

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592505

研究課題名(和文) LXRのヒト子宮内膜におけるシグナル伝達機構解明と子宮体癌病態解明への新たな視点

研究課題名(英文) Analysis to elucidate regulatory mechanism of LXR in uterine tissue

研究代表者

平池 修 (Hiraike, Osamu)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20529060

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)：内在性酸化コレステロールをリガンドとする肝臓X受容体(LXR)は脂質代謝と糖代謝の両方に関与する核内受容体であり、細胞増殖抑制作用をもつ。本研究でLXRの乳腺および子宮内膜における作用機序について検討したところ、造腫瘍的機能を有するCCAR2はLXRの細胞増殖抑制作用を脱抑制する新規メカニズムが示された。LXRの下流因子である細胞周期関連因子の発現抑制も脱抑制されることから、CCAR2の新たな細胞増殖制御メカニズムが示された。

研究成果の概要(英文)：Liver X receptors (LXRs) have been shown to maintain whole-body cholesterol level. Recent studies demonstrate that LXRs might inhibit cellular proliferation, but the underlying mechanism remains to be elucidated. We found that CCAR2 could form a complex with LXR in a ligand-independent manner in HepG2 cells, and in vitro pull down assays revealed a direct interaction between the amino-terminus of CCAR2 and AF-2 domain of LXR. Thereby CCAR2 attenuates the ligand-dependent transcriptional activation function of LXR. Abrogation of CCAR2 resulted in a decreased cellular proliferation. Competitive immunoprecipitation studies have revealed that the downregulation of LXR involves inhibition of SIRT1 interaction with LXR. These results clearly indicate the mechanism that CCAR2 might regulate the transcriptional activation function of LXR due to its specific inhibition of SIRT1 and serve to regulate the cellular proliferation.

研究分野：生殖生理

キーワード：核内受容体 転写因子 乳がん 子宮体がん

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜の増殖はエストロゲンによって制御されており、エストロゲンの生理活性は核内受容体であるエストロゲンレセプター (ER) により制御されている。内在性酸化コレステロールをリガンドとする肝臓 X 受容体 (LXR) は、脂質代謝と糖代謝の両方に関与する核内受容体であり、エストロゲン作用に拮抗し細胞増殖抑制作用をもつ可能性が近年明らかとなってきたが、そのメカニズムはほとんど不明である。

LXR はリガンドとしてオキシステロール {22(R)-hydroxycholesterol など} と結合する核内受容体であり、コレステロール過剰状態を感知しコレステロールの胆汁酸異化を促進する作用があることが知られている。LXR アゴニストは動脈硬化予防効果をもたらすことが明らかになり、その研究は近年創薬標的として大いに注目を浴びている。さらに LXR アゴニストは脂肪細胞による糖取り込み能の増加や、肝臓における糖新生の低下といった作用を示し、血糖値を下げる作用を持つため、インスリン抵抗性の改善に使用することも提案されている。LXR には LXR α および LXR β のサブタイプが存在し、LXR α は主に肝臓、脂肪組織、小腸、腎臓及びマクロファージに発現し、LXR β は幅広い組織に発現している。天然物 LXR リガンドとしてカンペステロール等の植物ステロールがあり、血清コレステロール値を低下させる作用があることから特定保健用食品として利用されている。LXR 欠損マウスに高コレステロール食を与えると脂肪肝、血中の LDL コレステロール濃度上昇、及び HDL コレステロール濃度低下などを示すことが報告されている。その一方で、LXR がホルモン依存性腫瘍の増殖に関与しているという報告が散見されるようになり、乳癌、卵巣癌培養細胞などにおける報告が相次いでいる。

2. 研究の目的

エストロゲン依存性に増殖する乳癌細胞において、LXR の合成アゴニストである T0901317 が細胞増殖を抑制する一方で、エストロゲン依存性増殖作用のない乳癌細胞は細胞増殖が抑制されなかったことから、LXR 作用の増強が子宮内膜細胞の増殖に影響を及ぼす可能性は極めて高いものと考えられる。マウスの子宮体癌移植細胞を用いた増殖実験において、LXR アゴニストはエストロゲンの硫酸抱合化を促進したため、結果として細胞増殖が抑制されるという機序が示された。しかしながら LXR アゴニストは副作用として lipogenesis 促進によるトリグリセリド上昇を招くことから、細胞組織選択的あるいは選択的に機能を発揮するリガンドの開発が期待されている。

