

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19791142
 研究課題名 (和文) 子宮内膜癌におけるエストロゲンおよびその代謝産物によるゲノム異常誘発の実験的検証
 研究課題名 (英文) Experimental verification of estrogen and its metabolites to induce genomic abnormalities in endometrial carcinogenesis.
 研究代表者
 水本 泰成 (MIZUMOTO YASUNARI)
 金沢大学・附属病院・助教
 研究者番号：00420331

研究成果の概要：

単離した子宮内膜腺上皮細胞にHPV16E6/E7およびhTERTという既知の遺伝子を導入することで子宮内膜不死化細胞を樹立し、エストロゲンおよびその代謝産物による刺激下に長期培養を行った。その結果、in vitro growth assay, soft agar colony formation assay, nude mice tumor formation assay において形質転換を認めなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	330,000	3,130,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮内膜癌、エストロゲン、エストロゲン代謝産物

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜の発癌の機序は多段階発癌にて一部解明が進んでいる。高分化腺癌においてはミスマッチ修復系の異常、microsatellite instability (MSI)、癌遺伝子である KRAS 遺伝子の活性型変異、癌抑制遺伝子である PTEN の変異など genomic な異常の集積が発癌のト

リガーとなっているとする説が有力である。一方、エストロゲン類似物質 (環境ホルモン) やエストロゲン代謝産物が遺伝子変異や活性酸素を介する DNA damage に関わるとする研究が近年数多く報告されており、特に子宮や乳房で発現する CYP1A1, CYP1B1 によりエストロゲンが代謝される際、産生される

2-Hydroxyestradiol (2OH-E2), 4-Hydroxyestradiol (4OH-E2) と発癌とのかかわりが示唆されている。Estradiol は肝臓においては CYP1A2, CYP3A4 によって子宮などの肝外臓器においては CYP1A1 によって代謝され 2OH-E2 へと変化する。また特に乳腺、卵巣、子宮などエストロゲン標的臓器においては CYP1B1 promotor に存在する Estrogen receptor responsive element (ERE) を介する estrogen dependent な CYP1B1 の高発現を認めている。CYP1B1 によって子宮では estradiol から 4OH-E2 への代謝が盛んに行われていると考えられる。

子宮内膜癌における発癌メカニズムへの estrogen の関与は、疫学的な危険因子として広く受け入れられている。プロテストロンにより拮抗されない状態でのエストロゲン暴露は子宮内膜癌を容量および期間依存性に増加させる (Key TJA, Br J Cancer 57:205-212, 1998)。また肥満も子宮内膜癌のリスクを上げるが、その機序は脂肪細胞におけるアロマトラーゼが組織内および循環 E1 レベルを上げることが主とされている。このエストロゲンによる発癌リスクの上焦はエストロゲンの estrogen receptor を介する癌関連遺伝子の転写亢進など epigenetic nongenotoxic carcinogens としての機能の結果と考えられてきた。その背景には estradiol や estrone を用いた実験系にて細菌や哺乳類の遺伝子変異を誘発することができなかったことがある (Nandi S, Cancer Res 38:4046-49, 1978, Li JJ Endocr Rev 1:94-95, 1993)。しかし、そのみで子宮内膜癌において高頻度に認められる遺伝子変異の集積は説明できない。最近になってエストロゲンの genotoxic mutagenic carcinogen としての機能が注目され始めている。Estrogen の代謝の際に生じる 4-Hydroxyestrogen の carcinogenic activity がハムスターの腎腫瘍モデルにおいて示されたことに端を発する (Liehr JG, J Steroid Biochem 24:353-56, 1986)。4OH-E2 は酸化され semiquinone /quinone に変化する際、フリーラジカルを産生する。フリーラジカルに起因する DNA damage の機序として DNA single strand break (Nutter LM, J Biol Chem 226:16380-86, 1991) が報告されている。また estrogen は直接的あるいは間接的な DNA adduct 形成に関与することで genotoxicity を示すことも知られてきている。間接的な adduct 形成としてはエストロゲン処理によって産生する lipid peroxidase の分解によって生ずる malondialdehyde と DNA の adduct が報告されており、これは乳癌患者においても確認されている (Wang MY, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 5:705-10, 1996)。直接的な adduct 形成

