

原 著

エストロゲン応答遺伝子COX7RP (cytochrome c oxidase subunit 7a related polypeptide) の子宮内膜癌における発現とその調節

林 るつ子

Expression and Regulation of an Estrogen-Responsive Gene, Cytochrome C Oxidase Subunit 7a Related Polypeptide (COX7RP) in Endometrial Cancer

Rutsuko Hobo-Hayashi (Department of Obstetrics and Gynecology, Saitama Medical Center, Saitama Medical School, Kawagoe, Saitama 350-8550, Japan)

Endometrial cancer is one of the most common gynecologic malignancies. Recent epidemiological studies show that the incidence rate of endometrial cancer is increasing in Japan. Although the exact cause of endometrial cancer is still obscured, estrogen appears to play an important role in endometrial cancer because prolonged exposure to unopposed estrogen has been reported as a risk factor for it. Indeed, Ishikawa cells derived from human endometrial cancer that express estrogen receptor α and β (ER α and ER β) show estrogen dependent proliferation. ERs are ligand dependent transcription factors that regulate target gene transcription. Therefore, estrogen actions such as cell growth in endometrial cancer are exhibited by estrogen-responsive genes. However, it has not been fully elucidated how the estrogen-responsive genes mediate the progression of endometrial cancer.

COX7RP has been isolated as an estrogen responsive-gene with an ER-binding human genomic fragment, EB1, obtained by the genomic-binding site cloning. COX7RP gene contains a perfect palindromic estrogen-responsive element (ERE) in the first intron. The expression of COX7RP mRNA is up-regulated by estrogen in human breast cancer MCF7 cells. Based on the homology of the amino acids, COX7RP is considered as a member of COX7a family which is a nuclear encoded subunit of cytochrome c oxidase (COX).

The present study aims to determine whether COX7RP as a novel estrogen-responsive gene associates with endometrial cancer. The expression of COX7RP mRNA is demonstrated to respond to estrogen and repressed by ICI 182, 780, a pure antagonist for ER in human endometrial cancer Ishikawa cells. The ERE-containing EB1 fragment activates transcription in response to estrogen. In addition, the correlations between COX7RP and ER mRNA expression levels are found in clinical samples of endometrial cancer. Western blot analysis detected COX7RP protein in a mitochondrial fraction of cell extracts by a rabbit polyclonal antibody raised against a C-terminal polypeptide of human COX7RP. Moreover, immunohistochemistry with this anti-COX7RP polyclonal antibody and a ER α antibody reveals that the COX7RP protein is localized in cytoplasm of endometrial cancer cells. In most of COX7RP positive cells, we also observed nuclear staining of ER α .

Taken together, these results suggest that COX7RP is involved in the estrogen actions in endometrial cancer as a primary estrogen-responsive gene.

Keywords: Estrogen, endometrial cancer, COX7RP, estrogen receptor

J Saitama Med School 2004;31:199-206

(Received July 14, 2004)

緒 言

子宮内膜癌の発症数は、近年増加傾向にあり、日本産婦人科学会の婦人科腫瘍委員会の子宮癌統計によ

ると、1989年では子宮癌に占める割合の24%¹⁾に過ぎなかったが、1996年では34%²⁾に増加しており、日常診療でも、よく遭遇する子宮癌の一つとなっている。

子宮内膜癌の発症には女性ホルモンであるエストロゲンが深く関わっていると考えられおり、子宮内膜癌のリスク因子として、分娩回数の低下による

エストロゲンの持続的な暴露やエストロゲン単独でのホルモン補充療法、多嚢胞性卵巣症候群などによる高濃度エストロゲンの持続的な暴露³⁾などが報告されている。実際、子宮内膜癌の70~80%はestrogen-related typeによって占められており、組織型では複雑型異型増殖症および類内膜癌の高分化型、中分化型がこれに相当する。一方、類内膜癌の低分化型はestrogen-nonrelated typeに分類される⁴⁾。estrogen-related typeではER α およびER β の両方の発現を認め、診断、治療および予後との関連が報告されている⁵⁻⁷⁾。エストロゲンの子宮内膜癌に対する作用は培養細胞株においても確立されており、エストロゲン受容体(ER)陽性のヒト子宮内膜癌由来の細胞株であるIshikawa細胞⁸⁾においてはエストロゲン依存性の増殖を示す⁹⁾。

このような癌細胞の増殖促進効果をはじめとするエストロゲンの作用は、リガンド依存性の転写因子であるERを介して発揮されると考えられている。エストロゲンを結合して活性化されたERは、エストロゲン標的遺伝子の転写調節領域に存在するエストロゲン応答配列(ERE)に結合し、近傍の標的遺伝子の発現量を制御する。従って、エストロゲンの生理学的ならびに病態生理学的作用はエストロゲン応答遺伝子によって媒介されると考えられている¹⁰⁻¹⁴⁾。しかしながら、子宮内膜癌におけるエストロゲン応答遺伝子の解析は不十分であり、その作用機構についてはほとんど明らかにされていない。

cytochrome c oxidase subunit 7a related polypeptide(COX7RP)は、ERのDNA結合領域を用いてゲノム上のEREを検索するゲノム結合部位クローニング法によって単離されたヒトゲノム断片(EB1)をプローブとしてその近傍に同定された新たなエストロゲン応答遺伝子である。COX7RPの第1イントロンにはpalindromic ERE配列が存在し、乳癌細胞株であるMCF-7細胞においてCOX7RP遺伝子の新たな蛋白合成を介さない直接のエストロゲン応答性が報告されている¹⁵⁾。cytochrome c oxidase(COX)はミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系の最終段階において、多量のエネルギーをATP合成酵素に伝達する酵素であり¹⁶⁾、13個のサブユニットが報告されている。COX1, 2, および3のサブユニットはミトコンドリアゲノムにコードされ、COX活性中心を形成するが、一方、他のサブユニットは核のゲノムにコードされており、COX活性の制御に関わっていると考えられている¹⁷⁾。COX7RPのアミノ酸一次構造はN末端側からTargeting presequence, N-Terminal HydrophilicおよびTransmembrane構造を有しており、COXサブユニットの一つであるCOX7aと相同性が高いことから、COX7RPは新たなCOX7aのファミリーとして考えられている¹⁸⁾。

本研究では、COX7RPの発現制御および細胞内局在の解析を行い、子宮内膜癌におけるエストロゲン応答遺伝子としてのCOX7RPの役割ならびに、予後因子としての可能性を検討した。

材料と方法

細胞

ヒト子宮内膜癌由来Ishikawa細胞3H12 No.74, ヒト胎児腎臓由来293T細胞およびサル腎臓由来COS-1細胞は、10% fetal calf serum (Roche), 100 units/ml penicillinおよび100 μ g/ml streptomycinを含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)にて培養した。

子宮内膜組織

埼玉医科大学総合医療センター産婦人科にてインフォームドコンセントの得られた子宮内膜癌50検体および正常組織部分の子宮内膜10検体を用いた。手術後得られた検体(約5×5×5 mm大の組織)は1×PBSにて洗浄した後-80℃で保存した。

プラスミドの作製

ヒトCOX7RP cDNA (GenBank accession #; NM_004718)¹⁵⁾を鋳型としCOX7RPの2番目のアミノ酸からストップコドンまでの領域をプライマー(5'-GCGAATCCTACTACAAGTTTAGTGGCTTCA-3'および5'-ACCTCGAGTCATTTGTTTTTGGGCTGCCAA-3')を用いて、PCRにて増幅し、制限酵素EcoRI/XhoIで消化した断片をFlag-pcDNA3ベクターに挿入し、Flag-tag付き発現プラスミド(Flag-COX7RP)を構築した。また、ゲノム結合部位クローニング法により得られたCOX7RP遺伝子の5'上流領域から第1イントロンに相当しERE配列を含むゲノム断片であるEB1 (GenBank accession #; AY007643)¹⁵⁾をSalI/SacIサイトで切り出し、DNA Blunting Kit (TAKARA)を用いて末端を平滑化した後、pGL3-basic vector (Promega)のSmaIサイトに挿入してルシフェラーゼレポータープラスミド(EB1-LUC)を構築した。

定量的PCR(real-time quantitative PCR)

Ishikawa細胞をdextran-coated charcoal (SIGMA)処理した10% fetal calf serum (dcc-FCS)を含むphenol red free DMEMで24時間前培養した後、10 nM 17 β -Estradiol (E2)を添加し0, 2, 6, 12 および24時間培養した。また、10 nM E2, 1 μ M ICI 182, 780 (ICI) および10 nM E2 + 1 μ M ICIを添加し6時間培養した。これらの細胞よりISOGEN (Nippon Gene)を用いてtotal RNAを抽出し、total RNA 2 μ gをSuperScript II (Invitrogen)を用いて逆転写しcDNAを作製した。子宮内膜癌および正常子宮内膜組織のtotal RNAをISOGEN (Nippon Gene)を用いて抽出し、さらにOligotex-dT30 super mRNA purification Kit (TAKARA)によりpolyA(+) RNAを精製した。polyA(+) RNA 1 μ gよりcDNA

を作製した。これらの細胞と組織より合成したcDNAを鋳型としてSYBR green PCR master mix (ABI)を用いてPCRを行いABI PRIZM 7000 Sequence Detectorによって増幅産物を経時的に定量化することによりCOX7RP, ER α , ER β およびGAPDHのmRNAの発現量を定量した。定量的PCRに用いたプライマーはヒトCOX7RP (5'-GCCTGCCTGACCAAATGC-3' および 5'-GGGCGATCAGGCAAGT-3'), ヒトER α (5'-AGACGGACCAAAGCCACTTG-3' および 5'-CCCCGTGATGTAATACTTTTGCA-3'), ヒトER β (5'-GCCGTGACCGATGCTGCTTTG-3' および 5'-GTTAGCCAGGCGCATGGA-3'), ヒトGAPDH (5'-GCCTGCCTGACCAAATGC-3' および 5'-GTGGTCGTTGAGGGCAATG-3')を用いた。定量的PCRの結果より求められたCOX7RP, ER α , ER β mRNAの発現量はGAPDH mRNAの発現量を内部標準として補正した。

ルシフェラーゼアッセイ

ER α , β を発現していない293T細胞を10% dcc-FCSを含むphenol red free DMEMにて24時間前培養した後、EB1-LUCおよびコントロールであるERE-LUCをER α あるいはER β 発現ベクター¹²⁾と共にリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした。12時間培養後、10 nM E2あるいは溶媒であるエタノールを添加し24時間培養した。ルシフェラーゼアッセイはluciferase assay system (Promega)を用いて定法に従った。

