

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670174

研究課題名(和文) 乳癌病理組織検体を用いてエストロゲン受容体ヘテロ/ホモダイマーの検出は可能か否か

研究課題名(英文) Detection of estrogen receptor dimerization patten in breast carcinoma tissues.

研究代表者

笹野 公伸 (SASANO, HIRONOBU)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50187142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌はエストロゲン依存性増殖を症例が多く、エストロゲン受容体(ER)が治療標的因子の一つとして確立されてきた。ERは二量体を形成することでその作用を発揮する。しかしこれまでに病理組織標本上でこの二量体の形成を直接で観察する手段がなかった。近接ライゲーション法は、近接(<40nm)している二つのタンパクを検出することができ、近年、タンパク相互作用を観察する目的で開発された技術である。本研究はこの近接ライゲーション法を応用し、ER二量体の存在を可視化する技術を構築した。

研究成果の概要(英文)：Examination of estrogen receptors (ER) is important to determine appropriate treatment options for breast cancer. ER and ER dimers bind DNA with comparable affinities as either homo- or heterodimers to the same estrogen response elements. ER dimers have been identified by molecular technique but no in situ methodologies have been reported. Proximity Ligation Assay (PLA) could demonstrate the molecular proximity of two proteins in situ in tissue specimens. In this study, we established detection method of ER dimerization using PLA between specific antibodies for ER and ER in breast cancer cell lines and breast carcinoma tissues.

研究分野：医歯薬学

キーワード：乳癌 近接ライゲーションアッセイ エストロゲン受容体 ダイマー

1. 研究開始当初の背景

代表的なホルモン依存性増殖を示す乳癌の多くはエストロゲン受容体 (ER: Estrogen Receptor) が発現し、エストロゲンにより癌細胞の増殖、進展が促される。ER には二つのアイソフォーム (ER α , ER β) が存在し、ホモ二量体 (ER α /ER α , ER β /ER β) もしくはヘテロ二量体 (ER α /ER β) を形成する事でその作用を発揮する。免疫組織化学での ER の検出では単に抗原抗体複合体を検出するだけである事から、二量体と単体とを区別するのは不可能である。病理組織標本上でこれら二量体を評価することで、実際に活性化された機能的 ER の存在を知ることができ、抗エストロゲン療法が著効する症例の選定につながるのではと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、近年新たに開発された技術である「近接ライゲーション法(図1)」を用い、ER の二量体の発現様式を病理組織標本上で可視化する技術を構築することを目的とする。さらにこの技術を駆使して乳癌での ER ホモもしくはヘテロ二量体 (ER α /ER β) 発現と種々の乳癌の臨床病理学的因子 (細胞増殖、浸潤、予後など) との関連を明らかにする。

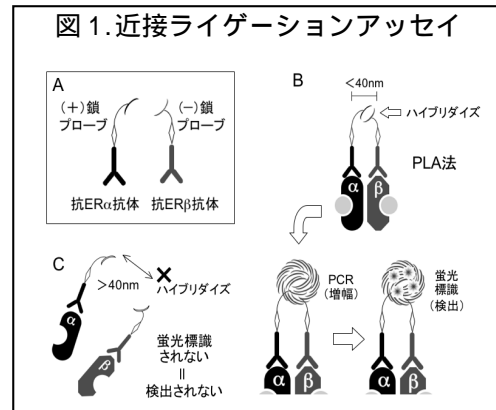
今まで ER の二量体の存在を病理組織標本上で直接証明した報告はなく、今回の研究で可視化技術を構築する事によりこれからの乳癌をはじめとするヒト性ステロイド依存性腫瘍における ER 研究の発展につながると期待される。さらにアロマトラーゼ阻害剤療法が確立されてきた事を踏まえ、乳癌の内分泌療法の研究は耐性の克服、再発への適応、個別化などの次のステップへ移り始めている。そこで本研究ではこのような状況を念頭におき、新規診断技術としての ER 二量体評価方法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 近接ライゲーションアッセイ (PLA: proximity ligation assay) :

PLA 法は事なるタンパク質が 40 nm 以内に近接している場合に組織化学的に可視化出来る技法である。最初に標的に対する一次抗体 (ER α , ER β) にオリゴヌクレオチドを連結した PLA Probe (+鎖、-鎖: 図 1A) を反応させた。この二つの異なる一次抗体同士が 40 nm 以内に近接した場合 (図 1B) にのみ、

PLA Probe 核酸のライゲーション反応が生じ、環状構造が形成される。さらにポリメラーゼ反応によって増幅を行い、特定の塩基配列に結合する蛍光プローブをハイブリダイズさせ蛍光顕微鏡にて観察した。二つの異なるタンパクが 40 nm 以上離れて存在する場合は、ハイブリダイズとそれ以降の反応が進まずシグナルが認められない (図 1C)。



