

乳がん細胞株 MCF-7 および MDA-MB-231
における転写因子 E2F5 の機能解析
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系内分泌代謝内科学専攻

稲垣 喜則

修了年 2018 年

指導教員 相馬 正義

はじめに

本邦における乳がん患者の粗死亡率，年齢調整死亡率とともに，ここ数十年増加傾向が続いている．2013 年の女性の乳がん患者の死亡者数は 13,000 人程度であり，年齢調整死亡率は大腸がんが続いて高く，第 2 位である．食事やライフスタイルの欧米化が進む発展途上国でも今後罹患者数の増大が見込まれ，全世界的に乳がんの有効な予防，診断，治療法の開発が喫緊の課題である．

乳がんの罹患のリスクのうち生活習慣要因としては，妊娠・出産経験の有無，初経年齢，アルコール，肥満などが知られている．また遺伝的要因としてはがん抑制遺伝子の変異があり，中でも代表的な BRCA1 や BRCA2 の変異は家族性の乳がん患者の 2 割程度で認められる．しかしながら，これらの因子では説明ができない症例も多々あり，早期の診断，新規の治療法を開発する上で，引き続き新たな乳がん関連因子の探索を行っていくことが必要である．

乳がんにおいて estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), epidermal growth factor receptor 2 (HER2) は，増殖や浸潤において重要な役割を持ち，治療標的ともなっている．そのため，これらの発現のパターンを基に乳がんのタイプを分類し (Luminal A タイプ, Luminal B タイプ, HER2 陽性タイプ, Triple Negative (TN) タイプ, その他), 治療方針が決定されている．しかしながらこれらの受容体をいずれも発現していない TN 乳がんでは，薬剤が作用せず予後も悪いため新規治療薬の開発が待たれている．近年 TN 乳がんにおいて転写因子 E2F5 が過剰発現し，E2F5 が高発現であるほど生命予後が悪いことが報告された．また食道がん，肝細胞がん，卵巣がん，前立腺がん，大腸がんなど各種がん組織においても E2F5 が高発現しているという報告が続いている．このため E2F5 はがん遺伝子として機能している可能性があると考えられた．そこで本研究では，異なる 2 株の乳がん細胞株を用いることで乳がん細胞株における転写

因子 E2F5 の機能解析を検討することを目的として以下の研究を行った。

目的

乳がん細胞の細胞機能における E2F5 の役割を細胞生物学的に検討し、更に E2F5 がそれらの機能を発揮する上で重要なシグナル伝達経路について検討を行う。

対象と方法

当研究グループで保管している 7 株のヒト乳がん細胞株について、Real-time PCR により E2F5 の発現量を確認し、一定の発現量を示す p53 野生型、Luminal A タイプの MCF-7 と p53 変異型、TN タイプの MDA-MB-231 を使用した。細胞内における E2F5 の局在は蛍光免疫染色により行った。E2F5 の発現抑制は lipofection 法による siRNA 導入により行い、Negative control には Control siRNA を用いた。細胞増殖能の検討は WST8 アッセイにより、コロニー形成能はコロニー形成試験にて行った。細胞周期の解析および死細胞の割合は、Propidium Iodidese 染色した細胞を FACS にて解析し、核内 DNA 量の分布を調べることにより解析した。E2F5, p53 およびその下流遺伝子の mRNA の発現は Real-time PCR により、蛋白質の発現解析は Western blotting により行った。E2F5 と p53 の蛋白レベルでの結合状態は免疫沈降試験にて解析し、p21^{WAF1} プロモーターへの E2F5 および p53 の結合はクロマチン免疫沈降試験 (ChIP アッセイ) により行った。統計学的解析は、Student's t 検定によっておこなった。

結果

はじめに MCF-7 について解析を行った. E2F5 は核内だけでなく細胞質にも存在していることを蛍光免疫染色により確認した. E2F5 の発現を抑制した細胞では, WST8 アッセイにより有意な細胞生存率の低下を認め ($p < 0.01$), コロニー形成能も低下していた. FACS 解析では, E2F5 siRNA 投与群で死細胞 (sub-G1 期) の割合 ($p < 0.01$) および G0/G1 期の細胞の割合 ($P < 0.05$) が有意に上昇していることを確認した.

そこで, E2F5 発現抑制下での p53 およびその下流遺伝子 mRNA の発現レベルを Real-time PCR により解析したところ, 細胞周期調節因子である p21^{WAF1} ($p < 0.01$) およびアポトーシス関連遺伝子である NOXA ($p < 0.01$) と PUMA ($p < 0.01$) において有意な発現上昇を認めた. p53 とそのファミリーメンバーである p73 の発現には有意な差は認めなかった. また Western blotting を用いた蛋白発現解析では, p21^{WAF1} およびアポトーシス関連蛋白である BAX, Cleaved PARP, Cleaved Caspase-3, Cleaved Capase-9 では明確な発現の上昇を認めた. また, p53 それ自体の発現の亢進は認めなかったが, p53 のリン酸化の亢進を確認した.

