

博 士 論 文

が ん 細 胞 の 増 殖 ・ 生 存 に お け
る 受 容 体 型 転 写 因 子 の 役 割

2016 年 4 月

静 岡 県 立 大 学

大 学 院 薬 学 研 究 科

趙 帥

The roles of ligand-activated transcription
factors in the proliferation and survival of cancer
cells

April 2016

Shuai Zhao

略語表

AF-1	Activation function 1
AHR	Aryl hydrocarbon receptor
ALDH-1	Aldehyde dehydrogenase 1
AR	Androgen receptor
Arnt	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
B[<i>a</i>]P	Benzo[<i>a</i>]pyrene
Bic	Bicalutamide
bHLH	Basic helix-loop-helix
β -NF	β -naphthoflavone
CA-AHR	Constitutively active AHR
CHX	Cycloheximide
CSCs	Cancer stem cells
DBD	DNA-binding domain
DEPTOR	DEP domain containing mTOR-interacting protein
DHT	Dihydrotestosterone
4E-BP1	4E-binding protein 1
EGFR	Epidermal growth factor receptor
eIF4E	Eukaryotic Translation Initiation Factor-4E
ER	Estrogen receptor
HSCs	Hematopoietic stem cells
HRP	Horseradish peroxidase
JAK1	Janus-activated kinase 1
LBD	Ligand-binding domain
LRP-5/6	Lipoprotein receptor-related protein) -5/6
MEK/ERK	Mitogen/extracellular-regulated kinase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
3MC	3-methylcholanthrene
PAS	Per-Arnt-Sim
PgR	Progesteron receptor
PI3K/Akt	Phosphatidylinositol 3-kinase/Protein kinase B
TCDD	2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo- <i>p</i> -dioxin
TCF/LEF	T cell factor/lymphoid enhancer binding factor
Tet	Tetracycline
XRE	Xenobiotic response element

目次

緒言.....	1
第1章 乳がんにおける芳香族炭化水素受容体（AHR）の役割.....	5
第1節 AHRによる乳がん細胞増殖抑制機構の解明.....	5
1-1. 序論.....	5
1-2. 実験方法.....	8
1-2-1. 使用した細胞.....	8
1-2-2. 使用薬品.....	8
1-2-3. 細胞培養.....	8
1-2-4. スフェロイドコロニーの計測.....	9
1-2-5. MTS アッセイ.....	10
1-2-6. Western Blot 解析.....	10
1-2-7. Real-time RT-PCR.....	12
1-2-8. siRNA 導入による mRNA ノックダウン.....	13
1-2-9. 免疫蛍光染色.....	13
1-2-10. ALDEFLUOR アッセイ.....	14
1-2-11. 統計分析.....	14
1-3. 実験結果.....	15
1-3-1. 乳がん細胞 MCF-7 の mammosphere 形成率（乳がん幹細胞の自己複製能）に対する AHR リガンドの阻害作用.....	15
1-3-1-1. AHR リガンドの乳がん細胞の増殖への影響.....	15
1-3-1-2. AHR リガンドの mammosphere 形成に対する影響.....	15
1-3-1-3. AHR リガンドの二次 mammosphere 形成への阻害作用.....	16
1-3-1-4. AHR リガンドによる mammosphere 形成抑制の AHR 依存性.....	18
1-3-2. 誘導性リガンド非依存的活性型 AHR 発現細胞株の構築.....	19
1-3-2-1. リガンド非依存的活性型 AHR による mammosphere 形成への影響.....	19
1-3-2-2. がん幹細胞の維持に関与する因子への AHR 活性化の影響.....	21
1-3-2-3. がん幹細胞マーカー ALDH-1 の高発現細胞への AHR 活性化の影響.....	22
1-4. 考察.....	23
第2節 芳香族炭化水素受容体（AHR）発現を介した HER2 過剰発現による炎症性シグナルの mammosphere	

形成促進.....	26
2-1. 序論.....	26
2-2. 実験方法.....	28
2-2-1. 細胞培養と HER2 を安定的に過剰発現する細胞株の確立.....	28
2-2-2. 使用薬品.....	28
2-2-3. siRNA 導入による mRNA ノックダウン.....	28
2-2-4. 細胞培養.....	28
2-2-5. Real-time RT-PCR.....	28
2-2-6. 核抽出物の調製.....	29
2-2-7. Western Blot 解析.....	30
2-2-8. 細胞内局在の解析.....	30
2-2-9. プラスミド作製.....	30
2-2-10. 一過性導入とプラスミドレポーター遺伝子アッセイ.....	31
2-2-11. 統計分析.....	31
2-3. 実験結果.....	32
2-3-1. HER2 過剰発現による AHR 発現、活性化への影響.....	32
2-3-2. HER2 過剰発現による AHR の細胞内局在への影響.....	34
2-3-3. HER2 過剰発現による AHR 発現誘導を介した IL-6 mRNA 発現への影響.....	35
2-3-4. HER2 過剰発現 MCF-7 細胞の mammosphere 形成における AHR 発現の影響.....	36
2-3-5. MCF-7 細胞の mammosphere 形成率への HER2 過剰発現 MCF-7 細胞から分泌される因子の影響.....	39
2-3-6. HER2 過剰発現 MCF-7 細胞の mammosphere 形成に対する AHR リガンドの影響.....	39
2-4. 考察.....	41
 第 2 章 アンドロゲン受容体の mTOR 阻害因子 DEPTOR に対する負の転写調節機能.....	44
1. 序論.....	44
2. 実験方法.....	46
2-1. 使用薬品.....	46
2-2. 細胞培養.....	46
2-3. Western Blot 解析.....	46
2-4. Real-time PCR.....	46
2-5. siRNA 導入による mRNA ノックダウン.....	47

2-6. クロマチン免疫沈降アッセイ	47
2-7. 統計分析	47
3. 実験結果	48
3-1. 前立腺がん細胞におけるアンドロゲン受容体依存的な DEPTOR mRNA 発現への影響	48
3-2. 前立腺がん細胞における DEPTOR の mTOR シグナルへの関与	49
3-3. AR の DEPTOR 遺伝子のイントロンの ARE への結合	50
4. 考察	52
総括	54
謝辞	57
参考文献	58

緒言

ステロイドホルモン、脂溶性ビタミンや生体外異物など低分子で脂溶性の化学物質の作用は、主に細胞内に存在する受容体型転写因子によって仲介されている。受容体型転写因子の多くは、核内受容体スーパーファミリーに属しており、ヒトでは48種類存在することが明らかとなっている（Table 1）。分子構造は、hinge region を介して N-末端側に DNA-binding domain（DBD）、C-末端側に ligand-binding domain（LBD）を配し、種々の転写活性化コファクターと結合する activation function 1（AF-1）、AF-2 領域がそれぞれ N-、C-末端付近に存在する。また、核内受容体スーパーファミリーに属していない受容体型転写因子も存在する。DNA に結合する bHLH（basic helix-loop-helix）及びリガンドに結合する PAS（Per-Arnt-Sim）ドメインを持ち、bHLH-PAS ファミリーに属する芳香族炭化水素受容体（aryl hydrocarbon receptor、AHR）もリガンド結合領域及び DNA 結合領域をもつ受容体型転写因子である。一般的には、受容体型転写因子はリガンド非結合下で細胞質に分子シャペロンと複合体を形成し局在している。細胞内に取り込まれた低分子で脂溶性の化学物質（リガンド）の結合により、シャペロンと乖離し核へ移行する。核内に移行した受容体型転写因子は、DNA 上に存在する応答配列に結合し、標的遺伝子の転写を調節する。このように受容体型転写因子は、脂溶性低分子化学物質によりその活性が調節され、様々な遺伝子の発現調節を行うことにより、性ホルモン作用、発生・分化、エネルギー代謝、異物代謝・排泄など様々な生理作用を示し、生体ホメオスタシスの維持に関与している（Fig. 1）。

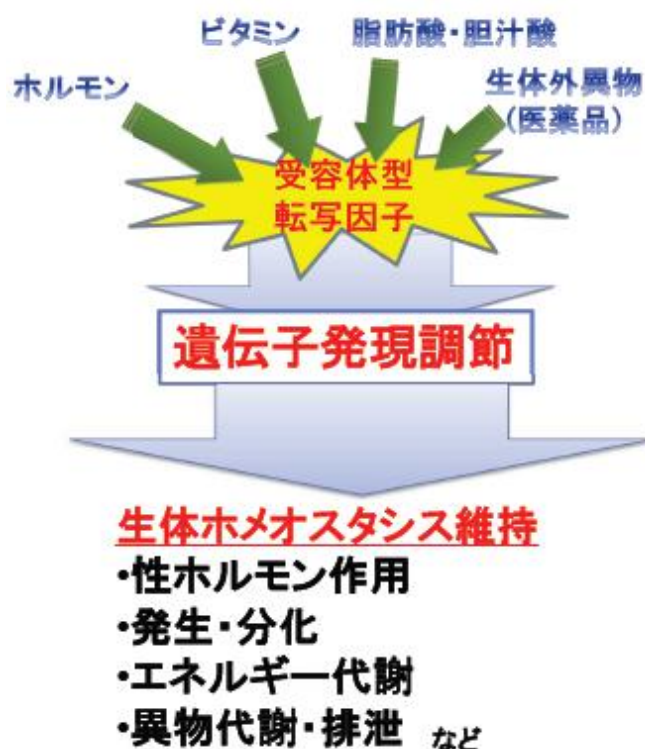


Fig. 1. Functions of ligand-activated transcription factors.

発がんやがんの進行と受容体型転写因子の関係に関する報告が多くされている。例えば、受容体型転写因子の一つであるアンドロゲン受容体 (androgen receptor、AR) は、アンドロゲンをリガンドとして男性ホルモンの生理作用に重要な役割を果たしている。アンドロゲンは AR を介して正常な前立腺の発達のみならず前立腺がんの発達に重要であることが知られている (1, 2)。同様に、エストロゲン受容体 (estrogen receptor、ER) も受容体型転写因子であり、正常な乳腺の発達など女性ホルモンの作用だけでなく乳がん、子宮内膜がん、卵巣がんの発生、発達で重要な役割を担っているとされている (3)。AHR は、benzo[a]pyrene (B[a]P) による発がんを介在する受容体型転写因子としてよく知られている。AHR は B[a]P をリガンドとして活性化し、代謝酵素を誘導し、B[a]P の代謝を促進する。その過程で生じる代謝中間生成物 B[a]P ジオールエポキシドは発がん性を示す (4-6)。

ホルモン依存性がんは年々増加している (7)。このうち子宮体がん、卵巣がんはこの 25 年間でそれぞれ 8 倍、4 倍に増加した。ホルモン、特にステロイドホルモンは種々の標的組織における細胞増殖に密接に関与していることから、腫瘍／がん化に大きく関与する。中でもエストロゲン、アンドロゲンなどの性ステロイドは男性では前立腺がん、女性では子宮内膜がん、卵巣がんそして乳がんの発生に密接に関与することはよく知られている。これらのいわば古典的な性ステロイド依存性腫瘍に加えて、最近では肺がん、大腸がん、胸腺腫等の一部でもこれらステロイドホルモンががん化に深く関与していることが示されるようになってきている (8-10)。

以前は、ホルモン依存性がんは、ヨーロッパの国々で発生率が高く、日本などアジアでは低かった。しかしながら、日本では、発生率がこの数十年間で増加している。日本でホルモン依存的ながんが増加している理由としては、食生活の欧米化が考えられている。食生活の欧米化により、性ホルモンの活動する期間が長くなったことが、乳がんなどの罹患率が増加している要因の一つだと考えられている (11)。

ホルモンなど脂溶性の化学物質の作用は主に細胞内に存在する受容体型転写因子によって仲介されている。受容体型転写因子はホルモン依存性がんを含めて、様々ながんの発達と増殖に関与することが報告されている (2-6)。したがって、受容体型転写因子のがん細胞における機能の詳細な解明と、その活性をコントロールする低分子化合物の探索は、抗がん薬の開発に非常に重要と考えられる。そこで、抗がん薬の分子標的となりうる受容体型転写因子に着目し、がん細胞における受容体型転写因子の役割を解明することを目的として、研究を行うことにした。

本研究では、ホルモン依存的ながんとして代表的である乳がんと前立腺がんに関わりの深い AHR と AR の 2 種類の受容体型転写因子に着目し、第 1 章では、がん幹細胞という概念に着目し、乳がん細胞の増殖における AHR の役割を、乳がん幹細胞に対する AHR の役割として評価した (12, 13)。また、前立腺がん細胞の増殖に、AR の活性化と哺乳類ラパマイシン標的タンパク質 mTOR (mammalian target of rapamycin, mTOR) の活性化が重要な役割を果たしているとされているが (14)、第 2 章では、AR が DEPTOR という mTOR 活性の抑制因子の遺伝子発現を抑制することで、mTOR 活性を亢進させるという AR と mTOR 活性の関連性を解析した (15)。

Table 1. List of the 48 known human nuclear receptors plus selected non-human receptors categorized according to sequence homology.

Subfamily		Group		Member				
				NRNC* Symbol (16)	Abbreviation	Name	Gene	Ligand(s)
1	Thyroid Hormone Receptor-like	A	Thyroid hormone receptor	NR1A1	TR α	Thyroid hormone receptor- α	THRA	Thyroid hormone
				NR1A2	TR β	Thyroid hormone receptor- β	THRB	
		B	Retinoic acid receptor	NR1B1	RAR α	Retinoic acid receptor- α	RARA	Vitamin A and related compounds
				NR1B2	RAR β	Retinoic acid receptor- β	RARB	
				NR1B3	RAR γ	Retinoic acid receptor- γ	RARG	
		C	Peroxisome proliferator-activ ated receptor	NR1C1	PPAR α	Peroxisome proliferator-activated receptor- α	PPARA	Fatty acids, prostaglandins
				NR1C2	PPAR- β/δ	Peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ	PPARD	
				NR1C3	PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ	PPARG	
		D	Rev-ErbA	NR1D1	Rev-ErbA α	Rev-ErbA α	NR1D1	Heme
				NR1D2	Rev-ErbA β	Rev-ErbA α	NR1D2	
		F	RAR-related orphan receptor	NR1F1	ROR α	RAR-related orphan receptor- α	RORA	Cholesterol, ATRA
				NR1F2	ROR β	RAR-related orphan receptor- β	RORB	
				NR1F3	ROR γ	RAR-related orphan receptor- γ	RORC	
		H	Liver X receptor-like	NR1H3	LXR α	Liver X receptor- α	NR1H3	Oxysterols
				NR1H2	LXR β	Liver X receptor- β	NR1H2	
				NR1H4	FXR	Farnesoid X receptor	NR1H4	
				NR1H5	FXR- β	Farnesoid X receptor- β	NR1H5P	
		I	Vitamin D receptor-like	NR1I1	VDR	Vitamin D receptor	VDR	Vitamin D
				NR1I2	PXR	Pregnane X receptor	NR1I2	Xenobiotics
				NR1I3	CAR	Constitutive androstane receptor	NR1I3	Androstane
		X	NRs with two DNA binding domains	NR1X1	2DBD-NR α			
				NR1X2	2DBD-NR β			
				NR1X3	2DBD-NR γ			
2	Retinoid X Receptor-like	A	Hepatocyte nuclear factor-4	NR2A1	HNF4 α	Hepatocyte nuclear factor-4- α	HNF4A	Fatty acids
				NR2A2	HNF4 γ	Hepatocyte nuclear factor-4- γ	HNF4G	
		B	Retinoid X receptor	NR2B1	RXR α	Retinoid X receptor- α	RXRA	Retinoids
				NR2B2	RXR β	Retinoid X receptor- β	RXRB	

		C	Testicular receptor	NR2B3	RXR γ	Retinoid X receptor- γ	RXRG	
				NR2C1	TR2	Testicular receptor 2	NR2C1	
				NR2C2	TR4	Testicular receptor 4	NR2C2	
		E	TLX/PNR	NR2E1	TLX	Homologue of the Drosophila tailless gene	NR2E1	
				NR2E3	PNR	Photoreceptor cell-specific nuclear receptor	NR2E3	
		F	COUP/EAR	NR2F1	COUP-TFI	Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I	NR2F1	
				NR2F2	COUP-TFII	Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II	NR2F2	
				NR2F6	EAR-2	V-erbA-related	NR2F6	
3	Estrogen Receptor-like	A	Estrogen receptor	NR3A1	ER α	Estrogen receptor- α	ESR1	Estrogens
				NR3A2	ER β	Estrogen receptor- β	ESR2	
		B	Estrogen related receptor	NR3B1	ERR α	Estrogen-related receptor- α	ESRRA	
				NR3B2	ERR β	Estrogen-related receptor- β	ESRRB	
				NR3B3	ERR γ	Estrogen-related receptor- γ	ESRRG	
		C	3-Ketosteroid receptors	NR3C1	GR	Glucocorticoid receptor	NR3C1	Cortisol
				NR3C2	MR	Mineralocorticoid receptor	NR3C2	Aldosterone
				NR3C3	PR	Progesterone receptor	PGR	Progesterone
				NR3C4	AR	Androgen receptor	AR	Testosterone
		A	NGFIB/NURR1/NOR1	NR4A1	NGFIB	Nerve Growth factor IB	NR4A1	
4	Nerve Growth Factor IB-like			NR4A2	NURR1	Nuclear receptor related 1	NR4A2	
				NR4A3	NOR1	Neuron-derived orphan receptor 1	NR4A3	
5	Steroidogenic Factor-like	A	SF1/LRH1	NR5A1	SF1	Steroidogenic factor 1	NR5A1	Phosphatidylinositols
				NR5A2	LRH-1	Liver receptor homolog-1	NR5A2	Phosphatidylinositols
6	Germ Cell Nuclear Factor-like	A	GCNF	NR6A1	GCNF	Germ cell nuclear factor	NR6A1	
0	Miscellaneous	B	DAX/SHP	NR0B1	DAX1	Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1	NR0B1	
				NR0B2	SHP	Small heterodimer partner	NR0B2	

*NRNC: Nuclear Receptors Nomenclature Committee

第1章 乳がんにおける芳香族炭化水素受容体（AHR）の役割

第1節 AHRによる乳がん細胞増殖抑制機構の解明

1-1. 序論

近年、乳がん罹患する女性は増加しており、2013年の統計では、日本人女性の部位別がん罹患率は胃がんを抜いて1位、死亡率も5位となっている。2011年の統計では、毎年4万人の女性が罹患し、1万人が死亡しており、今後もさらに増加すると予測されている（17）。

乳がんの増加の原因として、生活習慣、食生活の欧米化による肥満（特に閉経後）や初潮の若年化、また、晩婚化・少子化による初産や閉経の高齢化などが挙げられる。これらの危険因子があると、性ホルモンであるエストロゲンに乳腺や卵巣がさらされている期間が長くなる。乳がんが発生する乳腺細胞は、エストロゲンの作用によって増殖するため、エストロゲンに長くさらされていると、乳がんを発症する可能性が高くなるのである。このことから、エストロゲンは、乳がんの発生や増殖に大きく関与しているといえる。

したがって、乳がんの薬物的治療においては抗エストロゲン療法がよく用いられる。しかし、抗エストロゲン療法を始め、手術、放射線療法で乳がんを除去しても、治療に抵抗性を持つがんが再び出現し、再発・転移してしまうことがある。この現象を説明する概念として「がん幹細胞」（cancer stem cell）の存在が考えられるようになった（18）。

がん幹細胞とは、体内にある体性幹細胞（somatic stem cell）と同じく、自分と同じ細胞を作り出す『自己複製能』と、自分と違う様々な後代細胞に分化できる『多分化能』の2つの性質を持つ、ごく一部のがん細胞である（Fig. 2）。体性幹細胞との違いは自己複製能が無限であること、またがん細胞との違いは多分化能を持っていることである。この『自己複製能』と『多分化能』の二つの性質により、がん幹細胞は自分と同じ性質を持つ細胞を維持しつつ、大量のがん細胞を産生し続けることができる。がん幹細胞の同定と性状に関する報告が相次ぎ（18）、現在までに、白血病を始め、肺がん、乳がん、脳腫瘍、大腸がんなどで、がん幹細胞の分離・同定に成功したとの報告があり、がん幹細胞の存在は仮説にとどまらず、現実的なものとしてとらえられるようになっている（19）。がん幹細胞は抗がん剤や放射線に耐性であり、一般的な抗がん剤治療は、がん細胞のみを標的としている可能性が強く考えられる。がん幹細胞は治療の際に残存しやすく、がん細胞を除去してもがん幹細胞が体内に残っていれば、がん幹細胞をもとに再びがん細胞が増殖し、再発の原因となる。したがって、がん幹細胞をターゲットとした治療法が開発されれば、再発・転移を抑え完全治癒率の向上が期待できる。

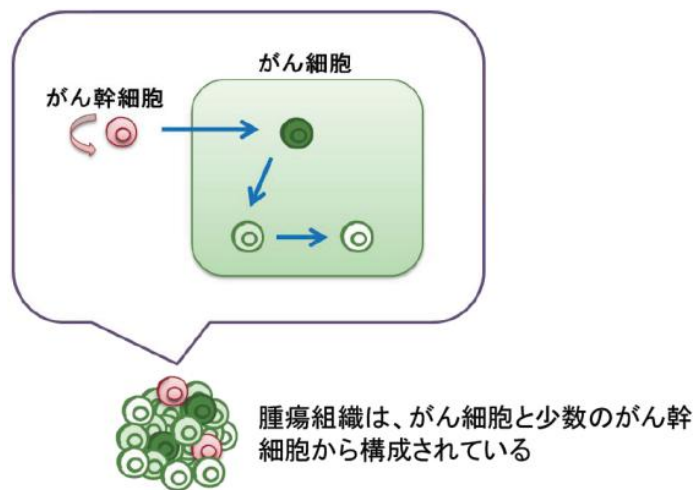


Fig. 2. Theory of cancer stem cells.

近年、AHR が乳がんの増殖を抑制することが報告されている (20)。AHR は bHLH-PAS ファミリーに属し、リガンドの結合により活性化され標的遺伝子の発現を促進する受容体型転写調節因子である (Fig. 3)。AHR は元来ダイオキシンや B[a]P などの多環性芳香族化合物によるシトクロム P450 1A1、1B1 (CYP1A1、CYP1B1) などの一連の薬物代謝酵素等の誘導、催奇形性、発がんプロモーション、胸腺縮退による免疫不全、体重減少、肝毒性などの多岐にわたる生物現象を仲介するタンパク質として見出された (21)。AHR は通常、熱ショックタンパク質 90 (HSP90) といった分子シャペロンと結合して、細胞質に局在している。2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin (TCDD)、 β -naphthoflavone (β -NF)、3-methylcholanthrene (3MC) などのリガンドの結合により、AHR は細胞質複合体から乖離して核内に移行する。核内では、AHR と同様に bHLH-PAS ファミリーに属する Arnt (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) とヘテロダイマーを形成し、DNA プロモーター上の異物応答配列 (xenobiotic response element: XRE) に結合して、AHR の標的遺伝子の転写を誘導する (12)。

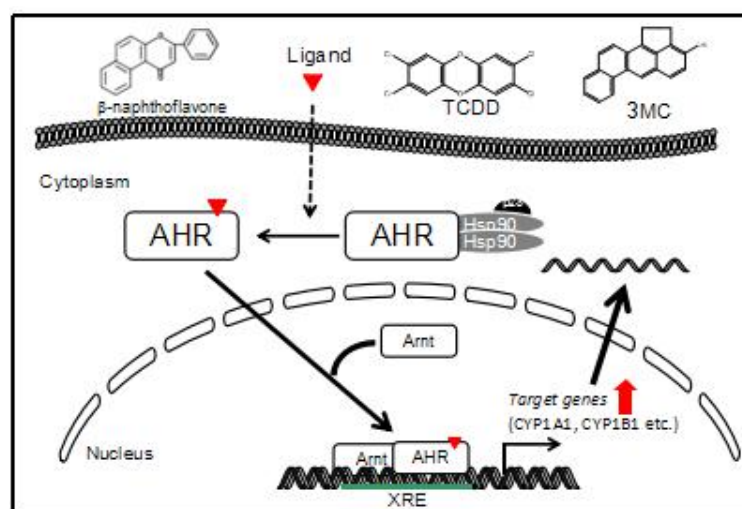


Fig. 3. AHR signaling pathway.