子宮組織は子宮内膜のエストロゲン・プロゲステロンによって増殖・分化が制御されており、代表的なホルモン依存性組織であるにもかかわらず、LXR の子宮における知見はいまだ乏しい。我々の以前の検討により、乳癌抑制遺伝子として知られる DBC1 は ER のリガンド依存的転写活性化能を負に制御することが知られている。

一方で抗老化分子かつ脱アセチル化酵素として知られる SIRT1 は、LXR の脱アセチル化を促進することにより LXR の代謝回転を促進し、結果として LXR のリガンド依存性転写活性化能を促進することが知られている。DBC1 は SIRT1 の negative regulator であることが各種細胞、組織において知られているため、DBC1 による LXR の制御メカニズムを解明し、LXR の細胞増殖能、分化制御への影響を検討することで、より安全なホルモン補充療法開発への基礎を構築することを本研究の主要な目的とした。

3. 研究の方法

- 1) LXR の分子間相互作用を検討するために、SIRT1、DBC1 との免疫沈降法、GST pull down アッセイ、蛍光免疫染色法を用いた。
- 2) LXR 作用薬による LXR のリガンド依存的転写活性化能に対する SIRT1 および DBC1 のもたらす影響を検討するために、ルシフェラーゼアッセイおよびクロマチン免疫沈降法を用いた。
- 3) LXR 作用薬による乳癌および子宮内膜癌細胞の増殖能・細胞周期調節能・細胞死誘導能を調べるため、定量的リアルタイム PCR 法、トリパンブルー細胞染色、BrdU 取り込み能、MTT アッセイ、フローサイトメトリー解析を用いた。

上記の系には、遺伝子過剰発現および siRNA による内在性遺伝子発現のノックダウンを用いるなどして LXR、SIRT1 および DBC1 の発現状態を制御した。

4. 研究成果

- 1) DBC1 は、細胞内および in vitro の系において LXR α および LXR β と直接的に結合することを示した。結合領域は DBC1 のアミノ酸末端と、LXR のリガンド依存性転写活性化領域である AF-2 ドメインであった。
- 2) LXR α および LXR β と DBC1 との結合は、リガンド(酸化コレステロール類似アゴニスト)に依存しなかった。
- 3) LXR α および LXR β のリガンド依存的転写活性増強作用に対し、DBC1 は抑制作用をもたらすことを示した。
- 4) LXR α および DBC1、SIRT1 は、LXR 応答領域を含む DNA 上で複合体を形成することをクロマチン免疫沈降法で示した。
- 5) LXR α および LXR β のリガンド依存的転写活性増強作用により、下流遺伝子であるコレステロールトランスポーター ABCA1 および ABCG1 の発現が上昇するが、内在性 DBC1 のノックダウンにより、これら遺伝子の発現が上昇することを、マクロファージ系培養細胞 THP-1 を用いて示した。
- 6) 3)における DBC1 による LXR α および LXR β のリガンド依存的転写活性抑制作用は、SIRT1 と LXR α および LXR β との複合体形成を DBC1 が阻害することによることを示した。これに伴い LXR α および LXR β のアセチル化レベルが DBC1 により制御された。
- 7) LXR アゴニストによる細胞増殖抑制効果が、内在性 DBC1 のノックダウンにより抑制された。

これは LXR 下流の細胞周期関連遺伝子発現の抑制によるものであることが示された。以上のような新たな知見を見出した。以前の我々の検討では、子宮内膜における DBC1 の発現量が増殖期より分泌期の方が高いことを定量的 PCR で示している。子宮内膜に対する LXR の作用と DBC1 の作用が動的変化を示しうることが示唆されるため、細胞増殖作用を両者がどのようにコントロールするかが、今後の更なる検討課題である。

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 21 件)

Diameter of dominant leiomyoma is a possible determinant to predict coexistent endometriosis. Isono W, Wada-Hiraike O, Osuga Y, Yano T, Taketani Y. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2012; 162: 87-90

Genome-wide single nucleotide polymorphism arrays as a diagnostic tool in patients with synchronous endometrial and ovarian cancer. Ikeda Y, Oda K, Nakagawa S, Murayama-Hosokawa S, Yamamoto S, Ishikawa S, Wang L, Takazawa Y, Maeda D, Wada-Hiraike O, Kawana K, Fukayama M, Aburatani H, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. Int J Gynecol Cancer. 2012; 22: 725-31

Genotype-dependent efficacy of a dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, and an mTOR inhibitor, RAD001, in endometrial carcinomas. Shoji K, Oda K, Kashiyama T, Ikeda Y, Nakagawa S, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Tanikawa M, Miyasaka A, Koso T, Matsumoto Y, Wada-Hiraike O, Kawana K, Kuramoto H, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. PLoS One. 2012; 7: e37431

