

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590297

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關する遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of the gene involved in the anti-proliferative action of estrogen

研究代表者

有田 順 (ARITA, Jun)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：80128587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：女性ホルモンであるエストロジェンは、周知の増殖促進作用の他に、逆の増殖抑制作用を有する。本研究は、増殖抑制遺伝子の一つであるRasd1に焦点を絞り、エストロジェンの増殖抑制作用発現へのRasd1の関与を調べた。

培養下垂体前葉細胞にエストロジェンを投与すると超早期にRasd1のmRNA発現が促進され、この促進はRasd1のプロモーター活性の増加を伴った。Rasd1を過剰発現させるとプロラクチン産生細胞の増殖が抑制され、一方エストロジェンによるRasd1発現促進を抑制すると同細胞のエストロジェンによる増殖抑制が阻止された。

研究成果の概要(英文)：The female ovarian steroid hormone estrogens have an anti-proliferative action as well as a well-known proliferative action on estrogen-responsive cells. We investigated the involvement of Rasd1, a tumor suppressor gene, in the regulation of the anti-proliferative action of estrogens in the present studies.

The expression of Rasd1 mRNA was stimulated at very early times after estradiol treatment of anterior pituitary cells in culture. The change in Rasd1 mRNA expression was accompanied by an increase in the promoter activity of the Rasd1 gene. Overexpression of Rasd1 inhibited proliferation of pituitary lactotrophs in culture while inhibition of estrogen-induced Rasd1 expression blocked the anti-proliferative action of estrogen.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：エストロジェン プロラクチン産生細胞 下垂体前葉 Rasd1 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣から分泌される女性ホルモンであるエストロジェンは、その増殖促進作用を介して乳腺や子宮といったエストロジェン感受性組織の発達を促進する一方、乳癌や子宮内膜癌といったエストロジェン依存性腫瘍の発症を促進する。このエストロジェンの増殖促進作用の発現機構に関しては、古くから精力的に調べられ、これに関与する分子が同定され、これらの研究成果に基づいて開発されたエストロジェン依存性腫瘍の治療薬が臨床的に広く使われている。

(2) 最近、エストロジェンは増殖促進作用だけでなく、逆の増殖抑制作用も有することが報告されている。特に、本来エストロジェン受容体を持たない細胞にエストロジェン受容体を強制的に発現させた細胞では、実際には逆にエストロジェンによって細胞増殖が抑制されることが明らかとなっている。この結果は、エストロジェンによる増殖抑制機構の方が促進機構よりも普遍的にエストロジェン感受性細胞に内在することを示唆している。

2. 研究の目的

(1) 我々は代表的なエストロジェン感受性細胞である下垂体前葉のプロラクチン産生細胞 (PRL 細胞) において、増殖に対する、この対立する二つのエストロジェンの作用が細胞環境依存性に現れることを明らかにした[1]。

(2) さらに、我々は、先行研究において、エストロジェンによって発現が減少する増殖促進遺伝子群とともに、発現が増加する増殖抑制遺伝子群を DNA マイクロアレイ解析によって同定した[2]。このような増殖抑制遺伝子の発現促進によって、エストロジェンの増殖抑制作用が発現する可能性が考えられる。

(3) 本研究では、このような増殖抑制遺伝子群の中でも、monomeric G protein Ras family の一つである Rasd1 に焦点を絞って、下垂体 PRL 細胞においてこの分子がエストロジェンの増殖抑制作用発現において果たす役割を、以下の疑問に答えることによって解明した。

エストロジェンは Rasd1 の mRNA および蛋白発現を促進するか？

エストロジェンはどのようにして Rasd1 遺伝子発現を促進するか？

Rasd1 には増殖抑制作用があるか？

エストロジェンによる Rasd1 発現促進を抑制することによってエストロジェンの増殖抑制作用が阻止されるか？

3. 研究の方法

(1) Wistar 系雌ラットの下垂体前葉を採取後、初代無血清培養を行った。エストロジェン受容体陽性 PRL 産生下垂体細胞株である GH4C1 細胞は米国 ATCC より入手した。

(2) Rasd1 の mRNA 発現は、培養細胞から total RNA を抽出後、定量的 real time polymerase chain reaction (qRT-PCR)法によって定量した。用いた primer の配列は、forward primer: 5'-CCAGGACTAACAGGGCATTATC TC-3'、reverse primer: 5'-GTTTCCAGTTTGC TGAGGACAGA-3'。内部標準として acid ribosomal phosphoprotein P0 を用い、 2^{-CT} 法によって mRNA 量を測定した。Rasd1 蛋白の発現は、市販の抗体を用いて Western blotting 法によって調べた。