ダイオキシン類の毒性は、低濃度では主に AHR と結合することで発現すると考えられている。実験動物（ラット、マウス及びハムスター）による長期毒性試験ではダイオキシン類の発がん性を示唆する結果が報告されている。ラットにおいては、Kociba らが肝細胞がん、硬口蓋及び鼻甲介、肺の扁平上皮がんの有意な増加を報告している（23）。しかし実験動物の結果と比べると、ヒトにおける AHR の発がん性や内分泌かく乱作用の詳細はまだ判明していない。AHR を介さないダイオキシン類の毒性発現機構も存在すると考えられており、主に高濃度での毒性発現と関係していると考えられている。

一方、AHR は腫瘍細胞の増殖を抑制する作用を持っている可能性を示唆する報告もなされている。例えば、AHR はユビキチンリガーゼの機能を有し、ER を分解することによって、乳がん細胞の増殖を抑制することが報告されている（20）。他方、AHR は ER の発現が少ない乳がん細胞による腫瘍形成を抑制することも報告されている（24）。AHR リガンドである TCDD に暴露されたマウスの乳腺上皮細胞において細胞は休止期（G0 期）から細胞周期に入ることに関与する cyclin D の mRNA が減少すること（25）、妊娠中の出産未経験マウスに TCDD を投与すると、環境発がん物質である 7,12-dimethylbenz[a]anthracene（DMBA）により誘導された乳腺腫瘍形成は TCDD 未処理マウスに比べて 4 週間遅延すること（26）、AHR の活性化は乳がん細胞の浸潤性と転移性を抑制、乳がん幹細胞の分化を促進することなどが報告されているが（27）、詳細な機構に関しては矛盾点も多く、明らかになっていない。

近年、転写調節因子である AHR の生物学的な機能に関する報告が増えている。これら報告から、特に幹細胞の増殖と分化に AHR は重要な役割を果たしていることが示唆されている。AHR リガンドである TCDD 投与したマウスでは造血幹細胞（hematopoietic stem cells, HSCs）を多く含む画分の細胞数及び細胞増殖能の亢進が認められ（28）、AHR アンタゴニストでも HSCs の増殖促進が報告されている（29）。さらに、AHR リガンドである TCDD と 6-formylindolo [3,2-*b*] carbazole（FICZ）では免疫細胞の分化方向が相反するといった報告もある（30, 31）。皮膚の幹細胞においては AHR が活性化すると、幹細胞が休止期（G0 期）から細胞周期に入ること、自己複製の亢進、毛の濾胞と皮脂腺細胞が上皮細胞に分化することなどの現象が認められる（32）。また、神経幹細胞では出生後の早期に神経発生に AHR の転写的活性化を示すとの報告がある（33）。

以上のことより、AHR はダイオキシン等の外因性物質の毒性発現に介在するだけでなく、内因性リガンドによる正常の生物学的な機能、特に生体の幹細胞の発生と維持に対する働きも示唆されている。

本研究では、「AHR リガンドによる乳がん細胞増殖抑制作用は、がん幹細胞自己複製における抑制作用を介したものである」との作業仮説をたて、これを立証することにより、乳がん細胞の増殖抑制機構を明らかとすることにした。

1-2. 実験方法

1-2-1. 使用した細胞

- ・ MCF-7 細胞 (ER⁺, HER2⁻) (日本細胞材料開発室、CELL BANK)
- ・ MCFTR-CA-AHR 細胞

pcDNA™6/TR vector Mammalian Expression Vector (Thermo Fisher Scientific, USA) を MCF-7 細胞にトランスフェクションして、blasticidin 選択により MCFTR 細胞 (Tet repressor を安定的に発現する MCF-7 細胞) を樹立した。myc タグを付いた AHR 遺伝子を pcDNA™5/TO Mammalian Expression Vector (Thermo Fisher Scientific, USA) に組み込んで、hygromycin 選択により pcDNA5/TO-myc-AHR プラスミドが作成した。そこで、Inverse PCR 法により、リガンド結合部位である PAS-B の欠損したリガンド非依存的活性型 AHR (constitutively active AHR, CA-AHR) 遺伝子を pcDNA5/TO-myc-AHR プラスミドから増やして、pcDNA5/TO-myc-CA-AHR プラスミドが作製した。それを上述した MCFTR 細胞にトランスフェクションし、安定発現株 (MCFTR-CA-AHR) を樹立した。MCFTR-CA-AHR 細胞は tetracycline (Tet) によって CA-AHR 発現が調節されている。Tet が Tet repressor (TetR) に結合すると、pcDNA™5/TO Mammalian Expression Vector (Thermo Fisher Scientific, USA) のプロモーター上にある Tet 応答配列 (TREs) から TetR が乖離し、CA-AHR の転写が活性化される (Fig. 4)。

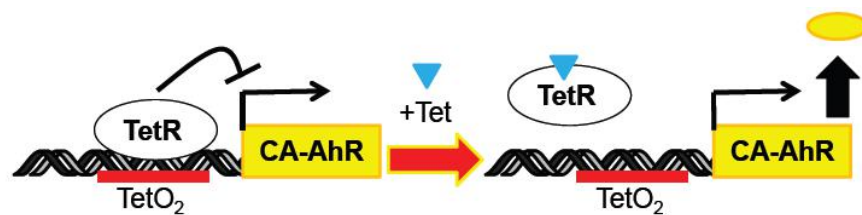


Fig. 4. Schematic illustration of inducible ligand-independent constitutive active AHR expressing cell.

1-2-2. 使用薬品

- ・ 3MC (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA)
- ・ β -NF (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA)
- ・ Tet (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA)
- ・ Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Toray Fine Chemical, Tokyo, Japan)

1-2-3. 細胞培養

- ・ 接着培養 (adherent culture)

細胞を、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (和光純薬工業、大阪) に、5%の fetal bovine serum を加えた培地で、penicillin (100 units/ml)、streptomycin (100 μ g/ml)、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

- ・ Mammosphere culture (Fig. 5)

Mammocult Medium の調製法 :MammoCult Basal Medium(Human) と MammoCult Proliferation Supplement (Human) (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) を 9 :1 で混ぜた。Hydrocortisone (0.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と Heparin (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ /0.0004%) を用時加えた。

80~90% confluent の細胞を用意した。PBS で 2 回洗浄した後、0.25w/v%トリプシン (和光純薬工業) 1 mL で細胞をはがした。DMEM 3 mL を加えて 500 $\times g$ で 3 分間遠心した。上清を注意深く除き、Mammocult Medium を 4 mL 加えてピペティングにより single cell にした。細胞数をカウントし、 4×10^4 cells/well で、Ultra-Low Adherent Plates (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) に播種した。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下で 4 日間培養した。以上の方法で培養し形成した細胞集落 (スフェロイド) を、1st mammosphere とした。

1st mammosphere culture の培養液を穏やかに遠心管に移した。プレートを Mammocult Medium 2 mL で 2 回リンスした。300 $\times g$ で 5 分間遠心した。上清を注意深く除き、0.25w/v%トリプシンを 500 μL 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間インキュベートした。DMEM 500 μL を加え、ピペットで懸濁した。300 $\times g$ で 5 分間遠心した。上清を注意深く除き、Mammocult Medium 500 μL を加えた。細胞数をカウントし、 4×10^4 cells/well に調整し、Ultra-Low Adherent Plates に播種した。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下で 7 日間培養した。以上の方法で培養し形成したスフェロイドを、2nd mammosphere とした。

1-2-4. スフェロイドコロニーの計測

細胞を播種する際に、Mammocult Medium で必要濃度に希釈した薬物を添加した。1st mammosphere 形成のための培養を行った。96-well plate に 50 μL ずつ移し、顕微鏡で mammosphere コロニーの数を数えた。mammosphere コロニー数を、まいた時の細胞数で割り、1st mammosphere 形成率とした。1st mammosphere から得られた single cell を継代し、2nd mammosphere の形成培養を行った。薬物処理は行わなかった。1st mammosphere 形成のための培養と同じように、96-well plate に 50 μL 移し、顕微鏡で mammosphere コロニー数を数え、mammosphere コロニー数を、まいた細胞数で割り、2nd mammosphere 形成率とした。顕微鏡の下で、形成したコロニーの写真を撮った。

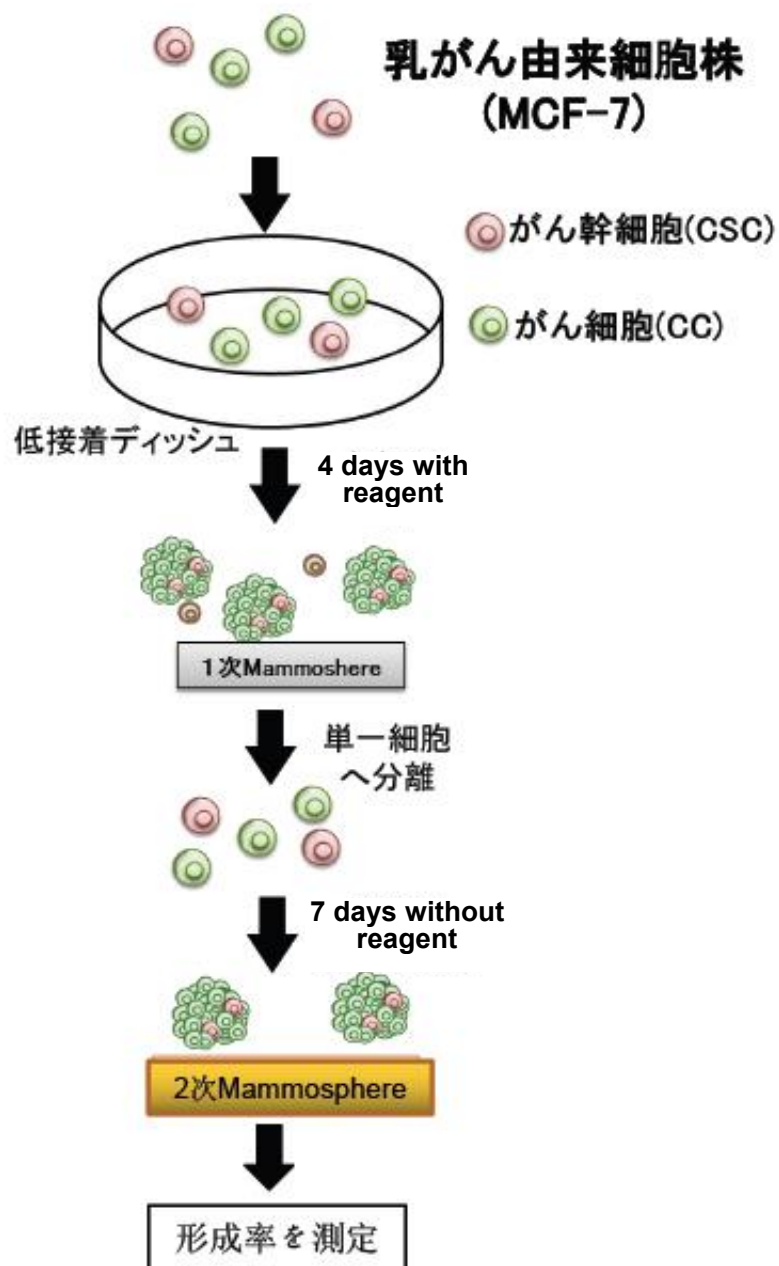


Fig. 5. Mammosphere formation assay.

1-2-5. MTS アッセイ

細胞を 4×10^3 cells/well に調製し、96-well plate に播種した。その翌日に、薬物処理を行い、37°C、5% CO₂ 条件下で 72 時間培養した。MTS 試薬 (Promega) を加え、30 分培養後、波長 490 nm の吸光度を測定した。

1-2-6. Western Blot 解析

1st mammosphere 形成培養を行った。細胞をまくときに CA-AHR 発現を誘導するテトラサイクリン (1μg/ml) を添加した。37°C、5% CO₂ 条件下で 4 日間培養した。サンプルの回収: 1) mammosphere culture

の培養液を穏やかに遠心管に移した。2) 300×g で 5 分間遠心した。3) 上清を注意深く除き、250μL の溶液 (1×SDS sample buffer + protease inhibitor + phosphatase inhibitor + DTT) を添加し、よくピペティングしてから回収し、使用するまでに - 80℃で保存した。RC DC プロテインアッセイ Kit (Bio-Rad Laboratories, USA) を用いてタンパク質の定量を行った。タンパク質 5 μg をチューブに移し、98℃で 10 分間加温した。7.5%分離ゲルと 4.5%濃縮ゲルを作成し (Table 2)、電気泳動装置をセットアップし、1×泳動バッファーに浸する。サンプル及びタンパク質マーカを、ローディングチップを使ってゲルにロードする。電気泳動パワーパックを 20mA にセットし、50 分間泳動した。ゲルを転写バッファーで 15 分間振とうした。メタノールに 10 秒で処理し、転写バッファーで平衡化しておいた PVDF membrane (EMD Millipore Corporation, Billerica Ma, USA) にタンパク質をブロッティング装置にて 200 mA で 30 分間転写した。membrane をブロッキングバッファーに浸し、1 時間ブロッキングした。HRP(horseradish peroxidase)標識の一次抗体が 1 回で membrane に処置して測定できるため、Tubulin の抗体である anti- α -Tubulin HRP-Direct Rabbit pAb (MBL, catalog No. PM054-7) を 10,000 倍希釈で使用して、membrane を抗体の希釈液に浸し、1 時間室温で振とうした。洗浄バッファーで 2 回洗浄し、HRP の基質として Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore) を使って、発光させて、Typhoon 9410 Variable Mode Imager (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) という画像解析装置で測定した。バンドの濃さは Image Quant ソフトウェア (GE Health Care) で分析した。ほかのタンパク質を測定するために、ブロッキングしてから、一次抗体反応を行った。抗体は、Notch1 の一次抗体として anti-Notch1 (D1E11) XP™ Rabbit mAb (Cell Signaling, catalog No. 3608) を 1,000 倍希釈で、Notch3 の一次抗体として anti-Notch3 Rabbit pAb (Cell Signaling, catalog No. 2889) を 1,000 倍希釈で、Musashi-1 の一次抗体として anti-Musashi-1 Rabbit mAb (D46A8) (Cell Signaling, catalog No. 5663) を 1,000 倍希釈で、 β -catenin の一次抗体として anti- β -catenin Rabbit mAb (MBL, catalog No. B-AN5105M) を 5,000 倍希釈で、Nanog の一次抗体として anti-NANOG Rabbit pAb (Abgent, catalog No. AP1486A) を 100 倍希釈で、Bmi-1 の一次抗体として anti-Bmi-1 Mouse mAb (Millipore, catalog No. 05-637) を 1,000 倍希釈で、AHR の一次抗体として anti-AHR Mouse mAb (Thermo, catalog No. MA1-514) を 2,000 倍希釈で、myc-tag の一次抗体として anti-myc-tag Rabbit pAb (MBL, catalog No. 562) を 4,000 倍希釈で使用した。希釈には一次抗体液 (Can Get Signal® Solution1, TOYOBO) を使用した。membrane を抗体液に浸し、室温で 30 分間振とうした後、4℃で 15 時間静置して反応させた。室温で 1 時間振とうし、洗浄バッファーで 2 回洗浄した。二次抗体反応を行った。抗体は、一次抗体相応の HRP で標識された二次抗体として rabbit IgG (Cell Signaling, catalog No. 2729) 抗体を 2,000 倍希釈で、mouse IgG (Cell Signaling, catalog No. 7076) 抗体を 2,000 倍希釈で使用した。希釈には二次抗体液 (Can Get Signal® Solution2, TOYOBO) を使用した。membrane を抗体液に浸し、1 時間室温で振とうした。洗浄バッファーで 2 回洗浄し、二次抗体に標識した HRP の基質として Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore) を使って、発光させて、Typhoon 9410 Variable Mode Imager (GE ヘルスケア・ジャパン

株式会社)という画像解析装置で測定した。バンドの濃さは Image Quant ソフトウェア (GE Health Care) で分析した。以上で用いる試薬の組成は以下のとおりである (Table 3)。

Table 2. Gel preparation.

	分離ゲル (mL、トータル 5mL)	濃縮ゲル (mL、トータル 2mL)
ゲル%	7.5%	4.5%
ddH ₂ O	2.8	1.64
40%アクリルアミド	0.94	0.281
分離/濃縮バッファー	1.25	0.3
10% APS	0.1	0.05
TEMED	0.01	0.01

Table 3. Reagent and composition.

Reagent	Composition
2×SDS sample Buffer	1 M Tris - HCl (pH 7.5) 6250 μ L SDS (w/v) 2g Glycerol 10mL Bromophenol Blue (BPB) 2mg H ₂ O 33750 μ L
protease inhibitor	complete Tablets, Mini EASYpack protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
phosphatase inhibitor	PhosSTOP EASYpack phosphatase inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
4× 分離バッファー	1.5M Tris HCl (pH 8.8) 0.4% SDS
4× 濃縮バッファー	1.0 M Tris HCl (pH6.8) 0.1% SDS
1 × 泳動バッファー	25 mM Tris-base 192 mM Glycine 0.1% SDS pH 8.3
転写バッファー	2.25 g Tris base 10.5 g Glycine 1 g SDS 200 ml Methanol Add distilled water to 1.0 L
ブロッキングバッファー	EzBlockChemi 非タンパク質性ブロッキング試薬 (ATTO, Tokyo)
洗浄バッファー	1 × PBST
10 × PBST	40 g NaCl 1 g KCl 6 g Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O 1 g KH ₂ PO ₄ 0.5 mL Tween-20 Add distilled water to 0.5 L

1-2-7. Real-time RT-PCR

Total RNA の回収：細胞を回収した後、1 サンプルずつ 200 μ L の ISOGEN II (Nippon Gene Co.) を添加し 5 分間振とうした後、ピペットでホモジナイズしながら 1.5 mL tube に回収した。そこに、100 μ L の

水を加えて激しく混和した後 10 分間静置して反応させた。その後、4°C、15,000×g で 15 分間遠心し、上清を 250μL 回収し、100μL の 70%エタノールを加えてボルツェクスした。10 分静置後、15,000×g で 10 分遠心し、沈殿を残して上清を捨てた。その後、500μL の 70%エタノールを加えてボルツェクス、15,000×g で 3 分遠心、沈殿を残して上清を捨てる作業を 2 回行った。沈殿を風乾した後、50μL の nuclease-free water (TOYOBO) で溶解し、RNA 溶液とした。

逆転写反応：以上で得られた RNA 溶液の濃度を 260 nm の吸光度により定量し、Nuclease-free Water を用いて 1μg/10μL になるように調製した。65°C で 10 分間インキュベートした後、氷冷した。

PCR 反応：cDNA を ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて逆転写することにより得た。それを 1 サンプル当たり 0.5μL 低吸着チューブに分注した。そこに、氷冷した 2μL の RNA 溶液を加えてピペティングにより、よく混和した。37°C で 30 分間反応させ、98°C で 5 分間インキュベートした。放冷後、TE-buffer で希釈し、全量 25μL にしたものを cDNA 溶液とした。

Real-time PCR：Real-time PCR は THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) を用いて行った。予め、1 サンプルあたり 12μL の THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix、0.5μL の 50× ROX reference dye、0.5μL の Forward 及び Reverse プライマー、1μL の cDNA 溶液を混合し、水で最終液量を 25μL とした。また検量線を引くために 1 倍、5 倍、10 倍、50 倍に希釈したサンプルも同様の方法で 25μL の混液を作製した。この Real-time RT-PCR 用の 25μL のサンプルを 10μL ずつ 96 well PCR プレーットの 2 つの well に分注して、7500 Fast Real-time PCR (Applied Biosystems) で PCR 反応を行った。95°C で 7 分間最初の変性ステップを行い、95°C で 10 秒インキュベーションすることで鋳型 DNA の変性を行い、55°C で 20 秒アニーリングステップを行い、72°C で 30 秒伸長ステップを行い、50 サイクルで PCR 増幅を行った。なお内部標準として β -actin を用いて補正を行った。プライマーの塩基配列及び PCR 条件は以下のとおりである (Table 4)。

Table 4. Sequence of primers.

Gene	Primer
AHR	Forward : 5' - CATGCTTTGGTCTTTTATG-3' Reverse : 5' - TTCCCTTTCTTTTCTGTCC-3'
CYP1A1	Forward : 5' -ACC CCA GGG TAC AGA GAA AGA-3' Reverse : 5' -TGG TCT CAC CGA TAC ACT TCC-3'
β -actin	Forward : 5' -TCC TCC TGA GCG CAA GTA CTC-3' Reverse : 5' -CTG CTT GCT GAT CCA CAT CTG-3'

1-2-8. siRNA 導入による mRNA ノックダウン

細胞に AHR siRNA (Invitrogen, Carlsbad, CA)、control siRNA (Invitrogen) を lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen) を用い、添付プロトコールにより導入した。

1-2-9. 免疫蛍光染色

Tet (1 μ g/mL) で 24 時間処理した MCFTR-CA-AHR 細胞を 5 \times 10⁴cells/ml でマイクロスライドチャンバー 4 well (日本ジェネティクス株式会社) に撒いた。PBS で細胞を洗浄した。細胞を 200 μ L の 4% paraformaldehyde (PFA) で 15 分間固定した。PBS で 2 回洗浄した。0.1%の triton (MP Biomedicals) 200 μ L で 10 分間室温で振とうした。PBS で 2 回洗浄した。150 μ L ブロッキング溶液 PVDF Blocking Reagent (TOYOBO) で 1 時間振とうした。一次抗体 anti-myc-IgG Rabbit pAb (MBL, catalog No. 562) を 200 倍希釈し、anti-IgG Rabbit pAb (MBL, catalog No. 458) を 200 倍希釈して加えて、1 時間振とう後、15 時間静置して反応させた。PBS で 2 回洗浄した。二次抗体 Alexa Fluor® 488 Goat anti-Rabbit pAb (Invitrogen, catalog No. A-11034) を 200 倍希釈して加えて、1 時間振とうした。PBS で 2 回洗浄した。共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM 510 META) を使って観察した。

1-2-10. ALDEFLUOR アッセイ

ALDEFLUOR アッセイはメーカー (Aldagen/Stemcell Technologies, Durham, NC, USA) の添付プロトコールにより行った。BODIPY-aminoacetaldehyde (BAAA) を含む ALDEFLUOR アッセイバッファーに細胞 (1 \times 10⁶ cells/mL) を懸濁する。その半量を別の tube に分取し、ALDH 特異的なインヒビター diethylaminobenzaldehyde (DEAB) を加え、バックグラウンドの蛍光を差し引くために用いた。37°C で 40 分間静置して反応させた後、FACScan II フローサイトメーター (Becton Dickinson Biosciences) で蛍光測定を行った。DEAB の加えた時の ALDH 活性のない細胞をバックグラウンドにしてゲートし、それと同じ範囲で BAAA の加えた時の細胞をゲートした。BAAA の加えた時の細胞のゲートされていない ALDH 活性の高い方向にシフトした細胞を ALDH 活性の高い細胞と認識されて、ゲートされて、ALDHhi 細胞として数を記録して、グラフを作った。

1-2-11. 統計分析

統計比較は KaleidaGraph Synergy Software (serial NO. 356609) で分散分析の Dunnett の比較検定で行った。

1-3. 実験結果

1-3-1. 乳がん細胞 MCF-7 の mammosphere 形成率（乳がん幹細胞の自己複製能）に対する AHR リガンドの阻害作用

AHR リガンド β -NF 及び 3MC の乳がん細胞への影響を接着培養条件下及び非接着培養条件下で検討した。

1-3-1-1. AHR リガンドの乳がん細胞の増殖への影響

AHR リガンドである β -NF 又は 3MC による乳がん細胞 MCF-7 の増殖に対する影響をみるために、それぞれを 72 時間処理し、細胞の生存活性を MTS アッセイにより検討した。3MC の高濃度処理時 ($0.1\mu\text{M}$ 以上) 生存活性を低下させたが、 β -NF 処理では検討したいずれの濃度でも影響は認められなかった (Fig. 6A)。このことから、3MC は $0.1\mu\text{M}$ 以上の処理で、細胞増殖抑制を示すこと、 β -NF は $10\mu\text{M}$ の処理でも細胞増殖抑制を示さないことが明らかとなった。

1-3-1-2. AHR リガンドの mammosphere 形成に対する影響

がん幹細胞は低接着ディッシュ上で培養することにより (mammosphere culture、非接着培養)、スフェロイド状のコロニー (mammosphere) を形成することが報告されている (34)。したがって、mammosphere 形成率はがん幹細胞の存在率を反映しているものと考えられている。実際に、細胞株である MCF-7 細胞においてもがん幹細胞を含んでいると考えられている (35)。そこで、 β -NF と 3MC 処理が MCF-7 の mammosphere 形成へ影響を示すか否かを検討した。その結果、両者共に、濃度依存的な mammosphere 形成率の低下が認められた (Fig. 6B)。このことから、AHR リガンドの処理でがん幹細胞の自己複製が抑制しているものと考えられた。

1-3-1-1 の実験で、3MC は高濃度で細胞増殖抑制を示したが、 β -NF では用いた濃度域で細胞増殖抑制は認められなかったことから、以降の実験ではがん幹細胞の自己複製を選択的に抑制している可能性の高い β -NF を用いることとした。

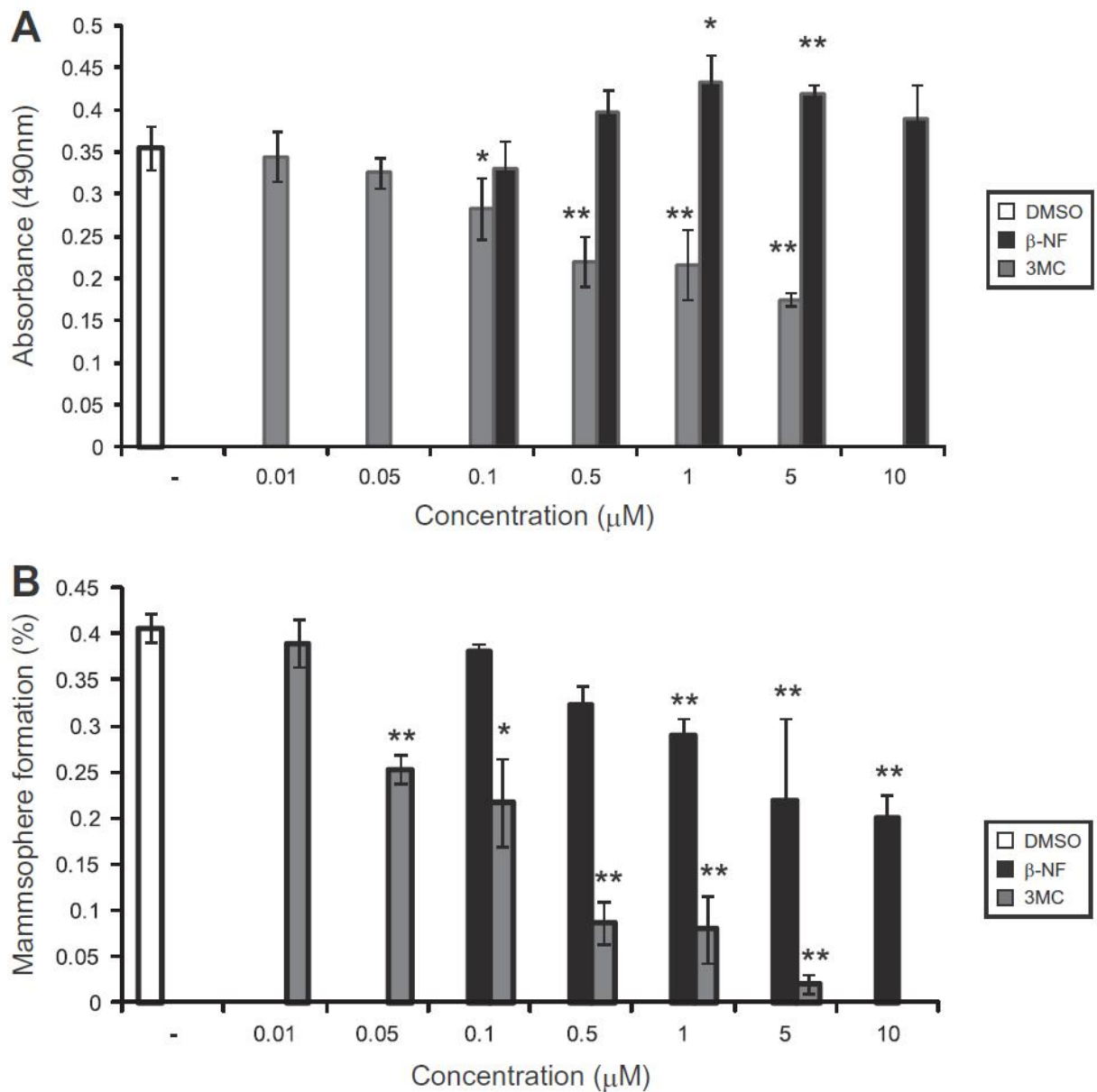


Fig. 6. Anti-proliferative effect of AHR-ligands, β -NF and 3MC.

