

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
佐々木 浩	主査 教授 大 槻 勝 紀 副査 教授 芝 山 雄 老 副査 教授 岡 田 仁 克 副査 教授 朝 日 通 雄
主論文題名 Difference between genomic actions of estrogen versus raloxifene in human ovarian cancer cell lines (卵巣癌細胞株におけるエストロゲンとラロキシフェンの遺伝子転写調節作用の違い)	
学位論文内容の要旨	
<p>高齢化社会を向かえ、女性においては閉経後の期間が長くなり、QOL の維持・改善のためにはエストロゲン補充療法の必要性が増している。しかしながら、エストロゲン補充療法により乳癌・子宮内膜癌の発症が危惧されるところでもある。卵巣癌は婦人科癌の中で最も予後の悪い癌として知られ、その約 60% にエストロゲン受容体が存在し、近年エストロゲン補充療法が卵巣癌発症に関与するとの報告があった。しかしながら、その詳細な分子機構は不明である。エストロゲン標的遺伝子で、また癌増殖にも関与する c-Myc や IGF-1 の発現が卵巣癌で上昇しているとの報告があることから、エストロゲンが卵巣癌細胞において c-Myc や IGF-1 の発現誘導するメカニズムを検討した。</p> <p>選択的エストロゲン受容体調節薬 (selective estrogen receptor modulator ; SERM) の第 2 世代であるラロキシフェンは、エストロゲン受容体(ER) α に結合後、骨・心血管系では co-activator をリクルートし遺伝子の転写を促進することによりエストロゲンのように作用する。一方、乳房・子宮内膜では co-repressor をリクルートし遺伝子の転写を抑制することによりエストロゲン拮抗的に作用する。最近、ラロキシフェンはエストロゲンと異なり、卵巣癌の発症に影響を与えないとの報告があった。そこで、ラロキシフェンが卵巣癌細</p>	

胞において c-Myc や IGF-1 の発現におよぼす影響およびそのメカニズムをエストロゲンと比較し検討した。

《方 法》

ER α 陽性卵巣癌細胞株 (Caov-3・OVCAR-3)、ER α 陰性株 (A2780)、ER α を強制発現させた細胞株 (A2780-ER) を用い以下の実験を行った。

1. エストロゲンおよびラロキシフェン添加時のエストロゲン標的遺伝子 (c-Myc・IGF-1) の mRNA の発現レベルを real time PCR を用いて検討した。
2. エストロゲンおよびラロキシフェンが、ER α を介して c-Myc・IGF-1 のプロモーター領域にある AP-1 site へ結合しているか否かを、Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay を用いて検討した。
3. エストロゲンによる c-Myc の発現誘導に ER α が関与しているか否かをエストロゲン拮抗薬 (ICI-182780) および ER α siRNA を用いて検討した。
4. エストロゲンおよびラロキシフェンが c-Myc・IGF-1 のプロモーター領域にある AP-1 site において co-activator および co-repressor をリクルートさせるのか否かを ChIP assay を用いて検討した。
5. エストロゲンによる c-Myc の発現誘導に co-activator のリクルートが関与しているのか否かを、co-activator を siRNA にて抑制して検討した。
6. co-activator のリクルートがエストロゲンによる細胞周期進行に関与しているのか否かを Flow cytometer を用いて解析した。

《結 果》

1. ER α 陽性卵巣癌細胞株 (Caov-3・OVCAR-3) にエストロゲンを添加すると c-Myc・IGF-1 の mRNA の発現が誘導されるが、ラロキシフェン添加によってはそれらの発現に影響を与えなかった。エストロゲンによる c-Myc・IGF-1 の発現誘導効果は ER α 陰性株 (A2780) では認められず、ER α を強制発現させた細胞株 (A2780-ER) では認められた。
2. エストロゲンおよびラロキシフェンを添加により、ER α を介して c-Myc・IGF-1 のプロモーター領域にある AP-1 site への結合が認められた。
3. ER α を抑制するとエストロゲンにより誘導された c-Myc の発現が有意に抑制された。

4. エストロゲン添加により co-activator である SRC-1 が c-Myc・IGF-1 のプロモーター領域にある AP-1 site にリクルートされた。一方、ラロキシフェン添加により co-repressor である N-CoR、SMRT が IGF-1 のプロモーター領域にある AP-1 site にリクルートされた。

