

ードを体系的に捉え、劇的な生体生理作用を引き起こすステロイドの最終的な作用点である下流応答遺伝子群に焦点を絞り、老化・老年病の疾患モデル動物を作製・応用し、その新規創薬・治療法の開発を目的とする。

具体的には、女性の加齢にともなう閉経前後において、ホルモン補充療法により更年期障害、骨密度の改善することが報告されている。一方、米国での大規模な疫学調査の結果、他の乳腺、子宮ガンリスクをあげてしまう等の副作用が報告され、ホルモン補充療法が 2002 年に米国で見直しが行われ、日本でもその報告を受けて制限される方向にある、これらの副作用は、性ステロイドホルモンであるエストロゲンのリガンドとしての多様な生体生理作用に起因すると考えられる。

これらの問題を改善するため、段階的に研究を展開することが必要と考えられる。

第一に生体におけるエストロゲン合成の中心的な臓器としての卵巣におけるエストロゲンレセプターの作用機構の解明をする。つまり、エストロゲンとエストロゲンレセプターの制御機構を解明することは、加齢に伴うステロイドシグナルの減衰・破綻が種々の老年病疾患の発症プロセスを理解するのに必須と考えられる。また、このエストロゲンシグナルが他のステロイドシグナルやホルモンレセプターと相互作用または制御機構について検討することは、老年病を生体内で体系的に理解するために極めて重要なコンセプトと考えられ、ステロイドシグナルの階層性について解明することを目的とする。

第二に現在使用されているステロイド性製剤とは別の作用点を持つ因子を同定・解析し、より副作用の少ない老年病への創薬・治療の開発を目的とした研究を行う。これらステロイド性製剤の特徴

として、転写因子である核内レセプターを介して、リガンド特異的な下流応答遺伝子群の転写を活性化し、この発現したタンパク質が生体において多様な生理作用を引き起こす。つまり、リガンド特異的な下流応答遺伝子群のシグナルに着目し、マウスモデルを利用することにより生体における下流応答遺伝子群の生体作用、および他の生理作用について併せて検討・評価し、より副作用の少ない創薬・治療法の盤を提供することを最終目的とする。

B. 研究方法

平成 15 年度：エストロゲンシグナルにおける生体作用：疾患モデルマウスの作製と下流応答遺伝子群の発現制御

エストロゲンレセプターは 2 種類 (ER α および ER β) 存在し、その生理作用について類似・相違性について未だ明確な報告がなく、ER α と ER β がお互いにオートクライン的に発現量、またはダイマー形成により転写因子としての作用を制御する可能性も考えられる。エストロゲン特異的シグナルを検討するには、KO マウスを検討することが重要と思われるが、より顕著に特異的なエストロゲンの生体作用を見るためにリガンド非依存型エストロゲンレセプター (caER α および caER β) のコンディショナルトランスジェニック (cTg) マウスおよび組織特異的プロモーター/Cre 作製・交配させることにより、標的臓器のみでリガンド非依存的に ER β シグナルのみを活性化することが可能である。さらに、Er α KO (ER β シグナルのみ存在) マウスを利用することにより、ER のシグナル特異性とその生体作用の特異性についても検討することが可能と考える。つまり、今まで不明瞭であった標的臓器での 1) エストロゲン (ステロイド) \Rightarrow 2) ER α /ER β の特異性およびその作用メカニズムについて詳細に検討し、エストロゲンシグナル

経路の特異性について、生体内で生理作用および作用メカニズムについて検討をおこなう。

平成 16 年度：エストロゲンシグナルの生体作用:標的臓器としての卵巣とエストロゲンシグナル

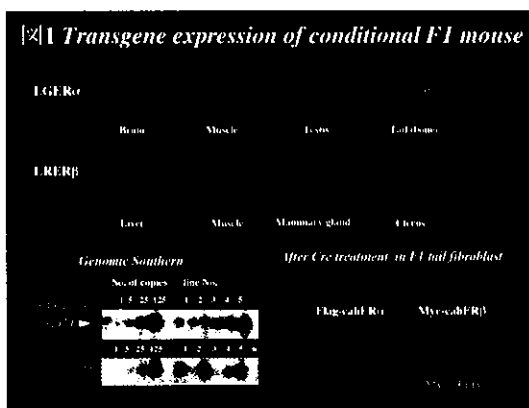
エストロゲンを合成する主要な臓器である卵巣について、そのステロイドレセプターである ER α および ER β の発現が報告されており、妊娠期に劇的に変化をとまなう子宮および乳腺が近接して存在する代表的な標的臓器として考えられる。とりわけ老年病との関連について考えると、女性の閉経後における生体変化は極めて重要な問題であり、骨粗鬆症、血管疾患、およびホルモン依存性ガン等と深く関連することが示唆されている。まず、生体内の卵巣でエストロゲンシグナルの時間軸を換えて誘導することにより、他のホルモンシグナルとの作用について検討する。これらのエストロゲンレセプター (ER α および ER β) に卵巣作用に相違または類似性が存在するか検討した。また、エストロゲンシグナルおよび下流応答遺伝子の生体生理作用およびリスクについて検討するために、受精卵 2 細胞後期から発現が知られている CAG (β -actin/CMV-IE) プロモーター/Cre マウスと cTg マウスを交配して下流応答遺伝子が過剰発現される条件を実験系により作製し、エストロゲンシグナルを介する下流応答遺伝子の生体での生理作用の解析、および副作用について評価する。さらに、エストロゲンレセプターの遺伝子改変マウスに卵巣特異的/Cre マウス (ZP3-Cre:Zona pellucidae 3 プロモーターに Cre を融合した Tg マウス) を交配し、卵巣の卵胞組織にエストロゲンシグナルを過剰または異所的に誘導する系を目指した。マウスにおいてエストロゲンは生後 11 日目前後から合成が開始されると考えられるが、ZP3 プロモーター支配下に Cre を発現したマウスを交配することにより、

生後 3 日前後でエストロゲンレセプターをリガンド非依存的に活性化し、エストロゲンシグナルの卵巣機能について検討する。また、これらのエストロゲン下流応答遺伝子が発現することにより引き起こされる生体作用について検討するとともに、他のステロイドホルモンシグナルとのクロストークに関しても併せて検討する。

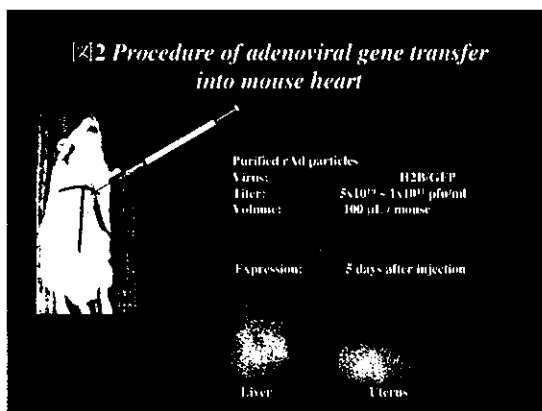
以上、段階的に研究計画を遂行し、本研究課題である老化と老年病の疾患モデル動物の開発とその応用について検討することにより、作用メカニズムが明確で非リガンド性物質であり、かつ副作用の少ないステロイドシグナル経路を分子標的とした新しい老年病の予防・治療法への応用できる因子の同定を目指し、研究を推進していく。

C. 研究結果

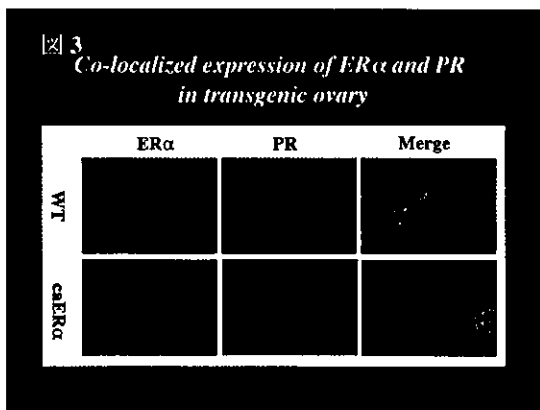
第 1 テーマは、caER α および caER β の cTg マウスの作製にそれぞれ成功し、少なくともこれらの cTg マウスの数ラインの種々の臓器でレポーター遺伝子 (GFP または DsRed) を発現していることが確かめられ、これらのレポーター遺伝子の発現は個体でリガンド非依存型エストロゲンレセプターを過剰発現させることが可能なことを示唆した(図 1)。また、Cre を発現可能な組換えアデノウイルスを cTg 由来の F1 マウス尾部の初代繊維芽細胞に感染させ、*in vitro* において外来性 caER α および caER β 遺伝子が発現して