ヒトCOX7RPポリクローナル抗体の作製

ヒトCOX7RPアミノ酸配列のC-末端14個の合成ペプチドにキャリアー蛋白としてkeyhole limpet hemocyanin (KLH)を結合させ、ウサギ(日本白色種)2羽に免疫して得られた抗血清をAffigel-10 (BIO-RAD)を用いて精製した。動物実験は埼玉医科大学動物実験の基本指針に従った。

粗ミトコンドリア分画の精製とWestern blot 解析

293T細胞に、FuGENETM 6 (Roche)を用いてFlag-COX7RP および Flag-pcDNA3をトランスフェクションした。36時間後にミトコンドリア分画分離用ホモジナイズbuffer (100 mM Tris-HCl, pH7.4, 250 mM Sucrose, 1 mM PMSF)にてホモジナイズし遠心分離により得られたミトコンドリア分画を4× sample buffer (1 M Tris-HCl, pH6.5, 4% SDS, 20% Glycerol, 4% 2-Mercaptoethanol)にて溶解した。80 μ gのミトコンドリア分画より抽出された蛋白を16% SDS-PAGEゲルにて泳動後、Immobilon-P (Millipore)へブロッティングした。Flag-COX7RP蛋白の検出には、1次抗体としてFlag M2 monoclonal抗体 (SIGMA) および精製したCOX7RP抗体を用い、ECL detection system (Amersham Pharmacia biotech)により行った。

免疫組織染色

患者病理パラフィンブロックを4ミクロン切片とし

てキシレンにて脱パラフィン後、抗原賦活化溶液 (10 mM クエン酸Na (pH 6) (和光試薬工業))中でオートクレーブ処理 (121°C 15分間)した。オートクレーブ後、自動免疫装置 (Bio GeneX I-600)を用いて協和ステインプロトコル (協同病理)に従い、精製したCOX7RP抗体にて免疫染色を行った。また、抗ER α マウスモノクローナル抗体 (6F11) (協同病理)による免疫染色も協和ステインプロトコルに従った。観察は蛍光顕微鏡 (Leica DMLB)を用いた。

統計解析

データの解析には多重比較検定または相関係数検定を行いP < 0.05以下を有意な差とした。

結 果

子宮内膜癌由来Ishikawa細胞におけるCOX7RP mRNAのエストロゲン応答性

Ishikawa細胞を10% dcc-FCSを含むphenol red free DMEMにて前培養後、10 nM E2を0, 2, 6, 12, 24時間添加し、COX7RP mRNAのエストロゲン応答性を解析した。その結果、COX7RP mRNAはエストロゲン投与後2時間および6時間においてそれぞれ2.5倍、1.6倍有意に上昇した (Fig. 1A)。その後12時間から24時間では発現量はエストロゲン誘導前のレベルに戻った。ERのアンタゴニストであるICI処理6時間においては、ICI単独ではCOX7RP mRNAの発現量は0.41倍に有意に抑制され、E2とICIを同時に処理することによりE2によるCOX7RP mRNAの発現上昇を抑制した (Fig. 1B)。このことにより、子宮内膜癌由来の細胞株であるIshikawa細胞においてCOX7RP mRNAの発現はERを介してエストロゲンによって誘導されることが示唆された。

COX7RP遺伝子プロモーター/エンハンサー領域のエストロゲン応答性

ゲノム結合部位クローニング法によって単離されたEB1断片はCOX7RPの5'上流領域から第1イントロンを含み、この第1イントロンには、ERE配列が存在している (Fig. 2A)。従って、EB1断片はCOX7RP遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域に相当するとともにエストロゲン依存性の転写活性を担う領域であると考えられる。そこで、Fig. 2Aに示すようにEB1をルシフェラーゼベクターに挿入し、EB1断片のエストロゲン応答性の転写活性化について解析した。ERを発現していない293T細胞にER α またはER β の発現ベクターと共に、EB1-LUCを一過性に発現させルシフェラーゼ活性を調べたところ、エストロゲンによってER α では1.7倍、ER β では1.2倍に有意に上昇した (Fig. 2B)。ER発現ベクターを導入しないときにはエストロゲン応答性はみられなかった。これらのことよりCOX7RP遺伝子の第1イントロンに存在するEREを含むEB1断片の転写活性にはエストロゲン応答性があり、2つのエストロゲン受容体であるER α , β のどちらによっても活性化された。

子宮内膜癌におけるCOX7RP, ER α およびER β mRNA発現量の相関

実際の正常子宮内膜組織ならびに子宮内膜癌におけるCOX7RP mRNAの発現をER α ならびにER β の発現量と共に解析した. COX7RP mRNA, ER α ならびにER β の発現量は内部標準として同時に定量したGAPDH mRNAの発現量を用いて補正し, COX7RPとER α の

発現量散布図 (Fig. 3A) ならびにCOX7RPとER β の発現量散布図 (Fig. 3B) を示した. これらの図に示したように正常子宮内膜に比較して子宮内膜癌組織においては, COX7RP mRNAの発現量が亢進している症例がより多いことが解り, 同時にこれらのCOX7RP mRNAが過剰発現している症例においてはER α ならびにER β mRNAの発現量も増大していることが明らかに

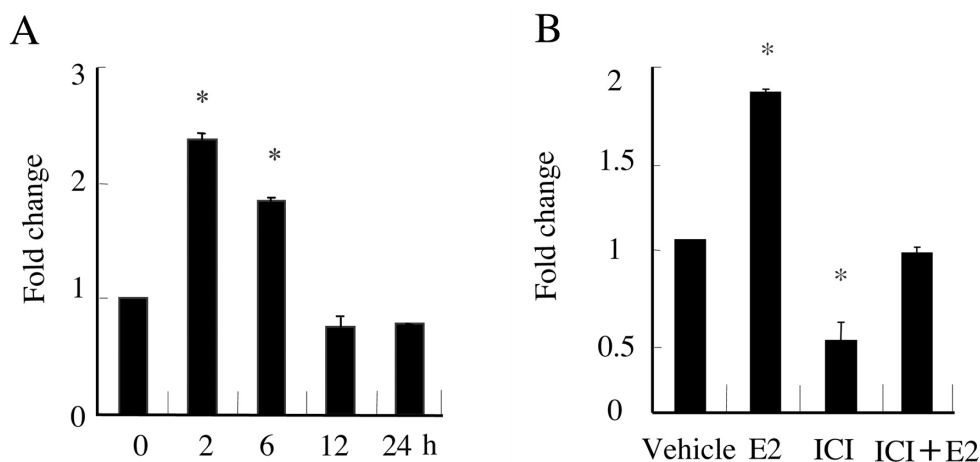


Fig. 1. Ishikawa細胞におけるCOX7RP mRNAのエストロゲン応答性. (A) 10% dcc-FCSを含んだphenol red-free DMEMで前培養したIshikawa細胞に10 nM E2を添加し, 0, 2, 6, 12, 24時間後のCOX7RP mRNAの発現量を定量的PCR法により解析した. それぞれの実験は3回行い, 結果を平均値±標準偏差で示した(*, $P < 0.05$). (B) 10 nM E2, 1 μ M ICIおよび10 nM E2+1 μ M ICIを添加し, 6時間後のCOX7RP mRNAの発現量を定量的PCR法にて解析した. それぞれの実験は3回行い, 結果を平均値±標準偏差で示した(*, $P < 0.05$).

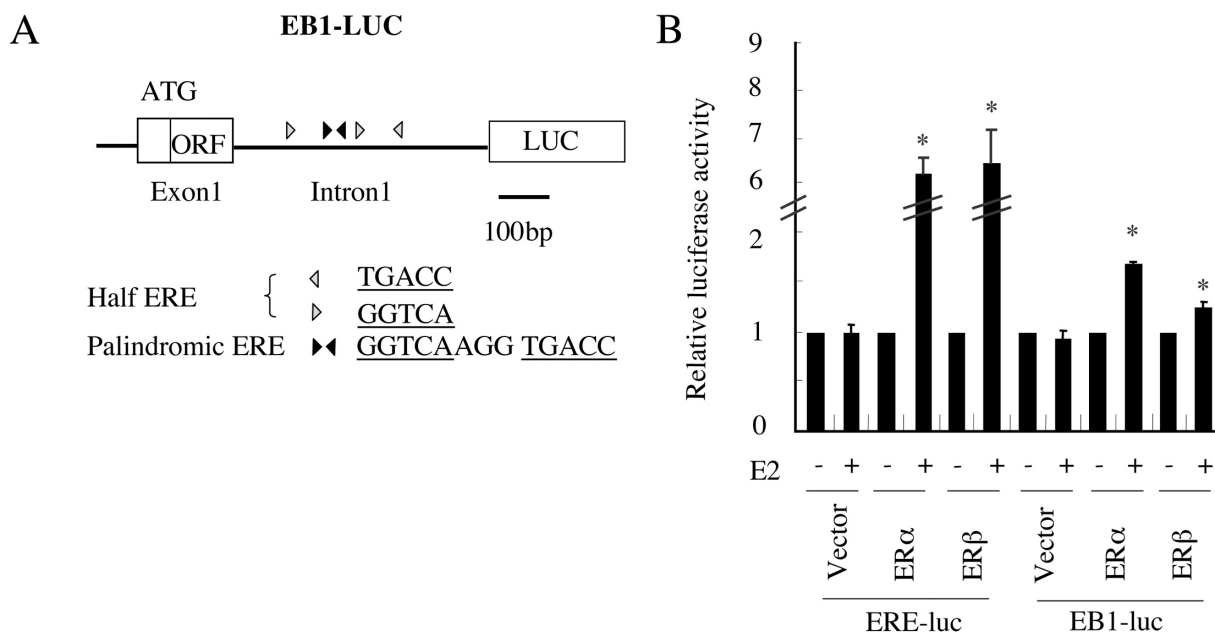


Fig. 2. COX7RP遺伝子プロモーター/エンハンサー領域を含むルシフェラーゼレポーターベクター (EB1-LUC) の構造. (A) COX7RP遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域を含むEB1ルシフェラーゼレポーターベクターの構造. (B) COX7RP遺伝子プロモーター/エンハンサー領域のエストロゲン応答性. EB1-LUCおよびコントロールであるERE-LUCをER α あるいはER β 発現ベクターと共にER α , β を発現していない293T細胞に導入し, 10 nM E2で24時間処理後, ルシフェラーゼアッセイを行った. それぞれの実験は3回行い, 結果を平均値±標準偏差で示した(*, $P < 0.05$).

