

学内グラント 報告書

平成26年度 学内グラント終了時報告書

丸木記念特別賞受賞

エストロゲン受容体と関連因子による代謝調節の解明と
がん増殖における役割

研究代表者 池田 和博 (ゲノム医学研究センター)

研究分担者 井上 聡*

ステロイドホルモンであるエストロゲンは転写因子として機能するエストロゲン受容体(ER)を介して標的遺伝子の発現を調節することにより生理的ならびに病態生理的な作用を発揮している¹⁾。エストロゲンは脂質および骨の代謝と関連しており、エストロゲン欠乏が閉経後女性の動脈硬化、肥満ならびに骨粗鬆症を促進することが知られているがメカニズムの解明は十分ではなく、その他のエネルギー代謝、糖代謝などの各種代謝との相互作用も想定される。また、エストロゲンは乳癌の増殖・進展に深く関与しており、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乳がんの内分泌療法として臨床応用されており、治療にも関係している²⁾。がん細胞における代謝調節に関しては、解糖系の亢進が以前より知られていたのに加え、近年、アミノ酸代謝、脂質代謝、ペントースリン酸経路などのがん特異的な調節の存在が示唆され始めている³⁾。しかしながら、がん細胞における代謝の制御とエストロゲンの関係に関しては、ほとんど明らかになっていない。一方、核内受容体のなかでERと最も高い保存性を有するエストロゲン関連受容体(ERR)が、ミトコンドリアの生合成、エネルギー代謝、骨形成、乳癌、前立腺癌に関わることが明らかになり注目されている⁴⁾。ERRは、ERと同様にエストロゲン応答配列(ERE)に結合できることから、ERとERRの相互作用が生理的・病態生理的機能を媒介すると想定されるが、その詳細は未解明であり、これら核内受容体の転写制御機構とその標的遺伝子の機能解明が不可欠である。

我々は、エストロゲンの生理作用ならびに病態における役割の解明を目指し、独自にエストロゲン標的遺伝子を複数同定し、発現制御・機能解析を行ってきた⁵⁻⁷⁾。なかでも、COX7RP(cytochrome c oxidase subunit. 7a related polypeptide)は、アミノ酸配列がミトコンドリア内膜に局在するシトクロムcオキシダーゼ(COX: 複合体IV)のCOX7Aサブユニットと高い相同性を有している⁵⁾。COXは、ミトコンドリア電子伝達系の最終的な電子受容

体として酸素を還元して水分子を生成する反応に関わる酵素であり、細胞のエネルギー産生に重要な役割を担っている。我々はCOX7RPが複合体IVの機能と関連する可能性を想定し解析を進めた。

はじめに、COX7RPの生体における作用を解明するため、*Cox7rp*ノックアウト(KO)マウスを作製した⁸⁾。作製した*Cox7rp*KOならびに野生型(WT)のマウスから胎児繊維芽細胞(MEF)を初代培養し、ミトコンドリアを分離してCOX活性とATP産生量を測定したところ、*Cox7rp*KO MEFで有意に低下していることが明らかになった。また、これらMEFにおいて、リンゴ酸+ピルビン酸、コハク酸、人工的な電子供与体をそれぞれ電子伝達系の複合体I、複合体II、複合体IVの基質として添加し、酸素消費量を測定して呼吸活性を定量したところ、*Cox7rp*KO MEFでいずれの呼吸基質を利用したときも呼吸活性が低下していることが判明した。さらに、細胞増殖能を解析したところ、*Cox7rp*KO MEFはWT MEFと比較して増殖能が低下していた。COX7RPの過剰発現による影響を個体レベルで解析するため、COX7RPを過剰発現するトランスジェニックマウス(COX7RP-Tg)を作製し、同様にMEFの初代培養を用いて細胞増殖能を解析したところ、COX7RP-Tg MEFはWT MEFよりも細胞増殖能が亢進していた。これらの結果から、COX7RPはミトコンドリアの呼吸活性とエネルギー産生を促進する作用を有し、細胞増殖を亢進することが明らかになった。

続いて、エネルギー産生が重要な機能を有する骨格筋の表現型について*Cox7rp*KOならびにCOX7RP-Tgマウスを用いて解析した。これら遺伝子改変マウスの大腿四頭筋におけるCOX活性を細胞化学的手法により検討したところ、*Cox7rp*KOマウスで減少し、COX7RP-Tgマウスで増強していることが示された。また、トレッドミルを用いて強制的に運動させ、疲労を呈するまでの運動持続時間の解析を行ったところ、*Cox7rp*KOマウスは運動持続時間が減少し、反対に、COX7RP-Tgマウスでは増加することが判明した。従って、COX7RPは骨格筋のエネルギー代謝を

*ゲノム医学研究センター

制御し、運動持続能に関与していることが示された。

さらに、体温調節に必要な熱産生組織である褐色脂肪細胞における表現型について解析を行った。褐色脂肪組織のミトコンドリアでは、脱共役タンパク質であるUCP1が発現しており、ミトコンドリア内膜での酸化的リン酸化反応を脱共役させ、エネルギーを熱として放出する作用を有している。*Cox7rp*KOマウスの褐色脂肪組織を解析したところ、組織全体の肥大化とともに、脂肪細胞内に蓄積されている油滴が大きいことが明らかとなり、機能不全の状態であることが示唆された。そこで、*Cox7rp*KOマウスを寒冷に暴露したところ、低体温症を呈しやすいたことが判明した。従って、COX7RPは褐色脂肪組織において、熱産生に関与することが明らかになり、脂質代謝における影響が示唆された。

次に、ミトコンドリア呼吸鎖のスーパー複合体形成におけるCOX7RPの役割をBlue native-polyacrylamide electrophoresis (BN-PAGE) の後にSDS-PAGEを行う2次元電気泳動を用いて解析した。マウス骨格筋から調整したミトコンドリアをジギトニンで可溶化し、2次元電気泳動を行った後、複合体I, III, IVのサブユニットに対する抗体とともにCox7rpに対する抗体などを用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、Cox7rpはI/III₂/IV_nスーパー複合体に存在することが示された。一方、*Cox7rp*KOマウスの骨格筋には、I/III₂/IV_nスーパー複合体が減少し、Cox4のスーパー複合体への取り込みも減少していることが判明した。従って、COX7RPの作用分子メカニズムとして、ミトコンドリア呼吸鎖のスーパー複合体形成を促進する機能を有することが明らかになった。

*Cox7rp*KOおよびCOX7RP-Tgマウスの解析は、エストロゲン応答遺伝子COX7RPによるミトコンドリア呼吸鎖スーパー複合体制御の生体における機能を明らかにするために有用であり、これら遺伝子改変マウスを駆使することにより、エストロゲン作用の疾患・がんにおける意義を明らかにできると考えられた。特に、各種代謝調節(糖代謝、脂質代謝、骨代謝など)におけるエストロゲンの作用とミトコンドリアの機能との関連を解明する研究は今後の課題であり、COX7RPの機能解明が有用であると考えられた。

エストロゲンの骨における作用として、エストロゲンは骨芽細胞および破骨細胞を標的としていることが従来の研究から示されている。エストロゲンは、骨芽細胞に対して直接的に作用し分化や増殖を促進することや、RANKLのデコイ受容体として作用するOsteoprotegerin (OPG) の発現を促進し、破骨細胞の分化・活性を抑制することが報告されている。一方、破骨細胞においては、エストロゲンはHIF1 α を抑制することによって骨吸収を抑制することや、骨吸収に関与するサイトカイン(IL-6やTNF α など)の発現を抑制することなどが我々の含むグループより報告されている。これらのメカニズムは、閉経後のエストロゲン欠乏による骨粗鬆症の病因と考えられ

ている。また、エストロゲンは生活習慣病との関係が注目されている。特に、閉経後のエストロゲン低下はメタボリック症候群と関連し、インスリン抵抗性、肥満、脂肪組織の増大、高脂血症、動脈硬化などの原因となり、エストロゲンシグナルがそれら生活習慣病の治療に役立つ可能性が想定されている。COX7RPは骨芽細胞、脂肪細胞をはじめ各組織での発現が認められることから、このようなエストロゲンの多彩な機能を媒介する可能性が考えられた。

エストロゲンはエストロゲン受容体(ER)陽性の乳がんや子宮がんの増殖・進展に関与している。特に、乳癌では抗エストロゲン剤やアロマターゼ阻害剤を用いた内分泌療法が臨床で広く行われている。しかしながら、内分泌治療薬の長期投与によって耐性を獲得するがん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が存在していることや、子宮がんでは内分泌療法が奏効する例が少ないなど、ホルモン依存性と抵抗性のメカニズムは、ホルモン依存性がんの解明すべき問題である。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。ERと相同性が最も高い核内受容体であるエストロゲン関連受容体(ER α)は、EREと結合して転写を調節することが知られている。ERはエネルギー代謝に関わるミトコンドリア生成や脂肪酸 β 酸化などを促進する転写因子として知られている一方で、乳癌の半数以上で発現しており、予後不良のバイオマーカーとして報告されている。我々は、COX7RP遺伝子に存在するEREを同定しており、ERによる転写制御を受けていることを確認している。従って、COX7RPはERとER α の両者の核内受容体によって制御される可能性が考えられ、エネルギー代謝・脂質代謝・糖代謝ならびにがんとの関連を明らかにする標的として期待された。

参考文献

- 1) Muramatsu M, Inoue S. Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:1-10.
- 2) 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.
- 3) Chen JQ, Russo J. Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2012;1826:370-84.
- 4) 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.

- 5) Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Kawashima H, Muramatsu M. Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Mol Cell Biol* 1998;18:442-9.
- 6) Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* 2002;417:871-5.
- 7) Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature*. 2007;446:916-20.
- 8) Ikeda K, Shiba S, Horie-Inoue K, Shimokata K, Inoue S. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat Commun* 2013;4:2147.

研究成果リスト

論文

- 1) Azuma K, Tsukui T, Ikeda K, Shiba S, Nakagawa K, Okano T, Urano T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Ikawa M, Inoue S. Liver-specific γ -glutamyl carboxylase-1 deficient mice display bleeding diathesis and short life span. *PLoS ONE* 2014;9:e88643.
- 2) Yamaga R, Ikeda K, Boele J, Horie-Inoue K, Takayama K, Urano T, Kaida K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Ouchi Y, de Hoon M, Inoue S. Systemic identification of estrogen-regulated genes in breast cancer cells through cap analysis of gene expression mapping. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;447:531-6.
- 3) Boele J, Persson H, Shin JW, Ishizu Y, Newie I, Søkilde R, Hawkins SM, Coarfa C, Ikeda K, Takayama K, Horie-Inoue K, Ando Y, Burroughs AM, Sasaki C, Suzuki C, Sakai M, Aoki S, Ogawa A, Hasegawa A, Lizio M, Kaida K, Teusink B, Carninci P, Suzuki H, Inoue S, Gunaratne P, Rovira C, Hayashizaki Y, de Hoon M. PAPD5-mediated 3'adenylation and subsequent degradation of oncomiR miR-21 is disrupted in proliferative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:11467-72.
- 4) Maruyama Y, Miyazaki T, Ikeda K, Okumura T, Sato W, Horie-Inoue K, Okamoto K, Takeda S, Inoue S. Short hairpin RNA library-based functional screening identified ribosomal protein L31 that modulates prostate cancer cell growth via p53 pathway. *PLoS ONE* 2014;9:e108743.
- 5) Miyazaki T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Amyloid precursor protein regulates migration and metalloproteinase gene expression in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;452:828-33.