いることを確認した。さらに *in vivo* において、高濃度に精製した Cre を発現する組換えアデノウイルスを心臓より直接接種することにより、外来性のエストロゲンシグナルを付加可能か検討した(図2)。

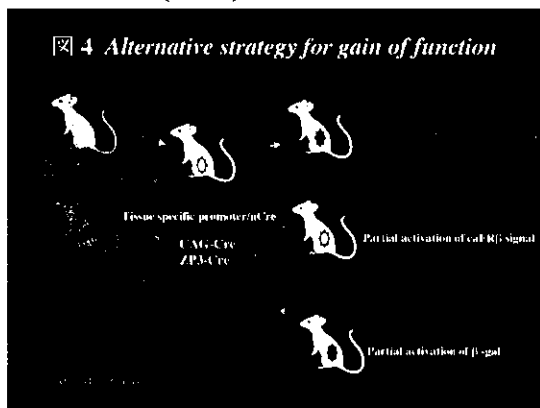


組換えウイルス導入 2 週間後にエストロゲンシグナルの標的臓器である卵巣を摘出し、トランスジェニックマウス由来の卵巣において異所性の外来性 caER α のシグナルを ISH 法により RNA レベルで確認すると共に、異所的な内在性の ER α および ER β シグナルの発現を確認した。Cre 処理卵巣は、部分的に外来性の caER α の発現が確認でき、これらの卵巣では黄体様の組織構造および発達した卵胞の減少が観察され、外来性の caER α の発現する部分において ER の下流応答遺伝子と知られている ER α 、ER β 、EBAG9、および efp が本来発現する部位で発現するのみでなく、外来性の caER α の発現が強い黄体様組織で異所的な発現が見られた。さらに、この外来性の caER α の発現が強い黄体様の組織で、黄体機能の作用が存在するか検討するために、エストロゲンの下流応答遺伝子として知られるプロゲステロンレセプター (PR) が発現しているか検討した結果、外来性の caER α の発現により下流応答遺伝子として知られる PR の発現を同じ黄体様組織において観察した(図3)。一方、前述で挙げた *in vivo* においてコンディショナルに目的の遺伝子を発現させるために Cre を発現できる組換えアデノウイ



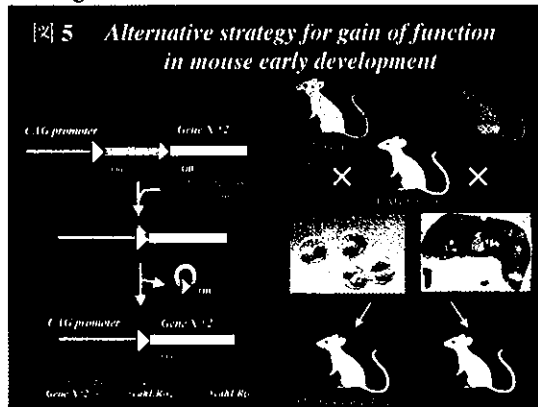
ルスを利用した方法について検討した結果、肝臓、肺等には導入効率が良いが特異性がなく、他の標的臓器に特異性を持って効率的に発現させるためには、組換えアデノウイルスを利用する系には短所があることが示唆された。それ故、より特異性が高く安定的なデータを得るために、組織特異的なプロモーターに Cre を発現できる遺伝子改変マウスを作製し検討した。

第 2 テーマに関しては、本研究で作製した cTg マウスに Cre を発現するトランスジェニックマウスを交配することにより、組織・時期を任意に変化可能な系を確立した(図4)。これらをさらに発展



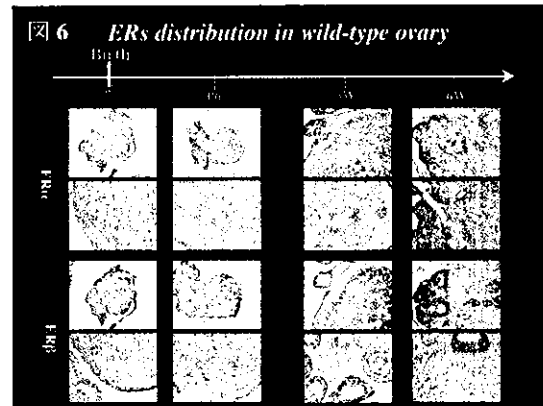
させ発生初期および胎児期での異所性のエストロゲンシグナルの過剰発現における作用について検討するために、CAG-Cre トランスジェニックマウスを 2 ライン作製した。Cre の発現する時期と組織を検討するために、テスターマウスである ROSA26LacZ マウスを交配し、X-Gal 染色をすることにより、Cre の発現時期・

分布を検討した結果、発現時期は 2 細胞期（受精後 24 時間）一胚盤胞期（受精後 96 時間）から発現を確認することができ、胎生 19.5 日の胎児で体全体的にユビキタスに X-gal 染色が確認され、Cre 遺伝子が発生初期からユビキタス発現する Tg マウスを作製できた(図 5)。生体

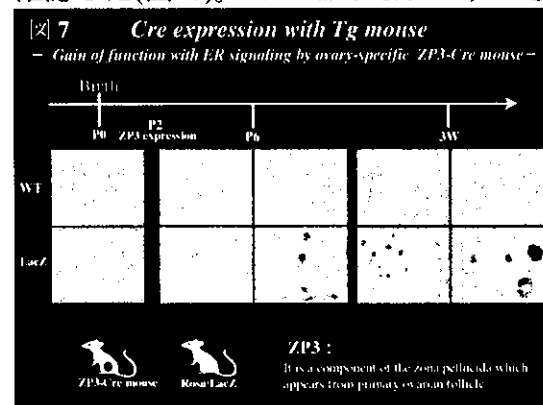


内でエストロゲンシグナル付加するために、CAG-Cre マウスを作製して、マウスの初期胚 2 細胞期から発生初期に Cre を発現させることにより、受精後の数日以内にエストロゲンシグナル (caER α および caER β) を初期発生から胎児で過剰に付加した場合、全体的に産仔数の低下、および異常なメンデル法則からかけはなれた率でしか産仔が得られないことが判明した。このエストロゲンシグナルを過剰に付加された産仔が、どの時期から過剰なエストロゲンシグナルの作用を受けるか詳細に検討する必要があるが、生後数日間までにメンデル法則で生まれてくるはずの産仔が減少し、少なくとも生後数日以内にほとんどのマウスが致死となることがわかった。

つづいて、エストロゲン合成の中心的な標的臓器である卵巣作用に焦点を絞り解析を検討した。実際に卵巣での内在性の ER の発現を抗体染色により時系列的に検討すると、出産後 0 日目の卵巣では ER の発現はほとんど確認できず、その後 6 日目の卵巣の卵胞組織周辺に ER β が ER α より強く発現していることがわかる(図 6)。それ故、より特異性が高



く安定的なデータがとれる系を検討するために、組織特異的なプロモーターに Cre を発現できる遺伝子改変マウスによる交配する系についても検討した。卵巣組織の卵胞および卵球細胞近位で発現し卵子を保護している Zona Pellucidae と呼ばれるカプセル様の形態を示すタンパク質は主に 3 種類から構成されており、その内の 1 つである ZP3 と呼ばれるタンパク質のプロモーター支配下に組換え酵素である Cre を融合させたマウスを得て、Cre の時期・組織特異性の検討を上述と同様にテスターマウスと交配することにより、X-gal 染色を検討した結果、生後 2-6 日目の胎児卵巣で X-gal 染色ポジティブである青色の染色が確認され、極めて卵巣の卵胞源基特異的な発現をすることを確認した(図 7)。この ZP3-Cre マウスと



