の増殖効果。

(5) まとめ

本研究の結果より、Qdot-6-E2 は細胞内には侵入せず、膜型 ER を選択的に刺激する有用なツールであることが示された。この選択的リガンドを用いることにより、膜型 ER が ER 陽性乳癌細胞においてその増殖や核内 ER の活性化にも関与していることが確認された。またその蛍光特性を活かし、細胞膜近辺でリガンドと ER が相互作用していることを視覚的に示し、膜型 ER (の少なくともひとつ) は核内 ER α が sublocalize したものであると考えられた。

さらに独自に樹立したエストロゲン枯渇耐性細胞株を用い、ER α は細胞膜における発現比が上昇し、親株よりも低濃度で増殖可能であることが明らかとなった。このように膜型 ER は枯渇条件下に存在する極微量のエストロゲンを有効に活用することが示唆された(図 7)。

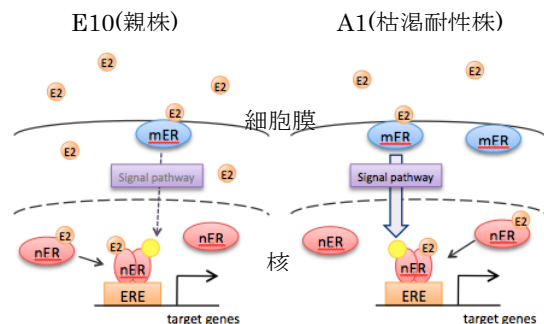


図 7 MCF-7-E10 細胞(親株)と枯渇耐性 A1 細胞における ER 細胞内動向の概念。

このため、膜型 ER はホルモン療法耐性時に二次治療を選択する際の情報を提供する、個別化治療のためのマーカーとなり得る可能性があり、種々耐性メカニズムにおける膜型 ER の関与についてさらなる研究を続けていきたい。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

①高信純子, 丹羽俊文, 守春菜, 郷野辰幸, 山口ゆり, 林慎一, Activation of membrane-type estrogen receptor in breast cancer cells by cognition of the conformation of estrogen and its signaling pathway., 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月5日, 神戸

②高信純子, 丹羽俊文, 品川優理, 郷野辰幸, 山口ゆり, 林慎一, The role of membrane-type estrogen receptor in estrogen receptor positive breast cancer., 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月4日, 横浜

③Toshifumi Niwa, Junko Takanobu, Yuri Shinagawa, Haruna Mori, Tatsuyuki Gohono, Yuri Yamaguchi, Takashi Suzuki, Shin-ichi Hayashi, Membrane-type estrogen receptor in breast cancer cells activated by specific ligands., 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormone & Cancer, 2012年11月16日, 金沢

④高信純子, 丹羽俊文, 品川優理, 郷野辰幸, 山口ゆり, 鈴木貴, 林慎一, ERK phosphorylation is activated by stereo-specific ligand for membrane-type estrogen receptor in breast cancer cells., 第71回日本癌学会学術総会, 2012年09月19日, 札幌

⑤丹羽俊文, 守春菜, 遠藤恵, 郷野辰幸, 山口ゆり, 林慎一, Membrane-type estrogen receptor in breast cancer., 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3日, 名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mfd.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 俊文 (NIWA, TOSHIFUMI)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号 : 90218248

(2) 研究分担者

林 慎一 (HAYASHI, SHIN-ICHI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 60144862

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :