

学内グラント 終了時報告書

## 平成19-20年度 学内グラント報告書

## 乳癌の内分泌療法抵抗性獲得メカニズムの解明

研究代表者 池田 和博 (埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター)

分担者 井上 聡<sup>1)</sup>, 佐伯 俊昭<sup>2)</sup>

## はじめに

乳癌は近年増加傾向を示しており、わが国においては女性が罹る癌の中で最も頻度が高くなっている。乳癌の発症原因としては性ステロイドホルモンであるエストロゲンによる暴露が重要な危険因子として考えられている<sup>1)</sup>。すなわち、初潮年齢の低下、初産年齢の上昇、出産児数の減少、遅い閉経などが乳癌の発生率を上昇させていると考えられている。乳癌の多くはエストロゲン受容体 (ER) を発現しており、エストロゲン依存性の増殖を示すことが知られている。ERは細胞核内に存在するリガンド依存性の転写因子であり、ゲノム中のエストロゲン応答配列 (ERE) に結合してその近傍の標的遺伝子の発現量を直接制御することによりエストロゲンの作用を媒介していると考えられている<sup>2)</sup>。従って、ERとその機能を制御する関連因子ならびにエストロゲン標的遺伝子の発現制御と機能を明らかにすることは、乳癌の診断と治療に密接に関わると考えられる。現在、乳癌の内分泌療法として抗エストロゲン製剤であるタモキシフェンやアロマターゼ阻害剤が臨床応用されており、効果を発揮している。しかしながら、これらの内分泌治療薬の長期投与によって耐性を獲得する癌が生じることが問題となっており、このような癌に対しては有効な治療方法が存在しない。加えて、乳癌の中にはもともとERを発現していないものも存在しており、内分泌療法が奏効しない症例も存在している。このような乳癌のエストロゲン非依存性の増殖機構、ならびに、エストロゲン依存性から非依存性を獲得する過程におけるスイッチングのメカニズムに関しては全く解明されていない現状である。

乳癌の多くはエストロゲン受容体 (ER) およびプロゲステロン受容体 (PR) 陽性であり、エストロゲン応答性の増殖を示すことが知られている。ERとPRはリ

ガンド依存性の転写因子として機能する核内受容体のメンバーであり、ヒトでは48種の核内受容体ファミリーが存在している。そのうち、ERとの相同性が最も高いエストロゲン関連受容体 $\alpha$  (ERR $\alpha$ )は、乳癌の55%で発現しており、予後不良のバイオマーカーとして報告されている<sup>3)</sup>。しかしながら、ERを除くその他の核内受容体の乳癌における作用はほとんど明らかになっていない。また、核内受容体は、その他の転写因子と相互作用し、複雑なネットワークを形成していると考えられている。最近、フォークヘッド転写因子 (FOX) が、ERまたはアンドロゲン受容体 (AR) と結合し、転写を調節することが明らかになり注目されているが<sup>4)</sup>、乳癌におけるその転写ネットワークの解明は十分ではない。本研究では、乳癌サンプルならびに内分泌療法抵抗性の乳癌細胞モデルを用いて、ERをはじめとする核内受容体およびそれらを制御する関連因子の発現機能解析を行い、乳癌の内分泌療法抵抗性獲得に関わる分子の解析を行った。

## 研究方法

乳癌の臨床サンプルを用いた解析は、国際医療センター乳癌腫瘍科との共同研究として行った。パラフィン包埋した乳癌組織を薄切後、定法に従って脱パラフィンと親水化を行った後、121℃で10分間の抗原賦活化処理を行った。その後、抗ER $\alpha$ 抗体、抗ERR $\alpha$ 抗体をはじめとし、ERに関連する因子の抗体を用いて免疫染色を行い、ポリマー試薬法 (Envision, DAKO社) で発色を行い、解析した。

ER $\alpha$ を発現し、エストロゲン応答性を有することが知られているMCF-7細胞を抗エストロゲン剤であるタモキシフェン ( $10^{-6}$ M) を含むDMEM培地で2ヶ月間継代培養することにより、タモキシフェン耐性株 (Tam-R) を複数樹立した。また、MCF-7細胞をフェノールレッドを含まないDMEM培地にチャコール処理血清を添加した培地で4ヶ月間培養することにより、エストロゲン枯渇耐性株 (Long Term Estrogen Deprived,