エストロゲンシグナルを活性化可能な cTg マウスを交配することにより、卵巣組織特異的に過剰なエストロゲンシグナルの付加を生体内で検討した。少なくとも caER α と ZP3-Cre マウスの交配により

両方の遺伝子をもった 3 週齢マウス卵巣において、ヒト ER α の抗体染色により異所的な卵胞周辺組織での発現を確認した。

D. 考察

エストロゲンと卵巣機能に関しては、ほ乳類であるマウスにおいては胎生 14 日胚からエストロゲンレセプターが発現し始め、卵巣の発達に伴い生後 11 日前後からエストロゲンの生合成が始まると考えられる。さらに雌性の二次成長に伴い卵巣が発達し、性周期により他のホルモンと厳密に相互作用しながら制御することにより、女性生殖を維持していることが考えられている。とりわけ老年病との関連について考えると、女性の閉経後における生体変化は極めて重要な問題であり、骨粗鬆症、血管疾患、およびホルモン依存性ガン等と深く関連することが示唆されている。

本研究により、エストロゲンシグナルが卵巣機能の黄体化作用に関与することが示唆され、下流応答遺伝子の 1 つである PR の発現を制御していることが推測される。1 つのモデルとして、卵巣においてエストロゲンシグナルがプロゲステロンシグナルを階層的に制御する可能性を示唆している(図 10)。また、エストロゲンレセプターの下流応答遺伝子である EBAG9、および *efp* についても、生体内で過剰な ER α シグナル付加することにより転写を上昇させることが示唆された。とりわけ、*efp* は乳癌の細胞増殖における重要な因子であることを研究代表者および分担者により既に報告しており、ガンとの関連について生体内での作用メカニズムを解明することは重要と考えられる。

発生初期からエストロゲンシグナルが過剰に付加された場合、ほとんどのマウスでメンデル法則から逸脱して胎生期に致死となることが示唆されたが、妊娠

期にエストロゲンシグナルが細胞増殖・分化に関与する可能性が示唆された。実際、エストロゲンシグナルが欠如した ER KO マウスにおいて、ER α KO では受精障害、性周期の異常、排卵障害等が報告、ER β KO では排卵障害、出産数の減少等が報告されており、エストロゲンシグナルの卵巣機能を解析していくためには、時系列的に解析を検討していく必要性が示唆された。

これらの研究を発展させるためには、エストロゲンシグナルの作用機序はいまだに未知の機能が多く存在し、個々の疾患に焦点を絞り、標的臓器・時間軸を換えて疾患モデルマウスを応用して本来エストロゲンが持つ生体作用を明確する必要があると考えられる。さらに、1 つのステロイドシグナルの減衰・破綻による病態メカニズムを理解するためには、生体内で総合的にステロイドシグナルの相互作用・制御機構を解明することが、新しい老年病の予防・治療法の開発を行うのに必須と考えられる。

E. 結論

研究課題である“老化と老年病の疾患モデル動物の開発とその応用”に対する観点から、エストロゲンシグナルをリガンド非依存的に活性化できる遺伝子改変マウスを作製し、生きた試薬を準備することができた。コンディショナルトランスジェニック(cTg)マウスについては、それぞれ *caER α* および *caER β* について数ラインのトランスジェニックマウスが得られた。発生初期からエストロゲンシグナルを過剰に付加するとほとんどのマウスでメンデル法則を逸脱し、胎生期で致死となることがわかった。エストロゲン合成の主要組織である卵巣で特異的にエストロゲンシグナルを付加する系を確立し、異所性のエストロゲンシグナルを付加することが可能であった。また、これらのトランスジェニックマウスをコンデ

ィショナルに過剰発現をさせる系を確立したが、*in vivo* でより組織特異性・時間軸を制御可能な系を開発し特定疾患に焦点を絞った cTg マウスの過剰発現系の確立が必須と考えられた。

今後の研究の方向性として、これらの遺伝子改変マウスを利用し、病態のメカニズム、治療法への応用性、老年病の治療効果およびそのリスクについて生体内で総合的に検討することは、治療法への新たなコンセプトの提案および新薬の開発に必須と考えられる。

F. 研究発表

1. 発表論文

1. Kawakami Y, Tsukui T, Ng JK, Izpisua Belmonte JC: Pattern Formation in Vertebrate Development, section in "Insights into the Molecular Basis of Vertebrate Forelimb and Hindlimb identity" *Oxford University Press*, London, 198-213, 2003.
 2. Fukuda A, Tokonabe S, Hamada M, Matsumoto M, Tsukui T, Nogi Y, Hisatake K: Alleviation of PC4-mediated transcriptional repression by the ERCC3 helicase activity of general transcription factor TFIIH. *J Biol Chem* 278, 14827-14831, 2003.
 3. Fukuda A, Nakadai T, Shimada M, Tsukui T, Matsumoto M, Nogi Y, Meisterernst M, Hisatake K: Transcriptional coactivator PC4 stimulates promoter escape and facilitates transcriptional synergy by GAL4-VP16. *Mol Cell Biol* 24, 6525-6535, 2004.
 4. Ikeda K, Ogawa, S., Tsukui T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kato S, Muramatsu M, Inoue S: Protein Phosphatase 5 Is a Negative Regulator of Estrogen Receptor-mediated Transcription. *Mol Endocrinol* 18, 1131-1143, 2004.
2. 学会発表
【国内学会】
 1. 津久井通、今澤由紀子、大羽沙弥佳、浦野友彦、藤田雅代、佐藤美幸、村松正實、井上聡：BGP コンディショナルトランスジェニックマウスにおける骨代謝の解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会
 2. 藤田雅代、浦野友彦、堀江公仁子、池田和博、津久井通、大内尉義、井上聡：骨芽細胞におけるエストロゲン分子標的の検索と機能解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会
 3. 市川智恵、堀江公仁子、津久井通、堺隆一、井上聡：プロテオーム解析による骨芽細胞様細胞におけるビタミン K 分子標的の同定 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会
 4. 大羽沙弥佳、津久井通、今澤由紀子、池田和博、堀江公仁子、久武幸司、禾泰壽、村松正實、井上聡：ER α および ER β の生体内 Gain of function による生殖機能の解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会
 5. 池田和博、菱沼俊樹、大羽沙弥佳、津久井通、村松正實、井上聡：ラット脳におけるエストロゲン標的遺伝子網羅的検索 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会
 6. 津久井通、井上聡：BGP コンディショナルトランスジェニックマウスにおける骨代謝の解析 (2004.2.14) 第 7 回 Vitamin K & Bone 研究会 (東京)
 7. 津久井通、今澤由紀子、大羽沙弥佳、藤田雅代、浦野友彦、村松正實、井上聡：BGP コンディショナルトランスジェニックマウスにおける骨代謝の解析 (2004.11.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 8. 今澤由紀子、津久井通、大羽沙弥佳、栗原真紀、堀江公仁子、村松正實、井上聡：Cre/LoxP システムを用いた骨代謝におけるエストロゲンシグナルの解

- 析 (2004.11.8-11) 第 27 回日本分子生物学学会年会 (神戸)
9. 大羽沙弥佳、津久井通、今澤由紀子、池田和博、堀江公仁子、久武幸司、禾泰壽、村松正實、井上聡：トランスジェニックマウスを用いた卵巣におけるエストロゲンシグナルの解析 (2004.11.8-11) 第 27 回日本分子生物学
- 会年会 (神戸)
10. 津久井通、大羽沙弥佳、今澤由紀子、井上聡：Analysis of ovarian function in conditional transgenic mice by overexpressed ER α and ER β . (2005. 1.22-23) 平成 16 年度 特定領域研究国際シンポジウム