なった。また、ER α とCOX7RP mRNAの発現量の相関係数は0.82であり、ER β とCOX7RP mRNAの発現量の相関係数は0.92となり、ER α ならびにER β mRNAの発現量とCOX7RP mRNAの発現量との間にそれぞれ強い正の相関が示された。

COX7RP抗体の作製とCOX7RP蛋白の細胞内局在の解析

次にCOX7RPの発現を蛋白レベルで解析するため、COX7RPのC-末端14個のアミノ酸配列に相当する合成ペプチドに、キャリアーとしてKLHを結合させ、ウサギに免疫して抗血清を作製し、アフィ

ニティーカラムを用いてCOX7RP抗体を精製した (Fig. 4A)。COX7RP蛋白はそのアミノ酸配列の相同性からミトコンドリアに局在することが示唆されている。そこで、Flag-COX7RPまたはそのベクターのみをトランスフェクションした293T細胞より粗ミトコンドリア分画を調整し、一次抗体としてCOX7RP抗体またはFlag-抗体を用いてウエスタンブロットにて解析し、COX7RP蛋白がミトコンドリアに局在するか検討した (Fig. 4B)。その結果、COX7RP抗体およびFlag抗体はミトコンドリア分画の約13 kDaに相当するFlag-COX7RPのバンドを特異的に認識することが確かめられた。これらの結果より、COX7RP蛋白はミトコンドリアに局在することが示された。

ヒト子宮免疫組織染色

次に精製したCOX7RP抗体を用いて、増殖期の正常子宮内膜および子宮内膜癌の免疫組織染色を行いCOX7RPの発現を解析した。併せて、ER α 抗体を用いてERの発現を解析した。Fig. 5A, B, CおよびDに正常

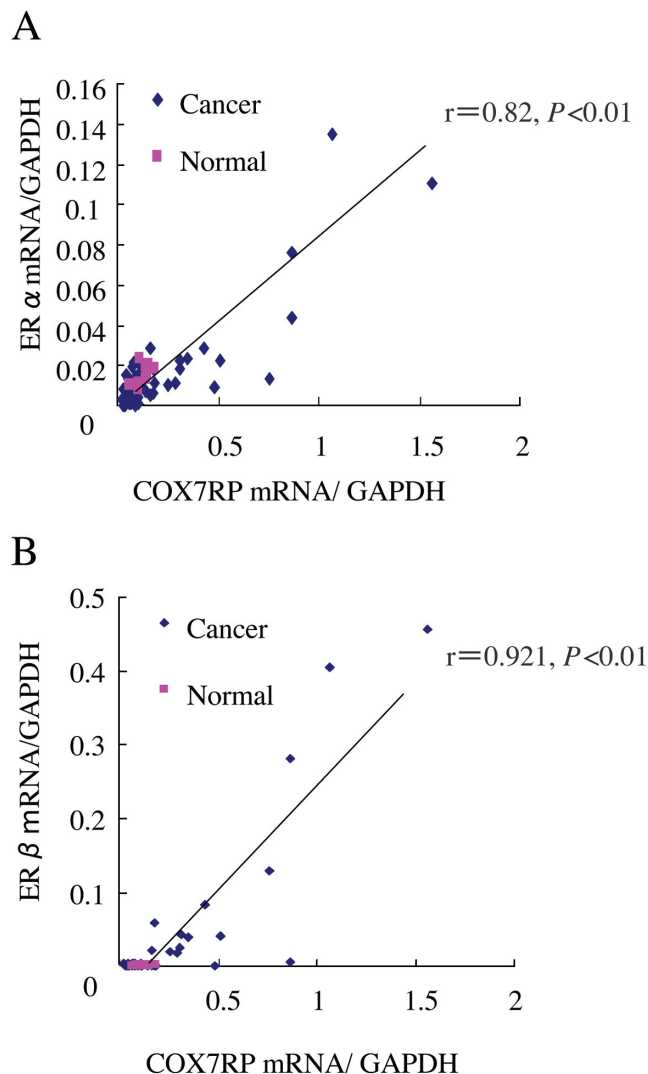


Fig. 3. 子宮内膜癌および正常子宮内膜組織におけるCOX7RP, ER α およびER β の発現解析. 子宮内膜癌および正常子宮内膜組織よりpolyA (+) RNAを精製しcDNAを作製した. このcDNAを用いて定量的PCRによってCOX7RP, ER α およびER β , GAPDH mRNAの発現量を定量化した. それぞれの遺伝子の発現量は内部標準として用いたGAPDH mRNAの発現量によって補正した. (A) COX 7RPとER α mRNA発現量の散布図. (B) COX7RPとER β mRNA 発現量の散布図. それぞれの回帰直線および相関係数(r)を図中に示した.