ER α のホモダイマー (ER α , 6F11, Leica, $\times 50$; ER α , SP-1, abcam, $\times 100$) または ER ヘテロダイマー (ER α , SP-1, abcam, $\times 100$; ER β , 14C8, Gena Tex, $\times 300$) を検出する一次抗体を用いて 4 で一晩反応させた。その後、Duolink In Situ PLA probe MINUS および PLUS (オリゴヌクレオチドを連結した二次抗体) 溶液を添加し、37 で 1 時間インキュベートし、2 種類のオリゴを含有している Ligation solution とリガーゼを加えて 37 で 30 分間反応させた。その後、Amplification solution とポリメラーゼを加え 37 で 100 分間反応させ、DAPI による核染を行い、蛍光顕微鏡 (オリンパス) にて red (Ex/Em: 594/624nm)、blue (Ex/Em: 345nm/455nm) のそれぞれの波長で陽性画像を検出した。

(2) 乳癌症例 :

東北公済病院で外科的切除された乳癌組織 25 例および東北大学病院で外科的切除された乳癌組織 2 例を解析に用いた。本研究は東北公済病院倫理委員会 (No. H17. 8. 5)、東北大学医学部医学系研究科倫理委員会 (No. 2009-323) の承認を得ている。

(3) 培養細胞 :

培養細胞の検討では、MCF-7 (東北大学医用細胞資源センター、仙台)、T-47D (American

type cell cultures, VA, USA), MDA-MB-231 (American type cell cultures), COS-7 (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、大阪) を用いた。

(4) 免疫組織化学：

1) 明視野での観察

Histofine SAB-PO (M) kit を使用し、ストレプトアビジンビオチン法にて免疫組織化学を行った。一次抗体は ER : 1D5、Dako、1000 倍希釈 または ER : 14C8、Gene Tex、1000 倍希釈を用いた。

2) 暗視野での観察

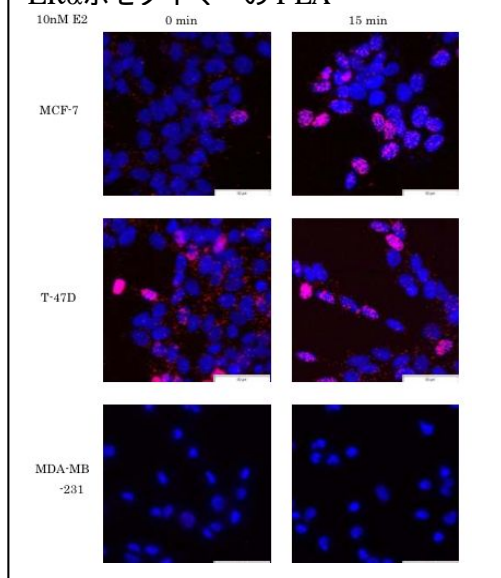
一次抗体は ER : 6F11、Leica、50 倍希釈 または ER : 14C8、Gene Tex、1000 倍希釈を用いた。一次抗体の反応後、蛍光標識された抗マウス IgG 抗体と抗ラビット IgG 抗体を用いて室温で 1 時間インキュベートした。蛍光顕微鏡 (オリンパス、東京) にて red (Ex/Em: 590nm/617nm)、green (Ex/Em: 490nm/525nm)、blue (Ex/Em: 345nm/455nm) のそれぞれの波長で陽性画像を検出した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞における ER のホモダイマーの発現

ER 陽性の MCF-7 では核に ER のホモダイマーの発現が確認でき、10nM エストロゲン (E2) 添加後 15 分、45 分後での核におけるホモダイマーの増加が認められた (図 2)。また、ER antagonist ICI の添加ではコントロールと比較して時間経過と共に ER のホモダイマーの発現が減少した。MCF-7 と同様に T-47D と MDA-MB-231 を用いて 10nM E2 添加後に PLA 法を施行し、ER ホモダイマーの発現を検討した (図 2)。ウエスタンブロッティングの結果から、T-47D は ER 陽性、MDA-MB-231 は ER 陰性であった。T-47D では MCF-7 と同様に E2 による ER ホモダイマーの誘導が検出されたが、MDA-MB-231 ではコントロール及び E2 添加後の細胞いずれにおいても ER のホモダイマーは検出されなかった。さらに、ER 陰性の COS-7 でも PLA を行ったが、MDA-MB-231 と同様に ER のホモダイマーの発現は認められなかった。