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

IV-	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
1	Horie K, Urano T, Ikeda K, Inoue S	Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth.	<i>J Steroid Biochem Mol Biol</i>	85	101-104	2003
5	Takahashi S, Urano T, Tsuchiya F, Fujimura T, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S	EBAG9/RCAS1 expression and its prognostic significance in prostatic cancer.	<i>Int J Cancer</i>	106	310-315	2003
11	Tsurusaki T, Aoki D, Kanetake H, Inoue S, Muramatsu M, Hishikawa Y, Koji T	Zone-dependent expression of estrogen receptor alpha and beta in human benign prostatic hyperplasia.	<i>J Clin Endocrinol Metab</i>	88	1333-1340	2003
19	Aoki T, Inoue S, Imamura H, Fukushima J, Takahashi S, Urano T, Hasegawa K, Ogushi T, Ouchi Y, Makuuchi M	EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma: Correlation with tumour dedifferentiation and proliferation.	<i>Eur J Cancer</i>	39	1552-1561	2003
29	Inoue H, Shimizu I, Lu G, Itonaga M, Cui X, Okamura Y, Shono M, Honda H, Inoue S, Muramatsu M, Ito S	Idoxifene and estradiol enhance antipoptotic activity through estrogen receptor-beta in cultured rat hepatocytes.	<i>Dig Dis Sci</i>	48	570-580	2003
40	Horie K, Urano T, Inoue S	Efp as a new molecular target for breast cancer therapy.	<i>Anticancer Drugs</i>	14	1-2	2003
42	Okada A, Ohta Y, Inoue S, Hiroi H, Muramatsu M, Iguchi T	Expression of estrogen, progesterone and androgen receptors in the oviduct of developing, cycling and pre-implantation rats.	<i>J Mol Endocrinol</i>	30	301-315	2003
57	Kawabata W, Suzuki T, Moriya T, Fujimori K, Naganuma H, Inoue S, Kinouchi Y, Kameyama K, Takami H, Shimosegawa T, Sasano H	Estrogen receptor (alpha and beta) and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 thyroid disorders.	<i>Modern Pathology</i>	16	437-444	2003
65	Tabb MM, Sun A, Zhou C, Grun F, Errandi JL, Romero KM, Pham H, Inoue S, Mallick S, Lin M, Forman BM, Blumberg B	Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor, SXR.	<i>J Biol Chem</i>	278	43919-43927	2003
74	Ezura Y, Nakajima T, Kajita M, Ishida R, Inoue S, Yoshida H, Suzuki T, Shiraki M, Hosoi T, Orimo H, Emi M	Association of molecular variants, haplotypes, and linkage disequilibrium within the human vitamin D-binding protein (DBP) gene with postmenopausal bone mineral density.	<i>J Bone Miner Res</i>	18	1642-1649	2003

82	Iwasaki H, Emi M, Ezura Y, Ishida R, Kajita M, Kodaira M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Swensen J, Orimo H	Association of a Trp16Ser variation in the gonadotropin releasing hormone (GnRH) signal peptide with bone mineral density, revealed by SNP-dependent PCR (Sd-PCR) Typing.	<i>Bone</i>	32	185-190	2003
88	Hoshino S, Hosoi T, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S	Association of Tumor Necrosis Factor 1 (TNFR1) gene polymorphism with bone mineral density.	<i>Geriatric Gerontol Int</i>	3	101-105	2003
93	Urano T, Shiraki M, Ezura Y, Fujita M, Sekine E, Hoshino S, Hosoi T, Orimo H, Emi M, Ouchi Y, Inoue S	Association of a single nucleotide polymorphism in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density.	<i>J Bone Miner Metab</i>	22	341-345	2004
98	Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kato S, Muramatsu M, Inoue S	Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription.	<i>Mol Endocrinol</i>	18	1131-1143	2004
111	Horie-Inoue K, Bono H, Okazaki Y, Inoue S	Identification and functional analysis of consensus androgen response elements in human prostate cancer cells.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	325	1312-1317	2004
117	Tamura N, Hishikawa Y, Ejima K, Nagasue N, Inoue S, Muramatsu M, Hayashi T, Koji T	Estrogen receptor-associated expression of keratinocyte growth factor and its possible role in the inhibition of apoptosis human breast cancer.	<i>Lab Invest</i>	84	1460-1471	2004
129	Shimada N, Suzuki T, Inoue S, Kato K, Imatani A, Sekine H, Ohara S, Shimosegawa T, Sasano H	Systemic distribution of estrogen-responsive finger protein (Efp) in human tissues.	<i>Mol Cell Endocrinol</i>	218	147-153	2004
136	Akahira J, Sugihashi Y, Suzuki T, Ito K, Niikura H, Moriya T, Nitta M, Okamura H, Inoue S, Sasano H, Okamura K, Yaegashi N	Decreased expression of 14-3-3 sigma is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer: its correlation with aberrant DNA methylation.	<i>Clin Cancer Res</i>	10	2687-2693	2004
143	Akahira J, Aoki M, Suzuki T, Moriya T, Niikura H, Ito K, Inoue S, Okamura K, Sasano H, Yaegashi N	Expression of EBAG9/RCAS1 is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer.	<i>Br J Cancer</i>	90	2197-2202	2004
149	Urano T, Takahashi S, Suzuki T, Fujimura T, Fujita M, Kumagai J, Horie-Inoue K, Sasano H, Kitamura T, Ouchi Y, Inoue S	14-3-3sigma is down-regulated in human prostate cancer.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	319	795-800	2004

155	Fujita M, Urano T, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S	Association of a single nucleotide polymorphism in the secreted frizzled related protein 4 (sFRP4) gene with bone mineral density.	<i>Geriatr Gerontol Int</i>	4	175-180	2004
161	Acconcia F, Totta P, Ogawa S, Cardillo I, Inoue S, Leone S, Trentalance A, Muramatsu M, Mario M	Survival versus apoptotic 17beta-estradiol effect: Role of ER alpha and ER beta activated non-genomic signaling.	<i>J Cell Physiol</i>	203	193-201	2005
170	Ikeda K, Inoue S	Estrogen receptors and their downstream targets in cancer.	<i>Arch Histol Cytol</i>	in press		
178	Ogushi T, Takahashi S, Takeuchi T, Urano T, Horie-Inoue K, Kumagai J, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S	Estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 is a tumor-promoting and prognostic factor for renal cell carcinoma.	<i>Cancer Res</i>	in press		
201	Urano T, Shiraki M, Fujita M, Hosoi T, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S	Association of a single nucleotide polymorphism in the lipoxxygenase ALOX15 5'-flanking region (-5229G/A) with bone mineral density.	<i>J Bone Miner Metab</i>	in press		
213	Watanabe T, Akishita M, He H, Miyahara Y, Nagano K, Nakaoka T, Yamashita N, Kozaki K, Ouchi Y	17beta-Estradiol inhibits cardiac fibroblast growth through both subtypes of estrogen receptor.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	311	454-459	2003
219	Watanabe T, Akishita M, Nakaoka T, Kozaki K, Miyahara Y, He H, Ohike Y, Ogita T, Inoue S, Muramatsu M, Yamashita N, Ouchi Y	Estrogen receptor beta mediates the inhibitory effect of estradiol on vascular muscle cell proliferation.	<i>Cardiovasc Res</i>	59	734-744	2003
230	Nakamura T, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Orimo H, Ouchi Y	Influence of sex and estrogen on vitamin D-induced arterial calcification in rats.	<i>Geriatr Gerontol Int</i>	3	145-149	2003
235	Akishita M, Yamada S, Nishiya H, Sonohara K, Ohni M, Toba K	Testosterone and comprehensive geriatric assessment in frail elderly men.	<i>J Am Geriatr Soc</i>	51	1324-1326	2003
238	Watanabe T, Akishita M, Nakaoka T, He H, Miyahara Y, Yamashita N, Wada Y, Aburatani H, Yoshizumi M, Kozaki K, Ouchi Y	Caveolin-1, Id3a and two LIM protein genes are upregulated by estrogen in vascular smooth muscle cells.	<i>Life Sci</i>	75	1219-1229	2004
249	Watanabe T, Miyahara Y, Akishita M, Nakaoka T, Yamashita N, Iijima K, Kim H, Kozaki K, Ouchi Y	Inhibitory effect of low-dose estrogen on neointimal formation after balloon injury of rat carotid artery.	<i>Eur J Pharmacol</i>	502	265-270	2004
255	Kobayashi K, Akishita M, Yu W, Hashimoto M, Ohni M, Toba K	Interrelationship between non-invasive measurements of atherosclerosis; flow-mediated dilation of brachial artery, carotid intima-media thickness and pulse wave velocity.	<i>Atherosclerosis</i>	173	13-18	2004