5. co-activator である SRC-1 を抑制すると、エストロゲンにより誘導された c-Myc の発現が有意に抑制された。

6. co-activator である SRC-1 を抑制すると、エストロゲン添加時の細胞周期進行が有意に抑制された。

《考 察》

卵巣癌細胞株において、エストロゲンは ER α を介して c-Myc・IGF-1 のプロモーター領域にある AP-1 site へ結合し、co-activator をリクルートすることにより c-Myc・IGF-1 を発現誘導し、細胞周期を進行させた。ラロキシフェンも ER α を介して c-Myc・IGF-1 のプロモーター領域にある AP-1 site へ結合するが、co-repressor をリクルートすることにより c-Myc・IGF-1 の発現誘導は認められなかった。

以上の結果より卵巣癌細胞株におけるエストロゲンとラロキシフェンの遺伝子転写調節作用の違いは co-regulator のリクルートの違いによることを解明した。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙第号	氏名	佐々木浩
論文審査担当者		主査教授 大槻 勝紀	
		副査教授 芝山 雄老	
		副査教授 岡田 仁克	
		副査教授 朝日 通雄	
主論文題名			
Difference between genomic actions of estrogen versus raloxifene in human ovarian cancer cell lines			
(卵巣癌株細胞におけるエストロゲンとラロキシフェンの遺伝子転写調節作用の違い)			
論文審査結果の要旨			
<p>高齢化社会を向かえ、女性においては閉経後の期間が長くなり、QOL の維持・改善のためにはエストロゲン補充療法の必要性が増している。しかしながら、エストロゲン補充療法により乳癌・子宮内膜癌の発症が危惧されるところでもある。卵巣癌は婦人科癌の中で最も予後の悪い癌として知られ、近年エストロゲン補充療法が卵巣癌発症に関与するとの報告があった。またエストロゲン標的遺伝子で、癌増殖にも関与するc-MycやIGF-1の発現が卵巣癌で上昇しているとの報告がある。</p> <p>選択的エストロゲン受容体調節薬 (selective estrogen receptor modulator ; SERM) の第2世代であるラロキシフェンは、エストロゲン受容体(ER) αに結合後、骨・心血管系では co-activator をリクルートし遺伝子の転写を促進することによりエストロゲンのように作用する。一方、乳房・子宮内膜では co-repressor をリクルートし遺伝子の転写を抑制することによりエストロゲン拮抗的に作用する。最近、ラロキシフェンはエストロゲンと異なり、卵巣癌の発症率に影響を与えないとの報告があった。しかしながら、その詳細な分子機構は不明である。申請者は本研究において卵巣癌細胞株におけるエストロゲンおよびラロキシフェンの遺伝子転写調整作用について検討した。</p>			

ER α 陽性卵巣癌細胞株にエストロゲンを添加すると c-Myc・IGF-1 の mRNA の発現が誘導されるが、ラロキシフェン添加によってはそれらの発現に影響を与えなかった。その遺伝子転写調整作用を検討すると、エストロゲンおよびラロキシフェンはどちらも ER α に結合するが、プロモーター領域でリクルートされる co-regulator に違いがあった。エストロゲン添加時は co-activator である SRC-1 が、ラロキシフェン添加時は co-repressor である N-CoR、SMRT がリクルートされていた。そこで co-activator である SRC-1 を抑制すると、エストロゲンにより誘導された c-Myc の発現が有意に抑制された。さらにエストロゲン添加により細胞周期進行が有意に抑制された。

以上の結果より次の 2 つのことが明らかとなった。① 卵巣癌細胞株において、エストロゲンは ER α を介して c-Myc・IGF-1 のプロモーター領域にある AP-1 site へ結合し、co-activator をリクルートすることにより c-Myc・IGF-1 を発現誘導し、細胞周期を進行させる。② ラロキシフェンは ER α を介して c-Myc・IGF-1 のプロモーター領域にある AP-1 site へ結合するが、co-repressor をリクルートすることにより c-Myc・IGF-1 の発現を誘導しない。

以上の結果より卵巣癌細胞株におけるエストロゲンとラロキシフェンの遺伝子転写調節作用の違いは co-regulator のリクルートの違いによることを解明した。

よって本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Oncogene 27(19): 2737-2745, 2008