

氏 名	宮川 信一
学位（専攻分野）	博士（理学）
学位記番号	総研大甲第 878 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 24 日
学位授与の要件	生命科学研究科 分子生物機構論専攻 学位規則第 6 条第 1 項該当
学位論文題目	Analysis of the Mechanisms of Estrogen -Independent Activation of Cell Proliferation in Mouse Vagina
論文審査員	主 査 教授 長濱 嘉孝 教授 井口 泰泉 教授 諸橋 憲一郎 教授 高田 慎治 教授 高橋 純夫（岡山大学）

論文内容の要旨

女性ホルモンであるエストロゲンは、生物の生殖機能を調節しているほか、その受容体は体内の様々な器官に発現しており、ホメオスタシスを調節している。エストロゲンは経口避妊薬や閉経後のホルモン補充療法薬として広く用いられているが、その有用性の反面、乳癌や子宮癌のリスク要因としてよく知られている。実際に 1970 年代には、それまでヒトに流産防止薬として処方された合成エストロゲン (DES) が胎児期に作用すると、若年での膣癌の原因となることが示されている。DES はヒトで臍帯経路による胎児曝露で発癌が認められた唯一の薬害の例であり、DES を曝露された女性は現在においても同世代の女性よりも発癌のリスクが高いとされている。

生殖器官の細胞増殖はエストロゲンによって一過性に、つまりエストロゲン依存的に調節されているので、生殖器官の癌とは、いわばエストロゲン非依存的細胞増殖といえる。マウスでは新生仔 (ヒトの 3~4 ヶ月の胎児に相当する) にエストロゲンを投与すると、成熟後にエストロゲン非依存的膣上皮の細胞増殖・角質化が誘起され、加齢に伴い腫瘍する。ヒトでの DES 曝露を模したこのモデルは、エストロゲンの細胞増殖機構とともに、発癌に至るプロセスの解明を生体レベルで行うことができる有用な系である。この「新生仔マウス DES 投与モデル」を用いることによってエストロゲン非依存的細胞増殖について、組織・個体レベルでの解明を目指した。

一般に、生殖器官の細胞増殖・分化には、エストロゲンと成長因子のクロストークが存在していることがよく知られている。間質細胞のエストロゲン受容体 α (ER α) を介して、間質からの分泌性因子 (= 成長因子) が上皮細胞の増殖・分化を促すというモデルである。本研究では、まず、エストロゲン刺激に応答して発現が誘導される成長因子を探索した。卵巣を摘出したマウスにエストロゲンを投与すると、EGF ファミリーの成長因子 (EGF、TGF α 、ヘパリン結合性 EGF 様成長因子、アンフィレギュリンなど) の mRNA の発現が上昇することが分かった。新生仔 DES 投与マウスの膣でも同様に、卵巣を除去して体内のエストロゲンを除去した後も、EGF ファミリーの成長因子が高発現しており、これら EGF ファミリーの成長因子は主に上皮で発現していた。EGF ファミリーの成長因子の受容体 (erbB 受容体) の中で、マウスの膣上皮に強く発現している EGF 受容体 (EGFR; erbB1) と erbB2 のリン酸化状態を調べてみると、確かにリン酸化されており、このことは、エストロゲン非存在下で EGF 様成長因子-erbB 受容体系が上皮組織で活性化されていることを示している。

次に erbB 受容体の下流で活性化する因子の同定を試みた。特に注目したのが ER α である。ER α にはリガンド依存的に活性化される AF-2 と、リガンド非依存的に活性化される AF-1 という 2 つの転写活性化領域が存在する。これまでに ER α の AF-1 は、MAPK や Akt 等の経路によって特定のセリン残基がリン酸化されることで、その転写活性が上昇することが示されている。卵巣を除去したマウスに EGF を投与すると、EGFR と erbB2 のリン酸化とともに ER α のリン酸化が起こることが分かった。また、新生仔 DES 投与マウスの膣でも ER α がリン酸化されており、さらに ER α をリン酸化する因子 (p90RSK や Akt) も活性化されていた。つまり AF-1 領域のリン酸化による、ER α のエストロゲン非依存的な転写活性化が、新生仔 DES 投与マウスの膣で誘起されていることが明らかとなった。また、erbB 受容体の阻害剤を投与することによって上皮基底細胞の細胞増殖率の減少とともに、ER α のリン酸化レベルも減少した。このことは erbB 受容体とその下流の因子が ER α のリン酸化に寄与していることを意味する。さらに ER の阻害剤である ICI182,780 により、膣上皮層の厚さが減少するほか、成長因子の発現減少、erbB の脱リン酸化が認められた。ER α のリン酸化は膣上皮で起きていることも確認している。したがって ER の AF-1 の転写活性化が成長因子の発現を誘導し、erbB 受容体のリン酸化を制御していることが明らかとなった。

