

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590087

研究課題名（和文） 乳癌におけるサイクリン D1 によるヘキソキナーゼ 2 制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the mechanisms by which cyclin D1 controls hexokinase 2 function in breast cancer.

研究代表者

酒巻 利行（SAKAMAKI TOSHIYUKI）

新潟薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00445892

研究成果の概要：ヒト乳腺上皮細胞株 MCF10A に Cyclin D1 及び Hexokinase 2 を過剰発現させた安定発現株の樹立に成功した。また、ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-453 及び SKBR3 に Cyclin D1 に対する siRNA に導入し、安定発現株を樹立した。上記の安定発現株を用いた解析の結果、Cyclin D1 が DNA メチル基転移酵素の発現に影響を及ぼす可能性が示唆され、さらに、Hexokinase 2 を含む複数の遺伝子のプロモーターのメチル化状況の網羅的な解析を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：腫瘍分子生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：遺伝子、癌、細胞・組織、シグナル伝達、蛋白質

1. 研究開始当初の背景

Cyclin D1 は 30-50%の乳癌で過剰発現が認められており、乳癌の発生に深く関与している癌遺伝子 *ERBB2* から発するシグナル伝達の重要なターゲット分子であると考えられている。しかしながら、Cyclin D1 は癌遺伝子であるとは明確に位置づけられてはおらず、乳癌の癌化における詳細な働きは未だに解明されていない。Cyclin D1 が細胞周期を制御する機能を持つことは発見当初から知られていたことだが、最近では、Cyclin D1 の新たな機能に関する報告も増えてきており、Cyclin D1 が関与する発癌に対し、これらの機能の寄与が注目されている。我々は、この Cyclin D1 の新たな機能として、

Cyclin D1 が Hexokinase 2 の発現及び活性を制御することを見出し、この機能が、Cyclin D1 が乳癌の発生に関与する上で重要な意味を持つのではないかと考えて、本研究を起案した。

2. 研究の目的

上記の Cyclin D1 が Hexokinase 2 の発現及び活性を制御するという点について、(1) Cyclin D1 が Hexokinase 2 のプロモーター活性を抑制するメカニズムとは何か、(2) Cyclin D1 の Hexokinase 2 発現抑制作用が、乳癌の癌化及び悪性化にどのような働きを持つのかという目的を設定し、本研究を開始した。

3. 研究の方法

(1)研究に使用した細胞株は、ヒト胎児腎臓細胞株 HEK293T、ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-453 及び SKBR3、ヒト乳腺上皮細胞株 MCF10A の 4 種である。HEK293T 細胞、MDA-MB-453 細胞、SKBR3 細胞は 10% FBS を添加した DMEM 培地中で、MCF10A 細胞は 5% horse serum、EGF (Epidermal Growth Factor)、insulin、hydrocortisone を添加した DMEM/F12 (1:1) 培地中でそれぞれ培養した。

(2)研究に使用したプラスミドは、pMSCV-puro、pMSCV-hyg 及び pMSCV-neo (Clontech 社)、pSilencer5.1-H1 Retro (Ambion/Applied Biosystems 社)、amphotropic helper plasmid の 5 種である。これらのプラスミドに Cyclin D1、Hexokinase 2、ErbB2 及び Cyclin D1 に対する siRNA をサブクローニングした。

(3)研究に使用した抗体は、Cyclin D1: Santa Cruz, DCS-6、Hexokinase 2: Millipore, AB1629、ErbB2: Ab-3, Calbiochem/Merck、-actin: MAB1501 である。

(4)トランスフェクションは、HEK293T 細胞にはリン酸カルシウム法で、それ以外の細胞にはリポフェクション法で行った。レトロウイルス感染方法は、HEK293T 細胞にレトロウイルスベクターとヘルパープラスミドをトランスフェクションし、12 時間後新しいメディアムに変え、さらに 36 時間培養後、レトロウイルスを含む培養上清を回収した。この培養上清をろ過した後、ポリブレンとともに感染させる細胞の培養液に加えた。

(5)ウエスタンブロッティングでは、培養した細胞を回収し Triton X-100 を含む可溶化バッファーで細胞を可溶化した後、細胞の可溶化物を用いて SDS-PAGE を行った。タンパク質を PVDF 膜に転写した後、抗体反応を行い、化学発光により反応した抗体を検出した。

(6)リアルタイム RT-PCR では、培養した細胞から Trizol を用いて RNA を抽出し、DNase 処理した後、再度 Trizol により抽出を行った。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems 社) を用いて抽出した RNA から逆転写反応を行い、SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (Takara 社) を用いてリアルタイム PCR を行った。

(7)以上の個々の実験方法を用いながら、本研究において、次のような研究を行った。MCF10A 細胞に Cyclin D1 をレトロウイルスベクターを用いて導入し、安定発現株の樹立を