Regulation of SIRT1 determines initial step of endometrial receptivity by controlling E-cadherin expression. Shirane A, Wada-Hiraike O, Tanikawa M, Seiki T, Hiraike H, Miyamoto Y, Sone K, Hirano M, Oishi H, Oda K, Kawana K, Nakagawa S, Osuga Y, Fujii T, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. Biochem Biophys Res Commun. 2012; 424: 604-10

Uterine arteriovenous fistula treated with repetitive transcatheter embolization: case report. Hasegawa A, Sasaki H, Wada-Hiraike O, Osuga Y, Yano T, Usman SM, Akahane M, Kozuma S, Taketani Y. J Minim Invasive Gynecol. 2012; 19: 780-4

Spontaneous cessation and recurrence of massive uterine bleeding can occur in uterine artery

pseudoaneurysm after laparoscopically assisted myomectomy. Oishi H, Wada-Hiraike O, Osuga Y, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. J Obstet Gynaecol Res. 2013; 39: 598-602

The prevalence of cervical regulatory T cells in HPV-related cervical intraepithelial neoplasia (CIN) correlates inversely with spontaneous regression of CIN. Kojima S, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Taguchi A, Miura S, Adachi K, Nagamatsu T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Arimoto T, Oda K, Wada-Hiraike O, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Schust DJ, Kozuma S. Am J Reprod Immunol. 2013; 69: 134-41

Sequential effects of the proteasome inhibitor bortezomib and chemotherapeutic agents in uterine cervical cancer cell lines. Miyamoto Y, Nakagawa S, Wada-Hiraike O, Seiki T, Tanikawa M, Hiraike H, Sone K, Nagasaka K, Oda K, Kawana K, Nakagawa K, Fujii T, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. Oncol Rep. 2013; 29:51-7

Laparoscopic ovarian-sparing surgery for a young woman with an exophytic ovarian fibroma. Hasegawa A, Koga K, Asada K, Wada-Hiraike O, Osuga Y, Kozuma S. J Obstet Gynaecol Res. 2013; 39: 1610-3

Increased tissue levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids prevents pathological preterm birth. Yamashita A, Kawana K, Tomio K, Taguchi A, Isobe Y, Iwamoto R, Masuda K, Furuya H, Nagamatsu T, Nagasaka K, Arimoto T, Oda K, Wada-Hiraike O, Yamashita T, Taketani Y, Kang JX, Kozuma S, Arai H, Arita M, Osuga Y, Fujii T. Sci Rep. 2013; 3: 3113

Role of multifunctional transcription factor TFII-I and putative tumour suppressor DBC1 in cell cycle and DNA double strand damage repair. Tanikawa M, Wada-Hiraike O, Yoshizawa-Sugata N, Shirane A, Hirano M, Hiraike H, Miyamoto Y, Sone K, Ikeda Y, Kashiyama T, Oda K, Kawana K, Katakura Y, Yano T, Masai H, Roy AL, Osuga Y, Fujii T. Br J Cancer. 2013; 109: 3042-8

Factors that predict poor clinical course among patients hospitalized with pelvic inflammatory disease. Terao M, Koga K, Fujimoto A, Wada-Hiraike O, Osuga Y, Yano T, Kozuma S. J Obstet Gynaecol Res. 2014; 40: 495-500

Antitumor activity and induction of TP53-dependent apoptosis toward ovarian clear cell adenocarcinoma by the dual PI3K/mTOR inhibitor DS-7423. Kashiyama T, Oda K, Ikeda Y, Shiose Y, Hirota Y, Inaba K, Makii C, Kurikawa R, Miyasaka A, Koso T, Fukuda T, Tanikawa M, Shoji K, Sone K, Arimoto T, Wada-Hiraike O,

Kawana K, Nakagawa S, Matsuda K, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Osuga Y, Fujii T. PLoS One. 2014; 9: e87220

Resveratrol suppresses inflammatory responses in endometrial stromal cells derived from endometriosis: a possible role of the sirtuin 1 pathway. Taguchi A, Wada-Hiraike O, Kawana K, Koga K, Yamashita A, Shirane A, Urata Y, Kozuma S, Osuga Y, Fujii T. J Obstet Gynaecol Res. 2014; 40: 770-8

Concomitant ovarian drilling and oocyte retrieval by laparoendoscopic single-site surgery led to live birth using in vitro maturation of oocyte and transfer of frozen-thawed blastocyst in woman with polycystic ovary syndrome. Hirata T, Fujimoto A, Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. J Obstet Gynaecol Res. 2014; 40: 1431-5

