

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870384

研究課題名(和文)新規basal-like乳癌サブタイプの分類と分子・細胞生物学的特性

研究課題名(英文)Classification and characterization of a novel basal-like breast cancer group.

研究代表者

伊東 潤二 (Itou, Junji)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・特定助教

研究者番号：10638844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞の性質を理解することは、癌治療を行う上で、大切である。本研究では、悪性度の高い乳癌のモデルである basal-like 乳癌細胞株において、転写因子 SALL4 依存的に増悪しているグループを新規に分類した。そして、そのグループにおいて、SALL4 が、増殖能および運動能の促進に働いていることを明らかにした。また、この新規グループの増殖能を詳細に調べるため、蛍光タンパク質を用いた新規の増殖評価系を構築した。そして、増殖の活発な乳癌細胞の集団の中に、低増殖性の細胞が必ず存在することを明らかにした。本研究成果は、今後、癌の基礎研究および癌治療に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Understanding molecular characteristics of cancer will facilitate cancer therapy. This study found a novel basal-like breast cancer cell group, the malignancy of which is regulated by a transcription factor SALL4. Knockdown experiments for SALL4 revealed that SALL4 maintains cell proliferation. In addition, SALL4 increases motility via suppression of cell-cell adhesion. These observations contribute to our understanding of basal-like breast cancer. To further study for basal-like breast cancer cells, this study established a novel fluorescent protein-based proliferation assay. This assay utilizes photoconvertible fluorescent protein, Kaede, for pulse-labeling. In our observation, there always are few non- or slow-cycling cells in basal-like breast cancer cell lines. This technique will be a useful tool for cancer researches and anti-cancer drug development.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：癌細胞 転写因子 増殖能 運動能

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞を分子・細胞レベルで解析し、その特徴を理解することは、学術的な知見を充実させるだけでなく、臨床面でも、適切な治療法の選択や、新たな治療戦略の確立を行うに当たり、重要である。

過去に、癌細胞の分子レベルの知見を得る目的で、マイクロアレイ解析などの網羅的な遺伝子発現解析が行われた。そして、発現プロファイルの違いから、癌のタイプ分けが行われるようになった。乳癌においては、発現プロファイルによるサブタイプ分類が、従来の病理学的分類とほとんど一致したことから、遺伝子発現パターンの違いによる分類は広く受け入れられた。しかし、そうして分類されたそれぞれのサブタイプの中でも、様々な性質のものが存在することが認識され始め、より詳細な分類が望まれるようになった。

乳癌の中でも、basal-like 乳癌は、特に多様なサブタイプとして知られていた。また、basal-like 乳癌は、悪性度が高く、確実な治療法が確立されていない乳癌であることから、さらなる分類と、分子・細胞生物学的特徴の解明が、社会的に求められていた。

この問題の解決のために、本研究では、basal-like 乳癌において、遺伝子発現パターンの違いを利用し、新規のグループ分けを行った。そして、転写因子 SALL4 依存的なグループを見出し、その特徴を解析した。さらに、新規に分類したグループの特徴を解析するに当たり、細胞増殖能を簡便に可視化できる評価法を確立し、新たな視点からの癌の性質の解析を可能とした。

## 2. 研究の目的

Basal-like 乳癌において、分子レベルの特徴の違いによる、新規のグループを分類することを目的とした。また、分類した新規のグループについて、その分子・細胞生物学的特徴を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)公開されている乳癌細胞株のマイクロアレイ解析のデータから、basal-like 乳癌の細胞株において、特定の細胞株群で高発現の遺伝子群を選ぶ。マイクロアレイのデータが無い遺伝子については、細胞株由来の RNA において、PCR 法により解析する。

(2)特定のグループでのみ発現が高いことが確認された遺伝子について、shRNA 法による発現抑制実験を行い、細胞レベルの変化が見られる遺伝子を選別する。細胞レベルの変化は、癌の悪性に重要であり、判別が容易な、細胞増殖能および運動能に着目して、解析する。

