

論 文 要 旨

PCP4/PEP19 Upregulates Aromatase Gene Expression via CYP19A1 Promoter I.1 in Human Breast Cancer SK-BR-3 Cells

ヒト乳癌細胞株 SK-BR-3 において、PCP4/PEP19 は CYP19A1 Promoter I.1 を介して aromatase 遺伝子発現を亢進する。

本庄 希江

【序論及び目的】

aromatase は、エストロゲン生合成の最終律速段階で触媒となる酵素であり、胎盤、卵巣、脂肪や乳房を含む広範囲の組織で発現する。乳癌組織内では、aromatase は癌細胞と間質細胞で発現し、乳癌細胞の増殖のために局所的にエストロゲンを供給することで、腫瘍浸潤と再発における重要な役割を果たしており、乳癌に対する新しい治療戦略を発展させるために、アロマターゼ発現の制御を解明することは極めて重要である。一方、PCP4/PEP19 はプルキンエ細胞内で発現しており、神経細胞のアポトーシスを阻害することが報告されてきた。我々はこれまでに、7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)誘発ラット乳癌モデルを用いて、PCP4/PEP19 の発現が乳癌発癌過程の乳腺組織において増加していること、ヒト乳癌細胞で抗アポトーシス作用を示し、遊走と浸潤の活性を高めることを示した。また、近年 PCP4/PEP19 は副腎皮質組織で発現し、CYP11B2 遺伝子をコードする、aldosterone 合成酵素の発現を促進させることが報告された。aromatase と aldosterone 合成酵素は、ステロイドホルモン生合成の CYP ファミリーの一つである。よって今回の研究では PCP4/PEP19 のヒト乳癌細胞内における aromatase の発現への関与とそのメカニズムを解明することを目的とした。

【材料及び方法】

細胞：ヒト乳癌細胞株 MCF-7 と SK-BR-3 を用いた。

培地：MCF-7 と SK-BR-3 はそれぞれ Minimal essential medium あるいは McCoy's 5A を用い、各実験は 5% charcoal-stripped FBS あるいは 10%FBS を用いて行った。

siRNA にて PCP4/PEP19、aromatase、ESR1 の発現を knockdown (KD)、又は plasmid にて PCP4/PEP19、aromatase の発現を overexpression (OE) し、以下の実験を行った。

- Western blot : ER- α 、phosphorylated-ER- α 、PCP4/PEP19
- Real-time PCR : PCP4/PEP19、aromatase、ESR1
- ELISA : PCP4/PEP19、aromatase、ESR1
- Promoter specific PCR : aromatase 遺伝子 (CYP19A1) には各組織に特異的な promoter 領域が存在し、発現調節が行われている。そこで以下の各 promoter 特異的な mRNA の発現量を測定した。
CYP19A1、Promoter I.1 (P I.1)、P I.4、P I.7、P I.f、P I.6、P I.3、P II
- Luciferase assay : 各 promoter の転写活性を評価するため、luciferase reporter plasmid を transfection し、以下の promoter における発光強度を測定した。P I.1、P I.3、P II、P I.4
- Immunocytochemistry : ER- α の発現における、PCP4/PEP19 と aromatase の共発現状態を評価した。

【結 果】

- PCP4/PEP19 の KD と OE による aromatase mRNA 発現への影響 (SK-BR-3、MCF-7)

aromatase の mRNA 発現は PCP4/PEP19 の KD 又は OE 後に、SK-BR-3 でのみ減少又は増加し、MCF-7 では変化は認められなかった。また E2 刺激下でも、MCF-7 での aromatase 遺伝子発現と E1 産生活性の変化は認められなかった。

2. PCP4/PEP19 の KD と OE 後の、aromatase 発現における ER の KD の影響 (MCF-7)

MCF-7 では、ER- α の遺伝子である ESR1 の KD 後に aromatase の mRNA 発現は増加した。この増加した aromatase の mRNA 発現は PCP4/PEP19 の KD 又は OE により変化しなかった。

3. PCP4/PEP19 の KD と OE による E1 と E2 産生への影響 (SK-BR-3)

aromatase の E1 産生活性は、PCP4/PEP19 の KD 後に培地中と細胞内で減少し、OE 後は培地中で有意に増加した。細胞内での E1 は、PCP4/PEP19 の OE 後には増加傾向を示した。E2 産生活性は、PCP4/PEP19 の OE 後に培地中と細胞内両方とも有意に増加し、KD 後に細胞内の E2 は有意に減少したが、培地中の E2 は減少しなかった。

4. aromatase mRNA 発現の promoter 特異的 RT-qPCR (SK-BR-3)

promoter 特異的 RT-qPCR は、P I .1 からの aromatase mRNA 発現は、PCP4/PEP19 の KD 後に有意に減少し、OE 後に増加した。

5. P I .1、P I .3/II、P I .4 における luciferase assay (SK-BR-3)

PCP4/PEP19 の KD 後には P I .1、P I .3/II、P I .4 の転写活性は減少し、OE 後には P I .1 の転写活性のみ増加を示した。

6. ER の発現状態におけるヒト乳癌組織の PCP4/PEP19 と aromatase の免疫染色と半定量的分析

PCP4/PEP19 は細胞質と核に、aromatase は細胞質のみに発現していた。導管癌 44 症例中、aromatase と PCP4/PEP19 の陽性症例はそれぞれ 75%、52%だった。また 34%の症例で aromatase と PCP4/PEP19 両方を発現した。ER の発現状態は、aromatase と PCP4/PEP19 の発現に相関は見られなかった。

PCP4/PEP19 と aromatase の両方陽性である癌組織において、ER+乳癌で aromatase 発現と比較した PCP4/PEP19 の陽性率は 69.2%であるが、ER-乳癌では 22.5%であった。

【結論及び考察】

今回の研究で、PCP4/PEP19 が ER (-) である SK-BR-3 にて、P I .1 を介して aromatase 発現を誘導する可能性を示した。ヒトの乳癌組織では、ER (+) と ER (-) の腫瘍細胞が混在して (intratumoral heterogeneity) いることもあり、SK-BR-3 のような、PCP4/PEP19 を発現する ER (-) 細胞群内で、aromatase 発現の促進により局所的に供給されるエストロゲンは、ER (+) の癌細胞群の増殖、移動、浸潤を促進すると考えられる。PCP4/PEP19 と aromatase は、ヒト導管癌組織内で ER の発現状態に無関係に発現しており、PCP4/PEP19 は核に局在することから転写に関与し、aromatase の発現を促進する可能性を示唆している。以前報告した PCP4/PEP19 の抗アポトーシス作用、乳癌における遊走、浸潤及び接着の促進作用に加えて、今回の研究では、PCP4/PEP19 は aromatase の発現を介したエストロゲンの傍分泌を促進することにより乳癌細胞増殖を促進することを示唆した。