(3) Rasd1 のプロモーター解析には、rat Bac clone から、5'上流領域約 5 kb 及び 3'下流領域約 4 kb を含む Rasd1 遺伝子をクローニングした後、5'上流及び 3'下流領域全体、さらにこれらの領域の DNA 断片を PCR 法によって、pGL3 Basic vector の luciferase 上流に挿入して、リポーター遺伝子を作成した。GH4C1 細胞に X-fect transfection 試薬を用いてリポーター遺伝子を導入した後、プロモーター活性を luciferase assay によって測定した。

(4) rat Rasd1 遺伝子の cDNA を tetracycline-response element-CMV promoter の下流に挿入し、これを最終的に、E1, E3 欠損非増殖性 adenovirus type5 plasmid の PI-SceI/I-CeuI 切断サイトに組み込んだ。negative control としては β -galactosidase 遺伝子の cDNA を挿入したものを使用した。small interfering RNA (siRNA) 発現のためには、Rasd1 の short hairpinRNA (shRNA) を U6 promoter の下流に挿入したものを、negative control としては non-targetting sequence を挿入したものを使用した。

(5) 増殖レベルは、bromodeoxyuridine (BrdU) によって標識された細胞周期 S 期にある PRL 細胞を、BrdU と PRL の 2 重免疫染色によって同定し、2 重免疫陽性細胞数の割合によって測定した。

4. 研究成果

(1) エストロジェンによる Rasd1 の mRNA 発現の促進

我々は、下垂体 PRL 初代培養細胞を使った先行研究において、エストロジェン投与4時間後に Rasd1 の mRNA が著明に増加することを DNA microarray 解析によって明らかにした。この mRNA の変化を qRT-PCR 法によって調べ

た結果、エストロゲン投与0.5時間後にすでに2倍に増加し、1時間後に約4.8倍のピークを示し、その後96時間後まで約2倍のレベルを維持することがわかった。PRL細胞の株化細胞であるGH4C1細胞においても、エストロゲンが細胞増殖を抑制する培養条件下でRasd1のmRNA発現が増加するかを調べたところ、初代培養細胞において見られた変化よりさらに著明な変化が認められた。ただ、GH4C1細胞では、Rasd1 mRNAが0.5時間後にはすでに増加し、1時間後にピークを迎える点では初代培養PRL細胞と全く同じ時間経過を示した。Pdlim3, Batf1, Ccnd1, C-fos, Abcg2等のエストロゲン反応性遺伝子は、エストロゲン投与4あるいは24時間後に発現のピークを示したのに対し、Rasd1とC-mycだけが1時間後にピークを示したことから、Rasd1はエストロゲン超早期反応性遺伝子であることが示された。

Rasd1のmRNAの変化を確認するために培養PRL細胞及びGH4C1細胞を用いてWestern blottingを行った。市販の抗Rasd1抗体を数種類用いたが、Rasd1に特異的なバンドを認めることができなかった。

(2) エストロゲンによるRasd1遺伝子の発現に関するプロモーター解析

エストロゲンによるRasd1の遺伝子発現の促進機構を解明するために、GH4C1細胞を用いてRasd1遺伝子のプロモーター解析を行った。その結果、5'領域において転写開始点から5 kbまでの領域のプロモーターがエストロゲン投与後、約2.5倍のリポーター活性の上昇を示した。一方、転写停止点から4 kb下流の3'領域のプロモーターはエストロゲンに対し何らリポーター活性の上昇を示さなかった。

(3) Rasd1の増殖抑制作用

Rasd1が下垂体PRL細胞に対して細胞増殖抑制作用を持っているかを検討するために、Rasd1過剰発現がinsulin-like growth factor-1 (IGF-1)存在下のPRL細胞の増殖を抑制するか否かを調べた。rat Rasd1遺伝子のcDNAをtetracycline依存性に発現するadenovirus vector (Ad-TRE/Rasd1)を作成した。negative controlとしては同様に β -galactosidaseを発現するadenovirus vector (Ad-TRE/bGal)を使用した。rtTAを発現するAd-Tet.OnとAd-TRE/bGalを培養下垂体細胞に共感染し、doxycycline (Dox)を投与してもqRT-PCR法によって検出されるRasd1のmRNA量は変化しなかった。Ad-Tet.OnとAd-TRE/Rasd1の共感染だけではRasd1のmRNA量は変わらなかったが、Dox投与によって用量依存性にRasd1のmRNA量が増加したことから、