261	Nagai K, Akishita M, Machida A, Sonohara K, Ohni M, Toba K	Correlation between pulse wave velocity and cognitive function in non-vascular dementia.	<i>J Am Geriatr Soc</i>	52	1037-1038	2004
263	Akishita M, Yamada S, Nishiya H, Sonohara K, Nakai R, Toba K	Effects of physical exercise on plasma concentrations of sex hormones in elderly women with dementia.	<i>J Am Geriatr Soc</i>	in press		
266	Huang J, Asawa T, Takato T, Sakai R	Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma.	<i>J Biol Chem</i>	278	48367-48376	2003
276	Tanaka M, Ohashi R, Nakamura R, Shinmura K, Kamo T, Sakai R, Sugimura H	Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2.	<i>EMBO J</i>	23	1075-1088	2004
290	Azuma K, Horie K, Inoue S, Ouchi Y, Sakai R	Analysis of estrogen receptor alpha signaling complex at the plasma membrane.	<i>FEBS Lett</i>	577	339-344	2004
296	Miyamoto Y, Chen L, Sato M, Sokabe M, Nabeshima T, Pawson T, Sakai R, Mori M	Hippocampal Synaptic Modulation by the Phosphotyrosine Adapter Protein ShcC/N-Shc via Interaction with the NMDA Receptor.	<i>J Neuroscience</i>	25	1826-1835	2005
306	Miyake I, Hakomori Y, Musu Y, Nakadate H, Matsuura N, Sakamoto M, Sakai R	Domain-specific function of ShcC docking protein in neuroblastoma cells.	<i>Oncogene</i>	in press		
316	Azuma K, Tanaka M, Uekita T, Inoue S, Yokota J, Ouchi Y, Sakai R	Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma.	<i>Oncogene</i>	in press		
327	Ikeda K, Arao Y, Otsuka H, Kikuchi A, Kayama F	Estrogen and phytoestrogen regulate the mRNA expression of adrenomedullin and adrenomedullin receptor components in the rat uterus.	<i>Mol Cell Endocrinol</i>	223	27-34	2004
335	Arao Y, Kikuchi A, Kishida M, Yonekura M, Inoue A, Yasuda S, Wada S, Ikeda K, Kayama F	Stability of A+U-rich element binding factor 1 (AUF1)-binding messenger ribonucleic acid correlates with the subcellular re-localization of AUF1 in the rat uterus upon estrogen treatment.	<i>Mol Endocrinol</i>	18	2255-2267	2004
348	Ikeda K, Inoue S, Muramatsu M	RING finger-B box-coiled coil (RBCC) proteins as ubiquitin ligase in the control of protein degradation and gene regulation.	<i>Zinc Finger Proteins: from Atomic Contact to Cellular Function</i>	in press		
356	Murata H, Ihara Y, Nakamura H, Yodoi J, Sumikawa K, Kondo T	Glutaredoxin exerts anti-apoptotic effect by regulating redox state of Akt.	<i>J Biol Chem</i>	278	50226-50233	2003

364	Yasuoka C, Ihara Y, Ikeda S, Miyahara Y, Kondo T, Kohno S	Antiapoptotic activity of Akt is down-regulated by Ca ²⁺ in myocardial H9c2 cell. _ Evidence of Ca ²⁺ -dependent regulation of protein phosphatase 2Ac.	<i>J Biol Chem</i>	279	51182-51192	2004
375	Kamada K, Goto S, Okunaga T, Ihara Y, Tsuji K, Kawai Y, Uchida K, Osawa T, Matsuo T, Nagata I, Kondo T	Nuclear glutathione prevents apoptosis by reducing the oxidative stress-induced pS-transferase formation of exocyclic DNA adducts.	<i>Free Radical Biol Med</i>	37	1875-1884	2004
385	Matsumoto T, Takeyama K, Sato T, Kato S	Androgen receptor functions from reverse genetic models.	<i>J Steroid Biochem Mol Biol</i>	85	95-99	2003
390	Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S	Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor.	<i>Nature</i>	423	545-550	2003
396	Murayama A, Kim M, Yanagisawa J, Takeyama K, Kato S	Ligand-induced transrepression by a nuclear receptor mediated by a bHLH-type activator through co-regulator switching.	<i>EMBO J</i>	21	1598-1608	2004
407	Takeyama K, Ito S, Sawatsubashi S, Shirode Y, Yamamoto A, Suzuki E, Maki A, Yamagata K, Zhao Y, Kouzmenko A, Tabata T, Kato S	A novel genetic system for analysis of co-activators for the N-terminal transactivation function domain of the human androgen receptor.	<i>Biosci Biotechnol Biochem</i>	68	1209-1215	2004
414	Kato S, Matsumoto T, Kawano H, Sato T, Takeyama K	Function of androgen receptor in gene regulations.	<i>J Steroid Biochem Mol Biol</i>	89-90	627-633	2004
421	Ito S, Takeyama K, Yamamoto A, Sawatsubashi S, Shirode Y, Kouzmenko A, Tabata T, Kato S	In vivo potentiation of human oestrogen receptor alpha by Cdk7-mediated phosphorylation.	<i>Genes to Cells</i>	9	983-992	2004
431	Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, Kato S	Wnt/beta -catenin and estrogen signaling converge in vivo.	<i>J Biol Chem</i>	279	40255-40258	2004
435	Fujita T, Kobayashi Y, Wada O, Tateishi Y, Kitada L, Yamamoto Y, Takashima H, Murayama A, Yano T, Baba T, Kato S, Kawabe YI, Yanagisawa J	Full activation of estrogen receptor alpha (ER alpha) activation function-1 (AF-1) induces proliferation of breast cancer cells.	<i>J Biol Chem</i>	278	26704-26714	2003

446	Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, Mezaki Y, Uematsu Y, Matsui D, Ogawa S, Unno K, Okubo M, Tokita A, Nakagawa T, Ito T, Ishimi Y, Nagasawa H, Matsumoto T, Yanagisawa J, Kato S	The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome.	<i>Cell</i>	113	905-917	2003
459	Tateishi Y, Kawabe Y, Chiba T, Murata S, Ichikawa K, Murayama A, Tanaka K, Baba T, Kato S, Yanagisawa J	Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor.	<i>EMBO J</i>	23	4813-4823	2004
470	Wada O, Oishi H, Takada I, Yanagisawa J, Yano T, Kato S	BRCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220.	<i>Oncogene</i>	23	6000-6005	2004
476	Fukuda A, Tokonabe S, Hamada M, Matsumoto M, Tsukui T, Nogi Y, Hisatake K	Alleviation of PC4-mediated transcriptional repression by the ERCC3 helicase activity of general transcription factor TFIID.	<i>J Biol Chem</i>	278	14827-14831	2003
481	Fukuda A, Nakadai T, Shimada M, Tsukui T, Matsumoto M, Nogi Y, Meisterernst M, Hisatake K	Transcriptional coactivator PC4 stimulates promoter escape and facilitates transcriptional synergy by GAL4-VP16.	<i>Mol Cell Biol</i>	24	6525-6535	2004

刊行物の別刷



Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth[☆]

Kuniko Horie^a, Tomohiko Urano^b, Kazuhiro Ikeda^a, Satoshi Inoue^{a,b,*}

^a Research Center for Genomic Medicine, Saitama Medical School, 1397-1 Yamane, Hidaka-shi, Saitama 350-1241, Japan