(3)発現抑制により、癌の悪性の低下が見られれば、その遺伝子を発現しているグループを、その遺伝子依存的なグループとして同定する。

(4)分子・細胞生物学的特徴は、発現抑制時に

見られた変化の詳細を解析することで、解明する。

(5)癌の主要な特性の一つである、細胞増殖について、蛍光イメージング法により簡便に評価できる系を確立し、新規グループの細胞増殖能を解析可能にする。

## 4. 研究成果

(1)Basal-like 乳癌の特定のグループのみで高発現の遺伝子を探索し、SUM159 や MDA-MB-231 などの細胞株が、共通する遺伝子発現パターンを有していることを見出した。その遺伝子群について、PCR 法による確認を行い、発現が確認できたものについて、shRNA 法による発現抑制実験を行った。

その結果、転写因子 SALL4 の発現抑制時に、細胞増殖能や運動能が低下することを明らかにし、SUM159 や MDA-MB-231 を含むグループを、新規に、SALL4 依存的に悪性を獲得しているグループとして分類した。(2)SALL4 依存的なグループの分子・細胞生物学的な特性を解明するために、乳癌細胞株における SALL4 の機能解析を行った。

細胞増殖については、SALL4 は、*BMI1* 遺伝子の発現を正に制御することにより、細胞増殖を正に制御していることが、胚性幹細胞や血球系細胞で報告されている。SALL4 が乳癌において同様の働きをしているのかを検証するため、SALL4 発現抑制株において *BMI1* 遺伝子の発現量を定量したところ、対照群に比べて有意に発現が低下していた。このことから、乳癌においても、SALL4 は、*BMI1* の発現制御を介して、細胞増殖を制御していることが示唆された。

本研究以前には、SALL4 が細胞運動に正に関係しているという報告が無かった。その原因として、SALL4 の発現抑制は、細胞増殖を著しく低下させるため、増殖能以外の機能解析が難しく、運動能が注目されなかったためと考えられる。本研究では、shRNA による発現抑制をドキシサイクリンで誘導できる系を確立し、細胞増殖阻害効果を回避することで、運動能の解析を可能とした。

乳癌細胞株のうち、SUM159 や MDA-MB-231 は、運動能が高く、2次元培養では、極性を持ち、各細胞同士が接着せずに分散している細胞株である。これらの細胞株において SALL4 の発現抑制を誘導したところ、細胞が極性を失い、細胞同士が接着した表現型に変化した。

このような変化から、basal-like 乳癌の間葉系細胞の性質が失われ、正常乳腺細胞が持つ上皮系の性質が現れたと考え、上皮系のマーカー遺伝子の発現を解析した。その結果、対照群では低発現の上皮系マーカー、*CDH1* 遺伝子の発現が上昇していた。*CDH1* 遺伝子は、細胞間接着に関わる E-cadherin をコードする遺伝子であり、E-cadherin の免疫染色を SALL4 抑制群で行ったところ、細胞間の接着面で、強いシグナルが観察された。

細胞が、上皮系から間葉系に移行することは、上皮-間葉転換 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) として知られている。また、basal-like 乳癌では、EMT に関係する転写因子の発現が報告されている。SALL4 抑制時の表現型から、EMT の性質が失われていることが示唆された。そこで、本研究では、SALL4 と EMT 転写因子との関係を調べるために、SALL4 抑制細胞において、EMT 転写因子の発現量を解析した。そして、乳癌において働くと報告されている EMT 転写因子の 1 つである、ZEB1 の発現が、転写レベルで低下していた。ZEB1 は、*CDH1* の発現抑制因子として知られている。そのことと本研究の結果から、SALL4 は、ZEB1 を正に制御することにより、細胞間接着を抑制していることが明らかとなった。

次に、SALL4 発現抑制時に観察される細胞同士が接着した状態が、どのように形成され、運動能が失われるのかを解明するために、動画観察を行った。その結果、運動している細胞同士が接触した時と、細胞が分裂した時に、細胞同士が離れず、その結果、運動能が失われる様子が観察された。特に、細胞分裂後は、SALL4 を抑制した細胞のほとんどが離れることがなかった。

以上の結果から、本研究でグループ分けをした basal-like 乳癌グループでは、SALL4 依存的に、その増殖能と運動能を維持しており、特に、運動能については、SALL4 の働きにより細胞間接着が抑制されることで、細胞運動が保たれていることが明らかとなった。