Ad-TRE/Rasd1の有効性が確認された。

増殖実験において、Ad-Tet.OnとAd-TRE/Rasd1の共感染によってRasd1を過剰発現させると、negative controlに比較して、BrdU標識法によるPRL細胞の基礎増殖レベルには変化が見られなかったが、IGF-1投与による増殖促進がDox用量依存性に有意に抑制された。これらの結果より、Rasd1がIGF-1によるPRL細胞の増殖促進に対し抑制作用を持っていることが示唆された。

(4) Rasd1 knockdownのエストロゲンの増殖抑制作用への影響

Rasd1遺伝子発現がエストロゲンの増殖抑制作用発現時に促進していることから、Rasd1がエストロゲンの増殖抑制作用を仲介している可能性が示唆されたので、エストロゲンによるRasd1発現の促進を抑制することによってエストロゲンの増殖抑制作用が阻止されるか否かを調べた。Rasd1遺伝子発現を抑制するために、RNA干渉に基づいたknockdownを採用した。Rasd1のsiRNAを発現するAd-shRasd1をPRL産生細胞に感染させると2及び4 MOIによってそれぞれ34%および52%の抑制がRasd1 mRNA発現に見られたことから、knockdown効率は十分であることが確認された。

培養PRL細胞にIGF-1存在下に1 nMのestradiolを投与すると、negative controlであるAd-shControl感染群では74%の増殖率の抑制が見られたのに対し、Ad-shRasd1感染群では55%の増殖率の抑制がみられた。この結果からエストロゲンによる増殖抑制がRasd1のknockdownによって一部阻止されることが示唆された。

<引用文献>

1. K Kawashima, K Yamakawa, W Takahashi, S Takizawa, P Yin, N Sugiyama, S Kanba, J Arita, The estrogen-occupied estrogen receptor functions as a negative regulator to inhibit cell proliferation induced by insulin/IGF-1. *Endocrinology* 143:2750-2758, 2002.
2. T Mitsui, M Ishida, M Izawa, Y Kagami, J Arita, Inhibition of Bcl3 gene expression mediates the anti-proliferative action of estrogen in pituitary lactotrophs in primary culture. *Molecular and Cellular Endocrinology* 345:68-78, 2011.

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)

Maho Ishida, Tetsuo Mitsui, Jun Arita, Global

gene expression profiling of the inhibitory effect of estrogen on the cell proliferation of MDA-MB231 breast cancer cells stably transfected with estrogen receptor. The journal of Physiological Sciences 査読なし. 65:s239, 2015.

Takeshi Saigusa, Jun Arita, ANG II modulates both slow and rapid baroreflex responses of barosensitive bulbospinal neurons in the rabbit rostral ventrolateral medulla. American journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology 査読あり, 306(8): R538-R551, 2014. (DOI,10.1152/ajpregu.00285.2013)

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 査読あり, 375 (1-2):58-67, 2013. (DOI,10.1016/j.mce.2013.05.011)

Tetsuo Mitsui, Maho Ishida, Michi Izawa, Jun Arita, Differences between rat strains in the development of PRL-secreting pituitary tumors with long-term estrogen treatment: In vitro insulin-like growth factor-1-induced lactotroph proliferation and gene expression are affected in Wistar-Kyoto rats with low estrogen-susceptibility. Endocrine Journal 査読あり, 60(11):1251-1259, 2013.

Tetsuo Mitsui, Maho Ishida, Jun Arita, Mechanism for the anti-proliferative action of estrogen on lactotroph proliferation. The Journal of Physiological Sciences 査読なし. 62:s33, 2012.

〔学会発表〕(計2件)

石田真帆、三井哲雄、有田順、安定的にエストロゲン受容体を発現するMDA-MB-231乳癌細胞を用いたエストロゲンの増殖抑制作用における網羅的遺伝子発現解析。第92回日本生理学会大会、神戸、2015年3月22日

Jun Arita, Estrogen modulation of lactotroph proliferation (招待講演), 8th International Congress of Neuroendocrinology, Sydney (Australia), August 17th, 2014.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

山梨大学大学院総合研究部生理学講座第一
<http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/physio01/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

有田 順 (ARITA, Jun)
山梨大学・大学院総合研究部・教授
研究者番号: 80128587

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

三井 哲雄 (MITSUI, Tetsuo)
山梨大学・大学院総合研究部・助教
研究者番号: 20402084

石田 真帆 (ISHIDA, Maho)
山梨大学・大学院総合研究部・助教
研究者番号: 80362086

(4)研究協力者

王 羚鴻 (WANG Linghong)
井澤 美知 (IZAWA, Michi)