^b Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

Abstract

Most of the breast cancers initially respond to endocrine therapy that reduces the levels of estrogens or competes with estrogen for binding to its receptor. Most of the patients, however, acquire resistance to endocrine therapy with tamoxifen and aromatase inhibitors later. We assumed that identification of estrogen-responsive genes those regulate the growth of breast cancer is indispensable to develop new strategies targeting the genes and overcome the resistance to current endocrine therapy. Estrogen-responsive finger protein (Efp) is one of the estrogen receptor (ER)-target genes we have cloned using genomic binding site cloning. Efp features a structure of the RING-finger B-box coiled-coil (RBCC) motif. We postulated that Efp is a critical factor in proliferation of breast tumors. In a model system using MCF7 cells grown in xenografts, we showed that inhibition of Efp expression by antisense oligonucleotide reduced the tumor growth. MCF7 cells overexpressing Efp formed tumors in xenografts even in estrogen deprivation environment. By yeast two-hybrid screen, we identified that Efp interacts with 14-3-3 σ , which is known as a cell cycle brake that causes G2 arrest and expressed in normal mammary glands. In vitro studies have revealed that Efp functions as a ubiquitin-protein ligase (E3) that targets 14-3-3 σ . These data suggest that Efp controls breast cancer growth through ubiquitin-dependent proteolysis of 14-3-3 σ . Future studies may provide a new therapy to block breast tumor proliferation by targeting Efp.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Breast cancer; Endocrine therapy; Estrogen; Efp; RING finger; RBCC motif; Ubiquitin-protein ligase (E3); 14-3-3 σ

1. Introduction

Breast cancer is the most common type of cancer in female and continues to be a major cancer death among women in the western world. Although primary treatment of breast cancer is surgical removal of the tumor, patients treated by surgery alone are likely to be further suffered from recurrent and metastatic disease. More than 100 years ago, removal of ovaries had been found to be effective in remission of metastatic breast cancer [1]. The ovarian hormone estrogen was discovered to stimulate breast tumor growth. Efforts had been made thereafter to establish endocrine therapy to inhibit estrogen actions or estrogen synthesis [2] (Fig. 1). The endocrine therapy since the 1940s, and tamoxifen in particular, has revolutionized the treatment of breast cancer.

The direct effect of estrogens on estrogen-responsive tissues are mediated via the estrogen receptors (ERs), namely ER α and ER β , in low levels in normal mammary gland tissue and in higher concentrations in about two-third of human

breast cancers [3]. It is known that most of the ER-positive breast cancers are primarily responsive to endocrine therapy. Tamoxifen, which is one of the selective estrogen receptor modulators or SERMs, was first used in the treatment of metastatic breast cancer, and now the first choice of adjuvant treatment after surgery [4].

In postmenopausal women, local estrogen synthesis is important in tumor progression because of cease of ovarian function. Aromatase in breast tissue is responsible for local estrogen synthesis [5]. Aromatase inhibitors such as anastrozole and letrozole are now being used as second- and third-line agents in endocrine therapy, once resistance to tamoxifen has developed [2].

In spite of all strategies of endocrine therapy, however, a substantial proportion of patients with breast cancers eventually acquire resistance against those treatment. Current antiestrogenic agents are not originally beneficial to patients with ER-negative breast tumors. Several critical side effects due to tamoxifen therapy are reported, including development of endometrial cancer or an increased incidence of venous thrombosis and strokes [4]. Aromatase inhibitors such as anastrozole have fewer thromboembolic and vaginal bleeding episodes than tamoxifen, yet have side effects including hot flashes, vaginal dryness, osteoporotic fractures, nausea, and gastrointestinal disturbances [6–8]. Thus, we need to

[☆] Presented at the 11th International Congress on Hormonal Steroids and 7th International Congress on Hormones and Cancer (Fukuoka, Japan, 21–25 October 2002).

* Corresponding author. Tel.: +81-429-85-7206; fax: +81-429-85-7209.
E-mail address: inoue-ger@h.u-tokyo.ac.jp (S. Inoue).

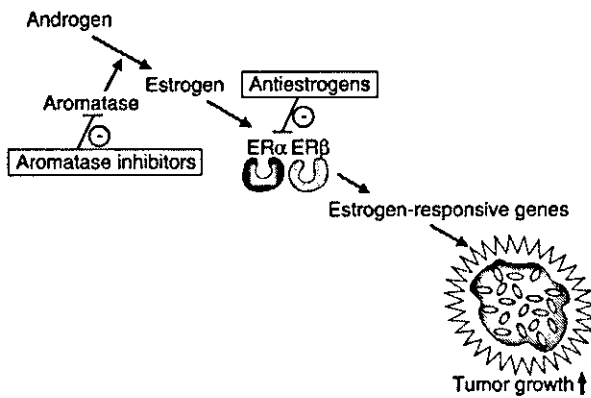


Fig. 1. Antiestrogenic drugs in cascade of estrogen action.

develop new agents that can overcome the resistance against today's endocrine therapy and have minimal side effects. Elucidation of precise estrogen/ER signaling pathway may give us some clues to develop future endocrine therapy.

2. Efp as an estrogen-responsive gene

Our group identified several downstream genes of ER that include estrogen-responsive elements in their promoter-enhancer regions, using genomic-binding site cloning

technique that we previously designed [9,10]. We specially interested in one of the ER-downstream molecules, Efp or estrogen-responsive finger protein [11], containing a RING finger, two B-boxes, a α -helical coiled-coil domain, and C-terminal SPRY domain (Fig. 2A). The structure of Efp has the RING-finger B-box-coiled-coil motif or RBCC [9]. The RING finger features a set of cysteine and histidine residues that have a distinctive spacing owing to their roles as the ligands of two zinc ions that stabilize a characteristic globular conformation (Fig. 2B) [12]. It is notable that several RING finger proteins are known to be responsible for some malignant tumors (Fig. 3). For example, PML is responsible for acute promyelocytic leukemia when it forms a fusion protein with retinoic acid receptor (RAR) α [13], or loss of the tumor suppressor BRCA1 results in chromosomal instability leading to development of familial breast and ovarian cancers [14].

Efp is predominantly expressed in estrogen target tissues including mammary glands, uteri, and osteoblasts [15,16], and also in breast cancers [17]. Efp is essential for growth of female organs such as uteri, since mice deficient in Efp gene have underdeveloped uteri [18].

To investigate a role of Efp in breast tumor growth, we performed experiments to examine the effects of Efp antisense oligonucleotide on tumor formation in female nude mice inoculated with human breast cancer MCF7 cells [19]. When the tumor volume reached 300 mm³, mice were treated with

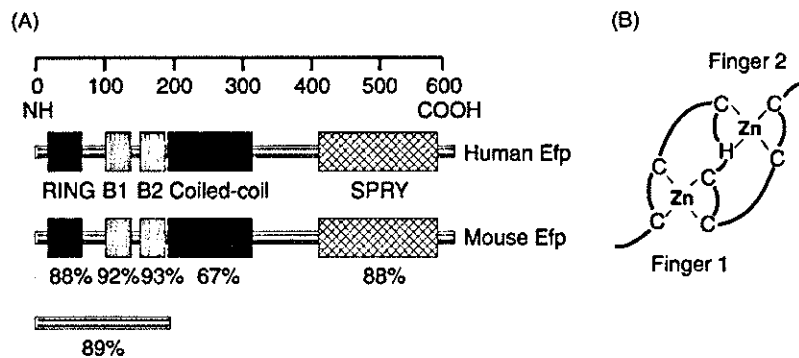


Fig. 2. Structure of Efp: (A) domain structure of human Efp and mouse Efp; (B) structure of RING finger motif.

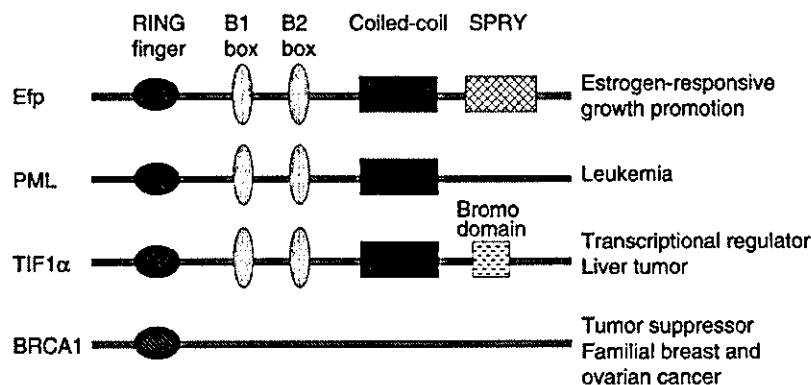


Fig. 3. Several members of RING finger family.

ovariectomy or with antisense/sense Efp oligonucleotides. Efp antisense oligonucleotide as well as ovariectomy efficiently reduced the size of tumor generated by MCF7 cells in the recipient mice. We postulated that Efp is an oncogenic factor in breast cancers.

