

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791823

研究課題名(和文) 乳腺上皮細胞の増殖調節におけるエストロゲン受容体の役割

研究課題名(英文) Effects of estrogen receptor expression in paracrine regulation of cell proliferation of mammary gland epithelial cell line

研究代表者

石田 真帆 (ISHIDA, Maho)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号：80362086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン(E2)がエストロゲン受容体(ER)発現細胞を介して傍分泌作用によりER非発現細胞の増殖を制御する機構をin vitroで再現することを試みた。非腫瘍形成性乳腺上皮細胞株(MCF 10A)に由来する、ER発現細胞とER非発現細胞を共培養し、E2の各細胞の増殖率に対する効果を調べた結果、E2によってER発現細胞の増殖は抑制されたのに対し、ER非発現細胞の増殖は変化しないことが明らかとなった。以上の結果は、E2によるER非発現細胞の増殖制御に傍分泌作用が関与しないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the mitogenic effect of estrogen on mammary gland epithelial cells without the expression of ERalpha through paracrine factors produced by mammary ERalpha-expressing cells. Two types of cells with and without the expression of ERalpha, both of which were derived from MCF 10A, the non-tumorigenic mammary gland epithelial cell line, were co-cultured. Treatment of cocultures with estrogen resulted in the inhibition of the ERalpha-expressing cells as demonstrated in previous studies. The fact that the proliferation of the cells without the expression of ERalpha was not changed by the treatment with estrogen indicates the absence of the mitogenic effect of estrogen through the paracrine mechanism in this system.

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：エストロゲン エストロゲン受容体 乳腺上皮細胞 細胞増殖 傍分泌

1. 研究開始当初の背景

乳腺は、性成熟、妊娠、授乳、閉経といった生殖機能の変化に応じて発達、乳汁分泌、退縮といった形態的にも機能的にもダイナミックな変化を示す組織である。一方、この組織に由来する乳癌は女性において発症頻度が最も高い腫瘍であるため、乳癌の発症機構の解明と有効な治療法の開発は医学医療の重要な課題となっている。乳腺の生理的発達および乳癌の発症、進行には女性ホルモンであるエストロゲンが深く関わっており、これまでエストロゲン受容体 (ER) 陽性乳癌細胞をモデルにしてエストロゲンの増殖促進作用に関する研究が精力的に行われてきた。その結果、乳癌細胞においてエストロゲンは細胞増殖に関係する、多くのシグナル伝達系や分子機能を修飾することによって細胞増殖を促進することが解明されつつある。

非常に興味深いことに、これら ER 陽性乳癌細胞とは異なり、正常乳腺組織ではエストロゲンによって増殖促進が認められるのは ER 陽性上皮細胞ではなく、ER 発現細胞近傍の ER 陰性上皮細胞であることが、ヒトや実験動物で多く報告されている。また、ヒト乳腺組織をヌードマウスへ異種移植する実験によって、エストロゲンは間質系細胞の共存下において乳腺上皮細胞の増殖を促進することが報告されている。これらの事実は、正常乳腺組織では、上皮細胞 上皮細胞の間の傍分泌機構および上皮細胞 間質系細胞の間の傍分泌機構を介してエストロゲンの増殖促進作用が現れることを示唆しているだけでなく、エストロゲンによって増殖が促進されない ER 陽性上皮細胞が、癌化の過程において、増殖反応性を獲得することを示唆している。従って、ER 陽性乳癌細胞を用いた研究だけでは ER 陽性正常乳腺上皮細胞の癌化を解明することは困難であり、立ち戻って正常乳腺上皮細胞に対するエストロゲンの作用機構についての詳細な研究が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

上記の *in vivo* 研究の結果に基づいて、本研究は、ヒト乳腺細胞を用いた *in vitro* 実験系を確立し、エストロゲンによる正常乳腺上皮細胞の増殖促進に関する ER 陽性乳腺上皮細胞及び間質系細胞が果たす役割を以下のように調べることにより、細胞間傍分泌機構の重要性を明らかにすることを目的とした。

(1) まず、ER を発現しないヒト非腫瘍形成性乳腺上皮細胞株に、ER を一過性導入し、ER 陽性上皮細胞と ER 陰性上皮細胞が混在する共培養系を確立する。この共培養系を用いて、エストロゲン刺激に対する ER 陽性細胞および ER 陰性細胞の増殖反応性を調べる。