(3)本研究では、SALL4 依存的な乳癌グループの特性について、主に古典的な手法を用いて解析を行った。しかし、より詳細に分子・細胞生物学的な特徴を捉えるために、新規の解析方法を確立する必要があると感じるに至った。特に、細胞集団をまとめてサンプリングし、平均化されたデータを解析するよりも、個々の細胞に着目し、その挙動を解析する手法の必要性が感じられた。

そのため、本研究では、癌の主要な能力である増殖能について、蛍光タンパク質によるイメージング法を利用した、新規の増殖評価系の確立を行った。

用いた蛍光タンパク質は、短波長の光の照射により蛍光色が不可逆的に変化する、Kaede である。Kaede の蛍光色は、緑色から赤色に変化する。そのため、Kaede 発現細胞を、短波長の光で一過的に照射することで、細胞を赤色 Kaede でパルスラベルすることができる。

本研究で発案した評価法では、まず、このパルスラベル法により細胞を標識する。そして、細胞当たりの赤色 Kaede 分子の数は、細胞分裂時に娘細胞に分配され、減少することから、数日間の細胞培養後に、赤色蛍光の強度の減弱を定量し、細胞増殖を評価する。

本研究では、レンチウイルスベクターを用い、核内に限局する Kaede を発現する乳癌細胞株を樹立した。

赤色 Kaede によるラベリングには、短波長の光の照射が必要であるが、短波長の光の照射は、細胞に、DNA 損傷や熱ストレスなどを与える。そういった細胞へのダメージを抑えるため、本研究では、短波長の光の中でも比較的長い波長の光を用い、照射時間を調整することで、細胞増殖・生存・DNA 損傷・ストレス応答系に影響が無く、Kaede の色を換えることのできる条件を見出した。

次に、本評価法の有効性を示すために、細胞増殖の定量解析を行った。ラベリング直後の赤色の蛍光強度を 100% とし、数日間培養を行い、細胞数の増加に伴い、赤色の蛍光強度が低下するかどうかを解析した。その結果、細胞数が 2 倍になった時に、赤色の蛍光強度は、約 50% となっており、細胞数が 3 倍の時に、約 30% に減弱していた。

さらに、この評価法を用い、本研究で分類した新規の basal-like 乳癌グループを観察したところ、細胞増殖の様子が一樣でないことと、ほとんど増殖しない低増殖性の細胞が必ず存在することが明らかとなった。低増殖性の細胞は、薬剤抵抗性を持つ癌幹細胞とも考えられており、今後、本評価系を用いることで、新規に分類した basal-like 乳癌の特性がより詳細に解明できると期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Junji Itou, Yoshiaki Matsumoto, Kiyotsugu Yoshikawa, Masakazu Toi, Sal-like 4 (SALL4) suppresses *CDH1* expression and maintains cell dispersion in basal-like breast cancer, *FEBS Letters*, **587**: 3115-3121, 2013、査読有  
doi: 10.1016/j.febslet.2013.07.049.

Junji Itou, Sunao Tanaka, Fumiaki Sato, Ryutaro Akiyama, Yasuhiko Kawakami, Masakazu Toi, An optical labeling-based proliferation assay system reveals the paracrine effect of interleukin-6 in breast cancer, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1853**, 27-40, 2015、査読有  
doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.10.004.

〔学会発表〕(計 1 件)

第 36 回日本分子生物学会  
2013 年 12 月 3-6 日 神戸  
演者 伊東潤二、松本純明、吉川清次、戸井雅和  
タイトル 乳癌において SALL4 が制御する遺伝子群の解析  
ポスター発表

〔図書〕(計 0 件)

なし。

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

なし。

取得状況(計 0 件)

なし。

〔その他〕  
ホームページ等

なし。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊東 潤二 ( ITOU, Junji )  
京都大学・医学研究科・特定助教  
研究者番号：10638844

##### (2) 研究分担者

なし。

##### (3) 連携研究者

なし。

##### (4) 研究協力者

松本 純明 ( MATSUMOTO, Yoshiaki )