

有棘細胞癌の発生・進展における エストロゲン受容体 β の役割の解明

篠島由一¹⁾, 相馬正義²⁾, 上野高浩³⁾, 照井 正¹⁾, 藤原恭子²⁾

Analysis of the role of estrogen receptor β in the development and progression of cutaneous squamous cell carcinoma

Yui SHINOJIMA¹⁾, Masayoshi SOMA²⁾, Takahiro UENO³⁾,
Tadashi TERUI¹⁾, Kyoko FUJIWARA²⁾

要旨

我々はこれまでにヒストン脱メチル化酵素GASC1をノックアウト(KO)したマウスにおいて、皮膚有棘細胞癌(SCC)の発生頻度が低いこと、これらのマウスではエストロゲン受容体 β (ER β)が低発現であること、ER β がGASC1による発現制御を受けている可能性が高いことを確認してきた。本研究では、SCCの増殖におけるER β の役割を解明することを目的として、解析を行い、SCC細胞株におけるER β の発現を抑制すると細胞増殖率が有意に低下することを確認した。一方、ヒトSCC検体においてはER β が正常部と比較して有意ではないものの高発現傾向にあり、今後検体数を増やした解析を行う予定である。

1. はじめに

腫瘍の発生にはゲノムの配列変異、増幅等のgeneticな変異のみならず、DNAのメチル化やヒストン修飾等epigeneticな変異が関与する事は知られている。ヒストン修飾酵素の一つJMJD2C(GASC1)はH3ヒストンのK9K36リジンの脱メチル化機能を持ち、この遺伝子が食道SCC、未分化ES細胞、乳癌において増幅していることが報告されている¹⁻³⁾。これまでに我々はSCCの発生・進展におけるGASC1の役割を解明するため、GASC1ノックアウトマウス(GASC1 KO)を作成し、皮膚化学発癌への感受性を解析した。DMBAとTPAを用いた2段階化学発癌プロトコルにて処理したところ、GASC1 KOにおける良性皮膚腫瘍、SCCの発生頻度は野生型と比べて有意に低かった。GASC1の下流で制御を受け発癌感受性に影響を与えている遺伝子をスクリーニングするため、ヘテロと野生型の正常皮膚の発現プロファイルを調べたところ、エストロゲン受容体(ER) β の発現がヘテロにて有意に低いことが

判った。GASC1 KOのER β のプロモーターのH3K9メチル化レベルが野生型と比較して更新していることをChIPアッセイにより確認した。

これらの結果から、GASC1によりER β の発現量が制御されていることが証明されたが、GASC1 KOにおけるER β の低発現がSCCの発生頻度の低下の原因となっているか否かは不明である。ER β は乳癌、大腸癌、メラノーマでは正常組織と比較して発現が上昇しているとの報告があり、一般的にはER β はむしろ癌抑制機能があると考えられている。一方、ヒト食道SCC組織におけるER β が高発現であるほど予後が悪いとの報告もあり、ER β と発癌の機能については不明な点が多い⁴⁾。そこで本研究では、ER β が皮膚SCCの発生・進展に関与している可能性について検討するため、SCC細胞株および皮膚腫瘍手術検体を用いて以下の研究を行った。