SIRT3 positively regulates the expression of folliculogenesis- and luteinization-related genes and progesterone secretion by manipulating oxidative stress in human luteinized granulosa cells. Fu H, Wada-Hiraike O, Hirano M, Kawamura Y, Sakurabashi A, Shirane A, Morita Y, Isono W, Oishi H, Koga K, Oda K, Kawana K, Yano T, Kurihara H, Osuga Y, Fujii T. Endocrinology. 2014; 155: 3079-87

Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients. Kawana K, Adachi K, Kojima S, Taguchi A, Tomio K, Yamashita A, Nishida H, Nagasaka K, Arimoto T, Yokoyama T, Wada-Hiraike O, Oda K, Sewaki T, Osuga Y, Fujii T. Vaccine. 2014; 32: 6233-9

A coexistence case of right tubal adenomyoma and ectopic pregnancy. Miyasaka A, Wada-Hiraike O, Shiotsu H, Osuga Y, Fujii T. J Minim Invasive Gynecol. 2015; 22: 6

Temporary balloon occlusion of the uterine arteries to control hemorrhage during hysterectomy in a case of uterine arteriovenous fistula. Yamamoto N, Koga K, Akahane M, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. J Obstet Gynaecol Res. 2015; 41: 314-8

Identifying patients who can improve fertility with myomectomy. Samejima T, Koga K, Nakae H, Wada-Hiraike O, Fujimoto A, Fujii T, Osuga Y. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2015; 185: 28-32.

CCAR2 negatively regulates nuclear receptor LXR α by competing with SIRT1 deacetylase.

Sakurabashi A, Wada-Hiraike O, Hirano M, Fu H, Isono W, Fukuda T, Morita Y, Tanikawa M, Miyamoto Y, Oda K, Kawana K, Osuga Y, Fujii T. J Steroid Biochem Mol Biol. 2015; 149: 80-8

(学会発表)(計 10 件)
エストロゲン(E)受容体の機能解析と抗老化分子 SIRT1 の E 標的臓器への作用に基づいた新規ホルモン補充療法の開発に向けた研究
第 64 回日本産科婦人科学会(2012 年)

産婦人科領域における抗老化分子 SIRT1 の生理的作用の解明
第 14 回神澤医学研究振興財団講演会(2012 年)

Resveratrol promotes SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: possible implication of SIRT1 in the ovary
第 94 回北米内分泌学会(2012 年)

Clinical significance and pathogenesis of macroprolactinemia
第 95 回北米内分泌学会(2013 年)

AMH 高値の多嚢胞性卵巣症候群に限定した腹腔鏡下卵巣多孔術
第 53 回日本産科婦人科内視鏡学会(2013 年)

Putative tumor suppressor DBC1/CCAR2 negatively regulates the nuclear receptor LXR
第 96 回北米内分泌学会・第 16 回国際内分泌学会(2014 年)

エストロゲン標的組織の病態発症に関与する分子制御機構の解明を目的とした基礎的研究
第 29 回日本女性医学学会(2014 年)

当院における先進医療・腹腔鏡下仙骨腔固定術の導入
第 54 回日本産科婦人科内視鏡学会(2014 年)

当院における先進医療・腹腔鏡下仙骨腔固定術の現況
第 37 回日本産婦人科手術学会(2014 年)

当院における腹腔鏡下仙骨腔固定術の短期成績
第 9 回骨盤臓器脱手術学会(2015 年)

(図書)(計 9 件)

特集:ホルモン療法実践マニュアル GnRH アナログ製剤の種類と特徴 平池修 診断と治療社

近年の手術関連機器の進歩 平池修 大須賀穰 藤井知行 金原出版

卵巣過剰刺激症候群 ovarian hyperstimulation syndrome の予防と管理 平池修 矢野哲 中外

医学社

()

目で見るエストロゲンの生殖器外作用～エストロゲンの抗老化作用～ 平池修 メジカルビュー社

研究者番号:

生殖医療ポケットマニュアル 平池修 医学書院

抗加齢物質としてのエストロゲン 平池修 フジメディカル出版

子宮・腔奇形に対する形成術 平池修 東京医学社

現代生殖医療のメインストリーム 子宮鏡下の不妊治療 平池修 金原出版

組織特異性を考慮したホルモン補充療法 平池修 協和企画

[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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

平池 修 (Osamu Hiraike)

東京大学医学部附属病院 女性診療科・産科
講師

研究者番号: 20529060

(2)研究分担者

織田 克利 (Katsutoshi Oda)

東京大学医学部附属病院 女性外科
准教授

研究者番号: 30359068

(3)連携研究者