(A) MCF-7 cells were cultured under adherent conditions in the presence of varying concentrations of β -NF or 3MC for 72 h. Cell viability was evaluated by the MTS assay. (B) MCF-7 cells were cultured under non-adherent conditions in the presence of varying concentrations of β -NF or 3MC for 7 days. Percentage mammosphere formation was determined by microscopic examination. The results are expressed as the mean \pm S.D. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; $n = 3$).

1-3-1-3. AHR リガンドの二次 mammosphere 形成への阻害作用

β -NF 処理及び未処理培養下で形成した mammosphere (一次 mammosphere) をトリプシン処理により単一細胞とし、 β -NF を添加せずにさらに 7 日間 mammosphere culture を行い、二次 mammosphere の形成率を求めた。二次 mammosphere 形成率は対照群に比する β -NF 処理群で顕著に低下した (Fig. 7)。こ

の結果から、 β -NF 処理により一次 mammosphere 中のがん幹細胞が減少したことにより、二次 mammosphere の形成率が低下したものと考えられる。

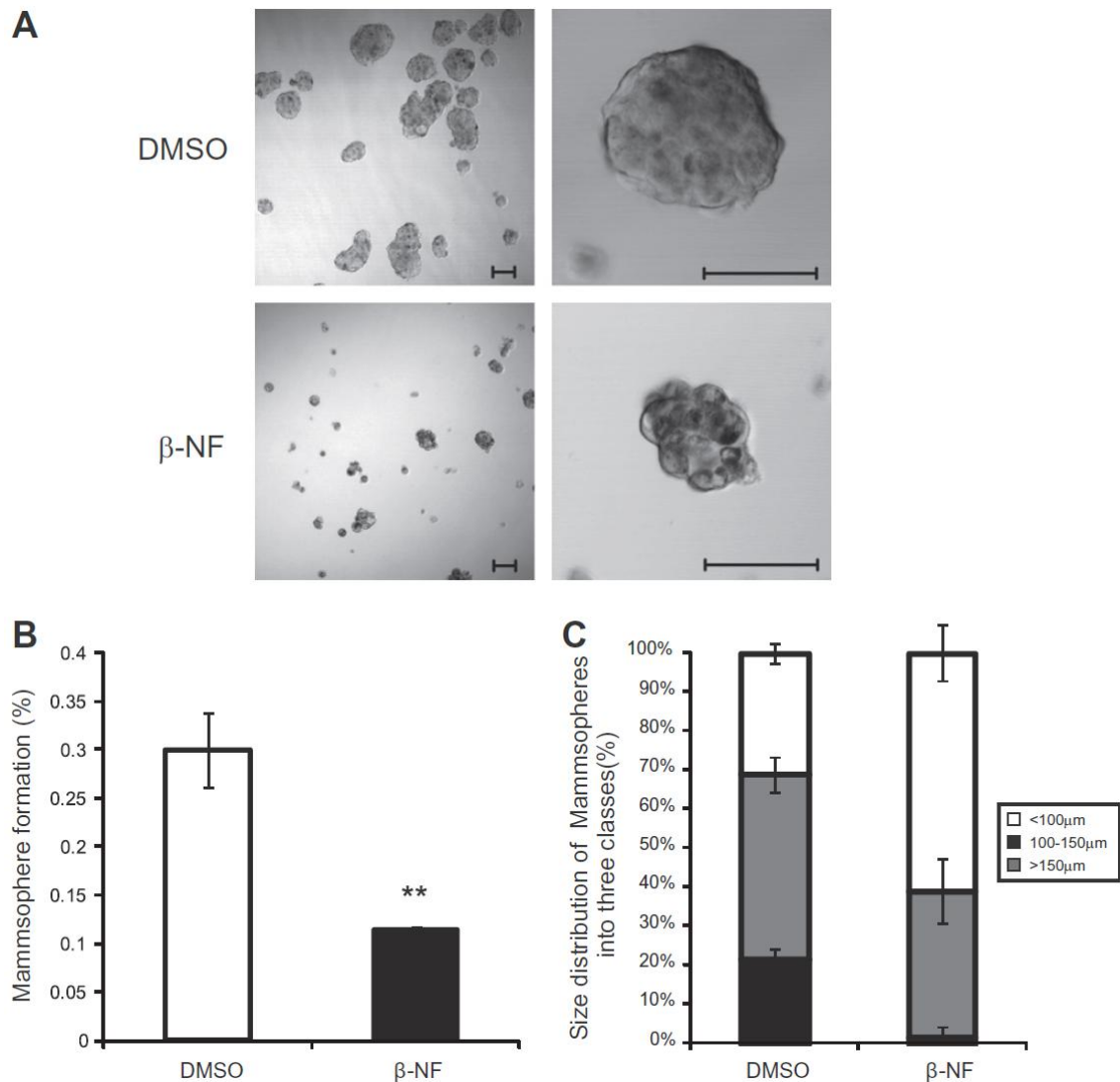


Fig. 7. Inhibitory effect of β -NF on secondary mammosphere formation.

MCF-7 cells were cultured under non-adherent conditions in the absence or presence of β -NF (10 μ M) for 7 days. Single cells prepared by trypsinization of primary mammospheres were recultured in the absence of β -NF for a further 7 days. (A) Secondary mammospheres derived from vehicle or β -NF-treated primary mammospheres were observed using a confocal laser scanning microscope. Bar: 100 μ m. (B) Percentages of secondary mammospheres formed from plated single cells. The results are expressed as the mean \pm S.D. (**, $P < 0.01$; $n = 3$). (C) The secondary mammospheres are classified into three groups depending on their diameters (smaller than 100 μ m, between 100 and 150 μ m, and larger than 150 μ m), and are expressed as the percentage of the total. The results are expressed as the mean \pm S.D. ($n = 3$).

1-3-1-4. AHR リガンドによる mammosphere 形成抑制の AHR 依存性

次に、 β -NF による mammosphere 形成の抑制が AHR を介したものであるか否かを AHR 標的 siRNA を用いて AHR 発現をノックダウンすることにより評価することにした。AHR 標的 siRNA またはネガティブコントロール siRNA を MCF-7 細胞に導入した。AHR 遺伝子のノックダウン効果は AHR タンパク質 (Fig. 8A) と mRNA の発現抑制 (Fig. 8B) で確認された。さらに、AHR のターゲット遺伝子である CYP1A1 mRNA の β -NF による誘導も AHR のノックダウンにより減弱したことから、AHR のノックダウンは AHR の機能を十分に低下させるものであった。さらに、AHR の発現は β -NF 処理においても Vehicle 処理群と相違は認められなかった (Fig. 8B)。なお、データは示さないが一次 mammosphere 形成に対する β -NF の抑制効果に対して siRNA によるノックダウンの影響は見られなかった。一方、 β -NF による二次 mammosphere 形成の抑制作用は AHR のノックダウンにより認められなくなった (Fig. 8C)。

以上の結果より、AHR リガンドである β -NF による mammosphere 形成の抑制作用は AHR に依存的事であることが明らかになった。

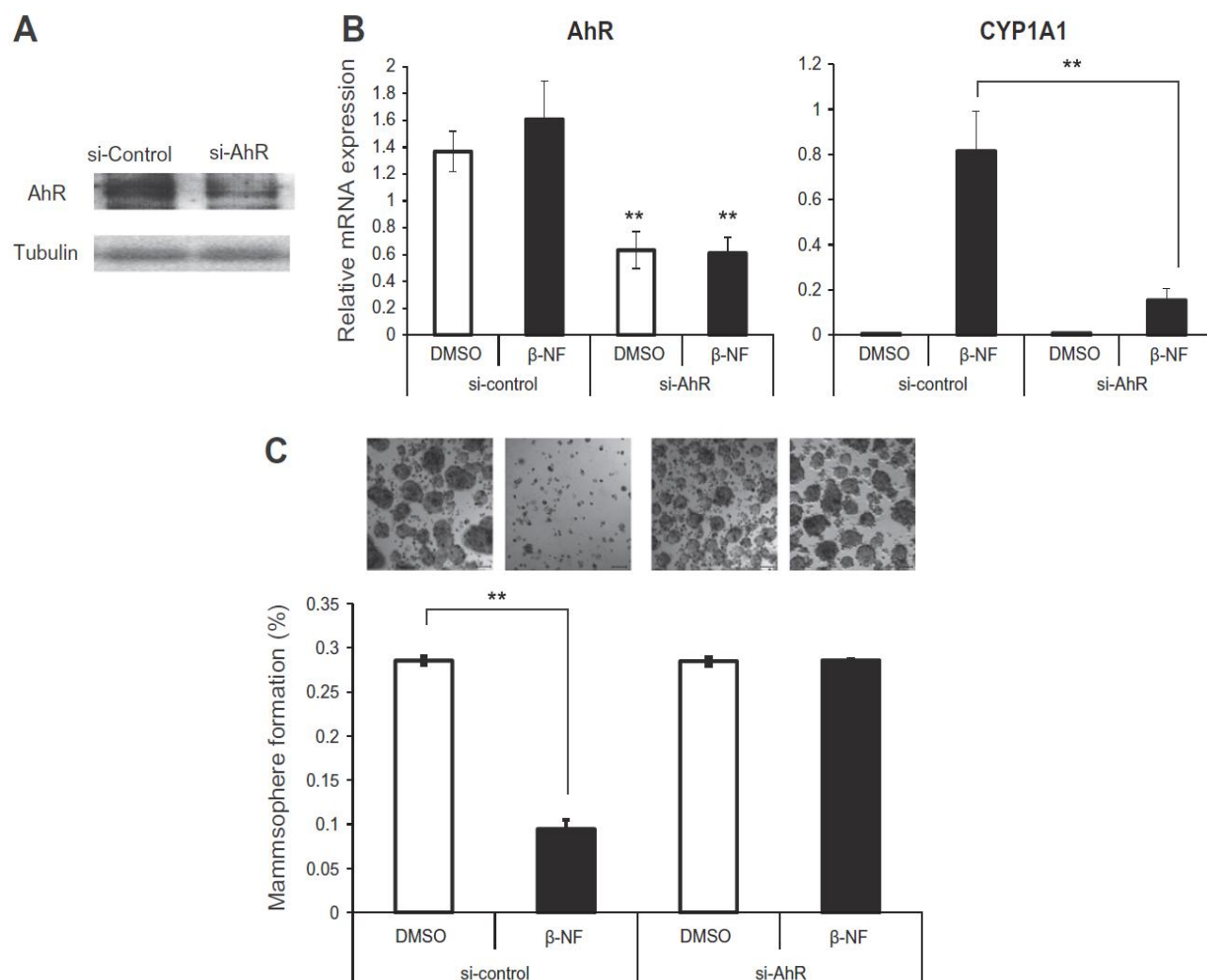


Fig. 8. Inhibitory effect of β -NF on secondary mammosphere formation abolished by knockdown of AHR.

(A) Whole-cell lysates from MCF-7 cells transfected with AHR siRNA (si-AHR) and negative control siRNA (si-Control) were resolved by SDS-PAGE, and proteins were detected by immunoblotting using antibodies against anti-AHR and anti-tubulin. (B) MCF-7 cells transfected with si-AHR and si-Control were treated with β -NF or DMSO for 24 h. Total RNA was extracted, and the expression of AHR and CYP1A1 mRNA was measured by real-time RT-PCR. The results were normalized against those of β -actin. The results are expressed as the mean \pm S.D. (**, $P < 0.01$; $n = 3$). (C) Secondary mammospheres derived from DMSO- or β -NF- treated siRNA transfected MCF-7 cells. Mammospheres were observed using a confocal laser scanning microscope. Bar: 100 μ m. Percentage mammosphere formation was determined by microscopic examination. The results are expressed as the mean \pm S.D. (**, $P < 0.01$; $n = 3$).

1-3-2. 誘導性リガンド非依存的活性型 AHR 発現細胞株の構築

Constitutive active AHR (CA-AHR) はリガンド結合領域 PAS-B 領域を欠き、リガンド結合能を持たないが、恒常的に活性化状態にある AHR 変異体である。この変異体 (CA-AHR) を発現させることにより、 β -NF の影響を考慮することなく、活性化した AHR の機能を観察することが可能となる。そこで、CA-AHR 発現の on, off をコントロールできるように、T-Rex System を用いることで、Tet の添加により CA-AHR を誘導発現することが出来る MCF-7 細胞変異株 (MCFTR-CA-AHR) を樹立した。樹立方法は「実験方法」の Fig. 4 の通りである。

1-3-2-1. リガンド非依存的活性型 AHR による mammosphere 形成への影響

初めに、MCFTR-CA-AHR 細胞に Tet 処理により CA-AHR の発現が on になることを、ウエスタンブロット法により確認した (Fig. 9A)。さらに、CA-AHR には予め myc-tag を付けてあるが、免疫染色によって myc-tag が付いた CA-AHR の大部分が核内に移行していることを確認した (Fig. 9B)。AHR 標的遺伝子 CYP1A1 の mRNA 発現量の上昇も確認できた (Fig. 9C)。

次に、MCFTR-CA-AHR 細胞と Tet を用いて、CA-AHR の mammosphere 形成への影響を調べることにした。Tet 処理 (すなわち CA-AHR を発現している) 細胞の一次 mammosphere 形成率は Tet 未処理コントロール (CA-AHR が発現していない場合) と比べて変化は見られなかったが (Fig. 9D)、二次 mammosphere 形成率は顕著に低下した (Fig. 9E)。 β -NF で AHR を活性化した場合は、一次 mammosphere 形成を抑制したが、CA-AHR の発現が一次 mammosphere 形成に影響を及ぼさなかったことについては、さらなる検討が必要である。いずれにせよ、活性化した AHR は乳がん幹細胞に作用して、二次 mammosphere の形成率を低下させていることが強く示唆された。

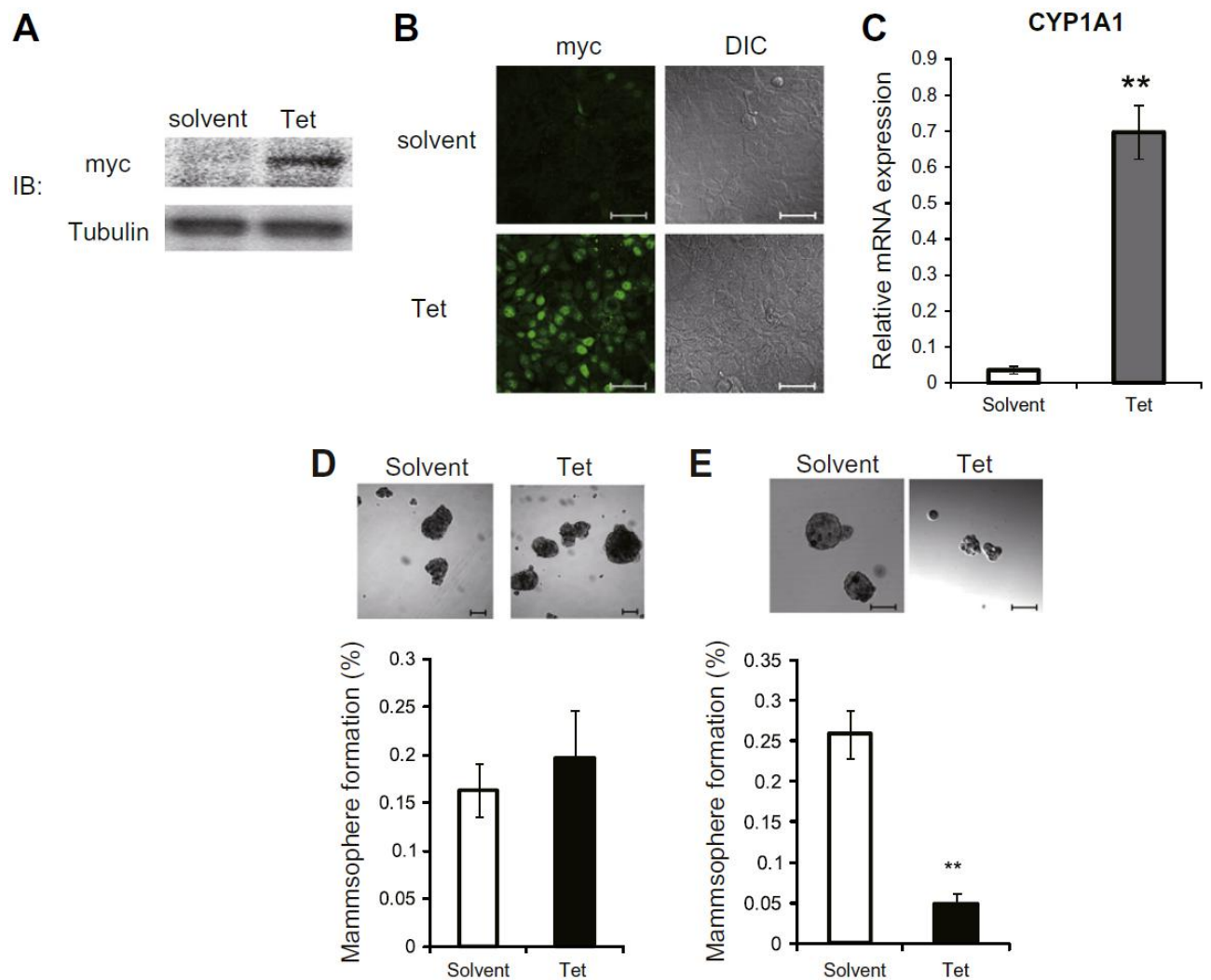


Fig. 9. Tetracycline treated MCFTR-CA-AHR cells show decreased secondary mammosphere formation.

(A) MCFTR-CA-AHR cells were treated with tetracycline (Tet, 1 μ g/ml) or solvent for 48 h. Whole-cell lysates were resolved by SDS-PAGE, and proteins were detected by immunoblotting using antibodies against anti-myc tag and anti-tubulin. (B) MCFTR-CA-AHR cells were treated with tetracycline (Tet, 1 μ g/ml) or solvent for 24 h. Immunofluorescence staining for myc-tag is indicated in the left panel (green). The right panel indicates differential interference-contrast micrographs. Bar: 100 μ m. (C) MCFTR-CA-AHR cells were treated with tetracycline (Tet, 1 μ g/ml) or solvent for 48 h. Total RNA was extracted, and the expression of CYP1A1 mRNA was measured by real-time RT-PCR. The results were normalized against those of β -actin. The results were expressed as the mean \pm S.D. (**, $P < 0.01$; $n = 3$). (D) MCFTR-CA-AHR cells were cultured under non-adherent conditions in the presence of tetracycline (Tet, 1 μ g/ml) or solvent for 7 days. (E) Secondary mammospheres derived from vehicle or Tet-treated primary mammospheres of MCFTR-CA-AHR cells were observed using a confocal laser scanning microscope. Bar: 100 μ m. Percentage mammosphere formation was determined by microscopic examination. The results are expressed as the mean \pm S.D. (**, $P < 0.01$; $n = 3$).

1-3-2-2. がん幹細胞の維持に関与する因子への AHR 活性化の影響

次に、AHR 活性化によるがん幹細胞自己複製の抑制のメカニズムを調べることにした。

がん幹細胞は体性幹細胞と同じように自己複製能と分化能を持ち、幹細胞を維持する転写因子が活性化されていることが報告されている。そこで、AHR 活性化ががん幹細胞の維持に関与するとされる因子の発現量に影響するかを調べることにした。

幹細胞を維持する因子としては N1ICD と N3ICD (36) , β -catenin (37) , Musashi-1 (38) , Nanog (39) や Bmi-1 (40) などが知られている。MCFTR-CA-AHR 細胞は Tet 処理により CA-AHR の発現が on になる時、これらの諸因子の発現量がタンパク質レベルでは変化していた (Fig. 10)。すなわち、Notch 経路に存在する Notch 受容体の細胞内切断領域である N1ICD と N3ICD の発現量が減少した。Wnt/ β -catenin 経路に存在する β -catenin タンパク質の発現量は減少した。Notch 及び Wnt 経路を調節することにより、乳がんの増殖と転移を促進することも報告されている (41) Musashi-1 は低下していた。Nanog と Bmi-1 も CA-AHR の発現により低下が認められた。

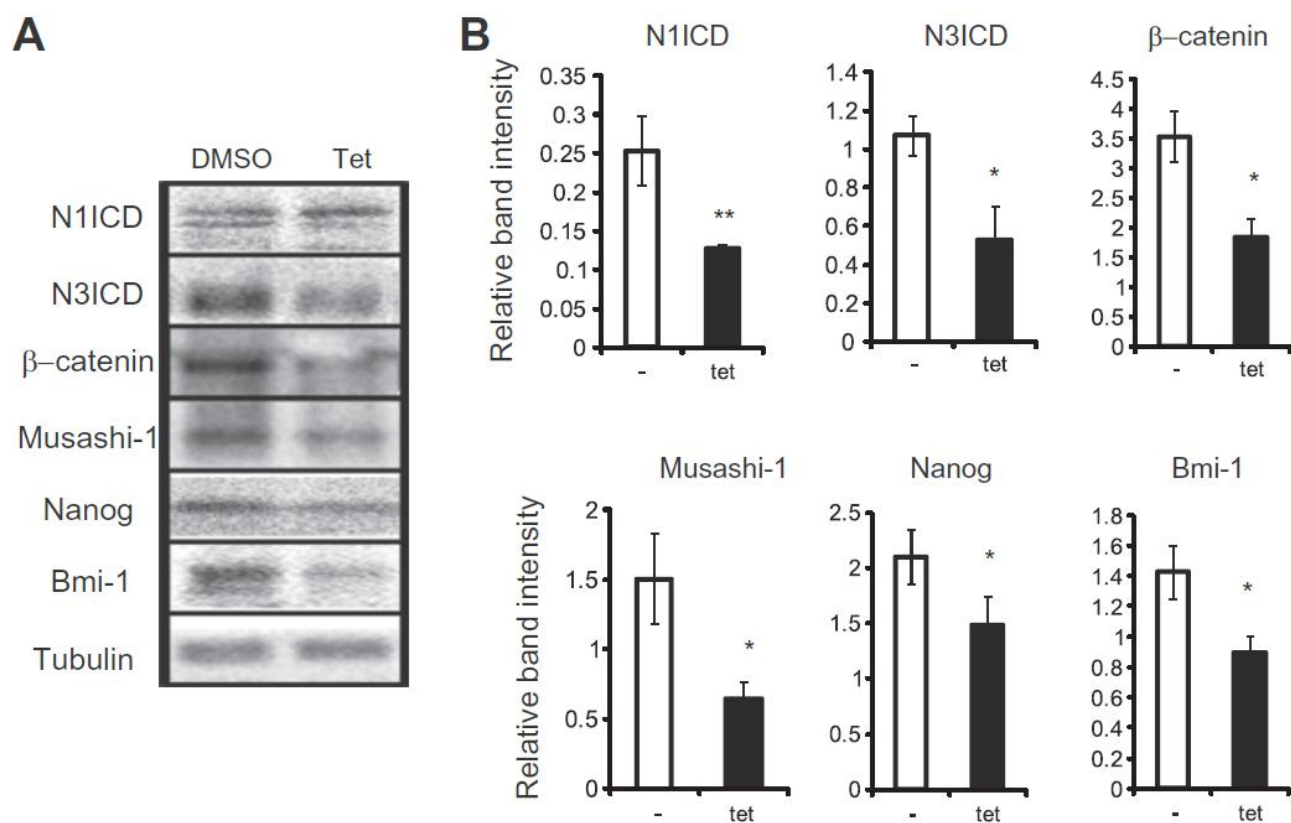


Fig. 10. Tetracycline treated MCFTR-CA-AHR cells show decreased stem cell factor protein levels in primary mammospheres.

(A) Whole-cell lysates were resolved by SDS-PAGE, and proteins were detected by immunoblotting using antibodies against Notch1, Notch3, β -catenin, Musashi-1, Nanog, Bmi-1 and tubulin. Similar results were obtained in three independent experiments. The results are expressed as the mean \pm S.D. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; $n = 3$).

(B) The Band intensities are expressed in the graphs (mean \pm S.D., *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; $n = 3$).