1) 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター

2) 埼玉医科大学 国際医療センター 乳癌腫瘍科

LTED)を複数樹立した。

Tam-R細胞の細胞増殖速度の解析は生細胞数測定試薬SF(ナカライテスク社)を用いて行った。4000個の細胞を24 well-plateに播種してタモキシフェン存在下または非存在下で培養した。その後、24, 72, 120時間後にWST-8試薬を10  $\mu$ l混合し、2時間37°Cで培養した後、450 nmの吸光度を測定し、細胞増殖を評価した。また、Tam-R細胞をウエスタンブロット用サンプルバッファーにて溶解し、SDS-PAGEを用いて分離後、抗ER  $\alpha$ 抗体(Cell Signaling Technology社)を用いてウエスタンブロット解析を行い、ERタンパク質の発現量を定量化した。Tam-R細胞およびLTED細胞における遺伝子のmRNAの発現量は、これらの細胞より採取したRNAからcDNAを合成し、遺伝子特異的プライマーを用いた定量的PCR法(ABI PRISM 7000, アプライドバイオシステムズ社)により解析を行った。

### 研究結果と考察

はじめに、内分泌療法を施行し臨床効果が評価できる乳癌サンプルを用いて免疫染色を行い、ERならびに関連因子の発現と臨床効果とに関連があるか解析を行った。本研究では、2004年11月から2007年7月までに乳腺腫瘍科において浸潤性乳癌と診断され治療を行った閉経後患者のうち、内分泌療法を施行し、臨床効果が評価可能であった20例を用いた。これら20症例は年齢：57～89歳(中央値77歳)、病期：I～III期18症例、IV期2症例であり、ホルモン受容体の発現はER陽性且つPR陽性が13症例、ER陽性でPR陰性が7症例であった。治療薬としてはアロマターゼ阻害剤であるレトロゾール投与：2症例、アナストロゾール投与：3症例、エキセメスタン投与：15症例であった。これらの症例においてERR  $\alpha$ 陽性は12症例(60%)であったが、ERR  $\alpha$ の発現と治療効果との相関には一定の傾向は認められなかった。今後さらに症例数を増やして検討する必要があると考えられた。

MCF-7細胞をタモキシフェン存在下( $10^6$ M)で2ヶ月間継代培養することにより、タモキシフェン耐性株(Tam-R)を18個樹立した。このうち6クローンについて、細胞増殖アッセイ(WST-8 assay)とエストロゲン受容体などの発現量を解析し、基礎的な性状解析を行った。その結果、これらのタモキシフェン耐性株はMCF-7細胞に比較して、タモキシフェン存在下においても、エストロゲン存在下においても細胞増殖速度が亢進していることが明らかになった。また、これらのタモキシフェン耐性株においてはER  $\alpha$ タンパク質の発現がやや亢進している傾向がウエスタンブロット解析によって観察された。また、Tam-R株とMCF-7細胞におけるエストロゲン受容体を含めた核内受容体の発現変化ならびにエストロゲン応答性について定量的PCR法を用いて解析を行った。そ

の結果、ER  $\alpha$  mRNAの発現およびエストロゲン応答性は両者で大きく変化しなかった。前述のウエスタンブロット解析においてはTam-R細胞でER  $\alpha$ タンパク質の発現量の亢進が観察されたことから、タンパク質レベルでの制御機構の関与が示唆された。一方、ER  $\beta$  mRNAの発現はTam-Rで上昇傾向が観察された。また、その他の核内受容体においては、プロゲステロン受容体(PR)の発現量がTam-R株で低下している一方で、グルココルチコイド受容体(GR)の発現量が亢進していることなどが明らかとなり、複数の核内受容体の発現変動が検出された。PRはエストロゲン受容体と同様に多くの乳がんが発現しており、内分泌療法施行の診断マーカーと考えられている。GRは乳がんの進行に伴い発現量が減少することが報告されているほか、そのリガンドであるグルココルチコイドは乳腺細胞に対してはアポトーシスを抑制することが知られている<sup>9)</sup>。Tam-R細胞においてこれらの核内受容体の発現変動が生じていることは、内分泌療法抵抗性獲得との関係に関与している可能性が示唆された。また、最近のゲノム研究から、Forkhead box(FOX)転写因子群が核内受容体と相互作用してその転写活性を調節することが判明し、注目されている<sup>4)</sup>。特に、FOXA1はERおよびアンドロゲン受容体(AR)と結合してERの転写を促進する作用を有することが知られている。Tam-Rにおいては、FOXA1の発現亢進が観察された。

