

論文の内容の要旨

論文題目 乳癌抑制遺伝子 DBC1 による核内受容体エストロゲン
レセプター β の転写制御機構の解明

指導教官 武谷 雄二 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 小山 哲

1) 序文

エストロゲンレセプター (ER) は核内レセプター (NR) スーパーファミリーの一つで、内在性リガンドである 17 β -Estradiol (エストロゲン; E₂) によって核内へ移行し転写因子として作用する。ER には ER α と ER β の二つのサブタイプが存在するが、ER α と ER β は activation function- 1 (AF-1) と AF-2 という活性化領域をもつ。AF-1 はアミノ基末に存在し、E₂ 非依存的に転写活性化能を示す一方、AF-2 はカルボキシル基末に存在し、リガンド結合部位を有し、E₂ 依存性転写活性化能を有する。ER が E₂ 依存的に作用するには、AF-2 領域とコアクチベーターとの E₂ 依存的な結合が必要であり、細胞増殖や細胞死、クロマチン再構成、タンパク分解といった生理的現象に関与していると考えられる多くの AF-2 コアクチベーターがこれ

までに明らかになっている。

ER β の機能は、ER β ノックアウトマウスの解析により、子宮、乳腺、前立腺、および大腸などの様々な上皮細胞において細胞増殖と細胞分化の制御に関与することがわかっている。また *in vitro* での研究においても同様に、ER β に細胞増殖抑制と分化誘導能があることが知られている。

DBC1 は染色体 8p21 領域にコードされる遺伝子であり、乳癌において欠失している領域から同定されたことから乳癌抑制遺伝子の候補ではないかと考えられており、その生物学的機能が徐々に明らかになってきている。DBC1 は TNF- α 誘導性細胞死において、核内から細胞質に移動し細胞死を促進することが知られており、その発癌抑制の機序の一つと考えられている。また、NAD 依存性のヒストン脱アセチル化作用をもつ抗老化分子 SIRT1 の作用を抑制することで p53 依存性の細胞死を促進しているという報告もあるが、DBC1 の全体的な機能についてはいまだ不明な点が多く、DBC1 の癌抑制機序については更なる検討の余地がある。

近年 DBC1 と NR が相互作用する報告が相次いでおり、DBC1 が E₂ 非存在時に ER α の発現を維持することで、ヒト乳癌細胞における細胞増殖作用を促進しているという報告がある。本研究では、DBC1 と ER β との相互作用について検討し、DBC1 と ER β が細胞内において複合体を形成することを示し、DBC1 が ER β のエストロゲン依存的転写活性を抑制することを明らかにしていく。

2) 方法

1. 免疫沈降法

MDA-MB-231 細胞を培養回収した後、細胞溶解液と anti-ER β 抗体、及び Protein G Sepharose 4 Fast Flow ビーズを混和し、ER β に結合する免疫複合体を精製した。免疫沈降産物はウェスタンブロッティングに供され、一次抗体として anti-DBC1

抗体を使用し、バンドを確認した。

2. 蛍光免疫染色

MCF-7 細胞と T-47D 細胞を培養し、4%パラホルムアルデヒドで固定した後、1 次抗体として、MCF-7 細胞には anti-ER α 抗体および anti-DBC1 抗体、T-47D 細胞には anti-ER β 抗体および anti-DBC1 抗体を用いて、2 次抗体として蛍光標識抗体を使用し二重染色した。さらに核染色として Hoechst 33342 染色を行い、共焦点顕微鏡を用いて細胞を観察した。

3. GST-pull down アッセイ

GST-pull down アッセイにより ER と DBC1 の直接結合を確認した。ER α AF-1、ER α AF-2、ER β AF-1、ER β AF-2 の各領域を、タンパク発現ベクターの GST 遺伝子の下流にフレームがあうように組み込むことで構築し、大腸菌に形質転換した。大腸菌は GST 融合タンパクとしてタンパク発現誘導を行ったのちに回収され、Glutathione-Sepharose ビーズに結合させた。ビーズに結合した GST 融合タンパクと、 $[^{35}\text{S}]$ methionine 標識を行った DBC1 の全長および分割された断片をインキュベートし、SDS-PAGE で泳動しバンドの解析を行った。

4. ルシフェラーゼアッセイ

DBC1 による ER α/β の転写活性化能への影響を調べるために、293T 細胞および MDA-MB-231 細胞を用いてトランスフェクションを行い、ルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼレポーター遺伝子、internal control 用ベクター、発現ベクターをトランスフェクションし、細胞を回収後 Firefly luciferase 活性を測定した。トランスフェクション効率是正のため Renilla luciferase 活性も同時に

測定した。

5. si (short-interference) RNA

MDA-MB-231 細胞を用いた上記ルシフェラーゼアッセイにおいて、同時に siRNA による内在性 DBC1 のノックダウンを行った条件下でのルシフェラーゼアッセイも行った。DBC1-specific siRNA をトランスフェクションし、ウエスタンブロットティングにより DBC1 がノックダウンされていることを確認した。