1-3-2-3. がん幹細胞マーカー ALDH-1 の高発現細胞への AHR 活性化の影響

がん幹細胞は一般的に高い aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH-1) 活性を持っていることが報告されている (42)。そこで、ALDEFLUOR アッセイを用いて ALDH-1 高発現細胞 (ALDH-1 hi) の割合をフローサイトメーターの測定により評価した。その結果、AHR リガンドである β -NF 処理 MCF-7 細胞及び Tet 処理 MCFTR-CA-AHR 細胞から形成した mammosphere 中に存在する ALDH-1 hi 細胞の割合は Tet 未処理コントロール細胞に比べて減少することが明らかとなった (Fig. 11)。

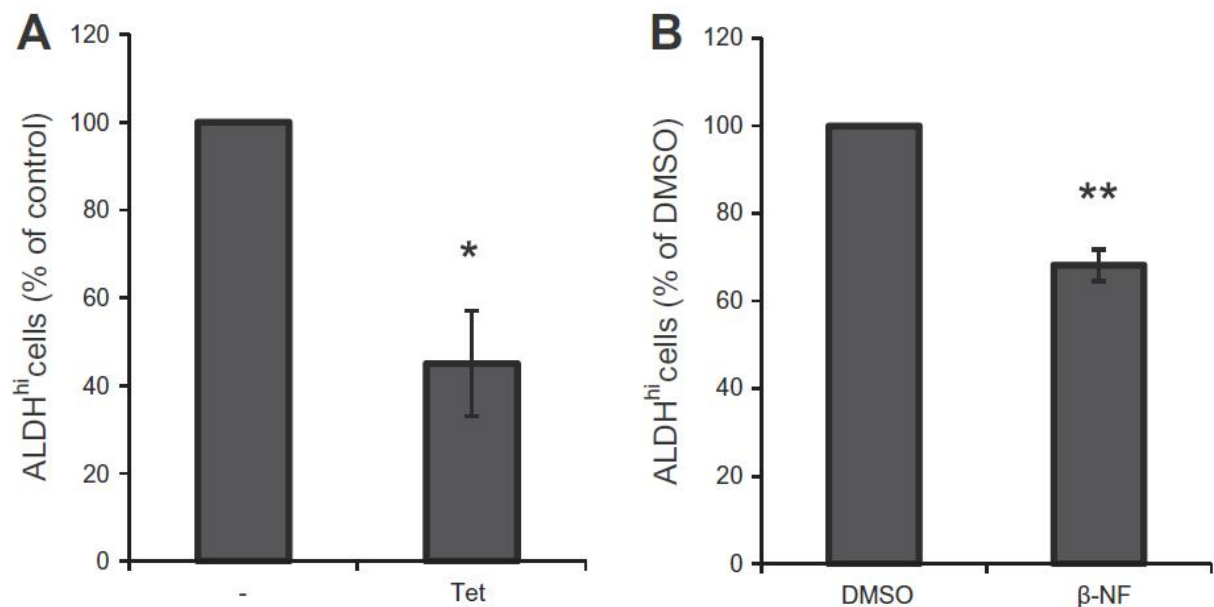


Fig. 11. Inhibitory effect of AHR activation on the population of ALDH-1 hi cells.

(A) MCFTR-CA-AHR cells were cultured under non-adherent conditions in the absence or presence of Tet for 4 days. (B) MCF-7 cells were cultured under non-adherent conditions in the absence or presence of β -NF (10 μ M) for 4 days. The proportions of ALDH-1-positive (ALDH-1 hi) cells were determined by the ALDEFLUOR assay. The quantitative results were shown in bar graph. Similar results were obtained in three independent experiments. The results are expressed as the mean \pm S.D. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; $n = 3$).

以上のことより、AHR 活性化を介した MCF-7 細胞の mammosphere 形成の抑制はがん幹細胞の増殖に対する抑制によることが示唆された。

1-4. 考察

本研究ではリガンドにより活性化された AHR の乳がん細胞増殖抑制機構を、がん幹細胞という新たな角度から解析した。

まず初めに、MCF 細胞株に AHR リガンド 3MC および β -NF を処理することで、MCF7 細胞に含まれる乳がん幹細胞に由来する mammosphere の形成率を検討したところ、これらリガンドにより、その形成率が低下することが明らかとなった。特に β -NF については、 β -NF 処理で生じた一次 mammosphere を単一細胞化した後に β -NF を含まない培地で mammosphere culture を行い、二次 mammosphere の形成率の低下も示した。さらに、siRNA による AHR のノックダウンは、 β -NF の mammosphere 形成に対する抑制作用を低減させたことから、mammosphere 形成抑制作用は β -NF というリガンドにより活性化された AHR に依存的であることが強く示唆された。加えて、リガンド非依存的に活性化状態にある変異型 AHR (CA-AHR :リガンド結合領域(LBD)欠損 AHR)を発現させた MCF7 細胞も、リガンド非存在下で mammosphere の形成率が非発現細胞と比較して低くなっていた。以上の実験により、AHR はリガンドで活性化されることにより、乳がん幹細胞の自己複製能を抑制する作用を発揮することを明確に示すことができた。

しかし、 β -NF は処理した最高濃度 10 μ M でも接着細胞培養では細胞増殖抑制を示さなかったが (1 μ M 以上で mammosphere 形成を抑制する)、3MC は 0.1 μ M 以上で接着細胞培養では細胞増殖抑制を示し (0.05 μ M 以上で mammosphere 形成を抑制する)、リガンドの相違によって、非がん幹細胞である乳がん細胞と乳がん幹細胞はその感受性が異なる可能性が考えられた。今後は、この相違の理由や、乳がん幹細胞に特異的に抑制作用を示すリガンドと非がん幹細胞である乳がん細胞と乳がん幹細胞の両方に抑制作用を示すリガンド、どちらが制がん作用として優れているのかを追究する必要があると思われる。また、CA-AHR の発現は二次 mammosphere の形成率を低下させたが一次 mammosphere の形成率には大きな変化を与えなかった。この理由についても今後明らかにしていく必要があると考える。

本研究では、AHR 活性化による mammosphere 形成抑制のメカニズムについての考察を加えるために、mammosphere 形成に関与するとされる Wnt/ β -catenin、Notch および Hedgehog シグナル伝達経路に存在する因子の発現への AHR 活性化の影響を CA-AHR 発現 MCF7 細胞を用いてさらに検討した。

まず、Wnt/ β -catenin 経路の中心的役割を演じるとされる β -catenin の発現を調べたが、CA-AHR の発現により減少した。Wnt/ β -catenin 経路は、細胞の発生・増殖・分化・恒常性の維持など、様々な重要な役割を果たしている。この Wnt/ β -catenin 経路に異常が生じると、細胞にそれら機能に異常が生じることになる。近年、Wnt/ β -catenin 経路はがん幹細胞の調節にも関与していることが報告された (33)。Wnt/ β -catenin 経路の活性化は、細胞質中の β -catenin 量に依存している。通常、Wnt の非存在下では細胞質内の β -catenin のタンパク質量は低く保たれている。これは GSK-3 β が β -catenin をリン酸化し、リン酸化された β -catenin はユビキチン化を受け、最終的にはプロテアソームで分解されるためである。一方、Wnt が分泌されて細胞膜上の Frizzled タンパク質と共役受容体である LRP (lipoprotein receptor-related protein) -5/6 に結合すると、そのシグナルは細胞内へと伝達され、

Dishevelled タンパク質は GSK-3 β 依存性の β -catenin のリン酸化を抑制し、低リン酸化状態となった β -catenin はプロテアソームによる分解から免れ、細胞質内に蓄積する。その後、核内に移行した β -catenin は転写因子 Tcf/Lef (T cell factor/lymphoid enhancer binding factor) と複合体を形成して標的遺伝子の発現を促進することによって、種々の細胞機能を制御する。Wnt の標的遺伝子である Oct4、Nanog などの発現がオンになることにより、がん幹細胞の自己複製が引き起こされと考えられている。AHR はユビキチンリガーゼ機能を有し、 β -catenin を分解することにより大腸がん細胞の増殖を抑制することも報告されている (43)。本研究の結果により、CA-AHR 発現細胞では、 β -catenin がタンパク質レベルで発現量が減少したことから、AHR の活性化により β -catenin の分解を介して乳がん幹細胞の自己複製が抑制される可能性が十分に予想できる。

Notch 経路も Wnt 経路と同様に、細胞の発生・増殖・分化・恒常性の維持など、様々な重要な役割を果たしている。通常の状態では、Notch 受容体は細胞膜に存在する。Notch シグナルは隣り合う細胞同士でシグナル伝達を送るため、送り手側の細胞膜に存在するリガンド (Jagged、Delta など) の結合により、Notch 経路が活性化する。その時、Notch 受容体が γ -セクレターゼにより切断され、活性化 Notch である Notch 細胞内領域 (NICD) が生じる。NICD は核に移行して、転写調節因子である CSL ファミリータンパク質と結合し標的遺伝子の転写を促進させる。Notch 経路はがん幹細胞の自己複製を維持することも報告されている (44)。本研究では、活性型 Notch である N1ICD と N3ICD の発現について検討し、CA-AHR 発現により、それらの発現量がタンパク質レベルで減少していることが明らかとなった。したがって、AHR の活性化により Notch シグナルの活性が低下し、乳がん幹細胞の自己複製が抑制される可能性が想定された。一方、やはり、がん幹細胞の自己複製を維持するとされる Hedgehog シグナル経路の中心因子である Gli1 の発現も調べたが、発現が検出できなかった。

幹細胞の自己複製に重要とされる他の因子として、Musashi-1 (38)、Nanog (39) 及び Bmi-1 (40) がよく知られている。これらは、未分化の悪性腫瘍のマーカーとしての報告も最近増えている。例えば、Musashi-1 は、Notch と Wnt 経路を活性化することによって、乳腺幹細胞の増殖を促進させることが報告されている (41)。Polycomb タンパク質 Bmi-1 も乳腺幹細胞の自己複製に大事な役割を果たすことが報告されている。Nanog は、前述したように Wnt の標的遺伝子である。これらの発現もまた、CA-AHR 発現細胞で減少していることがわかった。このことから、AHR の活性化はこれら因子の発現にも影響して乳がん幹細胞の自己複製を抑制している可能性が示唆された。

MCF-7 細胞はエストロゲン依存的に増殖する細胞株として知られている。AHR はユビキチンリガーゼの機能を有し、ER を分解することにより乳がん細胞の増殖を抑制することが報告されている。しかし、最近、乳がん幹細胞由来の mammosphere の形成は ER 非依存的であることが報告された (45)。したがって、本研究での AHR 活性化による mammosphere の形成抑制には、ユビキチンリガーゼ活性を介した ER の分解は関与していない可能性が考えられる。

以上のように、ダイオキシンなど多くの化学物質の毒性発現の介在因子として知られている AHR は、

乳がん幹細胞の分子標的という新たな乳がん治療の新たなターゲットになりうることが本研究で立証された。AHR のどのような機能、すなわち、転写因子としての機能、ユビキチンリガーゼとしての機能、あるいはまだ知られていない機能のいずれの機能を介して、どのような遺伝子の発現を活性化し、どのようなタンパク質の発現量を制御することで、乳がん幹細胞の自己複製を抑制するのかを今後さらに明らかにしていく必要がある。また、本研究では、乳がん幹細胞に焦点を絞ったが、他のがん幹細胞に対する AHR の重要性を調べていく必要もあると考える。これらの研究を基盤として、がん治療に適した医薬品として、AHR リガンドの検索・開発が発展することを期待する。

第2節 芳香族炭化水素受容体(AHR)発現を介した HER2 過剰発現による炎症性シグナルの mammosphere 形成促進

2-1. 序論

乳がんには、様々なサブタイプが存在し、それは免疫組織学的染色や遺伝子発現特性 (gene signature) をもとに分類されている (46)。主に乳がんのサブタイプは、luminal A (ER⁺ and PgR⁺ and HER2⁻ and Ki67 低値)、luminal B (ER⁺ and PgR⁺ and HER2⁺ and Ki67 高値)、HER2 enriched (ER⁻ and PgR⁻ and HER2⁺)、basal-like (ER⁻ and PgR⁻ and HER2⁻)、triple negative phenotype-non basal に分類される (ER: estrogen receptor, PgR: progesteron receptor, Ki67: a nuclear marker of cell proliferation, +: overexpression, -: under expression, 高値: high level expression, 低値: low level expression)。HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) チロシンキナーゼ受容体遺伝子は 15-20%の乳がんに過剰発現している (47)。

HER2 は epidermal growth factor receptor (EGFR) ファミリーに属し、erbB2 受容体とも呼ばれる。erbB 受容体とは、細胞膜に貫通して存在する膜型チロシンキナーゼ受容体であり、erbB1~4 までの種類がある。erbB 1 (EGFR: HER1)、erbB 2 (HER2)、erbB 3 (HER3)、erbB 4 (HER4) のように分けられ、これらは共通した構造をもち、3つのドメイン: 細胞外領域、細胞膜貫通領域、細胞内領域からなる。細胞外領域はリガンド結合部位をもち、ここにリガンドが結合することにより、受容体が活性化する (Fig. 12)。しかしながら、HER2 はリガンドに結合しなくても他分子と二量体を形成しやすく、リガンドと結合した他の erbB 受容体などと二量体を形成しやすい。したがって、リガンドと結合しなくてもヘテロ二量体として活性化すると考えられ、さらに活性化した EGFR や HER3、HER4 と結合して二量体を形成し、シグナル伝達を行うと考えられている。HER2 活性化により PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) /Akt (protein kinase B) (48)、MEK (mitogen-activated protein kinase kinase) /ERK (extracellular-regulated kinase) (49) シグナル伝達経路が活性化し、その下流のシグナル伝達経路の活性化を導いている (Fig. 12)。このシグナル伝達経路は腫瘍の増殖と薬物抵抗性に寄与するとされている。乳がんにおける HER2 過剰発現はサイトカインである interleukin (IL)-6 の分泌を強く亢進させることが報告されている (50)。さらに、IL-6 は乳がん幹細胞の自己複製の直接の制御因子であることが知られており、血清中 IL-6 のレベル上昇は乳がんの不良予後と相関する (51)。前節において、HER2 の低発現乳がん細胞株 MCF7 細胞の検討から、リガンドにより活性化された AHR が乳がん幹細胞の自己複製と増殖を抑制することを明らかとした。本節では HER2 過剰発現乳がんにおけるがん幹細胞維持における AHR の役割を明確にするために、MCF-7 細胞に安定的に HER2 を過剰発現する細胞株を樹立し、その役割を検討することにした。

EGFRファミリー
(チロシンキナーゼ型受容体)
ErbB1 (= EGFR)、ErbB2 (= HER2)、
ErbB3 (= HER3)、ErbB4 (= HER4)

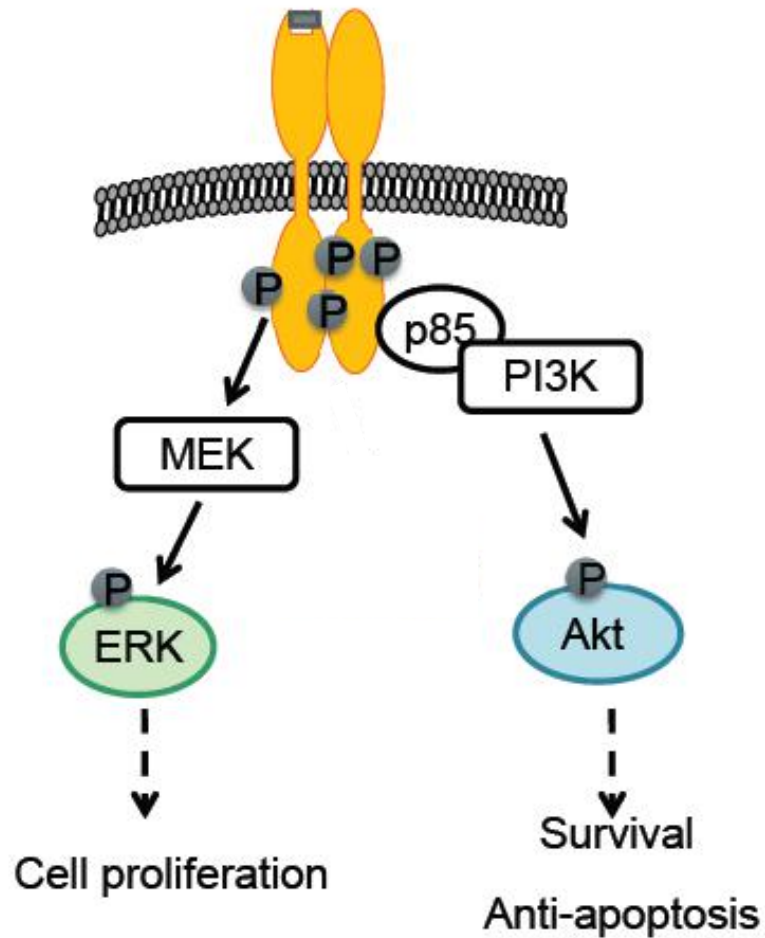


Fig. 12. HER2 signaling pathway.

2-2. 実験方法

2-2-1. 細胞培養と HER2 を安定的に過剰発現する細胞株の確立

MCF-7 (ER⁺, HER2⁻) と MDA-MB-453 (ER⁻, HER2 過剰発現) ヒト乳がん細胞株はそれぞれ、Cell Resource Center for Biomedical Research, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University and the Japanese Cancer Research Resources Bank から入手した。これら細胞は、5% FBS とペニシリン-ストレプトマイシン含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (和光純薬工業) により、5% CO₂ 37°Cで培養した。

MCF-7 細胞に安定的に HER2 過剰発現する細胞株 (HER2-1, 4, 5, 7) は pcDNA[™]5/T0 Mammalian Expression Vector (Thermo Fisher Scientific, USA) に HER2 遺伝子を組み込んだプラスミドをトランスフェクションし、ハイグロマイシン選択により樹立した。

2-2-2. 使用薬品

- ・ AG1478 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)
- ・ U0126 (CST, Danvers, MA, USA)
- ・ LY294002 (CST, Beverly, MA, USA)
- ・ CH223191 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany)
- ・ DMSO (Toray Fine Chemical, Tokyo, Japan)

2-2-3. siRNA 導入による mRNA ノックダウン

1-1-2-8 と同じ方法で行った。

2-2-4. 細胞培養

1-1-2-3 と同じ方法で行った。

2-2-5. Real-time RT-PCR

1-1-2-7 と同じ方法で行った。用いたプライマーの塩基配列は以下のとおりである (Table 5)。

Table 5. Sequence of primers.

Gene	Primer
CYP1A1	Forward : 5'-ACCCCAGGGTACAGAGAAAGA-3' Reverse : 5'-TGGTCTCACCGATACACTTCC-3'
CYP1B1	Forward : 5'-GCTGCAGTGGCTGCTCCT-3' Reverse : 5'-CCCACGACCTGATCCAATTCT-3'
IL-6	Forward : 5'-GGTACATCCTCGACGGCATCT-3' Reverse : 5'-GTGCCTCTTTGCTGCTTTGCTGCTTTTAC-3'
AHR	Forward : 5'-CATGCTTTGGTCTTTTATG-3' Reverse : 5'-TTCCCTTTCTTTTCTGTCC-3'
β -actin	Forward : 5'-TCC TCC TGA GCG CAA GTA CTC-3' Reverse : 5'-CTG CTT GCT GAT CCA CAT CTG-3'

2-2-6. 核抽出物の調製

核抽出は以前に述べた手順 (52) にしたがって、MCF-7 と HER2-5 細胞で行った。用いる試薬は以下のとおりである (Table 6)。核抽出：1) プレートに 90% confluent にしておく。2) Buffer A (低浸透圧水) にタンパク分解酵素阻害薬、DTT、脱リン酸化阻害薬を入れる。3) 細胞を PBS で 2~3 回洗浄。4) Buffer A を 200ul (6cm dish) or 500ul (10cm dish) 加える。On ice か室温 10~30 分放置。5) Scraper でかき集め、1.5ml tube に移し、チップか超音波破碎装置でホモジネート。6) 5min 4°C 3000rpm で遠心。上清を細胞質分画として保存。7) 6) で残ったペレットに Buffer B (高浸透圧液) を 100ul (6cm dish) or 200ul (10cm dish) 加える。8) P200 でサスペンション。4°C で 1hr、shaking する。9) 15000 rpm 4°C 5min 遠心。上清を核内蛋白分画とする。RC DC プロテインアッセイ Kit (Bio-Rad Laboratories, USA) を用いてタンパク質の定量を行った。

Table 6. Reagent and composition.

Reagent	Composition
1 M HEPES	HEPES (MW238.30) 23.83g を 70 ml の DW (蒸留水) に溶かし、水酸化ナトリウムで pH7.9 に調整する。さらに DW で 100ml にメスアップして、オートクレーブ 120°C 20min。4°C で保存。
1 M MgCl ₂	塩化マグネシウム 6 水和物 (MW203.3) 20.33g を 70ml の DW に溶かし、スターラーで完全にとけたら 100ml にメスアップしてオートクレーブ。室温か冷蔵。
1 M KCl	KCl (MW 74.55) 7.45g を 70ml の DW に溶かし、スターラーで完全にとけたら 100ml にメスアップしてオートクレーブ。室温か冷蔵。
5 M NaCl	NaCl (MW 58.5) 29.25g を 70ml の DW に溶かし、スターラーで完全にとけたら 100ml にメスアップしてオートクレーブ。室温か冷蔵。
0.5 M EDTA (pH8.0)	EDTA 2Na 2H ₂ O 18.61g を 70ml の DW に溶かし、NaOH で pH を 8.0 に調節し、100ml にメスアップしてオートクレーブ。室温か冷蔵。
0.5 M DTT	DTT (ジチオトレイトール : MW154.253)、0.77g を DW10ml に溶かし、1ml ずつくらいに分注して -20°C で保存。
タンパク質分解酵素阻害薬	Complete Tablets, Mini EASYpack protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
脱リン酸化阻害薬	PhosSTOP EASYpack phosphatase inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
Buffer A (低浸透圧液)	10mM HEPES pH 7.9 (1M をストックで作しておく) 1.5mM MgCl ₂ (1M をストックで作しておく) 10mM KCl (1M をストックで作しておく) 0.1mM EDTA (0.5M をストックで作しておく)

	0.1% NP-40 1mM DTT (0.5M を作っておいて-20℃で保存) タンパク分解酵素阻害薬 脱リン酸化阻害薬
Buffer B (高浸透圧液)	20mM HEPES pH 7.9 (1M をストックで作しておく) 1.5mM MgCl ₂ (1M をストックで作しておく) 400mM NaCl (5M をストックで作しておく) 0.1mM EDTA (0.5M をストックで作しておく) 0.1% NP-40 10% Glycerol 1mM DTT (0.5M を作っておいて-20℃で保存) タンパク分解酵素阻害薬 脱リン酸化阻害薬

2-2-7. Western Blot 解析

1-1-2-6 と同じ方法である。核抽出物と全体の細胞の可溶化液は SDS-PAGE により分離し、次に示す抗体を使って抗体反応を行った。一次抗体は anti-AHR Mouse mAb (Thermo, catalog No. MA1-514) を 2000 倍希釈で、anti-HER2 Mouse mAb (Thermo, catalog No. 28-0003Z) を 1000 倍希釈で、anti-Lamin B1 (H-90) Rabbit pAb (SANTA CRUZ, catalog No. sc-20682) を 1000 倍希釈で、anti-Tubulin HRP-Direct Rabbit pAb (MBL, catalog No. PM054-7) を 20000 倍希釈で用いた。HRP で標識された二次抗体は anti-mouse IgG(Cell Signaling, catalog No. 7076) を 2000 倍希釈で、anti-rabbit IgG(Cell Signaling, catalog No. 2729) を 2000 倍希釈で用いた。Typhoon 9410 Variable Mode Imager (GE Health Care) 画像解析装置で測定した。バンドの濃さは Image Quant ソフトウェア (GE Health Care) により分析した。

2-2-8. 細胞内局在の解析

MCF-7 と HER2-5 細胞に pcDNA™5/TO Mammalian Expression Vector (Thermo Fisher Scientific, USA) に yellow fluorescent protein (YFP) を融合させた AHR 遺伝子を組み込んだプラスミドをトランスフェクションし、24 時間後、YFP-AHR キメラタンパク質の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss) により観察した。

2-2-9. プラスミド作製

ヒト AHR 遺伝子のプロモーター領域に存在する開始コドンから 2.2kb の長さの断片を、KOD FX (TOYOBO) DNA ポリメラーゼにより PCR によって増幅させた。用いたプライマーの塩基配列は以下のとおりである：(-2107) FW:5'-GCGGAGCTCGAATTCTGGGAA-3', Rev:5'-GCGAAGCTTGCCCCTTGGGTGAGGGAGGTGCC-3'。増幅した配列は制限酵素 SacI (TAKARA) と HindIII (TAKARA) により切断し、pGL4.14-enhancer luciferase vector (Promega) に組み込んだ。

2-2-10. 一過性導入とプラスミドレポーター遺伝子アッセイ

MCF-7 細胞と HER2-5 細胞に、1-2-2-8 で作製したプラスミドあるいはコントロールプラスミド pRL-SV40 (Promega) を TransFast Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, USA) により、トランスフェクションした。翌日に細胞は被験化学物質で処理し、24 時間後、Passive Lysis Buffer (Promega) で細胞を溶解し、レポーター活性を Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) によって測定した。

2-2-11. 統計分析

統計比較は KaleidaGraph Synergy Software (serial NO. 356609) で分散分析の Dunnett の比較検定で行った。

2-3. 実験結果

2-3-1. HER2 過剰発現による AHR 発現、活性化への影響

HER2 過剰発現の影響を評価するために、MCF-7 細胞に HER2 を安定的に過剰発現する細胞株を樹立することにした。pcDNA5/T0-HER2 (ハイグロマイシン耐性遺伝子をもつ) プラスミドを MCF-7 細胞にトランスフェクションし、プラスミドが安定的に組み込まれた細胞をハイグロマイシンでセレクションをし、MCF7/HER2-1, 4, 5, 7 細胞の四つのクローンを樹立した (Fig. 13A)。初めに、HER2 過剰発現による AHR 発現への影響を調べるために、RT-PCR 法により AHR mRNA の発現量を検討した。その結果、親株である MCF-7 細胞と比較して、四つのクローンの AHR mRNA 発現量は顕著に増加していた (Fig. 13A)。そこで、AHR の発現に影響を与えていることが示唆されたので、今後はクローンの一つであるクローン #5 (HER2-5) 細胞株を用いて、HER2 過剰発現による AHR 発現亢進の機構・意義を詳細に検討することにした。まず、MCF-7 細胞と HER2-5 細胞における HER2 及び AHR の遺伝子およびタンパク質の発現量をリアルタイム PCR およびウエスタンブロット法により比較した。その結果、AHR の発現量は mRNA 及びタンパク質レベルにおいて HER2-5 で増加していた (Fig. 13B, C)。加えて、AHR の標的遺伝子である CYP1A1 mRNA の発現の増加も認められた。このことより、HER2 の過剰発現により、AHR の発現が増加し、さらに転写因子として活性化していることが示唆された。

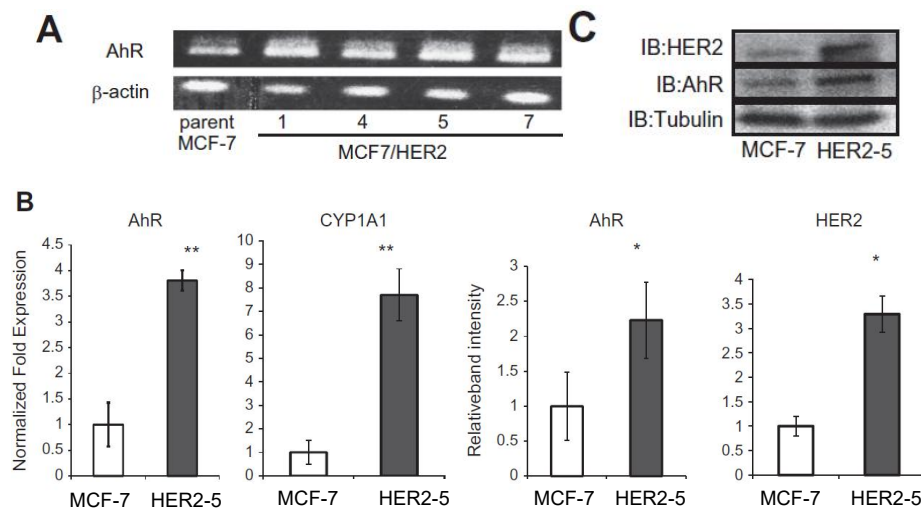


Fig. 13. HER2-overexpression increases AHR expression in MCF-7 cells.