さらにMCF-7細胞をチャコール処理血清とフェノールレッド無添加培地で長期間培養することによりエストロゲン枯渇耐性株(LTED)を数クローン樹立した。これらのLTEDにおけるER  $\alpha$ 、ER  $\beta$ 、FOXA1の発現を解析したところ、ER  $\beta$ とFOXA1の発現はTam-Rの場合と同様に親株であるMCF-7細胞より発現が上昇していた。一方、ER  $\alpha$ の発現はTam-Rと異なる傾向を示し、LTEDではER  $\alpha$ の発現が増加していた。これらの結果から、タモキシフェン耐性乳がんの細胞モデルとなるTam-Rならびにアロマターゼ阻害剤耐性モデルとなるLTEDの解析によって、ER  $\alpha$ 、ER  $\beta$ 、PR、GRの核内受容体ならびにそれらの活性を制御すると想定されるFOX転写因子の発現変動が示されたことは、核内受容体とFOX転写因子による遺伝子発現ネットワークが、乳癌細胞の治療薬抵抗性と密接に関連していることが示唆された。

### おわりに

臨床サンプルおよび内分泌療法抵抗性の細胞モデルを用いた解析により、乳癌のエストロゲン応答性に関わる遺伝子がエストロゲン非依存性を獲得した際に発現変動を示すことを明らかにした。これらの解析は、乳癌が治療に対して抵抗性を獲得する際のスイッチング機構の解明をもたらし、内分泌療法に抵抗性を示す

乳癌の新たな診断や創薬に応用可能な分子標的へと展開できると考えられた。

## 研究成果リスト

### 論文

1. Takayama K, Kaneshiro K, Tsutsumi S, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Ijichi N, Ouchi Y, Shirahige K, Aburatani H, Inoue S. Identification of novel androgen response genes in prostate cancer cells by coupling chromatin immunoprecipitation and genomic microarray analysis. *Oncogene* 2007;26:4453-63.
2. Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Yagi K, Okazaki Y, Inoue S. Estrogen-related receptor  $\alpha$  modulates the expression of adipogenesis-related genes during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;358:813-8.
3. Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, Inoue S. Vitamin K2 induces phosphorylation of protein kinase A and expression of novel target genes in osteoblastic cells. *J Mol Endocrinol* 2007;39:239-47.
4. Kubo M, Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. Modulation of adipogenesis-related gene expression by estrogen-related receptor  $\gamma$  during adipocytic differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2009;1789:71-7.
5. Takayama K, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Murakami K, Hayashizaki Y, Ouchi Y, Inoue S. FOXP1 is an androgen-responsive transcription factor that negatively regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;374:388-93.
6. Takayama K, Tsutsumi S, Suzuki T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Kaneshiro K, Fujimura T, Kumagai J, Urano T, Sakaki Y, Shirahige K, Sasano H, Takahashi S, Kitamura T, Ouchi Y, Aburatani H, Inoue S. Amyloid precursor protein is a primary androgen target gene that promotes prostate cancer growth. *Cancer Res* 2009;69:137-42.
7. Takeo C, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Identification of *Igf2*, *Igfbp2* and *Enpp2* as Estrogen-Responsive Genes in Rat Hippocampus. *Endocrine J* 2009;56:113-20.
8. 伊地知暢広, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡 脂肪細胞分化におけるエストロゲン関連受容体の機能的役割 第28回日本肥満学会 2007年10月19-20日 東京都
9. 竹尾愛理, 池田和博, 菱沼俊樹, 堀江公仁子, 井上聡 ラット海馬におけるエストロゲン標的遺伝子の解析 第15回日本ステロイドホルモン学会 2007年11月23-24日 仙台市
10. Nobuhiro Ijichi, Mayumi Kubo, Kazuhiro Ikeda, Kuniko Horie-Inoue, and Satoshi Inoue. Functional role of estrogen-related receptor family in adipocyte differentiation 第13回アディポサイエンス研究会 シンポジウム 平成20年8月22日 豊中市
11. Nobuhiro Ijichi, Kazuhiro Ikeda, Kayoko Murakami, Kuniko Horie-Inoue, Jun Kawai, Yoshihide Hayashizaki, Satoshi Inoue. Gene expression profiles of nuclear hormone receptors regulated by estrogen in human breast cancer MCF-7 cells The 26th Congress of the International Association for Breast Cancer Research September22-24, 2008, Kurashiki, Okayama, Japan
12. 窪麻由美, 伊地知暢広, 池田和博, 堀江公仁子, 竹田省, 井上聡 脂肪細胞分化モデルとマウス高脂肪食モデルを用いたエストロゲン関連受容体 ERR  $\gamma$  の機能解析 第29回日本肥満学会 2008年10月17-18日 大分市
13. Kazuhiro Ikeda, Nobuhiro Ijichi, Mayumi Kubo, Kuniko Horie-Inoue, Satoshi Inoue. Estrogen-related receptors in fats and adipogenesis. CBI Annual Meeting 2008 International Symposium August 22-24, 2008 Tokyo
14. 伊地知暢広, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡 EPAS1/HIF2  $\alpha$  はグルココルチコイドにより発現が誘導され, 骨芽細胞分化を抑制する 第16回ステロイドホルモン学会 2008年11月22日 福井市
15. 上山和也, 池田和博, 堀江公仁子, 竹田省, 井上聡 エストロゲン応答遺伝子 *Efp* を標的とする二本鎖核酸分子による乳癌・子宮癌細胞の増殖, 腫瘍形成抑制効果 第16回日本ステロイドホルモン学会 2008年11月22日 福井市
16. 池田和博, 伊地知暢広, 村上佳代子, 堀江公仁子, 河合純, 林崎良英, 井上聡 乳癌細胞 MCF7 における核内受容体およびフォークヘッド転写因子のエストロゲンによる発現調節と機能 BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) 2008年12月9-12日 神戸市
17. 池田和博, 井上聡 Glutamate receptor subunit 2D (*Grin2d*) 遺伝子の脳における発現制御と機能解析 遺伝情報 DECODE・冬のワークショップ (転写研究会共催) 2009年1月19-21日 新潟県湯沢町