試みた。また、MDA-MB-453 細胞及び SKBR3 細胞に、Cyclin D1 に対する siRNA の導入を試みた。目的(1)の Cyclin D1 による Hexokinase 2 のプロモーター活性の制御機構の解析については、上記で作製した Cyclin D1 の発現量を変化させた細胞を用いて、DNA メチル基転移酵素の発現比較、プロモーターのメチル化状況の網羅的な解析等を試みた。目的(2)に対しては、MCF10A 細胞に Cyclin D1 と Hexokinase 2 をともに過剰発現させた際に、細胞にどのような変化が起こるのかを調べるために、MCF10A 細胞に Hexokinase 2 の遺伝子導入を試みた。

4. 研究成果

(1)Cyclin D1 の安定発現株を作製するためのレトロウイルスベクターを作製した。pMSCV-puro プラスミドに、制限酵素処理した Cyclin D1 の cDNA を組み込み、シーケンス解析により正しく組み込まれたことを確認し、さらに HEK293T 細胞にトランスフェクションし、ウエスタンブロット解析により、Cyclin D1 が過剰発現することを確認した。このレトロウイルスベクター (pMSCV-Cyclin D1-puro) を用いて MCF10A 細胞に感染させ、puromycin により選別した細胞 (MCF10A/Cyclin D1) とそのコントロールベクター (pMSCV-puro) を用いて MCF10A に感染させ、puromycin により選別した細胞 (MCF10A/puro) について、ウエスタンブロッティングを行った結果、MCF10A/Cyclin D1 細胞では MCF10A/puro 細胞に比べて Cyclin D1 が過剰に発現していることが確認できた。

(2) Hexokinase 2 の安定発現株を作製するためのレトロウイルスベクターを作製した。pMSCV-hyg プラスミドに、制限酵素処理した Hexokinase 2 の cDNA を組み込み、シーケンス解析により正しく組み込まれたことを確認し、さらに HEK293T 細胞にトランスフェクションし、ウエスタンブロット解析により、Hexokinase 2 が過剰発現することを確認した。このレトロウイルスベクター (pMSCV-HK2-hyg) を用いて MCF10A 細胞に感染させ、hygromycin により選別した細胞 (MCF10A/HK2) とそのコントロールベクター (pMSCV-hyg) を用いて MCF10A に感染させ、hygromycin により選別した細胞 (MCF10A/hyg) について、ウエスタンブロッティングを行った結果、MCF10A/HK2 細胞では MCF10A/hyg 細胞に比べて Hexokinase 2 が過剰に発現していることが確認できた。

(3)Cyclin D1 siRNA の安定発現株を作製するためのレトロウイルスベクターを作製した。pSilencer5.1-H1 Retro プラスミドの添付書に従い、Cyclin D1 に対する siRNA の配列と

ヘアピン構造を作製するための配列と制限酵素認識配列を含むアダプター部位の配列を連結させた Oligo DNA を設計し、合成された Oligo をアニールした後制限酵素処理を行った。この制限酵素処理した Oligo DNA を pSilencer5.1-H1 Retro プラスミドに組み込み、シーケンス解析により正しく組み込まれたことを確認した (pSilencer5.1-H1 Retro-Cyclin D1 siRNA)。この pSilencer5.1-H1 Retro-Cyclin D1 siRNA を MDA-MB-453 細胞及び SKBR3 細胞にトランスフェクションした際に、ウエスタンブロット解析により、Cyclin D1 の発現が約 80% 抑制されることを確認した。次に Cyclin siRNA の安定発現株を得るために、pSilencer5.1-H1 Retro-Cyclin D1 siRNA と、siRNA 効果のないコントロール配列を含むコントロールプラスミド (pSilencer5.1-H1 Retro-CTL siRNA) を用いて MDA-MB-453 細胞及び SKBR3 細胞に感染させ、puromycin により選別した。pSilencer5.1-H1 Retro-Cyclin D1 siRNA を用いて得た安定発現株 (MDA-MB-453/Cyclin D1 siRNA 及び SKBR3/Cyclin D1 siRNA) と、pSilencer5.1-H1 Retro-CTL siRNA を用いて得た安定発現株 (MDA-MB-453/CTL siRNA 及び SKBR3/CTL siRNA) について、ウエスタンブロット解析を行った結果、MDA-MB-453/Cyclin D1 siRNA 細胞及び SKBR3/Cyclin D1 siRNA 細胞では、MDA-MB-453/CTL siRNA 細胞及び SKBR3/CTL siRNA 細胞に比べて Cyclin D1 の発現が約 10 ~ 30% 減少していることが確認できた。現在、siRNA の発現を高めるためにウイルス感染操作を繰り返し行うと同時に、発現抑制効果の高い Cyclin D1 siRNA の設計や siRNA を高く発現するプラスミドの選定等を行っている。