- 6) Miyazaki T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Kondo T, Takahashi S, Inoue S. EBAG9 modulates host immune defense against tumor formation and metastasis by regulating cytotoxic activity of T lymphocytes. *Oncogenesis* 2014;3:e126.
- 7) Shiba S, Ikeda K, Azuma K, Hasegawa T, Amizuka N, Horie-Inoue K, Inoue S. γ -Glutamyl carboxylase in osteoblasts regulates glucose metabolism in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;453:350-5.
- 8) Azuma K, Shiba S, Hasegawa T, Ikeda K, Urano T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Amizuka N, Inoue S. Osteoblast-specific γ -glutamyl carboxylase-deficient mice display enhanced bone formation with aberrant mineralization. *J Bone Miner Res* (in press).
- 9) Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Analysis of TFRNs associated with steroid hormone-related cancers. *Methods Mol Biol* 2014;1164:197-209.
- 10) Ujihira T, Ikeda K, Suzuki T, Yamaga R, Sato W, Horie-Inoue K, Shigekawa T, Osaki A, Saeki T, Okamoto K, Takeda S, Inoue S. MicroRNA-574-3p, identified by microRNA library-based functional screening, modulates tamoxifen response in breast cancer. *Sci Rep* 2015;5:7641.
- 11) Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Identification of estrogen-responsive genes based on the DNA binding properties of estrogen receptors using high-throughput sequencing technology. *Acta Pharmacol Sin* 2015;36:24-31.

学会発表

- 1) 池田和博, 氏平崇文, 丸山洋二郎, 堀江公仁子, 井上 聡. 乳がん細胞ならびに前立腺がん細胞の内分泌療法耐性に関わるシグナル経路の解析, 第6回日本RNAi研究会, 2014年8月28-30日, 広島市
- 2) Shiba S, Azuma K, Hasegawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Amizuka N, Inoue S. Vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase regulates bone formation and glucose metabolism. 24th NZBMS Annual Scientific Meeting, September 7-10 2014, Queenstown, New Zealand.
- 3) 鈴木佐和子, 池田和博, 井上 聡, 鈴木 稊, 菅野純夫, 横手幸太郎, 田中知明. ミトコンドリア分子GLS2のヒトES/iPS細胞におけるグルタミン代謝を介した幹細胞制御機構, 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25-27日, 横浜市
- 4) 柴祥子, 池田和博, 堀江公仁子, 井上 聡. COX7RPは動物個体レベルで糖・脂質代謝を調節する, 第87回日本生化学会大会, 2014年10月15-18日, 京都市
- 5) 堀江公仁子, 池田和博, 井上 聡. 乳がんの病態進行にかかわるアンチセンス長鎖非コードRNAの同定と

- 機能解析, 第 22 回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 2014 年 11 月 3 日, 東京都
- 6) 池田和博, 堀江公仁子, 井上 聡. エストロゲン応答遺伝子 COX7RP の骨における生体機能, 第 22 回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 2014 年 11 月 3 日, 東京都
- 7) 池田和博, 堀江公仁子, 井上 聡. 乳がん細胞の内分泌療法耐性に関わるマイクロ RNA とその標的の探索ならびに機能解析, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25-27 日, 横浜市
- 8) 奥村俊之, 丸山洋二郎, 宮崎利明, 池田和博, 佐藤 航, 堀江公仁子, 岡本康司, 竹田 省, 井上 聡. RPL31 は p53 タンパク質の分解を制御することによってビカルタミド耐性前立腺がん細胞の増殖に関与する, 第 15 回関東ホルモンと癌研究会, 2015 年 1 月 31 日, 東京都
- 9) 池田和博. 生体ならびに乳癌におけるエストロゲン応答因子の探索と機能解析, 埼玉医科大学国際医療センター包括的がんセンター教育カンファレンス, 2015 年 2 月 23 日, 日高市