(A) Human breast cancer MCF-7 cells were transfected with pcDNA-HER2 and selected in hygromycin containing medium. MCF-7 and four HER2-overexpressing clones (HER2-1, 4, 5 and 7) were analyzed for AHR mRNA by semiquantitative RT-PCR (control: β -actin mRNA). (B) The levels of AHR and CYP1A1 mRNA were measured by RT-qPCR in MCF-7 and HER2-5 cells. The results are normalized against those of β -actin and are expressed as the mean \pm S.D. (**, $P < 0.01$; $n = 3$). (C) Whole-cell lysates were resolved by SDS-PAGE, and proteins were detected by immunoblotting using antibodies against HER2, AHR and tubulin (upper panel). Similar results were obtained in three independent experiments. The band intensities of AHR and HER2 protein, normalized against those of tubulin, are expressed as the mean \pm S.D. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; $n = 3$) (lower panel).

次に、HER2 過剰発現が AHR 遺伝子のプロモーター活性へ及ぼす影響を調べるために、AHR プロモーター配列をレポーターベクターに組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミド (pGL4. 14-AhR Pro) を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定することにした。さらに、シグナル伝達経路の関わりも併せて調べるために、HER2-5 細胞と MCF-7 細胞に、pGL4. 14-AhR Pro を一過性にトランスフェクションした後、シグナル伝達経路阻害剤である AG1478 (epidermal growth factor receptor (EGFR) 阻害剤)、U0126 (MEK 阻害剤)、あるいは LY294002 (PI3K 阻害剤) でそれぞれ処理し、レポーター活性を測定した。その結果、AG1478 と U0126 処置により、HER2-5 細胞における AHR 遺伝子プロモーターの活性は減少した (Fig. 14)。一方、PI3K 阻害剤である LY294002 処置による影響は認められなかった。これらの結果より、HER2-5 細胞における HER2/MEK/ERK シグナル伝達経路の活性化が、AHR の転写を促進するものと考えられた。

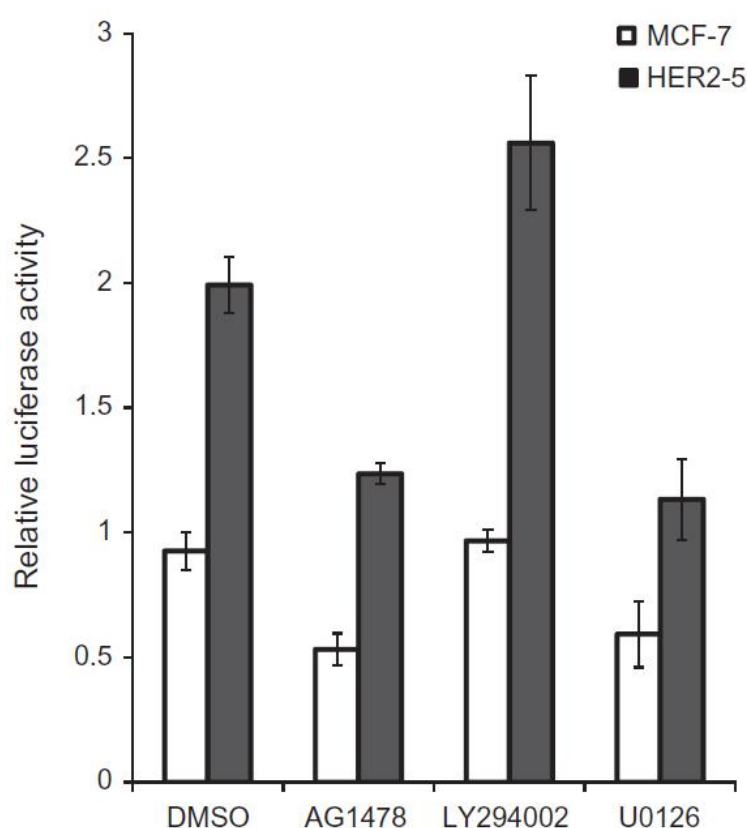


Fig. 14. AHR promoter is activated through the HER2/MEK/ERK signaling pathway.

MCF-7 and HER2-5 cells were transfected with pGL4. 14 AHR promoter (-1149/+103) -driven reporter plasmids and pGL4. 74 plasmid. The next day, cells were treated with DMSO (vehicle), EGFR inhibitor (AG1478, 10 μ M), MEK inhibitor (U0126, 10 μ M) or PI3K inhibitor (LY294002, 10 μ M) for 24 h. Luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System. The results, normalized against those of an internal standard, are shown as the mean \pm S. D. (n = 4).

2-3-2. HER2 過剰発現による AHR の細胞内局在への影響

AHR の活性化には核移行が重要なステップであるため、さらに、AHR の細胞内分布を観察することにした。細胞を細胞質画分と核画分に分画し、それぞれの分画での AHR の存在量をウエスタンブロットにより検出した。その結果、HER2-5 細胞において AHR が核画分に増えた局在していることが明らかとなった (Fig. 15A)。さらに、その細胞内局在を検証するために、蛍光タンパク質 yellow fluorescence protein (YFP) を融合させた AHR を MCF-7、HER2-5 両細胞に発現させ、その細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、MCF-7 細胞と比較して、HER2-5 細胞で YFP-AHR の高レベルの核蓄積が認められた (Fig. 15B)。以上のことより、HER2 過剰発現は AHR の発現量の増加のみでなく、AHR の核移行に伴う核移行も促進していることが明らかとなった。

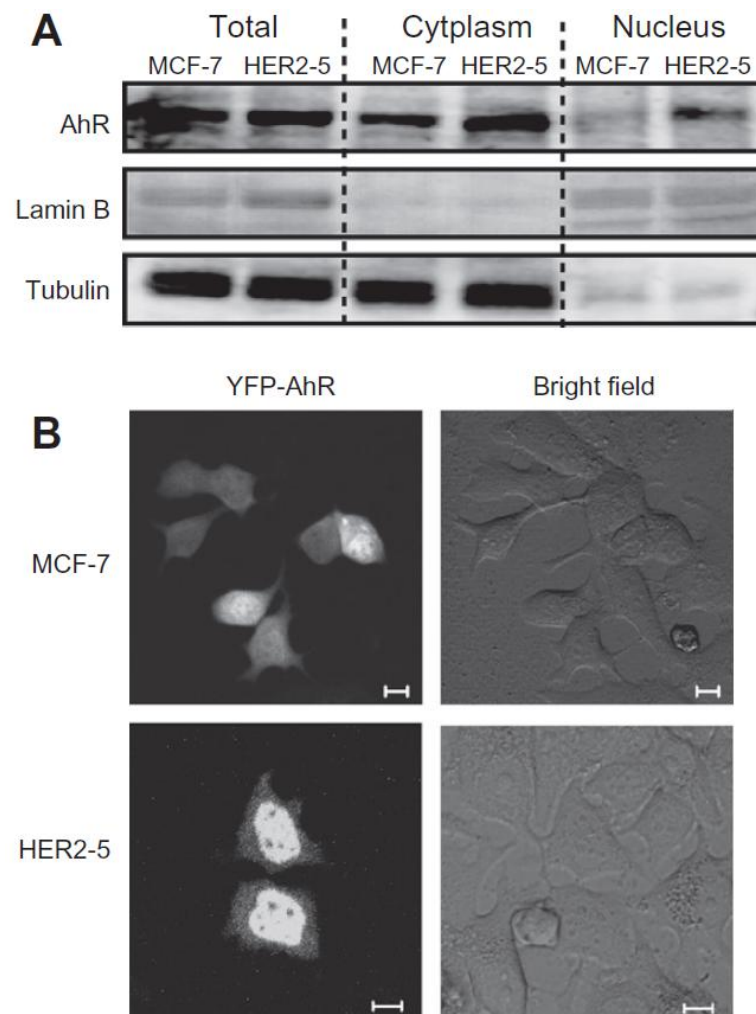


Fig. 15. Overexpression of HER2 elicits nuclear accumulation of AHR.

(A) Whole-cell lysates of MCF-7 and HER2-5 cells were separated into cytosolic and nuclear fractions. Whole-cell lysates and subcellular fractions were resolved by SDS-PAGE, and AHR protein was detected by western blotting using anti-AHR, anti-lamin B and anti-tubulin antibodies. (B) MCF-7 and HER2-5 cells were transfected with YFP-AHR expression plasmid. Twenty-four hours after transfection, the cells were observed with a confocal laser-scanning microscope.

2-3-3. HER2 過剰発現による AHR 発現誘導を介した IL-6 mRNA 発現への影響

これまでに、HER2 過剰発現は IL-6 や IL-8 などの炎症性サイトカインの発現上昇など炎症に関わるタンパク質の遺伝子発現変化を引き起こすことにより、がん幹細胞の自己複製の維持が促進されていることが報告されている (53-55)。そこで、HER2-5 細胞と MCF-7 細胞における炎症性サイトカインである IL-6 と IL-8 mRNA 発現量を比較した。その結果、MCF-7 細胞と比較して、HER2-5 細胞において IL-6 と IL-8 mRNA 発現量の顕著な上昇が認められた (Fig. 16A)。これまでに、AHR の活性化は炎症性サイトカイン IL-6 や IL-8 mRNA の発現を誘導することが知られているため (56, 57)、HER2 過剰発現による IL-6 や IL-8 mRNA 発現誘導に AHR が関与しているかどうかを、AHR アンタゴニスト処理と AHR のノックダウンにより確認することにした。AHR アンタゴニストである CH223191 処置により、HER2-5 細胞において IL-6 mRNA と AHR の標的遺伝子である CYP1B1 の mRNA 発現減少が認められた (Fig. 16A)。一方、IL-8 mRNA 発現への影響は認められなかった。同様に、AHR の siRNA によるノックダウンにより、HER2-5 細胞で CYP1B1 と IL-6 mRNA の誘導性の低下が認められた (Fig. 16B)。さらに、AHR ノックダウンは、HER2 を過剰発現している乳がんから由来した MDA-MB 453 (HER2⁺, ER⁻) 細胞においてもまた IL-6 mRNA の発現を減少させた (Fig. 16C)。HER2-5 細胞とは異なり、MDA-MB 453 細胞での IL-8 mRNA レベルも AHR ノックダウンにより減少した。

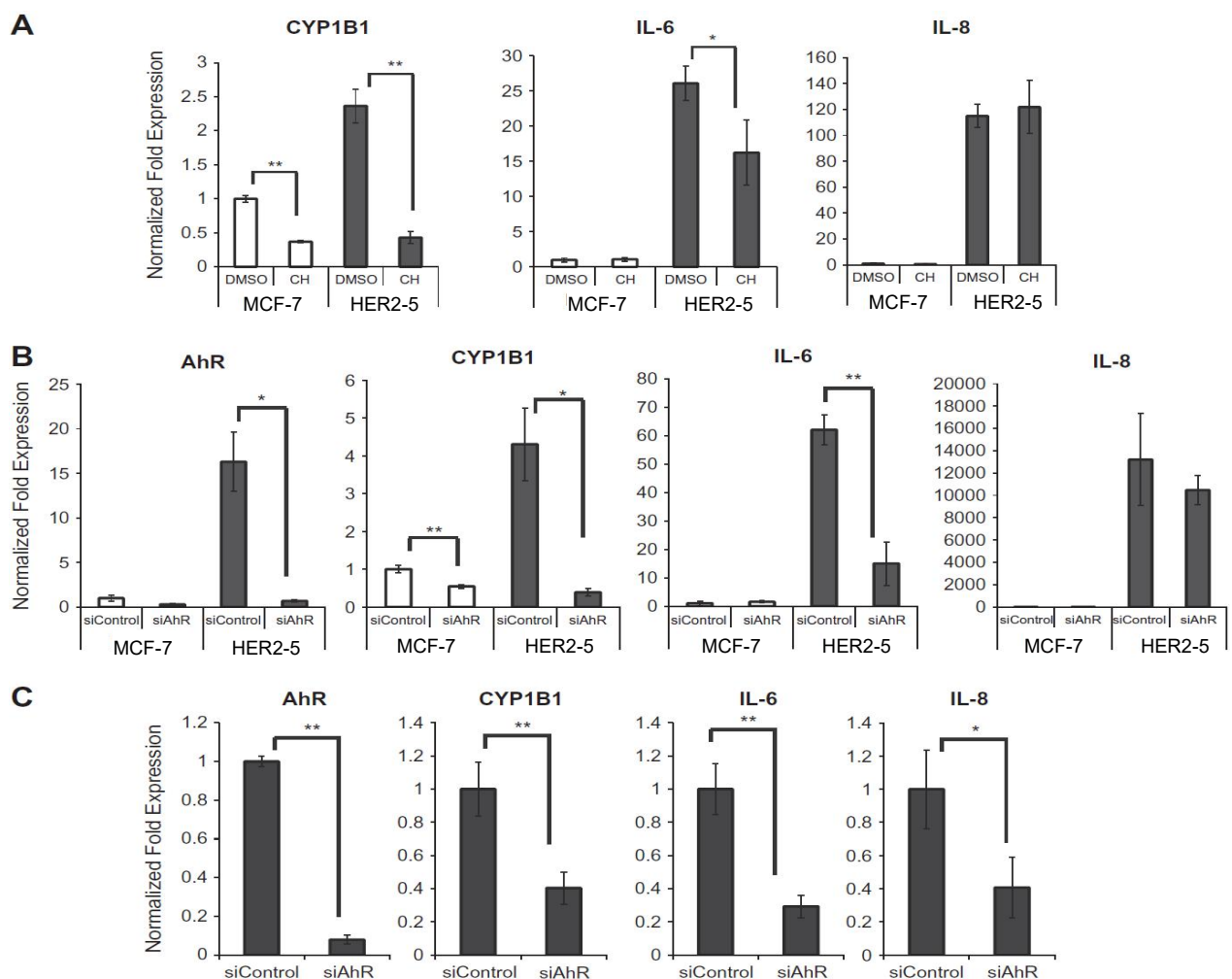
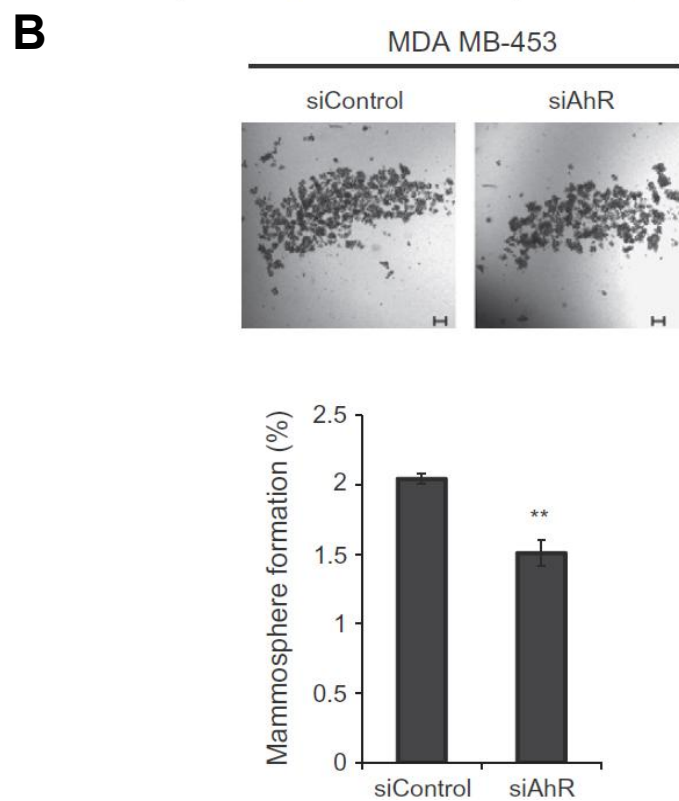
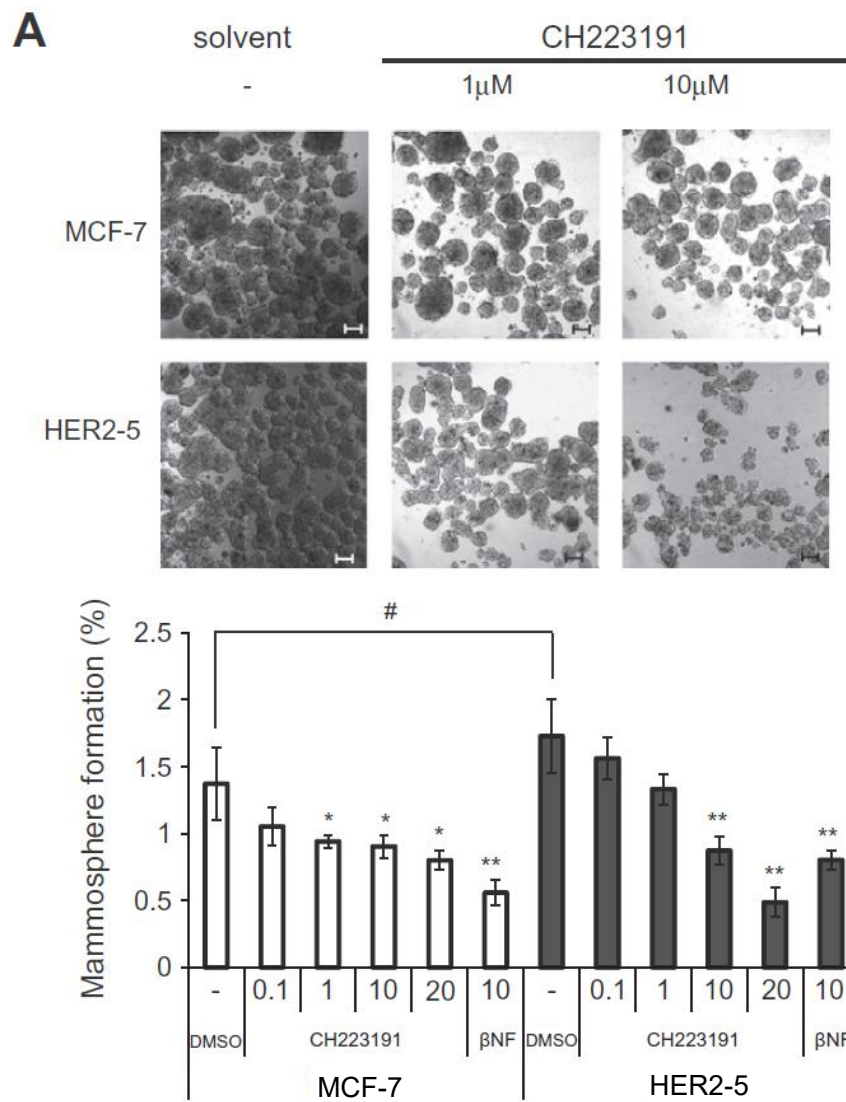


Fig. 16. Induction of IL6 and IL8 mRNA by HER2-overexpression is associated with AHR signaling.

(A) MCF-7 and HER2-5 cells were treated with AHR antagonist, CH223191, for 24 h. (B) MCF-7 and HER2-5 cells were transfected with either siRNA for AHR (siAHR) or non-specific siRNA control (siControl) for 48 h. Total RNA was extracted, and the levels of CYP1B1, IL6 and IL-8 mRNA were measured by real-time RT-qPCR. The results, normalized against those of β -actin, are expressed as the mean \pm S.D. (n=3). (C) MDA-MB 453 cells were analyzed as for MCF-7 and HER2-5 cells in (B).

2-3-4. HER2 過剰発現 MCF-7 細胞の mammosphere 形成における AHR 発現の影響

ここでは、HER2 過剰発現による mammosphere 形成率の影響、ならびに mammosphere 形成率に対する AHR 機能阻害や発現阻害の影響を検討することとした。まず、Fig. 17A で示すように、溶媒でのみ処理した場合、MCF-7 細胞に比べ、HER2 を過剰に発現している HER2-5 細胞は高い mammosphere 形成率を示した。このことから、HER2 の過剰発現が、mammosphere 形成率の亢進、言い換えれば、乳がん幹細胞自己複製の活性化に密接に関わっているものと推定された。次に、AHR アンタゴニスト CH223191 処理による mammosphere 形成率への影響を調べた。その結果、用量依存的に CH223191 処理は、HER2-5 細胞のみならず MCF-7 細胞の mammosphere 形成率を低下させた (Fig. 17A)。さらに、HER2 を過剰発現している乳がんから由来した MDA-MB 453 細胞において、siRNA のトランスフェクションにより AHR をノックダウンすると、やはり mammosphere 形成率の減少が認められた (Fig. 17B)。このことから、mammosphere 形成率の亢進、言い換えれば、乳がん幹細胞自己複製の活性化に AHR の機能発現が強く関わっているものと考えられた。加えて、MCF-7 あるいは HER2-5 細胞を CH223191 (1, 10 μ M) あるいは溶媒 (ジメチルスルホキシド、DMSO) 存在下で 4 日間 mammosphere 培養することで形成した 1 次 mammosphere を単一細胞化し、CH223191 非存在下でさらに 7 日間再培養し、2 次 mammosphere 形成率を測定した。その結果、CH223191 で処理された 1 次 mammosphere から調製された細胞は、溶媒で処理された方より、2 次 mammosphere の形成率が低くなった (Fig. 17C)。この結果は、一次 mammosphere 形成時に CH223191 処理によりがん幹細胞が減少し、2 次 mammosphere 播種時にがん幹細胞が減少していることを意味しているものと考えられ、この実験からも AHR の機能発現が乳がん幹細胞の自己複製の活性化に必要であることが強く想定された。2-3-3 までの成果を考え合わせると、乳がん幹細胞の自己複製能の向上に、HER2 が過剰発現すること、それによって、AHR の発現亢進とそれに伴う AHR の機能亢進が引き起こることが重要であると推定された。



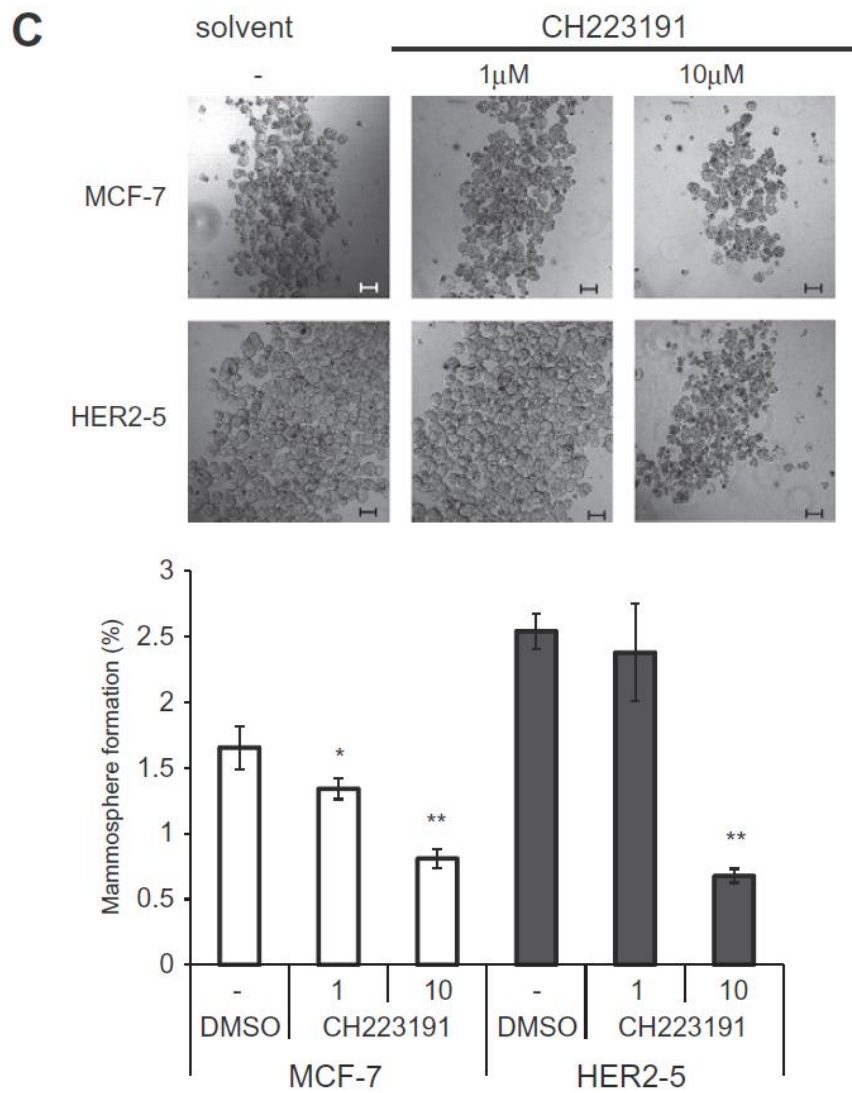


Fig. 17. AHR signaling is required for mammosphere formation in HER2-overexpressing MCF-7 cells.