以上の結果は, E2F5 の発現抑制により p53 シグナルが活性化され, 増殖停止や細胞死の誘導死をもたらしたと考えられた. このため E2F5 の作用点を解明するために, E2F5 と p53 の相互作用について免疫沈降試験で解析を行ったが, E2F5 と p53 が共沈しているという結果は認めなかった. さらに, E2F5 が直接 p53 の標的遺伝子の発現を抑制している可能性を調べるために, ChIP アッセイを行ったが, E2F5 の p21^{WAF1} プロモーター領域への結合は確認できなかった. また, p21^{WAF1} プロモーターへの p53 蛋白の結合が, E2F5 の発現抑制により亢進するか解析をしたが, 予想とは逆に E2F5 の発現抑制により, p21^{WAF1} プロモ

ーターへの p53 の結合は抑制されていた。

次に MDA-MB231 について解析を行った。E2F5 の発現抑制により細胞の生存率が有意に低下し ($p < 0.01$)、コロニー形成能も抑制されることを確認した。FACS 解析では、E2F5 siRNA 投与群で死細胞 (sub-G1 期) および G0/G1 期の細胞の割合は上昇していなかった。一方で、G2/M 期の細胞の割合が有意に上昇していた ($p < 0.05$)。

また、E2F5 発現抑制下での Real-time PCR による解析では、p53 およびその下流遺伝子 mRNA の発現レベルは、p73 ($p < 0.05$)、p21^{WAF1} ($p < 0.05$) および NOXA ($p < 0.05$) と PUMA ($p < 0.05$)、BAX ($p < 0.05$) において有意な発現上昇を認めたが、MCF-7 と比較して顕著ではなかった。また p53 およびその下流遺伝子の蛋白レベルでの発現解析では E2F5 抑制群とコントロールの間で明確な差は認めなかった。また、p53 それ自体の発現量やリン酸化レベルにも変化は認めなかった。

考察

本研究では、2 種類の異なった乳がん細胞株である、Luminal A タイプのヒト乳がん細胞株である MCF-7 と TN タイプであるヒト乳がん細胞株 MDA-MB231 を用いて、E2F5 の機能解析を行った。2 種類のタイプでともに、E2F5 の発現抑制により、細胞生存率、コロニー形成能が低下したが、その機序は異なっていると考えられた。MCF-7 では、E2F5 の発現抑制により、G0/G1 アレストと細胞死の誘導が生じていたが、MDA-MB231 ではそのどちらも起こっておらず、G2/M アレストのみを認めた。この結果は、E2F5 が p53 野生型と p53 変異型では異なる経路で細胞増殖・細胞死誘導を制御する可能性を示唆していると考えられた。

p53 野生型の MCF-7 では、E2F5 の発現抑制により、p53 がリン酸化され、そ

の下流である遺伝子が発現することに伴うメカニズムにより、細胞周期の停止ならびにアポトーシスが亢進すると考えられた。その機序の解明を試みたが、E2F5 と p53 の蛋白レベルでの相互作用は確認できなかった。また直接 p21 遺伝子プロモーター領域に結合している証左も得られなかったことから、E2F5 は p53 のさらなる上流で p53 の活性化を制御する分子の機能に影響を与えている可能性が高いと考えられた。

一方で、p53 変異型の MDA-MB231 では、E2F5 の発現抑制による p53 下流遺伝子の活性化や細胞死誘導、蛋白発現の上昇は観察されなかった。また、G2/M 期における細胞周期の停止が観察されたことから、E2F5 が複数のターゲットを持ち、p53 経路が十分に働かない細胞では、p53 非依存的な経路での細胞増殖能の制御を行っていると考えられた。今回の結果より、ヒト乳がん細胞株における E2F5 の機能解析には、p53 野生型と p53 変異型を区別して検討する必要があると考えられた。

結語

今回の実験結果からは、ヒト乳がん細胞株における転写因子 E2F5 による腫瘍制御機構は p53 野生型と p53 変異型で大きく異なることが明らかになった。このため今後は、がん遺伝子の候補の一つであると考えられる E2F5 の解析をおこなう上で p53 野生型と p53 変異型を分けて機能解析する必要があると考えられた。また今回の結果からは、E2F5 はがん遺伝子の一つであることを示唆し、さらに他の乳がん細胞株や各種がん組織の解析を進めることで、E2F5 の詳細な機能解析につながっていくと考える。