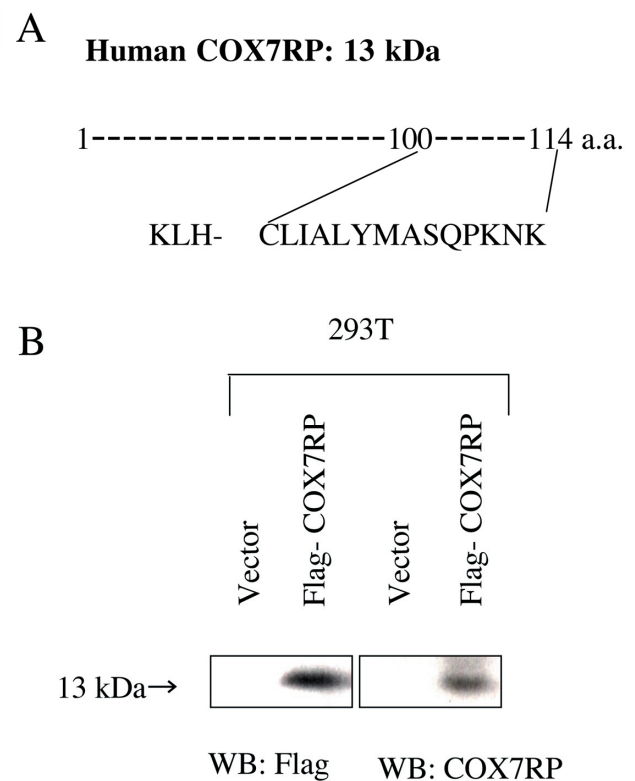


Fig. 4. COX7RP抗体の作製およびミトコンドリア分画を用いたウエスタンブロット. (A) ヒトCOX7RPのC末端の14個のアミノ酸からなる合成ペプチドにキャリアー蛋白としてKLHを結合させ、ウサギに免疫して得られた抗血清を精製した. (B) Flag-COX7RPを強制発現させた293T粗細胞より粗ミトコンドリア分画を精製し、SDS-PAGEにより分離した. 抗Flag抗体またはCOX7RP抗体を用いてウエスタンブロットを行った.

子宮内膜組織における結果を示した。ERの正常子宮内膜における発現パターンは以前より報告のみられるように内膜腺および間質の核に多く発現していた (Fig. 5. B, D). 特に、細胞の大きい内膜腺細胞でのER α 抗体による核染色は著明であった。一方、精製したCOX7RP抗体染色では、主にER α 陽性の内膜腺細胞の細胞質に染色された (Fig. 5. A, C). Fig. 5E, F, GおよびHに類内膜癌における結果を示した。ER α 抗体染色 (Fig. 5. F, H) および精製したCOX7RP抗体染色 (Fig. 5. E, G) では正常子宮内膜と同様な染色パターンを示し、ER α 陽性の内膜腺細胞の細胞質にてCOX7RPの発現を認めた。正常子宮内膜および子宮内膜癌における免疫染色においてCOX7RP蛋白は細胞質に検出されたが、これはウエスタンブロット解析によりCOX7RP蛋白がミトコンドリア分画に存在することに一致する結果となった。また、核内受容体であるER α は主に核に局在することが示された。このようにER α とCOX7RPの細胞内局在パターンは異なっていたが、同一子宮内膜組織における両者の発現は非常に良く相関しており、co-expressすることが示された。

考 察

本研究では、ヒト子宮内膜癌由来のIshikawa細胞においてCOX7RP mRNAの発現量はエストロゲン処理後2時間という短時間で誘導され、かつERのアンタゴニストであるICIにより抑制を受けることを示した。また、COX7RP遺伝子の5'上流領域からEREが存在する第1イントロンまでを含む領域はプロモーター/エンハンサー活性を有し、エストロゲンならびにER α 、ER β を介してエストロゲン応答性の転写活性化能を有することが明らかとなった。これらの結果より、ヒト子宮内膜癌由来のIshikawa細胞において、COX7RPはエストロゲンによって転写レベルで直接制御されるエストロゲン応答遺伝子であり、その際、ER α およびER β に共通の下流応答遺伝子であることが示唆された。

また、ウエスタンブロットの解析により、細胞のミトコンドリア分画にCOX7RP蛋白が存在することが示された。COX7RPのアミノ酸配列はCOXのサブユニットであるCOX7AH、COX7ALと相同性が高い¹⁸⁾。これらのことから、COX7RPは核にコードされた新たなCOXサブユニットでありCOXの活性を制御している可能性が想定される。すなわち、エストロゲン応答遺伝子であるCOX7RPはERの下流応答遺伝子としてミトコンドリアでの呼吸活性を制御している可能性がある。COX2¹⁹⁾およびCOX3²⁰⁾サブユニットもエストロゲン応答性を示すことが報告されており、エストロゲンがCOX活性を制御していることが示唆される。しかしながら、COX2およびCOX3はミトコンドリアゲノムにコードされており、EREを持たない²¹⁾。これらに対し、