(4) 目的(1)の Cyclin D1 による Hexokinase 2 のプロモーター活性の制御機構の解析について、Cyclin D1 を過剰発現させた細胞と Cyclin D1 の発現を抑制した細胞を用いて、Hexokinase 2 プロモーターを組み込んだレポータープラスミドを作製しレポーターアッセイを行う予定であったが、目的としていた既存の Hexokinase 2 プロモーターのレポータープラスミドよりもさらに上流のプロモーター部位を含むレポータープラスミドの作製が困難であったため、Hexokinase 2 遺伝子のプロモーター領域について、Bisulfite 処理後のシーケンス解析によりメチル化の状況を比較する方法と Hexokinase 2 以外の遺伝子についてもプロモーターのメチル化状況を網羅的に解析する方法を試みた。Bisulfite 処理後のシーケンス解析の方は、Cyclin D1 の発現量を変化させた細胞から DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen 社) を用いて抽出したゲノム DNA を EpiTect

Bisulfite Kit (Qiagen 社) を用いて Bisulfite 処理を行った。現在、Hexokinase 2 遺伝子のプロモーター領域に対する PCR クローニングを行っている。また、Hexokinase 2 以外の遺伝子のプロモーターのメチル化状況の網羅的な解析については、メチル化プロファイリングの受託解析を依頼し、現在、その結果の詳細な解析を行っている。目的(1)については、上記の実験以外に、DNA メチル基転移酵素の働きに着目し、Cyclin D1 の発現量を変化させた細胞における DNA メチル基転移酵素の発現量を比較した。現在までに、リアルタイム RT-PCR において DNMT ファミリーのいくつかの遺伝子の発現量に違いを認めており、さらに詳細な検討を行っている。

(5) 目的(2)に対しては、MCF10A 細胞に Cyclin D1 と Hexokinase 2 を単独で過剰発現させた場合と両者とともに過剰発現させた場合とで、細胞の形質に違いがみられるかどうかについて解析を行った。Cyclin D1 と Hexokinase 2 をともに過剰発現させた細胞は、MCF10A/hyg 細胞に pMSCV-Cyclin D1-puro プラスミドを用いたウイルス感染により作製し、ウエスタンブロット解析でその発現は確認済みであるが、そのコントロール細胞 (MCF10A/hyg 細胞に pMSCV-puro プラスミドを用いてウイルス感染させた細胞) の状態が悪かったので、再度作製中である。Cyclin D1 と Hexokinase 2 を単独で過剰発現させた場合には、Soft agar colony formation assay において colony の形成は認められなかった。また、Cyclin D1 と ErbB2 をともに過剰発現する乳癌細胞に、Hexokinase 2 に対する siRNA を導入した際に癌形質が抑制されるかについても解析中である。Cyclin D1 と ErbB2 をともに過剰発現する乳癌細胞としては、MDA-MB-453 細胞及び SKBR3 細胞に加え、MCF10A 細胞に ErbB2 を過剰発現させた細胞を作製し実験に用いた。ErbB2 を過剰発現させた細胞の作製方法は、MCF10A/Cyclin D1 や MCF10A/HK2 の作製方法と同様である。pMSCV-neo プラスミドに、制限酵素処理した ErbB2 の cDNA を組み込み、シーケンス解析により正しく組み込まれたことを確認し、さらに HEK293T 細胞にトランスフェクションし、ウエスタンブロット解析により、ErbB2 が過剰発現することを確認した後、このレトロウイルスベクター (pMSCV-ErbB2-neo) とそのコントロールベクター (pMSCV-neo) を用いて MCF10A 細胞に感染させた後、G418 により耐性株を選別した (MCF10A/ErbB2、MCF10A/neo)。この MCF10A/ErbB2 及び MCF10A/neo については、ウエスタンブロット解析の結果、MCF10A/ErbB2 細胞では MCF10A/neo 細胞に比べて ErbB2 が過剰に発現していることが確認できている。さらに Soft

agar colony formation assay においても、MCF10A/ErbB2 細胞では colony の形成が認められた。Hexokinase 2 に対する siRNA (Qiagen 社、HP GenomeWide Validated siRNA) を購入し、その癌形質に及ぼす影響を解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Lindsay J, Sakamaki T, Pestell RG. (他 16 名、3 番目) "ErbB2 Induces Notch1 Activity and Function in Breast Cancer Cells." *Clinical and Translational Science* Vol.1 107-115 (2008) 査読有

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." *Molecular and Cellular Biology* Vol.28 3589-3599 (2008) 査読有

Ozaki I, Sakamaki T, Yamamoto K. (他 6 名、7 番目) "Menatetrenone, a vitamin K2 analogue, inhibits hepatocellular carcinoma cell growth by suppressing cyclin D1 expression through inhibition of nuclear factor kappaB activation." *Clinical Cancer Research* Vol.13 2236-2245 (2007) 査読有

[学会発表](計1件)

酒巻 利行、「乳癌におけるサイクリン D1 の機能解析」、第 48 回新潟生化学懇話会、平成 19 年 10 月 13 日、新潟大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒巻 利行 (SAKAMAKI TOSHIYUKI)
新潟薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：00445892

(2) 研究分担者

佐藤 浩二 (SATO KOJI)
新潟薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：10445893