としては catecholestrogen の代謝中間産物である quinone がある。4-hydroxyestrone の酸化によって産生する estrone-3,4-quinone は DNA と adduct を形成するが不安定であるために分解されて apurinic site を形成する (deprinating adduct) ことで遺伝子変異に関与する。他方、2-hydroxyestrone より産生する estrone-2,3-quinone は化学的に安定であり apurinic site を形成しない。この違いが 4OH-E1 と 2OH-E1 の carcinogen としての作用の強弱に関与しているとする報告もある (Cavalieri EL, Proc Natl Acad Sci USA 94:10937-42, 1997)。エストロゲンによる染色体異常も注目されつつある。染色体異常は遺伝子の置換・欠失・挿入、染色体数の増減、変位、遺伝子増幅のメカニズムにおいて発癌に関与すると考えられる。エストロゲンは染色体の数の異常 (aneuploidy) や染色体の構造の異常に関与する (Banerjee SK, Mutat Res 311:191-197, 1994)。

子宮内膜癌の発癌メカニズムの解明は、手術により摘出した癌標本を用いた臨床検体の解析や動物実験によって進められてきた。しかし、癌標本を用いた研究は、癌の成れの果てを見ており、発癌過程を前方視的に解明するには不向きであり、またマウスなどを用いた動物実験ではヒトと決定的に月経メカニズムが異なることが、研究の妨げになってきた。子宮内膜癌の発生母体である子宮内膜腺上皮細胞は乳腺上皮細胞の MCF10F のような自然不死化細胞株が存在しない。正常子宮内膜上皮細胞を臨床検体より純化し、dish 上で培養すると、premature senescence, replicative senescence と呼ばれる二つのバリアをクリアできずに増殖を停止してしまうため、in vitro 実験系に用いることが困難であった。また、自然に不死化した子宮内膜上皮細胞株は存在しないため、in vitro 発癌研究を困難にしてきた。上皮細胞における Premature senescence, replicative senescence を乗り越え、長期培養を可能にするために SV40 antigen を用いた手法や Human Papilloma virus (HPV) を用いた手法など様々な手法が研究されてきている。

また近年になって、子宮内膜癌と同様にエストロゲン依存性腫瘍である乳癌発生に 4-Hydroxyestradiol, 2-Hydroxyestradiol の関与を示す報告がなされた (Sandra et al. Int. J. Cancer:118, 1862-1868 (2006))。彼らは自然不死化したヒト乳腺上皮細胞 (MCF10F) に対して E2, 4OH-E2, 2OH-E2 にて treatment を長期間施したところ細胞の Transformation を認め、これは抗エストロゲン薬 ICI182780 によってキャンセルされたと報告した。この transformation に際して、乳癌において高頻度に異常の認められる

BRCA2 の存在する 13 番染色体、BRCA1 および p53 の存在する 17 番染色体の遺伝子異常を既知の microsatellite marker および LOH 解析にて証明した。

Sandra らが示した手法は不死化子宮内膜腺上皮細胞株を樹立可能であれば、子宮内膜細胞に対する genotoxicity 解明実験に応用可能であり、且、子宮内膜においても乳腺同様 estrogen dependent な CYP1B1 の高発現が認められていることも合わせて、子宮内膜発癌過程における遺伝子変異にエストロゲンおよびエストロゲン代謝産物の関与を証明することが可能であると考えられた。

2. 研究の目的

我々は既知の遺伝子进行操作することによって子宮内膜腺上皮細胞株を樹立し、エストロゲンおよびその代謝産物である 2OH-E2、4OH-E2 刺激による形質転換を観察し、その際に生じる遺伝子不安定性、遺伝子変異を解析し、子宮内膜癌発生段階における遺伝子の変異導入機序の解明することを研究目的とした。