6. RNA 抽出及びリアルタイム定量 PCR

DBC1 による ER β の内因性の転写活性化能への影響を調べるために、ER β の発現により抑制される細胞死抑制因子 Bcl-2 の mRNA 量測定を行った。MDA-MB-231 細胞を DBC1 トランスフェクションの有無、リガンド (E₂ および ER β 特異的リガンド DPN) の有無に分けて培養した。その後回収した各細胞から RNA の抽出を行い、精製した RNA から cDNA を精製して、リアルタイム定量 PCR を行った。

7. Flowcytometric analysis (FACS 解析)

DBC1 と ER β の相互作用が細胞死に与える影響を FACS 解析により細胞死率を測定することで検討した。MDA-MB-231 細胞を用いて、siRNA による内在性 DBC1 のノックダウンが細胞死へ与える影響をリガンドの有無とあわせて検討した。細胞死の解析は Annexin V-FITC Apoptosis detection kit I、FACS Calibur および Cell Quest Pro (BD Biosciences) を用いて行い、Annexin V 陽性かつ PI 陰性細胞を細胞死と判定した。

3) 結果

内在性 DBC1 と ER β との結合についての解析

免疫沈降法により、内在性 DBC1 と ER β が MDA-MB-231 細胞内において複合体を形成することが判明した。

DBC1 と ER α/β との共在についての解析

蛍光免疫染色法により、T-47D 細胞の核内において DBC1 と ER β が共在することが示された。また DBC1 と ER α が MCF-7 細胞の核内において共在することも示された。

リガンドの有無による DBC1 と ER α/β との結合についての解析

GST-pull down 法により、E₂の有無に関係なく全長 DBC1 と ER α/β AF-2 とが結合することが判明した。既報では DBC1 と ER α は E₂非存在時のみに結合するということがあったが、本研究ではそれとは異なった結果となった。また DBC1 の結合領域はそのアミノ基末端であり、ER α AF-1/2、および ER β AF-1/2 と結合していることが示された。また、ER α/β AF-1 における結合において両者は異なり、DBC1 と ER β AF-1 における結合は、DBC1 と ER α AF-1 における結合よりも強く認められた。

DBC1 が ER α/β のエストロゲン依存的転写活性化能に与える影響についての解析

ER α の E₂依存的転写活性化能は DBC1 の過剰発現またはノックダウンにより影響を受けないことがルシフェラーゼ活性の測定により明らかとなった。一方 ER β の E₂依存的転写活性化能は、DBC1 の過剰発現により抑制され、逆に内在性 DBC1 のノックダウンにより促進されることが、ルシフェラーゼ活性の測定により示された。

DBC1 が ERβ のエストロゲン依存的転写活性化能に与える影響についての解析

ERβにより発現が抑制されるアポトーシス抑制因子 Bcl-2 が、内在性 DBC1 の過剰発現により、リガンド (E₂、DPN) 依存的に増加したことから、細胞内においても DBC1 により ERβ のリガンド依存的転写活性化能が抑制されることが示された。

DBC1 が細胞死に与える影響についての解析

MDA-MB-231 細胞の定常状態における細胞死率は ERβ リガンド (E₂、DPN) 処理を加えても有意差を認めなかった。内在性 DBC1 をノックダウンした細胞においては、ERβ リガンド (E₂、DPN) 処理により細胞死率が有意に増加した。内在性 DBC1 のノックダウンにより、ERβ の細胞死促進作用が顕在化したものと考えられた。

4) 考察

DBC1 は乳癌抑制遺伝子の候補として同定されたにもかかわらず、その機能にはいまだ不明の点が多く、DBC1 の腫瘍発生過程における生理的機能の解明が待たれている。ERβ は上皮細胞および非上皮細胞の分化過程で重要な役割を担っていることがこれまでの研究で判明しており、乳癌においては ERβ の発現を増加させることが治療に役立つ可能性も報告されている。本研究で、DBC1 が ERα だけでなく ERβ と結合することが示され、かつ DBC1 は ERβ のエストロゲン依存性転写活性化能を抑制するという新規機能が明らかとなった。既報ではリガンド非依存的に結合していた ERα と DBC1 の結合は、本研究ではリガンドの有無に関係なくみられた。ERβ もリガンドの有無に関係なく DBC1 と結合するにもかかわらず DBC1 が

ER α と ER β それぞれの転写活性化能に与える影響に違いがみられたが、この違いは AF-1 領域における結合が DBC1 と ER α との結合よりも DBC1 と ER β との結合の方がより強いことによるためであるという可能性と、DBC1 と ER α/β との結合時にリクルートされるコファクター群の違いによるためであるという可能性の二つの可能性が考えられた。DBC1 は ER β と複合体を形成することで、乳癌細胞の増殖や細胞死に関与し、その結果乳癌形成や乳癌の予後、治療に影響を与えているのではないかと推測され、今後更なる DBC1 の機能解析が、乳癌全体の病態解明につながる可能性が示唆された。