### 学会発表

1. 池田和博, 池田秀利, 三谷幸之介, 井上聡 ウイルス抵抗性における TRIM5  $\alpha$  と *Efp* (TRIM25) 遺伝子の共通もしくは特異的な作用メカニズム 第55回日本ウイルス学会 2007年10月21-23日 札幌市

12. 池田和博, 上山和也, 堀江公仁子, 竹田省, 井上聡  
ホルモン依存性がんの治療をめざしたエストロ  
ゲン応答遺伝子 Efp を標的とする二本鎖核酸分子の  
開発 第9回関東ホルモンと癌研究会 2009年1月  
24日 東京都
13. 伊地知暢広, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡 ヒト  
乳癌細胞におけるエストロゲン刺激による核内受  
容体ならびにフォークヘッド転写因子の包括的  
発現機能解析 第9回関東ホルモンと癌研究会  
2009年1月24日 東京都
- 2) Lone RO, Frith MC, Karlsson EK, Hansen Rosen U.  
Mol Endocrinol 2004;18:1859-75.
- 3) Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Shimada N, Ishida T,  
Hirakawa H, Ohuchi N, Sasano H. Estrogen-related  
receptor alpha in human breast carcinoma as a  
potent prognostic factor. Cancer Res 2004;64:4670-6.
- 4) Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR,  
Eeckhoute J, Brodsky AS, Keeton EK, Fertuck KC,  
Hall GF, Wang Q, Bekiranov S, Sementchenko V,  
Fox EA, Silver PA, Gingeras TR, Liu XS, Brown M.  
Genome-wide analysis of estrogen receptor binding  
sites. Nat Genet 2006;38:1289-97.
- 5) Wu W, Chaudhuri S, Brickley DR, Pang D,  
Karrison T, Conzen SD. Microarray analysis reveals  
glucocorticoid-regulated survival genes that are  
associated with inhibition of apoptosis in breast  
epithelial cells. Cancer Res 2004;64:1757-64.

#### 参考文献

- 1) Huang WY, Newman B, Millikan RC, Schell MJ,  
Hulka BS, Moorman PG. Hormone-related Factors  
and Risk of Breast Cancer in Relation to Estrogen  
Receptor and Progesterone Receptor Status. Am J  
Epidemiol 2000;151:703-14.