3. 研究の方法

子宮内膜は間質細胞と上皮細胞より構成されている。子宮内膜間質細胞は多くの場合、premature senescence は自然に乗り越えるため、摘出した子宮内膜組織を培養ディッシュ上で培養すると間質細胞が優位に増殖し、継代するに従い上皮細胞は消失していく。したがって子宮内膜上皮を培養するには組織より上皮細胞を単離した上で、培養する必要がある。摘出した子宮内膜組織をコラゲナーゼにて消化し、顕微鏡下に上皮細胞にて構成される腺管をピックアップして培養する。上皮細胞は培養ディッシュ上で数回継代すると細胞増殖が停止する。この premature senescence には Rb/p16 および p53 の pathway が関与していると考えられている。何らかの因子で premature senescence を乗り越えて継代された細胞も population doubling (PD) 40-50 程度で細胞増殖が停止する。これは replicative senescence と呼ばれ、DNA 末端に存在するテロメアの短縮に起因すると考えられている。Rb/p16 pathway をブロックするために Human Pappilloma virus (HPV) 16 E6/E7 を、テロメアの短縮をテロメア伸長の Key factor である human telomerase reverse transcriptase (hTERT) をそれぞれ恒常的に発現するよう設定されたレトロウイルスベクターを用いて導入する。薬剤セレクションにてピックアップされ

た細胞を長期培養し不死化の評価をする。癌形質の獲得していないことを軟寒天培地におけるコロニー形成能およびヌードマウスにおける腫瘍形成能にて評価する。子宮において estradiol は代謝酵素 CYP1B1 により 4-Hydroxyestradiol (4OH-E2) に代謝される。この 4OH-E2 が DNA と Depurinating adduct を形成することや 4OH-E2 ⇌ キノンの酸化還元反応にて生成される活性酸素が DNA ダメージを誘導することがゲノム異常の誘因と考えられる。したがって不死化子宮内膜腺上皮細胞に E2 あるいは 2-Hydroxyestradiol (2OH-E2), 4OH-E2 を暴露し、形質転換の有無を評価する。2OH-E2, 4OH-E2 刺激下に in vitro 培養を一年間継続し、4 週間毎に細胞より DNA、RNA を採取する。E2、2OH-E2 および 4OH-E2 による treatment は週 2 回行い、その濃度は各 0.007nM、70nM の二点とする。形質転換の評価としては、細胞形態の変化、増殖曲線の変化、軟寒天培地におけるコロニー形成能を観察し、コロニー形成の頻度にて評価する。形成したコロニーよりピックアップした細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍形成能を評価する。形質転換が認められれば、あらかじめ採取していた RNA を用いて、遺伝子発現 profile を解析する。また子宮内膜癌に高頻度に認められる KRAS、PTEN などの遺伝子変異や microsatellite instability (MSI) を評価する。

4. 研究成果

臨床検体より採取した子宮内膜から子宮内膜腺上皮を単離し、レトロウイルスベクターを用いて各々 Human Pappilloma virus (HPV) 16 E6/E7 および human telomerase reverse transcriptase (hTERT) を導入した。HPV6、HPV7、hTERT 単独で導入した子宮内膜腺上皮細胞は premature senescence を乗り越えられなかった。HPV6 および E7 を導入した細胞は premature senescence を乗り越え培養可能であったが PD (population doubling) 40 前後にて replicative senescence に陥り、増殖を停止した。HPV6、E7 および hTERT を導入した細胞は培養 dish 上で 150 PD を超えて継代可能で、不死化したものと考えられた。RT-PCR および western blotting にて Estrogen receptor 発現を mRNA レベル、タンパクレベルにて確認した。このように樹立した子宮内膜不死化細胞に対して長期間エストロゲンおよびエストロゲン代謝産物 4OH-E2, 2OH-E2 にて treatment したが、細胞形態の変化、増殖曲線の変化、軟寒天培地におけるコロニー形成能の変化などの形質転換には至らなかった。本研究においてはエストロゲンおよびその

代謝産物による子宮内膜腺上皮細胞の表現形の変化を観察するには至らなかったが、樹立した子宮内膜腺上皮細胞は in vitro 実験系において安定的に使用可能であり、Deurinating adduct やフリーラジカルによる微細な DNA ダメージを評価する実験系を立ち上げれば、形質転換に至らずとも子宮内膜における DNA damage や不安定性を観測することは可能性であろうと思われる。本実験系は子宮内膜癌において高頻度に観測される癌遺伝子 KRAS や癌抑制遺伝子 PTEN の変異や microsatellite instability におけるエストロゲンおよびエストロゲン代謝産物の関与を検出する系としても有用であると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水本 泰成 (MIZUMOTO YASUNARI)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：00420331