MCF7 cells are originally ER-positive and can initially proliferate in the presence of estrogen. We next examined whether MCF7 cells can grow even in estrogen deprived environment by Efp overexpression. MCF7 cells stably expressing Efp (Efp-MCF7) could proliferate even in mice treated with ovariectomy. Cell cycle analysis revealed that a higher ratio of Efp-MCF7 cells were in the proliferating stage compared to control MCF7 cells transfected with vector alone (30–35% versus 10–15%). It is also notable that endogenous levels of negative regulators of cell cycle progression such as p21^{Cip1} and 14-3-3 σ were reduced in Efp-MCF7 cells as compared with control MCF7 cells. Those results give us a notion that elevated levels of Efp promote cell growth of breast cancer, indicating that Efp might directly regulate the cell cycle machinery.

3. Mechanism of Efp function in cell cycle progression

We next assessed the molecular mechanism of Efp in cell cycle progression. As a first step, we performed yeast two-hybrid screening from a mouse embryo cDNA library using Efp as a bait. These screens led to the identification of 14-3-3 σ as an interacting clone with Efp [19]. 14-3-3 σ is a cell cycle brake that causes G2 arrest by sequestering cdc2 in the cytoplasm [20]. Although 14-3-3 σ is well expressed in epithelial cells of normal mammary glands, reduced levels of 14-3-3 σ seem to be related to breast malignancy, as

downregulation of the protein [21] or hypermethylation of its promoter region [22] is reported in breast cancer.

Since we found that 14-3-3 σ is an interacting clone of Efp and the amount of 14-3-3 σ was reduced in Efp-MCF7 cells, we investigated whether Efp directly regulates the activity of 14-3-3 σ . When we expressed Efp and 14-3-3 σ in COS7 cells, the two proteins colocalized in the cytoplasm and the protein–protein interaction of those proteins was confirmed by immunoprecipitation. Co-transfection of Efp and 14-3-3 σ resulted in lower levels of 14-3-3 σ protein compared with cells transfected with 14-3-3 σ alone. We identified that the B-box coiled-coil domain in Efp is the motif that specially interacts with 14-3-3 σ .

Recent advances of molecular research have revealed that a large number of RING finger proteins function as ubiquitin-protein ligases or E3s in the ubiquitination signaling pathway [13]. Ubiquitination regulates a variety of cellular functions, frequently by mediating the selective degradation of master regulatory proteins by proteasomes. The ubiquitin-dependent proteolysis is important to eliminate misfolded or abnormal proteins as well as to confer short half-lives on specific normal proteins such as mitotic cyclins whose critical concentrations must change promptly with alterations in the state of a cell. We hypothesized that Efp functions as an E3 that ubiquitinates 14-3-3 σ (Fig. 4). By pulse and chase experiments, we confirmed that the degradation rate of 14-3-3 σ protein was explicitly enhanced in Efp-MCF7 cells. The protein breakdown of 14-3-3 σ is proteasome-dependent because a proteasome inhibitor MG132 increased the amount of 14-3-3 σ protein binding to Efp. Finally, we confirmed that Efp directly degrades 14-3-3 σ through a ubiquitin-dependent pathway in which Efp functions as an E3.

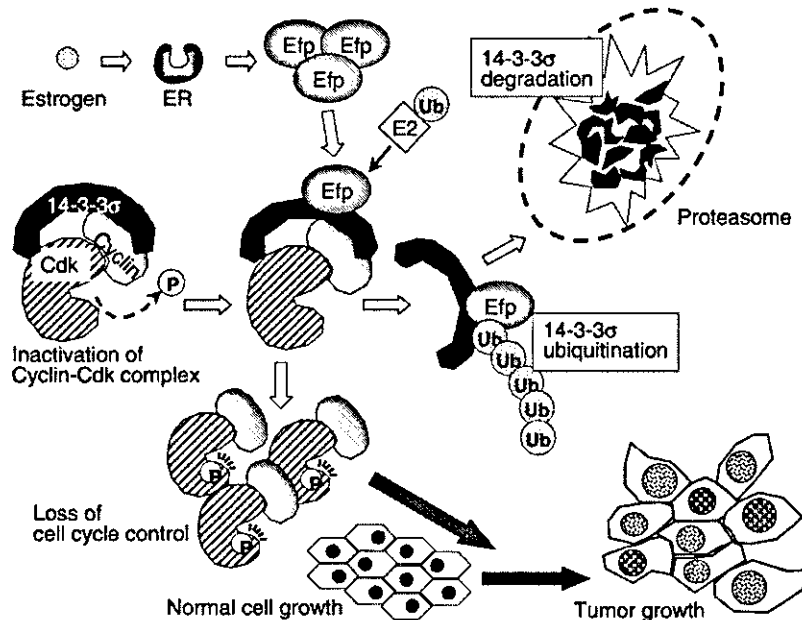


Fig. 4. Estrogen-responsive RING finger protein Efp targets 14-3-3 σ for proteolysis as a ubiquitin ligase and stimulates tumor growth.

4. Perspective

Our experimental data suggest that Efp may provide unlimited proliferation of breast cancer cells by accelerated destruction of 14-3-3 σ . It is intriguing that Efp might proliferate breast tumor in an estrogen deprivation environment although Efp has been originally identified as an estrogen-responsive gene. We speculate that overexpression of Efp might be one of the reasons for resistance to endocrine therapy. It remains to be determined whether Efp plays a similar critical role in human breast tumor progression. We anticipate that Efp could be used as a potential molecular target for clinical application that provides promising future direction of breast cancer treatment.

References

- [1] G.T. Beaten, On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: with suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases, *Lancet* 2 (1896) 104–107.
- [2] S. Ali, R.C. Combos, Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 101–112.
- [3] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials, *Lancet* 351 (1998) 1451–1467.
- [4] A. Howell, New antiestrogens: modulators of estrogen action, in: J.-M. Nabholz, K. Tonkin, M.S. Aapro, A.U. Buzdar (Eds.), *Breast Cancer Management*, Martin Dunitz Ltd., London, 2000, pp. 143–169.
- [5] J.R. Pasqualini, G. Chetrite, C. Blacker, et al., Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 (1996) 1460–1464.
- [6] A.U. Buzdar, G.N. Hortobagyi, Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer, in: J.-M. Nabholz, K. Tonkin, M.S. Aapro, A.U. Buzdar (Eds.), *Breast Cancer Management*, Martin Dunitz Ltd., London, 2000, pp. 171–180.
- [7] L.R. Wiseman, J.C. Adkins, Anastrozole. A review of its use in the management of postmenopausal women with advanced breast cancer, *Drugs Aging* 13 (1998) 321–332.
- [8] The ATAC Trialists' Group, Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial, *Lancet* 359 (2002) 2131–2139.
- [9] S. Inoue, S. Kondo, M. Hashimoto, et al., Isolation of estrogen receptor-binding sites in human genomic DNA, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 4091–4096.
- [10] T. Watanabe, S. Inoue, H. Hiroi, et al., Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library, *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998) 442–449.
- [11] S. Inoue, A. Orimo, T. Hosoi, et al., Genomic binding-site cloning reveals an estrogen-responsive gene that encodes a RING finger protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 11117–11121.
- [12] C.M. Pickart, Mechanisms underlying ubiquitination, *Ann. Rev. Biochem.* 70 (2001) 503–533.
- [13] K. Jensen, C. Shiels, P.S. Freemont, PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif, *Oncogene* 20 (2001) 7223–7233.
- [14] H. Ruffner, C.A. Joazeiro, D. Hemmati, et al., Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 5134–5139.
- [15] A. Orimo, S. Inoue, K. Ikeda, et al., Molecular cloning, structure, and expression of mouse estrogen-responsive finger protein Efp. Co-localization with estrogen receptor mRNA in target organs, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 24406–24413.
- [16] S. Inoue, T. Urano, S. Ogawa, et al., Molecular cloning of rat efp: expression and regulation in primary osteoblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261 (1999) 412–418.
- [17] K. Ikeda, A. Orimo, Y. Higashi, M. Muramatsu, S. Inoue, Efp as a primary estrogen-responsive gene in human breast cancer, *FEBS Lett.* 472 (2000) 9–13.
- [18] A. Orimo, S. Inoue, O. Minowa, et al., Underdeveloped uterus and reduced estrogen responsiveness in mice with disruption of the estrogen-responsive finger protein gene, which is a direct target of estrogen receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 12027–12032.
- [19] T. Urano, T. Saito, T. Tsukui, M. Fujita, T. Hosoi, M. Muramatsu, Y. Ouchi, S. Inoue, Efp targets 14-3-3 σ for proteolysis and promotes breast tumour growth, *Nature* 417 (2002) 871–875.
- [20] T.A. Chan, H. Hermeking, C. Lengauer, et al., 14-3-3 σ is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage, *Nature* 401 (1999) 616–620.
- [21] A.S. Vercoutter-Edouart, J. Lemoine, X. Le Bourhis, et al., Proteomic analysis reveals that 14-3-3 σ is down-regulated in human breast cancer cells, *Cancer Res.* 61 (2001) 76–80.
- [22] C.B. Umbricht, E. Evron, E. Gabrielson, et al., Hypermethylation of 14-3-3 σ (stratifin) is an early event in breast cancer, *Oncogene* 20 (2001) 3348–3353.