(2) さらに、乳腺上皮細胞共培養系に間質系線維芽細胞を加えたときの、エストロジェ

ンに対する ER 陽性上皮細胞および ER 陰性上皮細胞の増殖反応性の変化を調べる。

(3) ER を安定的に発現する乳腺細胞株を用いた共培養系を作成し、一過性 ER 遺伝子導入細胞の共培養系で得られた結果を確認すると共に、細胞間傍分泌機構に関する増殖因子を同定する。

3. 研究の方法

(1) 一過性 ER 遺伝子導入による共培養系確立の試み

ER を発現しないヒト非腫瘍形成性乳腺上皮細胞株として、MCF 10A 細胞を用いた。MCF 10A 細胞は、正常細胞と同等の染色体安定性を持ち、多くの乳癌細胞とは異なり野生型の p53 遺伝子を持つことが知られている。MCF 10A 細胞の不死化は CDK inhibitor 遺伝子の欠損により起こることから、これ以外の増殖調節系は正常と見なすことができる。この MCF 10A 細胞に、ER と GFP を共発現するためのプラスミドを、一過性に遺伝子導入した。ER 遺伝子と GFP 遺伝子を同一のプラスミド内で独立した CMV プロモーター制御により発現させるため、pBI-CMV2 vector に ER 遺伝子を挿入した pBI-CMV2-ER (図 1) および、pBI-CMV1 vector に EGFP 遺伝子と ER α 遺伝子を挿入した pBI-CMV1-EGFP-ER (図 2) を作成した。トランスフェクションには、Xfect を用いた。トランスフェクションの 24 時間

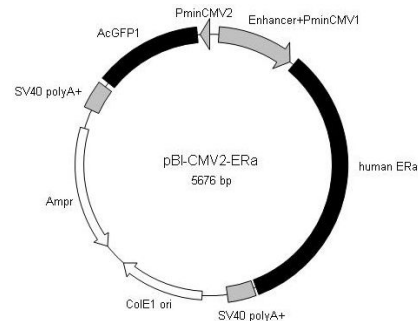


図 1

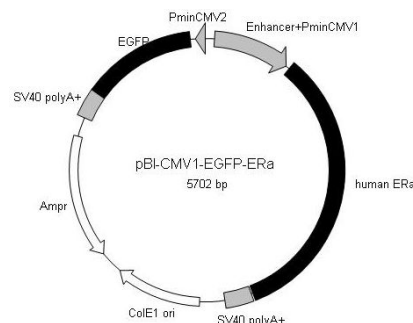


図 2

後、エストロゲン (17 β -estradiol) を 10 nM の濃度で 24-48 時間投与し、培養時間の最後の 2 時間に増殖マーカーとして

bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を増殖細胞に取り込ませて標識した。培養後、細胞を poly-D-lysine コーティングした格子付きスライド硝子に貼付し、固定前に GFP 蛍光陽性細胞と陰性細胞を識別した。細胞はメタノールにより固定し、免疫染色法により BrdU 陽性細胞を検出した。GFP 蛍光を指標に ER 陽性細胞と ER 陰性細胞を区別して、BrdU 陽性細胞を検出することで、ER 陽性細胞と ER 陰性細胞それぞれの増殖率を求めた。

(2) ER と GFP を安定的に発現する MCF 10A 細胞株樹立の試み

以前研究代表者が行った、ER と GFP を安定的に共発現する MDA-MB-231 細胞株の樹立方法と同様の方法で、MCF 10A 細胞株に ER と GFP 遺伝子を安定的に共発現させるを試みた。すなわち、別々のプラスミドに由来する、ER および GFP 遺伝子を同時にトランスフェクションした。ER 発現用のプラスミドには、pIRESneo3 vector に ER α 遺伝子を挿入して作成した pIRESneo3-ER α (図 3) を、GFP 発現用のプラスミドには、pcDNA3.1Zeo(+)-vector に EGFP 遺伝子を挿入して作成した pcDNA-EGFP (図 4) を用いた。トランスフェクション後、100 μ g/ml の G418 および Zeocin を投与して薬剤選択を行った。