これまでエストロゲン標的器官の腫瘍化には成長因子やその受容体、そして ER の関与が示唆されていたが、多くの研究が培養細胞での研究であるため、それぞれの因子を関係づけることはできていなかった。

た。本研究では、ERによる成長因子発現、erbB受容体のリン酸化とそれに伴う細胞内シグナル因子の活性化、ERのリン酸化による成長因子発現…というアクチベーションループが存在する事実を明らかにした。さらにこの活性化のループは間質組織からの因子に依存せず、腫上皮組織内で完結している。このことはこれまでの生殖器官における間質を介した正常な上皮の細胞増殖・分化の概念と異なっており、この上皮・間質相互作用の破綻が、エストロゲン非依存の異常な細胞増殖の特色であると思われる。また、ERを始めとする核内ステロイドホルモン受容体のリガンド非依存の活性化の研究は、培養細胞の実験系で行われている。本研究では、マウス生体で実際にERがリガンド非依存にリン酸化・活性化されて、それが腫上皮の細胞増殖・分化を制御することを明らかにした。

さらに、新生仔DES投与マウスの腫ではerbB受容体-ER系だけでなく、IGF-I経路も活性化されていることを明らかにした。IGF-Iを投与すると、マウスの腫でAktが活性化し、また、新生仔DES投与マウスの腫ではIGF-I受容体のリン酸化も認められた。したがって、エストロゲン非依存の腫上皮細胞増殖には、erbB-ERのアクチベーションループのほか、IGF-Iシグナルも寄与していることが明らかになった。

論文審査結果の要旨

エストロゲンは女性生殖器官腫瘍のリスクファクターとして知られているが、実際のそのシグナル経路がどのように腫瘍化に結びついているかは解明されていない。マウス膺上皮はエストロゲン刺激に依存して細胞増殖するが、出生直後にエストロゲンを投与すると、将来、そのマウスの膺上皮はエストロゲンに依存せずに細胞増殖し、加齢に伴い腫瘍化することが知られている。申請者はこのモデルを用いて、エストロゲン非依存に細胞増殖する膺を前癌病変として捉え、そのシグナル経路の解析を行った。

申請者は、本来エストロゲン刺激によって誘導される EGF 様成長因子の発現が、出生直後のエストロゲン投与により、エストロゲン非依存性を示す膺で高発現しており、その受容体である erbB 受容体がリン酸化されていることを見出した。さらに、そのシグナルが下流において、エストロゲン受容体 α の AF-1 領域のセリン残基をリン酸化していることを示した。エストロゲン受容体 α の AF-1 領域のみで膺上皮は細胞増殖し、また EGF 様成長因子の一つであるアンフィレギュリンの転写を活性化できること、さらに、エストロゲン受容体アンタゴニストにより EGF 様成長因子の発現と細胞増殖が抑制されること、erbB 受容体の抑制剤により、エストロゲン受容体のリン酸化が抑制され、細胞増殖も抑制されることを明らかにした。これらの結果から、リガンド非依存のエストロゲン受容体 α の AF-1 領域の活性化が、成長因子の発現とその受容体のリン酸化を誘導し、そのシグナルがエストロゲン受容体 α をリン酸化しているという、アクチベーションループを形成しているというモデルを提案した。

女性生殖器官を始め、エストロゲン標的器官における腫瘍形成ではエストロゲンシグナルの関与が示唆され続けていたが、エストロゲン受容体などの因子の細胞内での挙動は不明であった。本研究は、これまで培養細胞で行われてきたエストロゲン受容体のリン酸化による活性化という現象が、実際に生体内で細胞増殖や癌化に関連していることを明らかにした点で意義深い。今後、エストロゲンシグナルと腫瘍化の間にある分子メカニズムを解析するうえで、極めて重要なモデルであると評価される。

以上より、本研究は博士論文として十分な内容を有していると判断した。