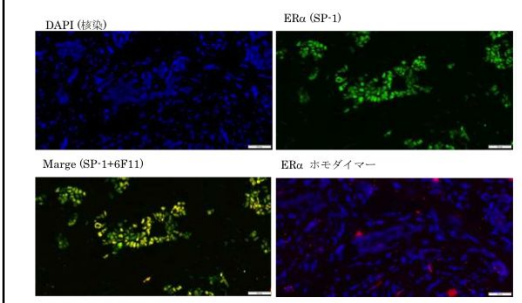
図 2. 乳癌培養細胞における ER α ホモダイマーの PLA



(2) 乳癌組織における ER ホモダイマーの検出

乳癌組織を用いて PLA 法にて ER ホモダイマーの発現を検討した。さらに、Hematoxylin-Eosin 染色と ER の免疫染色、2 種類の ER の抗体を用いた蛍光二重染色を行った。ER 陽性乳癌で ER のホモダイマーが検出できた (図 3)。また、ER 陰性乳癌では ER のホモダイマーは検出されなかった。ER 陰性乳癌組織中の正常乳腺上皮で ER のホモダイマーが検出されたが、その数は ER 陽性乳癌細胞で検出された数と比較すると明らかに少なかった。乳癌培養細胞で検出された陽性像と比較すると、乳癌組織がホモダイマーの発現する細胞数は多いが、細胞 1 個当たりの陽性像の数は逆に少なかった。PLA 法と ER の蛍光染色を組み合わせると、ER 陽性の細胞で ER のホモダイマーの発現が認められた。

図 3. 乳癌組織における ER α の免疫組織化学と ER α ホモダイマーの PLA



(3) ER ホモダイマーと乳癌におけるバイオマーカーとの関係

乳癌組織 25 症例を用いて PLA 法を施行し、他のバイオマーカーとの関係について統計解析を行った。乳癌細胞 1 個当たりの ER のホモダイマーの発現は ER と PgR の LI と有意に正の相関を示し、Ki67 の LI とは有意に逆相関を示した。

(4) 乳癌培養細胞における ER ヘテロダイマーと ER ホモダイマーの検出

ER / 陽性の MCF-7 と T-47D ではヘテロダイマーが検出され、ER がより高く発現している T-47D の方がより多くのヘテロダイマーが検出できた。ER 陰性の MDA-MB-231 ではヘテロダイマーの発現は確認できなかった。E2 添加により添加後 15 分でヘテロダイマーの誘導は確認できたものの、その後 (45 分、90 分後) は減少した。ER の発現が高い T-47D では多くのホモダイマーが検出できたが、MCF-7、MDA-MB-231 でも陽性像は確認できた。ER 陰性の COS-7 において ER のヘテロダイマーと ER のホモダイマーの発現を検討したが、いずれも陰性であった。

(5) 乳癌組織における ER ヘテロダイマーの検出

培養細胞と同様に乳癌組織における ER ヘテロダイマーの発現を検討した。ER ヘテロダイマーは ER、ER とともに陽性の細胞で検出され、どちらかあるいは両方が陰性の細胞では発現が認められなかった。また、乳癌組織内の正常の乳腺上皮での発現も検討したが、ER ヘテロダイマー発現は検出されなかった。

(6) ER ヘテロダイマーと乳癌におけるバイオマーカーとの関係

ER ホモダイマー検討時と同様にパラフィン包埋された乳癌組織 25 症例を用いて PLA 法を施行し、他のバイオマーカーとの関係について統計解析を行った。乳癌細胞 1 個当たりの ER ヘテロダイマーは ER 高発現群で高い発現が認められた。

以上、PLA 法を用い、乳癌培養細胞と乳癌組織における ER のダイマーを可視化し、その発現パターンを初めて明らかにした。培養細胞に関しては ER agonist/antagonist によってダイマーの発現パターンとそれによる細

胞内での局在の変化が認められた。現在、乳癌診断の日常業務において、パラフィン切片を用いた ER、PgR、HER2、Ki67 の免疫組織化学は必須の検査項目となっている。ER のホモダイマーのパターンによる解析が乳癌病理組織診断の一助になる可能性が高いと今回の研究から考えられた。

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 4 件)