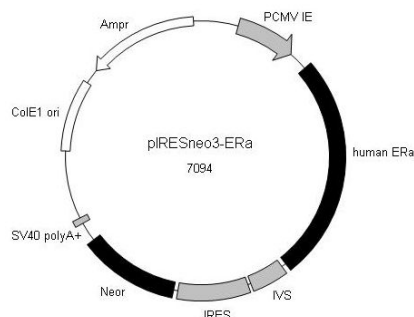


図 3

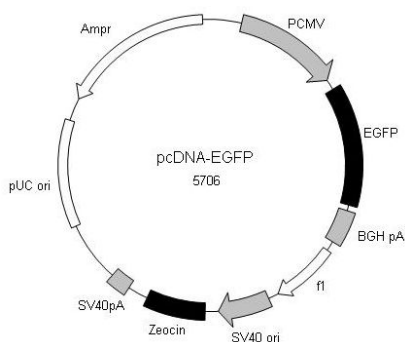


図 4

(3) GFP を安定的に発現する ERIN9 細胞株樹立の試み

Ben Ho Park 博士 (The Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins) より、ER を安定的に発現する MCF 10A 細胞 (ERIN9) および対照用に薬剤耐性遺

伝子のみを安定発現する MCF 10A 細胞 (10A IRES NEO) を譲り受けた。ERIN9 を用いて安定的に GFP を発現する細胞株を樹立するため、pcDNA-EGFP をトランスフェクションし、100 μ g/ml の Zeocin を用いて薬剤選択を行った。(4) PKH67 を用いて細胞標識した ERIN9 と 10A IRES NEO の共培養系の確立

遺伝子導入により細胞を蛍光標識する代わりに、細胞膜を一過性に標識する手段として、PKH67 による標識を行った。標識反応に用いる濃度は、40 μ M とした。標識反応の 24 時間後から、エストロジェンの存在下でさらに 24 時間培養を継続し、最後の 2 時間に BrdU を細胞に取り込ませて増殖細胞を標識した。培養後、細胞を poly-D-lysine コーティングした格子付きスライド硝子に貼付し、固定前に PKH67 蛍光陽性細胞と陰性細胞を識別した (図 5)。細胞はメタノールにより固定し、免疫染色法により BrdU 陽性細胞を検出し、スライドの格子を用いて、蛍光陽性細胞と陰性細胞における BrdU 陽性細胞の数をカウントし、増殖率を算出した。

4. 研究成果

(1) MCF10A 細胞への ER および蛍光蛋白の一過性遺伝子導入

まず始めに ER と AcGFP1 を、同一のプラスミド内で独立した CMV プロモーターの制御下で発現させるように、pBI-CMV2 vector に ER 遺伝子を挿入して pBI-CMV2-ER (図 1) を作成し、Xfect を用いてトランスフェクションした。しかし AcGFP1 の蛍光が非常に弱かったため、AcGFP1 を EGFP に変更することにした。すなわち、pBI-CMV1 vector を用いて AcGFP1 の代わりに EGFP を挿入した発現ベクター pBI-CMV1-EGFP-ER を作成し (図 2)、遺伝子導入を行い、GFP 陽性細胞の検出を試みた。その結果、遺伝子導入の 1 日後に 10 nM のエストロジェンを 2 日間処置した場合、増殖率検出時においては、GFP 陽性細胞の割合はわずか 1% に満たず、MCF 10A 細胞に対する ER および GFP の遺伝子導入の効率が極めて低いことが示された。また ER 陰性細胞の増殖率にはエストロジェン処置による変化は認められなかった。

(2) ER と GFP を安定的に発現する MCF 10A 細胞株の樹立

次に、安定的に ER と GFP を発現する MCF 10A 細胞株を樹立するため、pIRESneo3 vector に ER α 遺伝子を挿入して作成した pIRESneo3-ER および pcDNA3.1Zeo(+)-vector に EGFP 遺伝子を挿入して作成した pcDNA-EGFP の 2 種類の遺伝子コンストラクトを MCF 10A 細胞にトランスフェクションし、G418 および Zeocin を用いて安定的遺伝子導入細胞の薬剤選択を行った。その結果、GFP 蛍光陽性細胞のほとんどが死滅し、生き残った細胞からもコロニーの形成は見られず、ER を安定的に発現する MCF 10A 細胞株の樹立には至らなかった。研究代表者は以前同様の方法により、

MDA-MB-231 細胞を用いた ER と GFP の安定発現株の樹立には成功していること、また(1)の結果もあわせて、MCF 10A 細胞は遺伝子導入効率の低いことが示唆された。

(3) GFP を安定的に発現する ERIN9 細胞株の樹立

次善の策として、譲り受けた ERIN9 細胞に安定的に GFP を発現させて標識するため、pcDNA-EGFP をトランスフェクションし、Zeocin を用いて薬剤選択を行ったが、薬剤により細胞は死滅し、GFP を安定的に発現する ERIN9 細胞株の樹立には至らなかった。