2. 方法, 対象

マウスSCC細胞株PVD57を培養し、siRNAによ

1) 日本大学医学部皮膚科学系皮膚科学分野

2) 日本大学医学部内科学系総合内科・総合診療医学分野

3) 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野

篠島由一: shinojima.yui@nihon-u.ac.jp

藤原恭子: fujiwara.kyoko@nihon-u.ac.jp

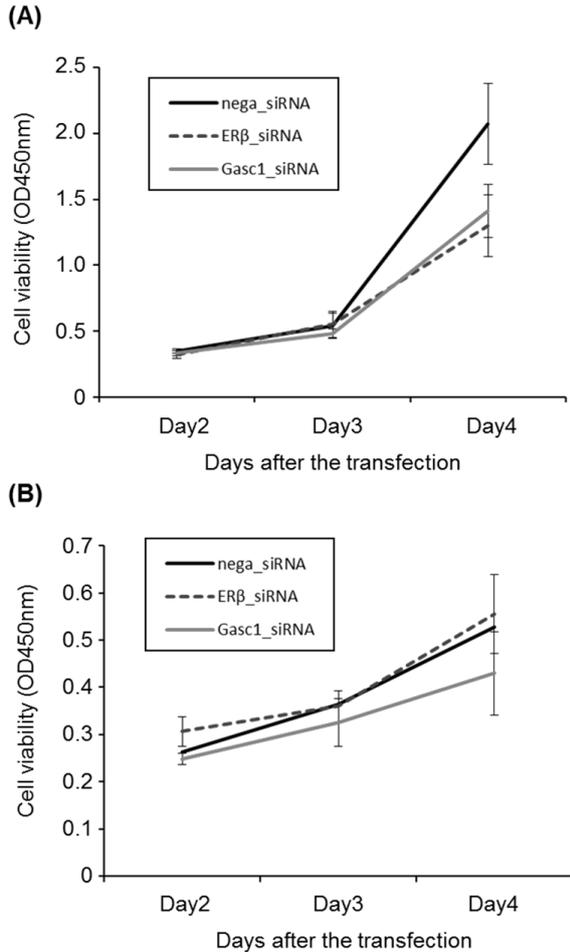


図1 ERβノックダウンによる細胞増殖能の変化
(A) SCC細胞株, (B) 繊維芽細胞株

りERβの発現をノックダウンし24時間から72時間後に細胞の生存率をWST8アッセイにより定量した。また対照として、繊維芽細胞細胞株NIH-3T3を用いても同様の実験を行った。ERβの発現抑制による細胞浸潤能の変化をMatrigel invasionアッセイにより調べ、Annexin VおよびPropidium Iodide染色によって、細胞死の様式についての判定を行った。

日大板橋病院にて採取された皮膚有棘細胞癌検体28例および皮膚正常部10例よりRNAを抽出し、real time PCRによりERβの発現を調べた。またパラフィンブロックより病理標本を作製し、免疫染色を行ってERβの発現レベルを解析した。

3. 結果

SCC細胞株PVD57におけるERβの発現をsiRNAにより抑制し、細胞増殖能への影響を調べたところ、

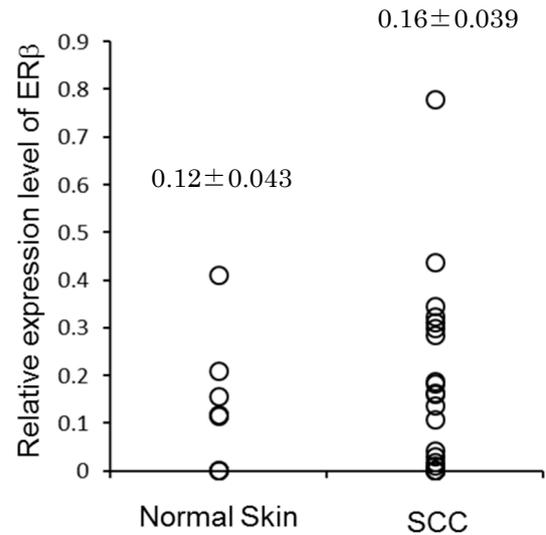


図2 SCC手術検体および正常皮膚におけるERβの発現量
両検体よりRNAを抽出し、real time PCRによりERβの発現量を定量した。値は平均値±標準誤差。

ろ、siRNA導入4日目においてNegativeコントロールと比較して、有意な増殖抑制効果を示した。Gasc1の発現抑制においても同様な低下が見られた。一方、マウス繊維芽細胞NIH-3T3においては、ERβの発現抑制による増殖抑制効果は殆ど見られなかった(図1A, B)。これらの細胞における浸潤能はERβの発現抑制の有無によって変化せず、またアポトーシスやネクロシスの頻度もERβの発現レベルとの有意な関連を認めなかった。

更に、ヒトSCC検体および正常皮膚におけるERβの発現レベルをreal time PCRにより検討したところ、腫瘍検体においてERβの発現が正常皮膚と比較して、有意差はないものの高発現を示す傾向にあった(図2)。組織検体の免疫染色においては、正常検体との顕著な差は確認できなかった。

4. 考察

本研究の結果から、ERβがSCC細胞の増殖に対して促進的に働くことが確認され、腫瘍の発生・進展に寄与する可能性が示唆された。一方、繊維芽細胞においてはERβの発現抑制による増殖率の変化が観察されなかった。今回データには示していない他の複数のSCC細胞株、繊維芽細胞株を用いた実験でも同様の結果を確認しており、ERβが腫瘍特異的

に増殖を促進している可能性が示唆された。現時点では作用機序が不明であるが、ER β が腫瘍抑制遺伝子として働くとの報告もあることから、細胞・組織ごとのER β 下流シグナル系の違いが、ER β による細胞の増殖抑制・促進を左右している可能性が考えられた。手術検体については、今回解析に用いた正常皮膚の検体数が少なく、またSCC組織提供者と異なる患者の皮膚検体であったことから、今後はSCCと正常皮膚を同一患者から採取し、改めて解析を行いたい。

文 献

- 1) Yang, Z. Q. et al. Identification of a novel gene, GASC1, within an amplicon at 9p, 23-24, frequently detected in esophageal cancer cell lines. *Cancer Res.* 60: 4735-4739; 2000.
- 2) Liu G. et al. Genomic amplification and oncogenic properties of the GASC1 histone demethylase gene in breast cancer. *Oncogene.* 28: 4491-4500; 2009.
- 3) Wang J. et al. The Histone Demethylase JMJD2C Is Stage-Specifically Expressed in Preimplantation Mouse Embryos and Is Required for Embryonic Development. *Biology of Reproduction.* 82: 105-111; 2010.
- 4) Zuguchi M. et al. Estrogen receptor α and β in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Science.* 103: 1348-1355; 2012.