(A) MCF-7 and HER2-5 cells were cultured under non-adherent conditions in the presence of varying concentrations of CH223191 or β -naphthoflavone (β -NF, 10 mM) for 7 days. (B) MDA-MB 453 cells transfected with siAHR or siControl were cultured under non-adherent conditions for 7 days. Percentage mammosphere formation was determined by microscopic examination. The results are expressed as the mean \pm S.D. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; $n = 3$).

(C) MCF-7 and HER2-5 cells were cultured under non-adherent conditions in the absence or presence of CH223191 for 4 days. Single cells prepared by trypsinization of primary mammospheres were cultured in the absence of CH223191 for a further 7 days. Percentage mammosphere formation was determined by microscopic examination. The results are expressed as the mean \pm S.D. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; $n = 3$).

2-3-5. MCF-7 細胞の mammosphere 形成率への HER2 過剰発現 MCF-7 細胞から分泌される因子の影響

2-3-3 において、HER2 過剰発現により亢進した AHR の発現と機能は、がん幹細胞の自己複製の活性化に重要とされる IL-6 や IL-8 といった炎症性サイトカインの発現を亢進させることを明らかとした。したがって、がん幹細胞の自己複製の活性化に強く関わる IL-6 や IL-8 といったような何らかの因子の分泌が、HER2 の過剰発現により促進される可能性が想定される。そこで、AHR の非ノックダウンあるいはノックダウンした MCF-7 または HER2 が過剰発現した HER2-5 細胞の培養上清を用いて、MCF-7 由来細胞（ここでは、第 1 節で用いた Tet で恒常的活性型 AHR である CA-AHR を誘導可能な MCFTR-CA-AHR 細胞）を mammosphere culture し、mammosphere 形成率を測定した（Fig. 18）。その結果、AHR の非ノックダウン細胞については、MCF-7 細胞より HER2-5 細胞の培養上清の方が有意に MCFTR-CA-AHR 細胞の mammosphere 形成効率を高くしていた。また、siRNA により AHR をノックダウンさせた HER2-5 細胞の培養上清は、AHR を非ノックダウン HER2-5 細胞の培養上清よりも MCFTR-CA-AHR 細胞の mammosphere 形成効率は低くなった。一方、AHR をノックダウンさせた MCF-7 細胞の培養上清は、AHR を非ノックダウン MCF-7 細胞の培養上清と同程度の MCFTR-CA-AHR 細胞の mammosphere 形成効率を示した。この結果から、HER2 の過剰発現によりがん幹細胞の自己複製の活性化に強く関わる何らかの因子が分泌されることが明らかとなった。それらの因子により自身のがん幹細胞の自己複製能が活性化するものと推定された。

2-3-6. HER2 過剰発現 MCF-7 細胞の mammosphere 形成に対する AHR リガンドの影響

前節においては、リガンドによる AHR の活性化が MCF7 細胞の mammosphere 形成を抑制することを示した。そこで、HER2 を過剰発現させた HER2-5 細胞の mammosphere 形成に対する AHR リガンド、ここでは β -NF の影響を調べることにした。結果は、Fig. 17A で示すように、第 1 節と同様、 β -NF は HER2-5 細胞の mammosphere 形成を抑制することがわかった。MCF-7 細胞や HER2-5 細胞の培養上清を MCFTR-CA-AHR 細胞に与え、同時に Tet 処理によって CA-AHR を発現させた場合の MCFTR-CA-AHR 細胞の mammosphere 形成能を調べたところ、低下することがわかった（Fig. 18B）。このことから、HER2 過剰発現乳がん細胞においても、リガンドにより AHR を活性化させたり、リガンド結合領域を欠損させ、リガンド非依存性活性型 AHR（CA-AHR）の発現は、乳がん幹細胞の自己複製能を抑制することが明らかとなった。

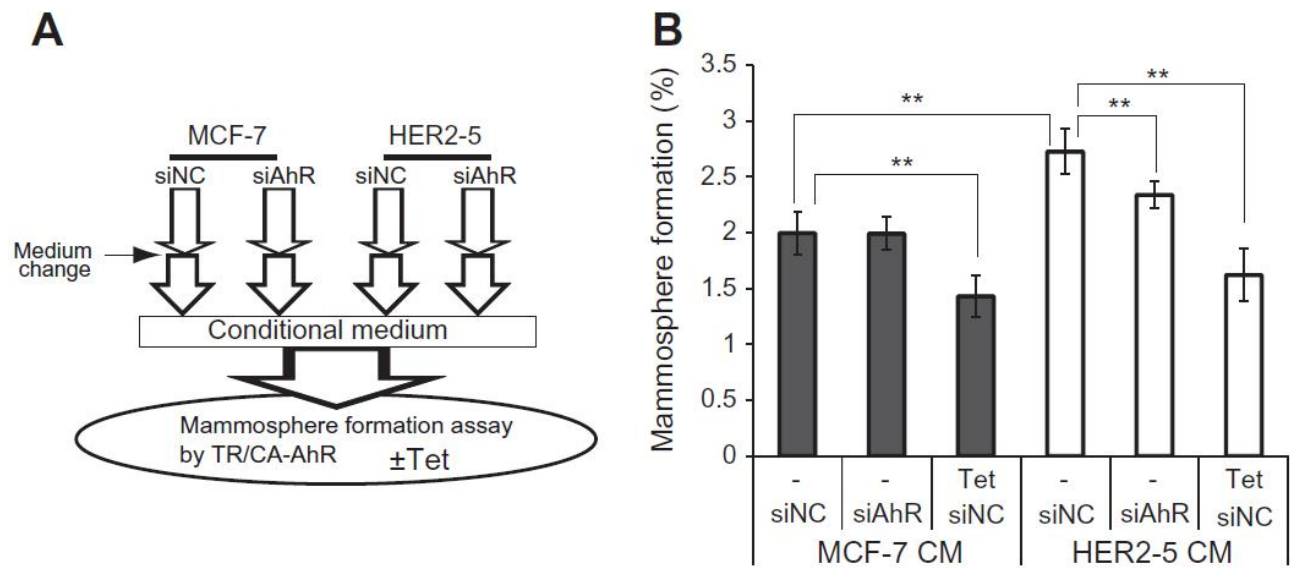


Fig. 18. Dual function of AHR in cancer stem cell maintenance.

(A) Schematic illustration of the mammosphere formation assay using conditioned medium from MCF-7 and HER2-5 cells. (B) MCF-7 and HER2-5 cells were transfected with either siAHR or siControl. After 48 h, medium was changed to MammoCult medium. After 24 h, medium was collected as conditioned medium (CM). MCFTR-CA-AHR cells were cultured under non-adherent conditions in the conditioned medium from MCF-7 or HER2-5 cells. Single cells prepared by trypsinization of primary mammospheres were cultured in the MammoCult medium for a further 7 days. Percentage mammosphere formation was determined by microscopic examination. The results are expressed as the mean \pm S.D. (**, $P < 0.01$; $n = 3$).

2-4. 考察

この節では、HER2 過剰発現乳がんの乳がん幹細胞における AHR の役割を明らかにすることを目指した。AHR の活性化は乳がん幹細胞の自己複製能を抑制するという第 1 節の結果とは逆に、HER2 の過剰発現は、HER2/MEK/ERK のシグナル伝達経路を介して AHR の転写を活性化し、その活性亢進に依存して乳がん幹細胞の自己複製と増殖亢進の原因となりうる炎症性サイトカイン IL-6 と IL-8 の発現を促進した。さらに、AHR アンタゴニスト CH223191 は濃度依存的に mammosphere 形成率を低下させたことから、HER2 過剰発現乳がん細胞での AHR 活性化は、炎症性サイトカインなどの因子によるパラクライン／オートクラインループの促進（がん幹細胞が増殖しやすいがん幹細胞環境を形成すること）を通して乳がん幹細胞の自己複製能の活性化に関わっているものと考えられた。

AHR は通常細胞質にシャペロンタンパク質と複合体を形成し存在している。リガンド（アゴニスト）と結合すると、AHR は細胞核に移動し、遺伝子の転写調節領域に存在する DNA 応答配列 xenobiotic response element (XRE) に結合する。本研究において、MCF-7 細胞と比較して、HER2 を過剰発現させた HER2-5 細胞での AHR タンパク質レベルの上昇は細胞質と細胞核のどちらの画分でも認められた。さらに、MCF-7 細胞に比べて、HER2-5 細胞において、一過性にトランスフェクションした YFP-AHR 融合タンパク質の核蓄積が観察できた。以上のことにより、HER2 過剰発現は外因性のリガンドなしで AHR の核蓄積を促進しているものと考えられる。すなわち、HER2 過剰発現細胞では AHR は恒常的に転写活性化能力を有しており、HER2 は AHR の発現亢進のみならず AHR の活性化をも誘導しているものと推定される。これまでに、悪性前段階にある乳腺組織と悪性化した乳腺腫瘍組織で AHR の標的遺伝子である CYP1B1 が恒常的に誘導されていることが報告され、CYP1B1 発現が乳がんの悪性化の指標になりうるものと示唆された (58)。本研究では、MCF-7 細胞や HER2-5 細胞での AHR アンタゴニスト処理や AHR ノックダウンの実験から CYP1B1 の発現が顕著に抑制された。これらの結果から、AHR の活性化は、CYP1B1 と同様、HER2 過剰発現など悪性化を示しうる指標と同程度の指標になりうるものと思われた。

HER2 過剰発現により引き起こされた炎症性サイトカインである IL-6 mRNA の発現量は AHR アンタゴニストまたは AHR のノックダウンにより減少した。AHR の活性化には、外因性リガンドの他に、多くの因子が存在することが知られている。例えば、低細胞密度または細胞 - 細胞接触の遮断は AHR の核への局在と、AHR の転写活性化能の亢進を引き起こすことが知られており、その核への蓄積は p38 MAPK による Ser68 のリン酸化により制御されていることも示されている (59)。さらに、cAMP シグナルも AHR の核移行を促進し、AHR を転写活性化能を促進する (60)。Brett らはリガンドにより活性化された AHR と炎症性シグナル伝達経路は、相乗的に IL-6 mRNA の発現を誘導することを示している (61, 62)。Zachary らは HER2 過剰発現による IL-6 発現の増加は NF- κ B、AP1、CAAT/enhancer binding protein (C/EBP) のような複数の転写因子によりコントロールされることを報告している (50)。さらに本研究では、HER2 過剰発現による IL-6 発現の亢進は AHR 発現の促進によることを明らかとした。したがって、HER2→AHR→IL-6 経路が乳がん成立や維持に極めて重要であることが、本研究によって改めて強調され

ることとなった。一方で、HER2-5 細胞において IL-8 の発現は AHR のアンタゴニスト処理と AHR ノックダウンにより変化しなかったが、MDA-MB 453 (HER2 過剰発現, ER⁺) 細胞では AHR のノックダウンにより IL-8 の発現が有意に減少した。AHR と RelB が過剰発現した ER 発現量の低いヒト乳がん細胞においては、IL-8 の転写は RelB/p52 複合体の代わりに RelB/AHR 複合体によって誘導されることが報告されている (63, 64)。IL-8 発現制御における AHR の役割についてさらに追究する必要があるものと思われる。

近年、炎症性のサイトカインである IL-6、IL-8 などによるパラクライン/オートクラインシグナル伝達は、がん幹細胞の自己複製と増殖を制御することが報告された (53-55)。加えて、乳がんにおける HER2 過剰発現は IL-6 の分泌を著しく上昇させ (50)、さらに、血清における IL-6 の発現の増加は不良な予後と相関することが報告されている (51)。実際、IL-6 は乳がん mammosphere 中の乳がん幹細胞の自己複製と増殖を促進する (54)。さらに最近、炎症性サイトカインである IL-6 を介在したフィードバックループは HER2 過剰発現の乳がん細胞における乳がん幹細胞の数の増加を導くことが報告された (65)。そこで、本研究では、HER2-5 細胞と MCF-7 細胞の培養上清の mammosphere 形成率に対する影響を評価することにより、がん幹細胞の自己複製と増殖は、HER2 過剰発現によって促進された IL-6 などの因子の分泌に依存するものか否かの検討を行った。実際に、HER2-5 細胞の培養上清は、MCF-7 細胞の培養上清に比べ、より効率的な mammosphere 形成を誘導した。これにより以前の報告 (66, 67) と同様、HER2 過剰発現がオートクライン/パラクラインループを介して乳がん幹細胞の自己複製を促進することが確認できた。さらに本研究では、AHR ノックダウンを施した HER2-5 細胞の培養上清は、AHR ノックダウンを施していない HER2-5 細胞の培養上清に比べて、mammosphere 形成率が減少した。このことから、オートクライン/パラクラインループを介した乳がん幹細胞の自己複製促進に、HER2 過剰発現により発現亢進・活性上昇した AHR が関わることを初めて明らかにするに至った (Fig. 19)。実際に、乳がん幹細胞の自己複製促進に関わる分泌因子は、IL-6 や IL-8 といった炎症性サイトカインであるか、それとも他の何らかの分泌性タンパク質であるかを明らかにすることは重要なことであると思われる。

第 1 節では「リガンドにより活性化された AHR は、乳がん幹細胞を抑制する」ことを示し、本節では、「HER2 過剰発現乳がんにおいては、AHR はがん幹細胞環境を形成し、乳がん幹細胞を活性化する」というがん幹細胞における AHR の 2 つの真逆の役割 (諸刃の剣: double-edged sword) を示した (Fig. 20)。このことは、AHR はがん幹細胞の維持においてバランスをとっている重要な因子であることを示すものであり、周りの環境、本研究では HER2 過剰発現によって周りの環境の役割を変化させていると考えられる。このような AHR の役割をさらに理解していくことで、AHR ががん幹細胞を標的とする新しいがん治療の分子標的になることを強調できるものと考ええる。

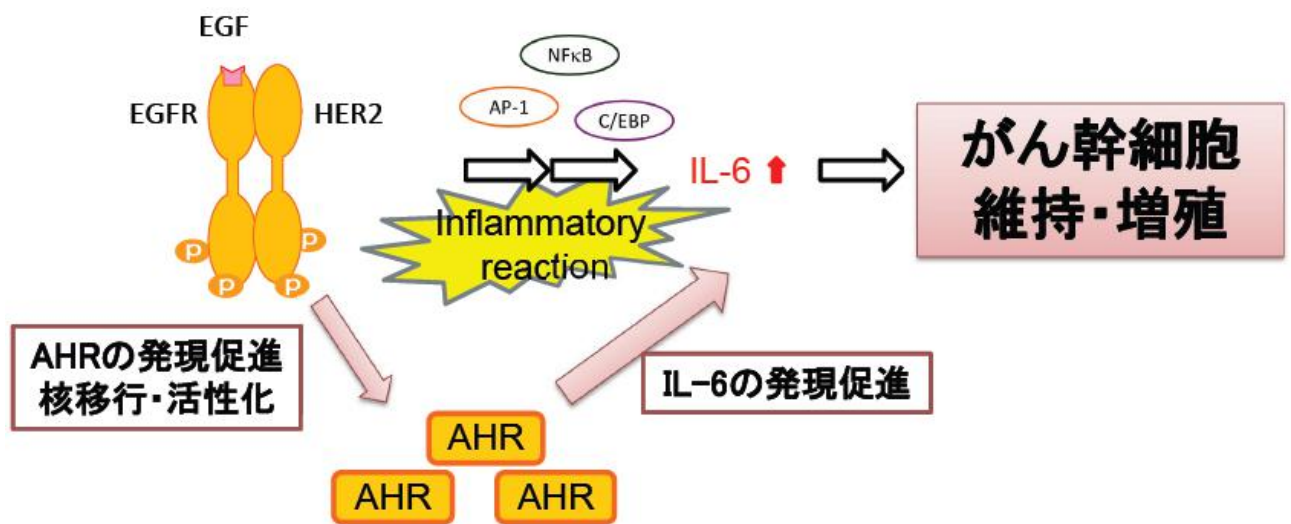


Fig. 19. AHR-mediated signaling pathway involved in maintenance of cancer stem cells.

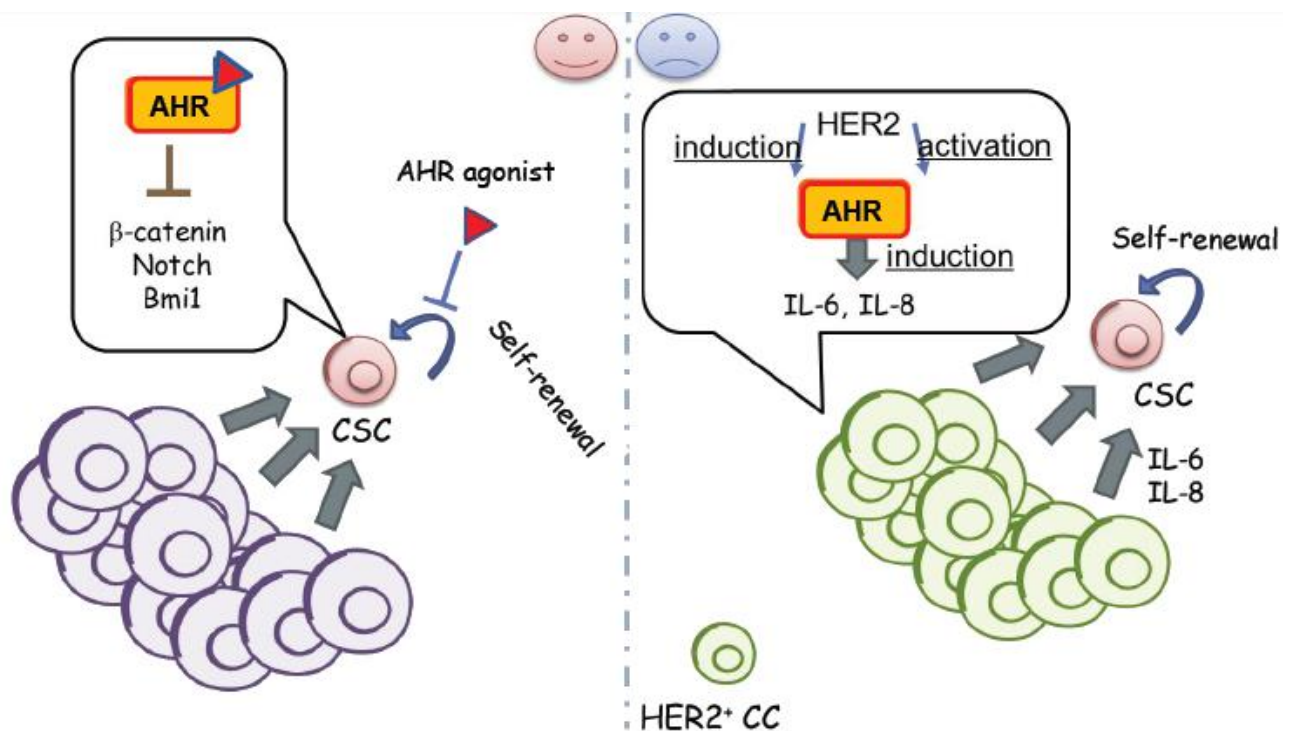


Fig. 20. Dual function of AHR on self-renewal of cancer stem cells (CSCs) .

第2章 アンドロゲン受容体の mTOR 阻害因子 DEPTOR に対する負の転写調節機能

1. 序論

アンドロゲンレセプター (androgen receptor, AR) は核内レセプタースーパーファミリーの一員であり、リガンドにより調節される受容体型転写因子である。AR は雄性生殖組織形成・機能維持、性発達、精子形成など様々な生理作用に関与することが報告されている (68-71)。加えて、AR は前立腺がんの増殖と発達にも重要な役割をしている (72-74)。リガンド非存在下では、AR はシャペロンと複合体を形成し細胞質に存在している。テストステロンや 5- α -ジヒドロテストステロン (DHT) などのリガンドに結合することにより、AR は核内へ移行する。核内へ移行した AR は、ホモダイマーを形成し、標的遺伝子のプロモーター領域に存在するアンドロゲン応答配列 (AREs) に結合する (Fig. 21)。

哺乳類ラパマイシン標的タンパク質 (mammalian target of rapamycin, mTOR) は非定型セリン/スレオニンタンパク質キナーゼであり、Raptor や Rictor などのタンパク質と相互作用し、二つの特徴的な複合体 (mTORC1 と mTORC2) を形成している (75) (Fig. 2)。mTORC1 は、翻訳開始因子 eIF4E (eukaryotic translation initiation factor-4E) の結合タンパク質である 4E-BP1 (4E-binding protein 1) および S6K (ribosomal protein S6 kinase) を含む下流の標的タンパク質をリン酸化することによりタンパク質合成を活性化し、細胞の大きさと細胞増殖を調節している。一方で、mTORC2 は AKT (protein kinase B: PKB) や血清グルココルチコイド誘導キナーゼ 1 (SGK1)などを活性化することにより、細胞の生存を調節している (76)。

近年、AR と mTOR とのクロストークは前立腺がんの細胞増殖に重要な役割をしていることが報告されている (14)。AR 依存的な前立腺がん細胞である LNCap 前立腺がん細胞に AR リガンドである DHT を処理すると、mTORC1 が活性化され、細胞増殖の一つのポジティブな調節因子であるサイクリン D1 の翻訳を増加する。しかしながら、AR 依存的な mTOR の調節機構の具体的なメカニズムはまだ明らかになっていない。DEP ドメインを含んだ mTOR-相互作用タンパク質 (DEP domain-containing mTOR-interacting protein、DEPTOR) は細胞内に存在する mTOR (mTORC1 と mTORC2) の阻害タンパク質として見出された (77, 78)。mTORC1 と mTORC2 シグナルを抑制することから、DEPTOR は腫瘍抑制因子であることが示唆されている。最近、DEPTOR タンパク質の翻訳後の制御機構が報告された (78-80)。DEPTOR はカゼインキナーゼ 1 α によりリン酸化され、F box protein SCF によりユビキチン化されることが報告された (81)。しかし、DEPTOR の転写レベルの制御機構はほとんど知られていない。そこで本研究では、最近新たに mTOR の抑制タンパク質として見出された DEPTOR に注目し、AR による DEPTOR の発現制御を解析することで、AR 依存的な mTOR の調節機構解明の一助となることを目指した。

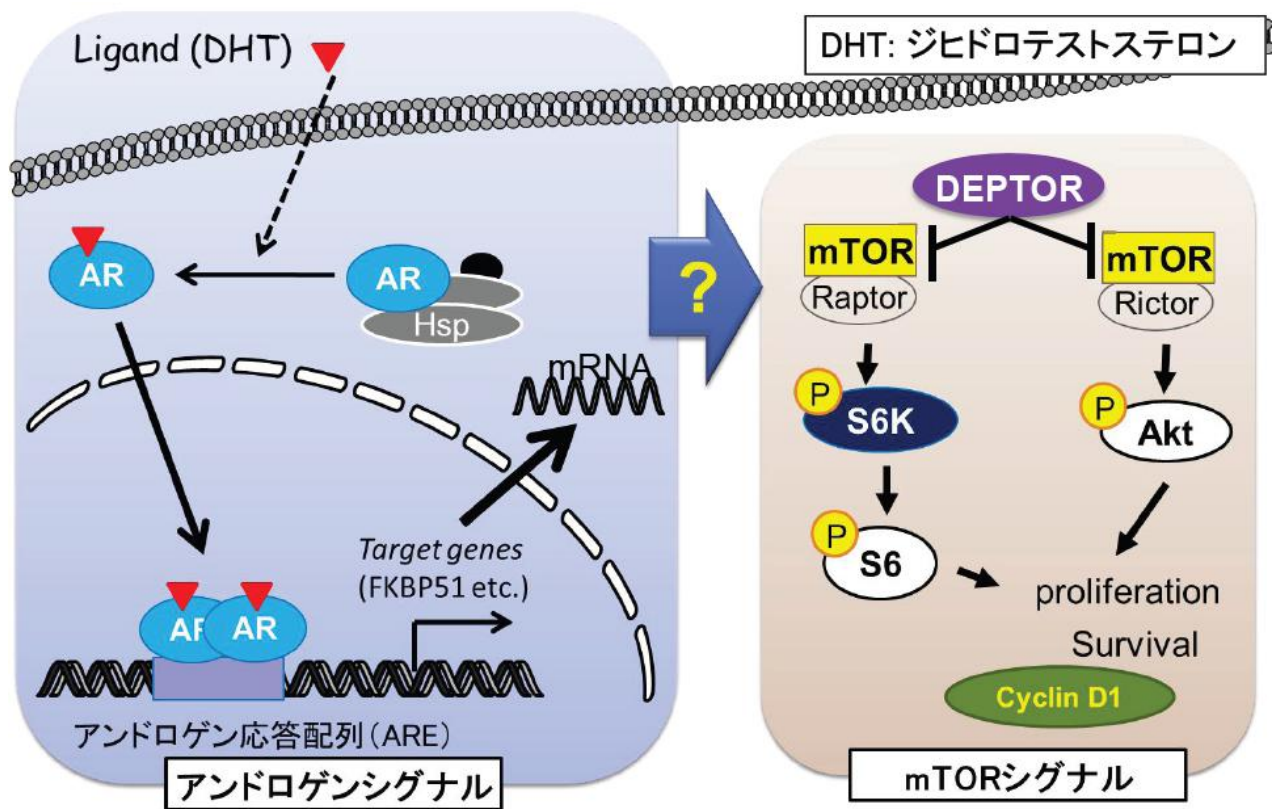


Fig. 21. AR and mTOR signaling pathway.