EBAG9/RCAS1 EXPRESSION AND ITS PROGNOSTIC SIGNIFICANCE IN PROSTATIC CANCER

Satoru TAKAHASHI^{1*}, Tomohiko URANO², Fujiko TSUCHIYA³, Tetsuya FUJIMURA¹, Tadaichi KITAMURA¹, Yasuyoshi OUCHI², Masami MURAMATSU³ and Satoshi INOUE^{2,3,4}

¹Department of Urology, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

²Department of Geriatric Medicine, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Japan

³Research Center for Genomic Medicine, Saitama Medical School, Hidaka-shi, Saitama, Japan

⁴CREST, Japan Science and Technology Corporation, Kawaguchi, Saitama, Japan

Estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9 (EBAG9) has been identified as a primary estrogen-responsive gene from MCF-7 human breast cancer cells (Watanabe T, et al., *Mol Cell Biol* 1998;18:442–9). EBAG9 is identical with RCAS1 (receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells), which has been reported as a cancer cell surface antigen implicated in immune escape (Nakashima M, et al., *Nat Med* 1999;5:938–42). In our present study, we examined EBAG9 expression in human prostatic tissues and investigated its prognostic significance in patients with prostatic cancer. EBAG9 expression in normal prostatic epithelial cells and PC-3, DU145 and LNCaP cancer cells was determined by Western blot analysis. Immunohistochemic analysis was performed in 21 benign and 81 malignant prostatic specimens, and patients' charts were reviewed for clinical, pathologic and survival data. EBAG9 was abundantly expressed in the prostate cancer cells compared to the normal epithelial cells. Strong and diffuse immunostaining in the cytoplasm of EBAG9 was found in 44 of 81 (54%) cancerous tissue samples. EBAG9 expression significantly correlated with advanced pathologic stages and high Gleason score ($p = 0.0305$ and < 0.0001 , respectively). EBAG9 was more frequently expressed at sites of capsular penetration (79%) and lymph node metastasis (100%) compared to intracapsular primary tumors (54%) ($p = 0.0264$ and 0.0048 , respectively). Positive EBAG9 immunoreactivity significantly correlated with poor PSA failure-free survival ($p = 0.0059$). EBAG9/RCAS1 may play a significant role in cancer progression via an immune escape system. Immunodetection of EBAG9/RCAS1 expression can be a negative prognostic indicator for patients with prostatic cancer.

© 2003 Wiley-Liss, Inc.

Key words: EBAG9; RCAS1; estrogen responsive gene; prognosis; immune escape

Estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9 (EBAG9) is an estrogen-responsive gene that has been isolated from a CpG island library of MCF-7 human breast cancer cells using a genomic binding site cloning method.¹ EBAG9 has an estrogen-responsive element (ERE) in the 5' flanking region, and its transcript is upregulated in the presence of estrogen.^{1,2} Recently, a cDNA encoding the antigen recognized by the 22-1-1 antibody, which is frequently expressed in uterine and ovarian carcinomas, has been isolated and named receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1).^{3–5} RCAS1 has been reported to be identical with EBAG9, and assumed to act as a ligand for a putative receptor present on various human cell lines and normal peripheral lymphocytes, such as T, B and natural killer (NK) cells.⁶ RCAS1 has been found to inhibit the *in vitro* growth of receptor-expressing cells and induce apoptotic cell death.^{6,7,21} Recent investigations demonstrated that EBAG9/RCAS1 was expressed in several human cancers, such as the uterine, lung, gastric, hepatic and breast cancers,^{8–14} and associated with tumor progression in some of these cancers.^{8,9,11–13} These findings suggest that tumor cells expressing EBAG9/RCAS1 may suppress clonal expansion and induce apoptosis in its receptor-positive immune cells, and subsequently evade immune surveillance.^{6,7}

Prostate cancers have an extensive variability of clinical behavior. A mechanism underlying the processes of tumor invasion and

metastasis remains unknown. Recently, a new estrogen receptor has been isolated from a cDNA library of the rat prostate, and termed estrogen receptor β (ER β).¹⁵ Several investigations, including ours, demonstrated ER β expression in human prostatic cancer,^{16–19} suggesting that estrogen-responsive genes may play a significant role in the development of prostatic cancers. In our present study, we evaluated EBAG9/RCAS1 expression in normal and malignant human prostate, and determined whether EBAG9/RCAS1 was associated with the cancer progression and prognosis.

MATERIAL AND METHODS

Antibody

Anti-EBAG9 antibody is a rabbit polyclonal antibody that has been raised against a GST-EBAG9 fusion protein.² The characterization of anti-EBAG9 polyclonal antibody was confirmed by Western blotting, and utilization of the antibody for immunohistochemistry has been previously reported.^{2,14} A monoclonal antibody for ER α (NCL-ER-6F11) was purchased from Novo-castra Laboratories (Newcastle upon Tyne, UK). A polyclonal antibody specific for ER β was raised in rabbit against synthesized peptides of the C-terminal region of ER β (CSPAEDSKSKEGSQNPQSQ).²⁰ The characterization and utilization of the antibody have been previously reported.^{19–21} A rabbit polyclonal antibody for CD3 (A0452), which recognizes T lymphocytes was obtained from DAKO (Carpinteria, CA).

Cell culture and western blot analysis

A batch of normal human prostatic epithelial cells (PrECs) were purchased from Clonetics Co. (San Diego, CA). The PrECs were cultured in PrE-basal medium supplemented with SingleQuots (Clonetics Co.) according to the manufacturer's recommended protocol. Three human prostate cancer cell lines (LNCaP, DU145 and PC-3) were purchased from American Type Culture Collec-

Abbreviations: AI, apoptotic index; EBAG9, estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9; ER, estrogen receptor; ERE, estrogen responsive element; HGPIN, high-grade prostatic intraepithelial neoplasia; NK, natural killer cells; PrECs, normal human prostatic epithelial cells; PSA, prostate-specific antigen; RCAS1, receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells; TIL, tumor-infiltrating lymphocytes.

Grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan; Grant number: 14571485.

*Correspondence to: Department of Urology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8655, Japan. Fax: +81-3-5800-8917. E-mail: takahashi-uro@h.u-tokyo.ac.jp

Received 14 August 2002; Revised 13 January 2003; Accepted 24 February 2003

DOI 10.1002/ijc.11205