COX7RPはその転写調節領域にEREを有しCOX7RPはエストロゲンの直接的な標的遺伝子としてCOX活性の制御に関わる可能性が示唆される。

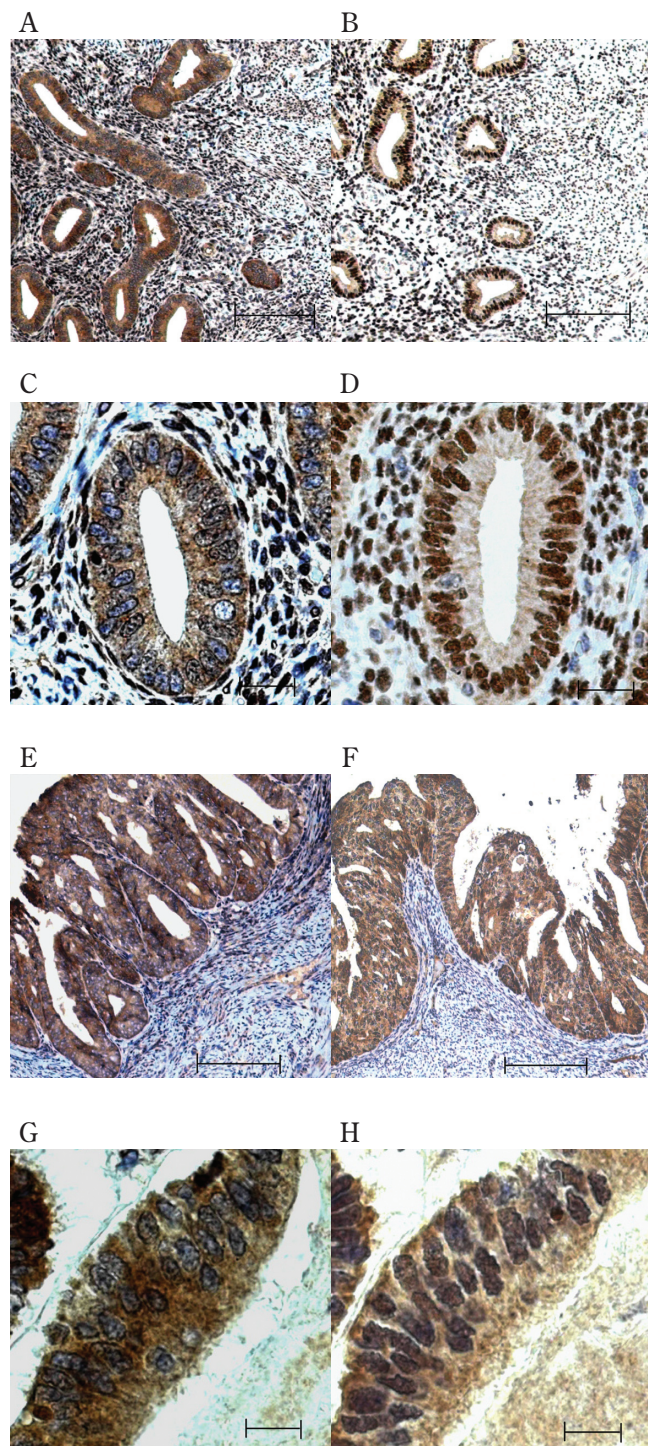


Fig. 5. COX7RP抗体およびER α 抗体を用いたヒト正常子宮内膜および子宮内膜癌の免疫組織染色。ヒト増殖期子宮内膜組織のCOX7RP抗体染 (A) ならびER α 抗体染色 (B). (C) Aの強拡大図. (D) Bの強拡大図. 類内膜癌組織のCOX7RP抗体染色 (E) ならびにER α 抗体染色 (F). (G) Eの強拡大図. (H) Fの強拡大図. スケールバーは10 μ mを示す。

実際の正常の子宮内膜および子宮内膜癌組織を用いた免疫染色において、COX7RPとER α の発現がco-expressすることが示された。さらに、患者サンプルにおいてCOX7RPとER α またはER β mRNAの発現量には、強い正の相関関係が認められた。したがって、エストロゲンの主要な標的臓器である子宮ならびにエストロゲンが深く関与する子宮内膜癌において、COX7RPがERの下流応答遺伝子として機能しうる。性周期のなかで増殖期に最もERの発現量が多く²²⁾、また、子宮内膜および子宮内膜癌の増殖にエストロゲンが重要であることを考え合わせると、COX7RPはエストロゲン応答遺伝子としてエストロゲンの細胞増殖促進に関与している可能性が示唆される。

近年、増加傾向を示す子宮内膜癌は婦人科領域において重要な疾患であり、エストロゲンが子宮内膜の発癌、増殖に関与^{2,3)}すると報告されている。そのメカニズムについては未解明の部分が多いが、高エストロゲン状態の暴露により正常子宮内膜が異形成化し、上皮内癌である複雑型異型増殖症へ分化し、さらに高分化型、中分化型、最後に低分化型類内膜癌へと分化すると考えられている。分化過程でのメカニズムとして、異型性から高分化へは癌抑制遺伝子PTEN変異が関与し、低分化へは癌遺伝子K-ras遺伝子および癌抑制遺伝子p53の変異が関与すると報告されており、さらに低分化するとERの発現は減少すると報告されている^{4,5)}。しかしながら、子宮内膜癌増殖に関与するエストロゲン標的遺伝子についてはいまだ不明の点が多い。子宮内膜癌において、ER α およびER β とCOX7RPの発現量には強い正の相関が見られたことから、ER α およびER β と同様に、COX7RPの発現量も分化度に相関することが予想される。さらに、症例数を増やし、子宮内膜癌の進行度、分化度、予後などとCOX7RP発現の関係について明らかにする必要があると考えられた。また、子宮内膜癌におけるCOX7RPならびにER α の発現に影響を及ぼすエストロゲン以外のシグナル系については、ほとんど未解明であり、これらの因子との相互作用を明らかにすることで、子宮内膜癌の発症、増殖に関与する新しいメカニズムが明らかにできると考えられた。

本研究において、エストロゲン応答遺伝子COX7RPはエストロゲン応答遺伝子として発現調節をうけ、ミトコンドリアのCOXの機能に関与する可能性が示唆されたことは、子宮内膜癌におけるエストロゲンの作用機構の解明につながると期待される。一方、本研究で作製された抗体を用いて、子宮内膜癌におけるCOX7RPの発現の増加、ER発現との相関、予後との関係を検討することにより、診断への応用が期待される。