1. Yoda T, McNamara KM, Miki Y, Takagi M, Rai Y, Ohi Y, Sagara Y, Tamaki K, Hirakawa H, Ishida T, Suzuki T, Ohuchi N, Sasano H: Intratumoral androgen metabolism and actions in invasive lobular carcinoma of the breast.: *Cancer Sci*. 査読あり: 105(11): 2014: 1503-1509. doi: 10.1111/cas.12535.
2. Chan MS, Chen SF, Felizola SJ, Wang L, Nemoto N, Tamaki K, Ishida T, Chow LW, Ohuchi N, Sasano H: Correlation of tumor-infiltrative lymphocyte subtypes alteration with neoangiogenesis before and after neoadjuvant chemotherapy treatment in breast cancer patients.: *Int J Biol Markers*. 査読あり: 29(3): 2014: e193-203. doi: 10.5301/jbm.5000082.
3. Saito R, Miki Y, Hata S, Takagi K, Iida S, Oba Y, Ono K, Ishida T, Suzuki T, Ohuchi N, Sasano H: Aryl hydrocarbon receptor in breast cancer—a newly defined prognostic marker.: *Horm Cancer*. 査読あり: 5(1): 2014: 11-21. doi: 10.1007/s12672-013-0160-z
4. Tamaki K, Ishida T, Tamaki N, Kamada Y, Uehara K, Miyashita M, Amari M, Tadano-Sato A, Takahashi Y, Watanabe M, McNamara K, Ohuchi N, Sasano H: Analysis of clinically relevant values of Ki-67 labeling index in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer*. 査読あり: 21(3): 2014: 325-333. doi: 10.1007/s12282-012-0387-5.

[学会発表](計 14 件)

1. 岩淵英里奈、三木康宏、小野寺好明、小野克彦、鈴木貴、笹野公伸: エストロゲンレセプターダイマーの発現局在の可視化とパターン解析: 第 55 回日本組織細胞化学会総会・学術集会: 2014 年 9 月 28 日: 松本市中央公民館(長野県松本市)
2. 依田智美、Kee ly M McNAMARA、三木康宏、高木清司、鈴木貴、笹野公伸: 11-Prostaglandin F2 produced by AKR1C3

- stimulates FPreceptor and contributes to breast cancer progression : 第 73 回日本癌学会学術総会 : 2014 年 9 月 26 日 : パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
3. 櫻井美奈子、三木康宏、鈴木貴、笹野公伸 : S100A7 in breast carcinoma invasion into adipose tissue : 第 73 回日本癌学会学術総会 : 2014 年 9 月 26 日 : パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 4. 岩淵英里奈、三木康宏、小野寺好明、小野克彦、笹野公伸 : Detection of estrogen-induced dimerization patterns of estrogen receptor in breast carcinoma cells : 第 73 回日本癌学会学術総会 : 2014 年 9 月 26 日 : パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 5. 石際康平、櫻井美奈子、三木康宏、石田孝宣、大内憲明、笹野公伸 : 乳癌微小環境における 27-hydroxy cholesterol 合成酵素の発現 : 第 15 回ホルモンと癌研究会 : 2014 年 7 月 4 日 : 民陵会館 (宮城県仙台市)
 6. 依田智美、McNamara M. Keely、三木康宏、高木清司、鈴木 貴、石田孝宣、大内憲明、笹野公伸 : ステロイドホルモン合成酵素 AKR1C3 は 11 -Prostaglandin F2 の産生に寄与し、乳癌の悪化に関わる : 第 15 回ホルモンと癌研究会 : 2014 年 7 月 4 日 : 民陵会館 (宮城県仙台市)
 7. 岩淵英里奈、三木康宏、増田真理子、柴原裕紀子、鈴木 貴、笹野公伸 : 乳癌における heterogeneous nuclear ribonucleo-protein K の発現意義 : 第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 25 日 : 広島国際会議場 (広島市)
 8. 内田恵子、柴原裕紀子、三木康宏、端秀子、岩淵英里奈、根本紀子、石田孝宣、大内憲明、笹野公伸 : The effect of preoperative chemotherapy on ER, PR, HER2 and Ki-67 expression in metastatic lymph node of breast cancer : 第 72 回日本癌学会学術総会 : 2013 年 10 月 4 日 : パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 9. 岩淵英里奈、三木康宏、小野寺好明、小野克彦、笹野公伸 : In situ detection of estrogen receptor dimers in breast carcinoma cells : 第 72 回日本癌学会学術総会 : 2013 年 10 月 4 日 : パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 10. 笹野公伸、櫻井美奈子、三木康宏 : Breast cancer, estrogen and obesity : 第 72 回日本癌学会学術総会 : 2013 年 10 月 3 日 : パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 11. 岩淵英里奈、三木康宏、小野寺好明、小野克彦、笹野公伸 : 近接ライゲーションアッセイ法を用いた乳癌培養細胞におけるエストロゲンレセプターダイマーの検出 : 第 54 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 : 2013 年 9 月 27 日 : 航空会館 (東京都港区)
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
- なし
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
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者
笹野 公伸 (SASANO HIRONOBU)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 50187142
- (2)連携研究者
三木 康宏 (MIKI YASUHIRO)
東北大学・災害科学国際研究所・講師
研究者番号 : 50451521
- (3)研究協力者
岩淵 英里奈 (IWABUCHI ERINA)
東北大学・大学院医学系研究科・技術補佐員