2. 実験方法

2-1. 使用薬品

Dihydrotestosterone (DHT)、bicalutamide (Bic) と cycloheximide (CHX) は sigma aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。

2-2. 細胞培養

AR ネガティブ前立腺がん細胞株 PC-3 (AR⁻)、AR ポジティブ前立腺がん細胞株 LNCaP (AR⁺) および VCaP (AR⁺) は、10% charcoal stripped fetal bovine serum (csFBS)、penicillin (100 units/ml)、streptomycin (100 µg/ml) 含有フェノールレッド不含 RPMI 1640 培地 (Wako, Osaka)、5% CO₂、37°C で培養を行った。それぞれの細胞は実験毎に適した化学物質で処理をした。

2-3. Western Blot 解析

第1章 1-1-2-6 と同じ方法である。全タンパク質は SDS Sample Buffer により抽出された。タンパク質の濃度は Pierce 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, Hudson, NH, USA) によって測定した。タンパク質サンプルは SDS-PAGE により分離された。第一次抗体として anti-DEPTOR Rabbit mAb (Cell Signaling, catalog No. 11816)、anti-pS6K Rabbit pAb (Cell Signaling, catalog No. 9205)、anti-S6K Rabbit pAb (Cell Signaling, catalog No. 9202) と anti-cyclin D1 Rabbit mAb (Cell Signaling, catalog No. 2978) を使用した。第二次抗体として HRP (horseradish peroxidase) で標識された anti-rabbit IgG (Cell Signaling, catalog No. 2729) を用いた。Anti- α -tubulin pAb-HRP-Direct Rabbit pAb (MBL, catalog No. PM054-7) をコントロールとして用いた。タンパク質は Immobilon Western Detection Reagent (Millipore, Billerica, MA, USA) を使うことにより可視化した。そのシグナルは Typhoon 9500 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) により検出した。バンドの濃さは ImageJ ソフトウェアにより分析した。

2-4. Real-time PCR

第1章 1-1-2-7 と同じ方法である。細胞を 12-ウェルプレートに播種した。チャコール処理した FBS (csFBS; GIBCO, Grand Island, NY, USA) を 5% 含有したフェノールレッド不含の RPMI1640 培地を用いた。翌日に、細胞は DHT で処理し、24 時間処置後に回収した。total RNA は ISOGEN II (Nippon Gene, Tokyo) を使うことにより単離した。cDNA は ReverTra Ace qPCR RT Kit (Toyobo, Osaka) を使うことにより合成した。定量的な RT-PCR (qRT-PCR) は KOD SYBP qPCR Mix (Toyobo) を使い、7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で反応を行った。用いたプライマーの塩基配列は以下のとおりである (Table 7)。

Table 7. Sequence of primers.

Gene	Primer
FKBP51	Forward : 5' -TCCCTCGAATGCAACTCTCT-3' Reverse : 5' -GCCACATCTCTGCAGTCAAA-3'
DEPTOR	Forward : 5' -AAGCTGATGAGCCCTGAAAA-3' Reverse : 5' -TTGTTGGACACATGCTGGAT-3'
β -actin	Forward : 5' -TCC TCC TGA GCG CAA GTA CTC-3' Reverse : 5' -CTG CTT GCT GAT CCA CAT CTG-3'

2-5. siRNA 導入による mRNA ノックダウン

LNCaP 細胞に Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて、DEPTOR-ターゲッティング siRNA あるいはコントロール siRNAs (siRNAs; Sigma Aldrich) を遺伝子導入した。

2-6. クロマチン免疫沈降アッセイ

LNCaP 細胞は 5% csFBS を含む RPMI1640 培地を用い、100mm ディッシュに播種した。翌日に、細胞は DHT あるいは溶媒で 6 時間処置した。クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイは、SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit (Cell Signaling Technology) を用いて行った。細胞は 1% ホルムアルデヒドにより 15 分間処置し、DNA とヒストンを固定させた。その後、核抽出し、クロマチンをヌクレアーゼにより消化し、300-1000bp の DNA ラダーにせん断した。せん断したクロマチン DNA 複合体を anti-AR (Abcam, Cambridge, MA, USA)、anti-Histone H3、anti-Acetyl-Histone H3 (Lys9/Lys14) (Cell Signaling Technology) 抗体により 4°C でオーバーナイトで免疫沈降し、DNA は以下に示した ARE 領域に特異的なプライマー (Table 8) で PCR により増幅された。バンドの濃さは ImageJ ソフトウェアにより検出した。

Table 8. Sequence of primers.

Gene	Primer
FKBP5 ARE	5' -GGAGCCTCTTTCTCAGTTTTG-3' 5' -CAATCGGAGTGTAACCACATC-3'
DEPTOR promoter	5' -CCATAGAAAAAGATACAGGC-3' 5' -TCATTCCATGAAATTTGAATG-3'
DEPTOR ARE1	5' -TCCCCTCTTAATCTGGTTA-3' 5' -CTAATGGCATACGGGCTTGT-3'
DEPTOR ARE2	5' -TGAAGACGTTGAGGCATTTG-3' 5' -ACAGGGCCAAAGCATATGAG-3'

2-7. 統計分析

統計比較は KaleidaGraph Synergy Software (serial NO. 356609) で分散分析の Dunnett の比較検定で行った。

3. 実験結果

3-1. 前立腺がん細胞におけるアンドロゲン受容体依存的な DEPTOR mRNA 発現への影響

DEPTORはmTORの阻害タンパク質であり、mTORC1とmTORC2を直接に結合することが知られている(78)。初めに、AR 依存的な前立腺がん細胞株であるLNCap 細胞を用いて、DEPTOR mRNA の発現がARにより調節されるか否かを調べた。細胞にAR リガンドであるDHT (10 nM) を3、6、24 時間処理し、リアルタイム PCR 法により mRNA の発現量を測定した。その結果、DEPTOR mRNA の発現量は、DHT 処理により時間依存的に減少していた (Fig. 22A)。一方、AR 標的遺伝子であるFKBP51 遺伝子の mRNA 発現量はDHT 処置により時間依存的に増加していた。さらに、AR アンタゴニストであるビカルタミド (Bic) との併用処理により、AR リガンドであるDHT による DEPTOR mRNA の発現量の抑制が減弱された (Fig. 22B)。このAR リガンドであるDHT による DEPTOR mRNA の発現量の抑制が、ほかの前立腺がん細胞株でも見られるかどうかを調べるために、AR が過剰発現している VCaP 細胞株及びAR 発現陰性であるPC3 細胞株を用いて、DHT 処理の影響を調べた。LNCap 細胞株と同様に、AR 過剰発現の VCaP 細胞において DEPTOR 遺伝子 mRNA 発現の低下が認められた (Fig. 22C)。一方、AR 陰性であるPC3 細胞では、DEPTOR 遺伝子の発現量の減少は認められなかった (Fig. 22D)。

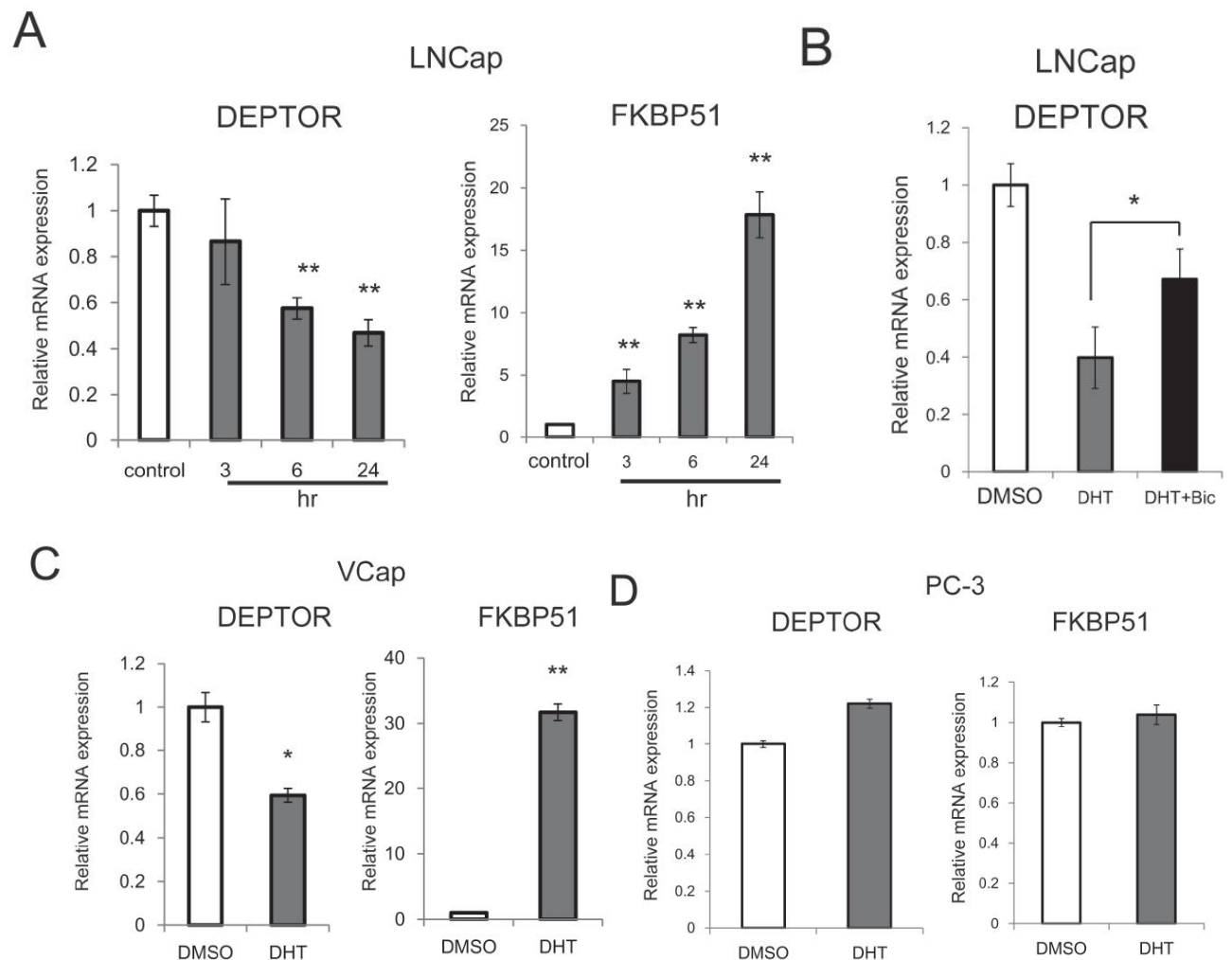


Fig. 22. Suppression of *DEPTOR* gene transcription by DHT in an AR-dependent manner.

(A) LNCaP cells were treated with 10 nM DHT for the indicated times. (B) LNCaP cells were treated with 10 nM DHT with or without 10 μ M bicalutamide. (C, D) VCaP and PC-3 cells were individually treated with 10 nM DHT for 24 hr. Cells were harvested and the mRNA levels of *DEPTOR* were measured by qRT-PCR, simultaneously with those of known AR-target gene *FKBP51*. Results normalized against those of β -actin are expressed as averaged fold activation over the solvent control of the four individual experiments (mean \pm S.D., n=4) ; * P <0.05, ** P <0.01.

3-2. 前立腺がん細胞における DEPTOR の mTOR シグナルへの関与

血清中のホルモンを除去するために、活性炭で処理した血清を用いて培養した LNCaP 細胞を、10 nM DHT で 24 時間処理した後、DEPTOR タンパク量を測定した。その結果、DHT 処置により DEPTOR タンパク質量の減少が認められ、さらに mTOR の標的である pS6K のリン酸化の亢進が認められた (Fig. 23A)。次に前立腺がん細胞において、DEPTOR 発現の減少が mTOR シグナルに与える影響を、DEPTOR を siRNA によってノックダウンすることにより調べることにした。その結果、DEPTOR のノックダウンにより、pS6K のリン酸化レベルの増加が認められた。さらに、DEPTOR のノックダウンにより、細胞増殖の一つのポジティブな調節因子であるサイクリン D1 の発現レベルの上昇も認められた (Fig. 23B)。

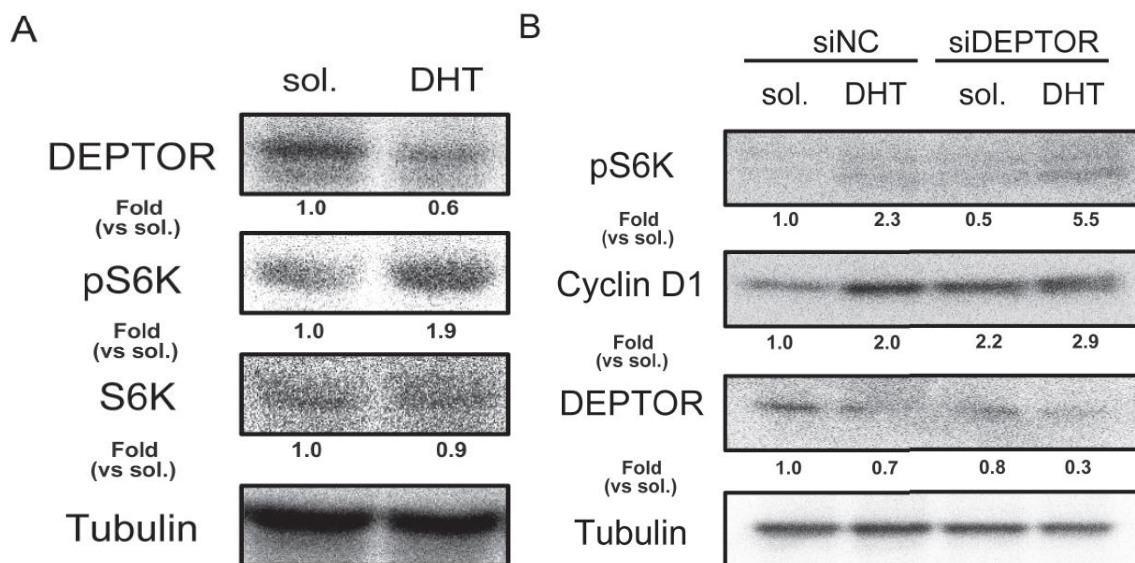


Fig. 23. Reduction in DEPTOR protein level by the DHT treatment and elevation in cyclin D1 protein level by knockdown of *DEPTOR* gene.

(A) LNCaP cells were treated with solvent control (sol.) or 10 nM DHT for 24hr. Whole-cell lysates were separated by SDS-PAGE, and proteins were detected by immunoblotting using antibodies against DEPTOR, pS6K (T389), S6K and tubulin used as a loading control. (B) LNCaP cells were transfected with DEPTOR-targeting or control siRNA. After 48 hr, cells were treated with DHT or sol. for an additional 24hr. Whole-cell lysates were separated by SDS-PAGE, and proteins were detected by immunoblotting using antibodies against Cyclin D1, DEPTOR, pS6K (T389) and tubulin used as a loading control.

3-3. AR の DEPTOR 遺伝子のイントロンの ARE への結合

次に、DHT による DEPTOR mRNA 発現の抑制が新規タンパク質合成を介しているか否かを調べることにした。タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) 存在下において、DHT による DEPTOR mRNA 発現を観察したところ、抑制が認められた (Fig. 24A)。この結果より、DHT による DEPTOR 遺伝子発現の抑制は新規タンパク質合成を必要としないことが明らかとなった。そこで、AR による DEPTOR 発現抑制機構を明らかとするために、DEPTOR 遺伝子周辺に存在する AR 結合配列を、公開されている chip-on-chip のデータセット (82) から *in silico* で探索した。この解析により、DEPTOR 遺伝子の三番目と四番目のイントロンの中に、それぞれに、ARE1 と ARE2 という二つの仮想的な AR 結合領域が存在することがわかった (Fig. 24B)。そこで、この領域へ AR が実際に結合するかを調べるために、ChIP アッセイを行った。その結果、コントロールとして用いた FKBP の ARE と同様に、ARE2 領域に AR が結合することが確認できた (Fig. 24C)。

さらに、遺伝子転写活性の増強に関与しているアセチル化ヒストン H3 (Lys9, Lys14) の程度を、ChIP アッセイによって調べた。アセチル化されたヒストン H3 レベルは DHT 処置により ARE2 領域で減少していた。一方で、FKBP5 遺伝子の ARE 領域におけるアセチル化ヒストン H3 レベルは増強していた (Fig. 24D)。

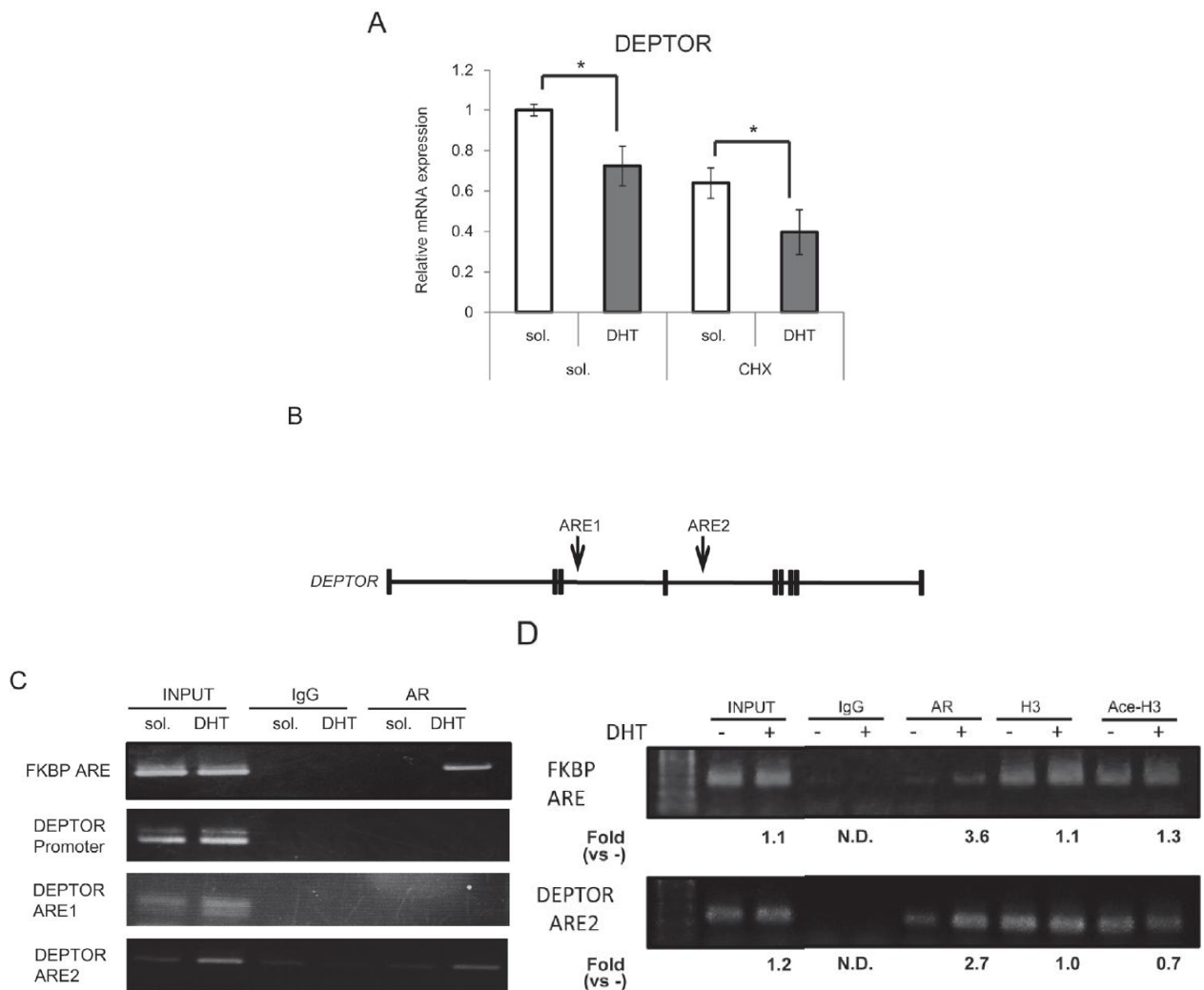


Fig. 24. Binding of AR to intronic ARE of *DEPTOR* gene.

(A) LNCaP cells were treated with 10 μ g/mL CHX. After 30 min, cells were treated with solvent control (sol.) or 10 nM DHT for 6hr. Cells were harvested and the mRNA level of *DEPTOR* was measured by qRT-PCR. Results normalized against those of β -actin are expressed as averages of fold activation over the solvent control of four individual experiments (mean \pm S.D., n=4) ; * P <0.05. (B) Schematic representation of *DEPTOR* gene locus. Black boxes designate the exons. Two putative AR-binding regions (ARE1 and ARE2) were indicated by arrows. (C, D) LNCaP cells were treated with sol. or 10 nM DHT for 24hr. ChIP-experiment was performed using individual antibodies against AR, histone H3 and acetylated histone H3 as well as control ones. The precipitated DNA was used for PCR amplification with the specific primers for ARE regions of *DEPTOR* gene and ARE region of *FKBP51* gene used as a positive control. N. D., not detected.

4. 考察

本章では、核内受容体に属するアンドロゲン受容体の男性ホルモン依存的な前立腺がんの促進作用機構を明らかにすることを目的にした。AR 依存的な前立腺がん細胞の増殖は AR を介した様々な遺伝子発現調節によって促進していることが知られている。近年、その機構の一つとして mTOR シグナルの促進作用が明らかとなってきた。前立腺がん細胞における mTOR シグナルの促進は、細胞の生存や細胞の増殖の促進に関与し、がんの発達に重要な役割を果たしている。また、前立腺がんにおいて mTOR シグナルの増加と悪性度に相関があることが報告されている (83)。しかしながら、これまで AR による mTOR シグナルの促進の詳細な分子機構はほとんど明らかになっていなかった。

本研究では、mTOR シグナルの抑制タンパク質として見出された DEPTOR に注目し、その AR による発現調節を検証した。その結果、AR 陽性の前立腺がん細胞株において、AR のリガンドである DHT の処置により、DEPTOR mRNA 及びタンパク質発現の減少が認められた。また、その抑制は AR 陰性の前立腺がん細胞株では認められなかった。次に、この AR による DEPTOR mRNA 転写抑制機構を明らかとするために、AR 結合領域を Chip-on-chip のデータセットを利用し *in silico* で検索した。その結果、候補となる領域が DEPTOR 遺伝子のイントロン領域に2つ見つかった。その推定上の候補配列を ARE1 と ARE2 として、AR の結合の有無を ChIP アッセイにより評価したところ、ARE2 において AR のその領域への動員（リクルート）が認められた。一般的に、DNA 塩基配列の変化によらない動的な遺伝子発現制御はヒストンの修飾によって調節されていると考えられている。転写因子によるヒストンのアセチル化は、クロマチン構造の弛緩を引き起こし転写の活性化を引き起こす。逆に、ヒストンの脱アセチル化はクロマチンを凝集させ転写を抑制させる。そこで、AR により転写抑制がどのように起こっているかを明確にするために、ヒストンの修飾変化による転写制御を検証した。そのために、DHT による AR の ARE 領域への動員が、ヒストン修飾に影響を与えているかを抗アセチル化ヒストン抗体による ChIP アッセイで検証した。予想通り、DHT 処置による AR のリクルートにより ARE2 領域のアセチル化ヒストンの減少が認められた。このことは、AR がヒストンを脱アセチル化するような活性をもつ転写共役因子を呼び込んで、脱アセチル化を促進し、クロマチンの凝集を引き起こした結果、DEPTOR の転写が抑制されたと考えられる。これまでも AR により転写抑制される遺伝子が報告されている。E カドヘリンの場合、AR によるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の AR 応答配列への動員が確認されている (84)。したがって、DEPTOR の ARE2 にも HDAC が動員されている可能性が考えられる。

一方で、コントロールとして実験した AR によって転写が促進される FKBP51 遺伝子の ARE 領域においては、AR の動員及びヒストンのアセチル化が認められた。このような、同一リガンドにより活性化された AR による転写促進と抑制の遺伝子における相違が認められるが、本研究ではその分子機構はまだ明らかにすることができなかったが、今回、ヒストンの修飾の変化に違いが認められたことから、AR による動員される転写共役因子が遺伝子（応答配列）により異なる可能性が強く示唆された。次いで、実際、前立腺がん細胞において AR による DEPTOR の発現抑制が mTOR シグナルの活性化に影響を与えているか

を確認した。DEPTOR mRNA を siRNA により抑制したところ、予想通り mTOR の標的タンパク質である S6K のリン酸化の促進及び細胞増殖促進に関与する Cyclin D1 の発現量の増加が認められた。

したがって本研究では、これまで詳細には明らかとなっていなかった AR による mTOR シグナルの活性化機構の一つとして、DEPTOR 遺伝子の転写抑制機構を明らかにすることができた (Fig. 25)。本研究により明らかとなった AR と mTOR の相互作用の新たな分子機構が、前立腺がん治療薬の開発において重要な知見となることを期待している。

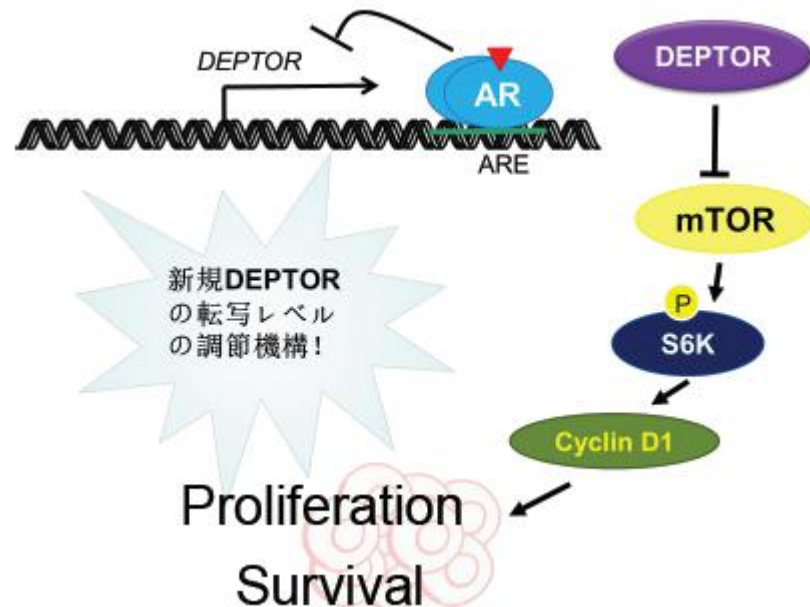


Fig. 25. Novel mechanism of transcriptional regulation of DEPTOR.