(4) PKH67 を用いた ERIN9 細胞の標識

ERIN9 細胞に安定的 GFP を発現させることができなかつたため、PKH67 を用いて一過性に蛍光標識する方針に転換した。PKH67 は濃度 40 μ M を用いることにより 24 時間後には強い蛍光を検出することができた。PKH67 の蛍光は時間の経過と共に褪色したが、標識反応後 48 時間経過後も、露光時間を長くすることで非標識細胞と区別することが可能であった。また、PKH67 非標識細胞においても標識試薬が移染したと思われる蛍光陽性細胞が見られたが、PKH67 標識細胞の単独培養細胞の蛍光像をポジティブコントロールとして比較することで、輪郭まではっきりと蛍光陽性の細胞を PKH67 標識細胞(図 5 白矢印)として検出することができた。

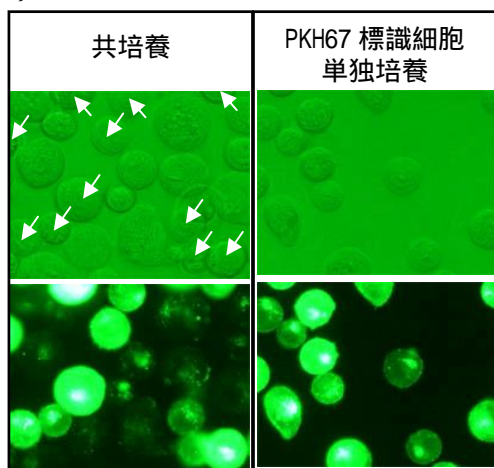


図 5

(5) ER を介した乳腺上皮細胞におけるエストロジェンの傍分泌的増殖制御機構の検討

PKH67 を用いて蛍光標識した ER 陽性細胞と ER 陰性細胞を共培養し、エストロジェンによる増殖制御を調べた。10 nM のエストロジェンを 24 時間投与した結果、ER 陽性細胞においては増殖率が約 65%に低下したものの、ER 陰性細胞においては増殖率に変化は認められず、両細胞においてエストロジェンによる傍分泌的増殖制御機構の存在は確認できなかった(図 6)。この結果をふまえて、当初予定していた間質系細胞を加えた共培養系における傍分泌的増殖制御機構の解析、および傍分泌性増殖因子の同定は中止した。

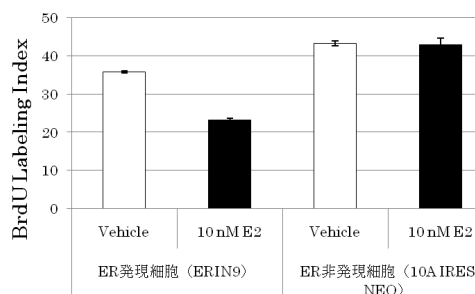


図 6

(6) 総括

ER を本来発現する細胞株に対し、エストロジェンはその増殖を促進するが、ER を本来発現しない細胞株に ER を強制発現させた場合、エストロジェンは増殖を抑制することが知られている。本研究ではこのエストロジェンの増殖抑制作用を実験モデルとして使うことによって、ER 発現細胞と非発現細胞の間での傍分泌機構を介した、エストロジェンの *in vitro* での増殖修飾作用を調べた。研究代表者の予備研究では、MDA-MB-231 乳腺細胞株を用い同様の実験を行い、当初期待したような結果が得られなかった。このため、本研究では、非腫瘍形成性の乳腺細胞株である MCF 10A 細胞を用いた。本研究の結果は、MDA-MB-231 乳腺細胞株を使った時と同様のものであり、少なくとも本実験モデルにおいてはエストロジェンの傍分泌作用を確認することはできなかった。本研究では、同一の細胞間での傍分泌機構を調べたが、今後、上皮細胞と間質細胞の間でのエストロジェンの傍分泌作用を調べる必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Maho Ishida, Tetsuo Mitsui, Michi Izawa, Jun Arita, Activation of D2 dopamine receptors inhibits estrogen response-element-mediated estrogen receptor transactivation in rat pituitary lactotrophs, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 査読有, 375, 2013, 58-67

DOI: 10.1016/j.mce.2013.05.011

[その他]

ホームページの名称

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/physio01/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 真帆 (ISHIDA, Maho)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号: 80362086