結 論

COX7RPはエストロゲンによって転写レベルで直接制御されるエストロゲン応答遺伝子であり、COX7RPの蛋白はミトコンドリアに存在する。また、子宮内膜癌組織においてCOX7RPの発現はERの発現とco-expressし、両者の発現量には強い正の相関がみられた。今後、COX7RPのエストロゲン増殖機能における役割の解明、子宮内膜癌診断への応用が期待される。

謝 辞

本稿研究の遂行および本論文作成に際し、終始ご指導ご鞭撻を賜りました東京大学老年病科、埼玉医大ゲノム医学センター井上聡教授、同池田和博助手、病理組織染色をご指導賜りました埼玉医大総合医療センター病理部、糸山進次教授、田丸淳一助教授、松野和子技師、升田智子技師へのご厚意に深く感謝します。

なお、本論文の一部は、第26回日本分子生物学会年会、第56回日本産科婦人科学会総会において発表した。

本研究に用いたIshikawa細胞 3H12 No. 74は国立霞ヶ浦病院 西田正人氏より供与を受けたことを深く感謝します。

最後に、この様な研究の機会を与えてくださった埼玉医科大学総合医療センター産婦人科竹田省教授に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 婦人科腫瘍委員会報告. 日産婦誌 2003;55:743-69.
- 2) 婦人科腫瘍委員会報告. 日産婦誌 2000;52:1400-41.
- 3) Oehler MK, Brand A, Wain GV. Molecular genetics and endometrial cancer. J Br Menopause Soc 2003;9:27-31.
- 4) Lax SF. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. Virchows Arch 2004;444:213-23.
- 5) Skrzypczak M, Bieche I, Szymczak S, Tozlu S, Lewandowski S, Girault I, et al. Evaluation of mRNA expression of estrogen receptor β and its isoforms in human normal and neoplastic endometrium. Int J Cancer 2004;110:783-7.
- 6) Wen H. Expression of estrogen receptor β mRNA in endometrial carcinoma and its significance. China Gynecol 2001;36:108-10.
- 7) Hanstein B, Beckmann MW, Bender HG. Role of estrogen receptor isoforms in the pathogenesis and treatment of endometrial cancer. Zentralbl Gynecol

- 2002;124:17-9.
- 8) Nishida M, Kasahara K, Oki A, Satoh T, Arai Y, Kubo T, et al. Establishment of eighteen clones of Ishikawa cells. *Human cell* 1996;21:109-19.
- 9) Hata H, Hamano M, Watanabe J, Kuramoto V. Role of estrogen and estrogen-related growth factor in the mechanism of hormone dependency of endometrial carcinoma cells. *Oncology* 1998;55:35-44.
- 10) Kumar V, Chambon P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 1988;55:145-56.
- 11) Tremblay GB, Tremblay A, Labrie F, Giguere V. Dominant activity of activation function 1 (AF-1) and differential stoichiometric requirements for AF-1 and -2 in the estrogen receptor α - β heterodimeric complex. *Mol Cell Biol* 1999;19:1919-27.
- 12) Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T, et al. The complete primary structure of human estrogen receptor β (hER β) and its heterodimerization with ER α in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;243:122-6.
- 13) Pace P, Taylor J, Suntharalingam S, Coombes RC, Ali S. Human estrogen receptor β binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor α . *J Biol Chem* 1997;272:25832-8.
- 14) Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. Estrogen receptors α and β form heterodimers on DNA. *J Biol Chem* 1997;272:19858-62.
- 15) Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Kawashima H, Muramatsu M, et al. Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Mol Cell Biol* 1998;18:442-9.
- 16) Bruce A, Dennis B, Alexander J, Julian L, Martin R, Keith R, et al. *Essential cell biology* New York (NY): Garland Science Publishing; 1998. p. 409-29.
- 17) Segade F, Hurle B, Claudio E, Ramos S, Lazo PS. Identification of an additional member of the cytochrome c oxidase subunit VIIa family of proteins. *J Biol Chem* 1996;271:12343-9.
- 18) Schmidt TR, Goodman M, Grossman LI. Molecular evolution of the COX7A gene family in primates. *Mol Biol Evol* 1999;16:619-26.
- 19) Van Itallie CM, Dannies PS. Estrogen induces accumulation of the mitochondrial ribonucleic acid for subunit II of cytochrome oxidase in pituitary tumor cells. *Mol Endocrinol* 1988;2:332-7.
- 20) Bettini E, Maggi A. Estrogen induction of cytochrome c oxidase subunit III in rat hippocampus. *J Neurochem* 1992;58:1923-9.
- 21) Law SW, Apostolakis EM, Samora PJ, O'Malley BW, Clark JH. Hormonal regulation of hypothalamic gene expression: identification of multiple novel estrogen induced genes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994;51:131-6.
- 22) Henderson TA, Saunders PT, Moffett-King A, Groome NP, Critchley HO. Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:440-9.
- 23) Pelletier G, El-Alfy M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors α and β in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4835-40.
- 24) Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, et al. Molecular inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res* 1998;26:3505-12.
- 25) Ioannou IM, Tsawdaroglou N, Sekeris CE. Presence of glucocorticoid responsive elements in the mitochondrial genome. *Anticancer Res* 1988;8:1405-9.