総括

本研究は、受容体型転写因子のがん細胞増殖における役割に注目し研究を行った。細胞内に存在する受容体型転写因子は、低分子で脂溶性である化学物質をリガンドとして、種々遺伝子の発現を制御することで様々な生理作用を担っている。受容体型転写因子は正常な生理作用に関わるのみでなく、疾病の原因や悪化に関わる一方で、疾病の改善・予防としての役割をもっていることも多く知られている。がんにおける受容体型転写因子の機能に関する研究も多くなされてきており、がんの発生や悪性化にのみならず抗がん作用やがん予防における役割も報告されている。そこで、受容体型転写因子のがん細胞における機能の詳細な解明と、その活性をコントロールすることができる低分子化合物の探索は、抗がん剤を含めたがんの治療法の開発に極めて重要であると考えられる。

本論文では、初めに、乳がん発生と関わりが深いとされる芳香族炭化水素の受容体 (aryl hydrocarbon receptor ; AHR) の乳がん細胞増殖における役割の解明を、近年その存在が実証されつつある「がん幹細胞」に注目し、乳がん幹細胞の自己複製能に対する AHR の役割を評価することとした。AHR は、いくつかのがんにおいて増殖抑制作用が報告されているが、特に乳がんに対する抑制作用についての報告が多い。しかしながら、その詳細な分子機構は未だに不透明な部分が多い。そこで本研究では、まず、AHR による乳がん抑制作用は乳がん幹細胞の自己複製や腫瘍形成能力に対する抑制作用を介して引き起こされているとの仮説を立て、それを実証することを目指した。乳がん幹細胞の腫瘍形成能力や自己複製能を *in vitro* で評価できるとされる mammosphere 形成法を実施することにより、リガンドによる AHR の活性化は乳がん幹細胞の mammosphere 形成を抑制すること、すなわち、その腫瘍形成能力や自己複製能を抑制することを示すことができた。さらに、AHR の活性化により、がん幹細胞マーカーとされる ALDH の活性を有している細胞が減少することを見いだした。また、がん幹細胞ならびに体性幹細胞の維持に関与するとされる β -catenin、Notch、Musashi-1、Nanog および Bmi-1 といったタンパク質の発現が減少していることも見いだした。したがって、AHR のリガンドによる活性化は、乳がん幹細胞の腫瘍形成能力や自己複製能の抑制を介して乳がんの形成を抑制していることが強く示唆された (1 章、第 1 節)。

乳がんは HER2 など特定のタンパク質の発現量によりいくつかのサブタイプに分類される。中でも、乳がんの 20~30% を占めている HER2 過剰発現乳がんには、がん幹細胞が多く含まれているとの報告がなされている。そこで次に、HER2 過剰発現乳がんの乳がん幹細胞における AHR の役割を明らかにすることを目指した。乳がん由来 MCF-7 細胞株に HER2 発現ベクターを導入し、HER2 を安定的に過剰発現させた細胞株を樹立し、HER2 発現により AHR の機能に変化が起こるか否かを評価した。HER2 過剰発現株では、AHR の発現の増加及び活性化が認められ、さらに、がん幹細胞の自己複製の促進に関与する IL-6 の AHR 依存的な発現誘導が引き起こされていることが明らかとなった。さらに、HER2 過剰発現乳がん細胞のがん幹細胞の自己複製能は AHR の発現に依存していること、HER2 過剰発現乳がん細胞の培養上清はがん幹細胞の自己複製能を活性化すること、そして、AHR の発現をノックダウンした HER2 過剰発現乳がん細胞

の培養上清は、AHR 非ノックダウン HER2 過剰発現乳がん細胞の培養上清よりもがん幹細胞の自己複製能活性化作用が低くなることを明らかとした。このことから、HER2 過剰発現乳がんにおいて、AHR は、HER2→AHR→IL-6（あるいは他のがん幹細胞自己複製能を亢進させる分泌性タンパク質の発現・分泌亢進）というシグナル経路を介して、IL-6（あるいは他のがん幹細胞自己複製能を亢進させる分泌性タンパク質）リッチながん幹細胞の周辺環境（ニッチ）を形成し、パラクライン／オートクラインループによりがん幹細胞の自己複製の亢進、増加に関与しているものと考えられた（1 章、第 2 節）。

これまでの結果より、第 1 節では「リガンドにより活性化された AHR は、乳がん幹細胞を抑制する」、第 2 節では「HER2 過剰発現乳がんにおいては、AHR は、がん幹細胞自己複製に適した環境を形成させることで乳がん幹細胞の自己複製能を活性化する」というがん幹細胞における AHR の 2 つの逆の役割を示した。すなわち、AHR はがん幹細胞に対して諸刃の剣（double-edged sword）である。このことは、AHR はがん幹細胞の増殖・生存維持のバランス制御をつかさどる重要な因子であり、リガンドの有無といったがん幹細胞を取り巻く環境や HER2 の発現量の多い少ないといったがん幹細胞内の状況によってその役割が変化するものと考えられる。このような状況に応じた AHR の役割変化をさらに理解していくことで、AHR および AHR リガンドが、がん幹細胞を標的とする新しいがん治療法を開拓するものと期待する。

さらに、本研究（第 2 章）では、前立腺がんとかかわりの深い受容体型転写因子であるアンドロゲン受容体（AR）に着目した。近年、ホルモン依存性の前立腺がんの進行に AR シグナルを介する mTOR の活性化が重要であることが報告されている。mTOR シグナルの活性化は多くの悪性度の高いがんで認められており、前立腺がんにおいても報告が多い。AR シグナルによる mTOR の活性化の報告はあるものの、その分子メカニズムに関しては明らかとなっていない。そこで、その機構を解明することで、mTOR を治療標的とした新たな前立腺がんの治療法開発に貢献できると考えた。最近、mTOR の阻害タンパク質として DEPTOR が新たに同定された。そこで、DEPTOR 遺伝子の発現への AR の関与の可能性を調べることにした。AR 陽性前立腺がん細胞株にアンドロゲンを処理により DEPTOR mRNA 発現の抑制が見られた。さらに DEPTOR 遺伝子のイントロンに AR の結合配列（ARE2）が存在し、実際に AR が結合することを実証した。加えて、前立腺がん細胞における DEPTOR のノックダウンは、mTOR シグナルの活性化および mTOR の標的遺伝子であり、その遺伝子産物は細胞増殖を活性化するサイクリン D1 の遺伝子発現量とタンパク質量の増加を引き起こしたことから、アンドロゲンで活性化された AR による DEPTOR の発現抑制は mTOR の活性化と細胞増殖促進に関与している可能性が強く考えられた。

以上のように、本研究では、受容体型転写因子に注目し、受容体型転写因子によるがん細胞の制御機構に関する研究を行った。受容体型転写因子は受容体であるという特性から、様々な化学物質（リガンド）によってその活性制御が可能となる。第 1 章の成果からは、がん幹細胞の機能を抑制するように AHR の活性をコントロールする AHR のリガンド（低分子化合物）を探索あるいは創製をすることで、これまでがん幹細胞の存在により困難となっていたがん治療に光明を与えるものとする。また、AR をアンドロゲンで活性化させる手法から導き出した第 2 章の成果は、単に AR の活性化を抗ホルモン療法で前立

腺がんを治療するのみならず、DEPTOR の発現を直接亢進させるような化合物を探索・創製することも前立腺がん治療の有効な手立てになることを提示するものである。このように、今後さらに、さまざまな生理機能を発揮する受容体型転写因子の機能解析を種々リガンドを用いて調べていくことで、さらなる薬学・医学の発展に貢献していきたいと考える。

謝辞

東邦大学・薬学部・公衆衛生学教室で大学院薬学研究科修士課程学生として本研究を行う機会を与えて下さり、ご指導をいただきました、平成 27 年 3 月迄当教室を主宰されていた井上義雄 東邦大学名誉教授に篤く感謝の意を表します。また、本論文の作成に際し、主査として適切なご助言を頂きました静岡県立大学・薬学部・衛生分子毒性学分野 吉成浩一 教授、ならびに、副査としてご指導を賜りました静岡県立大学・薬学部・臨床薬効解析学分野 伊藤邦彦 教授、静岡県立大学・薬学部・分子病態学分野 森本達也 教授、静岡県立大学大学院薬学研究院・創薬探索センター 浅井章良 教授に深く感謝いたします。

また、終始一貫して、直接研究のご指導を頂くとともに、公私にわたり大変お世話になりました、東邦大学・薬学部・公衆衛生学教室 菅野裕一郎 講師に心から感謝いたします。平成 27 年 4 月から特別研究学生として本研究をさらに続けさせていただき、多くのご指導ご鞭撻を頂いた東邦大学・薬学部・公衆衛生学教室 根本清光 教授に深く感謝をいたします。

さらに、色々と応援をして下さった東邦大学・薬学部・公衆衛生学教室 中浜隆之 講師、共に切磋琢磨した東邦大学・薬学部・公衆衛生学教室の大学院生、6 年生、5 年生の皆様にこの場をお借りして心より感謝いたします。

参考文献

- 1) Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, Sugimura Y, The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* 8:338-362, (1987) .
- 2) Coffey, D. S, Prostate Cancer, UICC Technical Report Series. *International Union Against Cancer, Geneva* 48: 4-23, (1979) .
- 3) Persson I, Estrogens in the causation of breast, endometrial and ovarian cancers – evidence and hypotheses from epidemiological findings. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74:357-364, (2000).
- 4) Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Ishikawa T, Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:779-782, (2000) .
- 5) Gelboin HV, Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev* 60:1107-1166, (1980).
- 6) Mandal PK, Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J Comp Physiol B* 175:221-230, (2005) .
- 7) Carroll KK, Experimental evidence of dietary factors and hormone-dependent cancers. *Cancer Res* 35:3374-3383, (1975) .
- 8) Beattie CW, Hansen NW, Thomas PA, Steroid receptors in human lung cancer. *Cancer Res* 45:4206-4214, (1985) .
- 9) Alford TC, Do HM, Geelhoed GW, Tsangaris NT, Lippman ME, Steroid hormone receptors in human colon cancers. *Cancer* 43:980-984, (1979) .
- 10) Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Moriya T, Kaneko C, Takizawa T, Sunamori M, Handa M, Kondo T, Sasano H, Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2309-2317, (2003) .
- 11) Russo J, Russo IH, Oestrogens and cell proliferation in the human breast. *J Cardiovasc Pharmacol* 28: 19-23, (1996) .
- 12) Zhao S, Kanno Y, Nakayama M, Makimura M, Ohara S, Inouye Y, Activation of the aryl hydrocarbon receptor represses mammosphere formation in MCF-7 cells. *Cancer Lett* 317:192-198, (2012).
- 13) Zhao S, Ohara S, Kanno Y, Midorikawa Y, Nakayama M, Makimura M, Park Y, Inouye Y, HER2 overexpression-mediated inflammatory signaling enhances mammosphere formation through up-regulation of aryl hydrocarbon receptor transcription. *Cancer Lett* 330:41-48, (2013).
- 14) Xu Y, Chen SY, Ross KN, Balk SP, Androgens induce prostate cancer cell proliferation through

- mammalian target of rapamycin activation and post-transcriptional increases in cyclin D proteins. *Cancer Res* 66:7783–7792, (2006) .
- 15) Kanno Y, Zhao S, Yamashita N, Yanai K, Nemoto K, Inouye Y, Androgen receptor functions as a negative transcriptional regulator of DEPTOR, mTOR inhibitor. *J Toxicol Sci* 40:753–758, (2015).
 - 16) Nuclear Receptors Nomenclature Committee., A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97:161–163, (1999) .
 - 17) 独立行政法人国立がん研究センターがん対策情報センター. がん情報サービス：最新がん統計（検索する日付：2016年3月3日）. http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html
 - 18) Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL, Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105–111, (2001) .
 - 19) Wicha MS, Liu S, Dontu G, Cancer stem cells: an old idea—a paradigm shift. *Cancer Res* 66:1883–1890; discussion 1895, (2006) .
 - 20) Safe S, Wormke M, Samudio I, Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor–estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:295–306, (2000) .
 - 21) Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Ishikawa T, Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:779–782, (2000) .
 - 22) Fujii-Kuriyama Y, Mimura J, Molecular mechanisms of AHR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun* 338:311–317, (2005) .
 - 23) Kociba RJ, Schwetz BA, Toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) . *Drug Metab Rev* 13:387–406, (1982) .
 - 24) Zhang S, Lei P, Liu X, Li X, Walker K, Kotha L, Rowlands C, Safe S, The aryl hydrocarbon receptor as a target for estrogen receptor–negative breast cancer chemotherapy. *Endocr Relat Cancer* 16:835–844, (2009) .
 - 25) Lew BJ, Manickam R, Lawrence BP, Activation of the aryl hydrocarbon receptor during pregnancy in the mouse alters mammary development through direct effects on stromal and epithelial tissues. *Biol Reprod* 84:1094–1102, (2011) .
 - 26) Wang T, Gavin HM, Arlt VM, Lawrence BP, Fenton SE, Medina D, Vorderstrasse BA, Aryl hydrocarbon receptor activation during pregnancy, and in adult nulliparous mice, delays the subsequent development of DMBA-induced mammary tumors. *Int J Cancer* 128:1509–1523, (2011) .
 - 27) Hall JM, Barhoover MA, Kazmin D, McDonnell DP, Greenlee WF, Thomas RS, Activation of the

- aryl-hydrocarbon receptor inhibits invasive and metastatic features of human breast cancer cells and promotes breast cancer cell differentiation. *Mol Endocrinol* 24:359–369, (2010).
- 28) Singh KP, Wyman A, Casado FL, Garrett RW, Gasiewicz TA, Treatment of mice with the Ah receptor agonist and human carcinogen dioxin results in altered numbers and function of hematopoietic stem cells. *Carcinogenesis* 30:11–19, (2009) .
 - 29) Boitano AE, Wang J, Romeo R, Bouchez LC, Parker AE, Sutton SE, Walker JR, Flaveny CA, Perdew GH, Denison MS, Schultz PG, Cooke MP, Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 329:1345–1348, (2010) .
 - 30) Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, Oukka M, Weiner HL, Control of T (reg) and T (H) 17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453:65–71, (2008) .
 - 31) Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld JC, Stockinger B, The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453:106–109, (2008) .
 - 32) Panteleyev AA, Bickers DR, Dioxin-induced chloracne--reconstructing the cellular and molecular mechanisms of a classic environmental disease. *Exp Dermatol* 15:705–730, (2006).
 - 33) Williamson MA, Gasiewicz TA, Opanashuk LA, Aryl hydrocarbon receptor expression and activity in cerebellar granule neuroblasts: implications for development and dioxin neurotoxicity. *Toxicol Sci* 83:340–348, (2005) .
 - 34) Grimshaw MJ, Cooper L, Papazisis K, Coleman JA, Bohnenkamp HR, Chiapero-Stanke L, Taylor-Papadimitriou J, Burchell JM, Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 10:R52, (2008) .
 - 35) Kondo T, Setoguchi T, Taga T, Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:781–786, (2004) .
 - 36) Kopan R, Ilagan MX, The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137:216–233, (2009) .
 - 37) Reya T, Clevers H, Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434:843–850, (2005) .
 - 38) Wang XY, Penalva LO, Yuan H, Linnoila RI, Lu J, Okano H, Glazer RI, Musashi1 regulates breast tumor cell proliferation and is a prognostic indicator of poor survival. *Mol Cancer* 9:221, (2010) .
 - 39) Jeter CR, Liu B, Liu X, Chen X, Liu C, Calhoun-Davis T, Repass J, Zaehres H, Shen JJ, Tang DG, NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene* 30:3833–3845, (2011) .

- 40) Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NS, Jackson KW, Suri P, Wicha MS, Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 66:6063–6071, (2006) .
- 41) Wang XY, Yin Y, Yuan H, Sakamaki T, Okano H, Glazer RI, Musashi1 modulates mammary progenitor cell expansion through proliferin-mediated activation of the Wnt and Notch pathways. *Mol Cell Biol* 28:3589–3599, (2008) .
- 42) Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G, ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1:555–567, (2007) .
- 43) Kawajiri K, Kobayashi Y, Ohtake F, Ikuta T, Matsushima Y, Mimura J, Pettersson S, Pollenz RS, Sakaki T, Hirokawa T, Akiyama T, Kurosumi M, Poellinger L, Kato S, Fujii-Kuriyama Y, Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice with natural ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13481–13486, (2009) .
- 44) Pannuti A, Foreman K, Rizzo P, Osipo C, Golde T, Osborne B, Miele L, Targeting Notch to target cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 16:3141–3152, (2010) .
- 45) Esquela-Kerscher A, Slack FJ, Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:259–269, (2006) .
- 46) Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW, A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10:515–527, (2006) .
- 47) Owens MA, Horten BC, Da Silva MM, HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer* 5:63–69, (2004) .
- 48) Blume-Jensen P, Hunter T, Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411:355–365, (2001) .
- 49) Harari D, Yarden Y, Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 19:6102–6114, (2000) .
- 50) Hartman ZC, Yang XY, Glass O, Lei G, Osada T, Dave SS, Morse MA, Clay TM, Lysterly HK, HER2 overexpression elicits a proinflammatory IL-6 autocrine signaling loop that is critical for tumorigenesis. *Cancer Res* 71:4380–4391, (2011) .
- 51) Knupfer H, Preiss R, Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review) . *Breast*

- Cancer Res Treat* 102:129–135, (2007) .
- 52) Kanno Y, Miyama Y, Ando M, Inouye Y, Dependence on the microtubule network and 90-kDa heat shock protein of phenobarbital-induced nuclear translocation of the rat constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol* 77:311–316, (2010) .
 - 53) Sansone P, Storci G, Tavorari S, Guarnieri T, Giovannini C, Taffurelli M, Ceccarelli C, Santini D, Paterini P, Marcu KB, Chieco P, Bonafe M, IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J Clin Invest* 117:3988–4002, (2007) .
 - 54) Ginestier C, Liu S, Diebel ME, Korkaya H, Luo M, Brown M, Wicinski J, Cabaud O, Charafe-Jauffret E, Birnbaum D, Guan JL, Dontu G, Wicha MS, CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *J Clin Invest* 120:485–497, (2010).
 - 55) Korkaya H, Liu S, Wicha MS, Regulation of cancer stem cells by cytokine networks: attacking cancer's inflammatory roots. *Clin Cancer Res* 17:6125–6129, (2011) .
 - 56) Hollingshead BD, Beischlag TV, Dinatale BC, Ramadoss P, Perdew GH, Inflammatory signaling and aryl hydrocarbon receptor mediate synergistic induction of interleukin 6 in MCF-7 cells. *Cancer Res* 68:3609–3617, (2008) .
 - 57) Podechard N, Lecureur V, Le Ferrec E, Guenon I, Sparfel L, Gilot D, Gordon JR, Lagente V, Fardel O, Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo (a) pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol Lett* 177:130–137, (2008) .
 - 58) Yang X, Solomon S, Fraser LR, Trombino AF, Liu D, Sonenshein GE, Hestermann EV, Sherr DH, Constitutive regulation of CYP1B1 by the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in pre-malignant and malignant mammary tissue. *J Cell Biochem* 104:402–417, (2008) .
 - 59) Ikuta T, Kobayashi Y, Kawajiri K, Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 279:19209–19216, (2004) .
 - 60) Oesch-Bartlomowicz B, Huelster A, Wiss O, Antoniou-Lipfert P, Dietrich C, Arand M, Weiss C, Bockamp E, Oesch F, Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9218–9223, (2005) .
 - 61) DiNatale BC, Murray IA, Schroeder JC, Flaveny CA, Lahoti TS, Laurenzana EM, Omiecinski CJ, Perdew GH, Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicol Sci* 115:89–97, (2010) .
 - 62) DiNatale BC, Schroeder JC, Francey LJ, Kushnadi A, Perdew GH, Mechanistic insights into the

- events that lead to synergistic induction of interleukin 6 transcription upon activation of the aryl hydrocarbon receptor and inflammatory signaling. *J Biol Chem* 285:24388–24397, (2010) .
- 63) Vogel CF, Sciullo E, Li W, Wong P, Lazennec G, Matsumura F, RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol* 21:2941–2955, (2007) .
 - 64) Vogel CF, Li W, Wu D, Miller JK, Sweeney C, Lazennec G, Fujisawa Y, Matsumura F, Interaction of aryl hydrocarbon receptor and NF-kappaB subunit RelB in breast cancer is associated with interleukin-8 overexpression. *Arch Biochem Biophys* 512:78–86, (2011) .
 - 65) Korkaya H, Kim GI, Davis A, Malik F, Henry NL, Ithimakin S, Quraishi AA, Tawakkol N, D'Angelo R, Paulson AK, Chung S, Luther T, Paholak HJ, Liu S, Hassan KA, Zen Q, Clouthier SG, Wicha MS, Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2⁺ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. *Mol Cell* 47:570–584, (2012) .
 - 66) Korkaya H, Paulson A, Iovino F, Wicha MS, HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene* 27:6120–6130, (2008) .
 - 67) Nakanishi T, Chumsri S, Khakpour N, Brodie AH, Leyland-Jones B, Hamburger AW, Ross DD, Burger AM, Side-population cells in luminal-type breast cancer have tumour-initiating cell properties, and are regulated by HER2 expression and signalling. *Br J Cancer* 102:815–826, (2010) .
 - 68) Matsumoto T, Takeyama K, Sato T, Kato S, Androgen receptor functions from reverse genetic models. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:95–99, (2003) .
 - 69) Matsumoto T, Takeyama K, Sato T, Kato S, Study of androgen receptor functions by genetic models. *J Biochem* 138:105–110, (2005) .
 - 70) Matsumoto T, Shiina H, Kawano H, Sato T, Kato S, Androgen receptor functions in male and female physiology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109:236–241, (2008) .
 - 71) Lee DK, Chang C, Endocrine mechanisms of disease: Expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4043–4054, (2003).
 - 72) Heinlein CA, Chang C, Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev* 25:276–308, (2004).
 - 73) Dehm SM, Tindall DJ, Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. *Mol Endocrinol* 21:2855–2863, (2007) .
 - 74) Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW, Gobe GC, Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 42:813–827, (2010) .
 - 75) Laplante M, Sabatini DM, mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149:274–293, (2012) .

- 76) Guertin DA, Sabatini DM, Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 12:9–22, (2007).
- 77) van Duin M, van Marion R, Vissers K, Watson JE, van Weerden WM, Schroder FH, Hop WC, van der Kwast TH, Collins C, van Dekken H, High-resolution array comparative genomic hybridization of chromosome arm 8q: evaluation of genetic progression markers for prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 44:438–449, (2005) .
- 78) Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM, DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137:873–886, (2009) .
- 79) Zhao Y, Xiong X, Sun Y, DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF (betaTrCP) E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy. *Mol Cell* 44:304–316, (2011) .
- 80) Gao D, Inuzuka H, Tan MK, Fukushima H, Locasale JW, Liu P, Wan L, Zhai B, Chin YR, Shaik S, Lyssiotis CA, Gygi SP, Toker A, Cantley LC, Asara JM, Harper JW, Wei W, mTOR drives its own activation via SCF (betaTrCP) –dependent degradation of the mTOR inhibitor DEPTOR. *Mol Cell* 44:290–303, (2011) .
- 81) Duan S, Skaar JR, Kuchay S, Toschi A, Kanarek N, Ben-Neriah Y, Pagano M, mTOR generates an auto-amplification loop by triggering the betaTrCP- and CK1alpha-dependent degradation of DEPTOR. *Mol Cell* 44:317–324, (2011) .
- 82) Wang Q, Li W, Zhang Y, Yuan X, Xu K, Yu J, Chen Z, Beroukhi R, Wang H, Lupien M, Wu T, Regan MM, Meyer CA, Carroll JS, Manrai AK, Janne OA, Balk SP, Mehra R, Han B, Chinnaiyan AM, Rubin MA, True L, Fiorentino M, Fiore C, Loda M, Kantoff PW, Liu XS, Brown M, Androgen receptor regulates a distinct transcription program in androgen-independent prostate cancer. *Cell* 138:245–256, (2009) .
- 83) Morgan TM, Koreckij TD, Corey E, Targeted therapy for advanced prostate cancer: inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Curr Cancer Drug Targets* 9:237–249, (2009) .
- 84) Liu YN, Liu Y, Lee HJ, Hsu YH, Chen JH, Activated androgen receptor downregulates E-cadherin gene expression and promotes tumor metastasis. *Mol Cell Biol* 28:7096–7108, (2008) .