

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591522
 研究課題名（和文） 未産・経産ラット乳腺の DNA メチル化状態の網羅的比較による乳癌予防標的の検索
 研究課題名（英文） Investigation of targets for mammary cancer prevention by comparing DNA-methylation states of virgin and parous rat mammary glands
 研究代表者
 松岡 洋一郎（MATSUOKA YOICHIRO）
 関西医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：60219409

研究成果の概要：未産・経産ラットをN-methyl-N-nitrosourea（50mg/kg体重）発癌刺激7日後に屠殺し、乳管上皮の増殖活性をBrdU取り込み率にて比較すると、未産個体 $3.6 \pm 1.4\%$ 、経産個体 $1.3 \pm 0.4\%$ と経産個体で細胞増殖が有意に抑制されていた。これと相関して、経産乳腺でのMyc抑制因子Mntの発現上昇、Mnt-ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC1）複合体形成の促進がそれぞれイムノプロット法、免疫沈降法により認められた。また両乳腺間でのヒストンアセチル化パターンの差異がイムノプロット法により検出された。以上の結果から、経産による乳腺発癌抑制にはヒストンアセチル化機構を介する細胞増殖関連遺伝子群の発現修飾が関与するものと考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳癌、予防、妊娠、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

本邦における近年の乳癌罹患患者数の急激な増加に鑑み、有効な乳癌一次予防法の確立は医療費抑制の観点からも緊急かつ重要な課題である。MacMahonら（1970）による広範な疫学研究によると、初回満期妊娠が若年齢であると乳癌発症を減少させ、20歳未満で満期妊娠を経験した女性は、未産婦に比して乳癌の発症は1/2である。経産（妊娠と出産）による乳癌の抑制は最も生理的かつ強力な一

次予防効果であり、ゆえに、その標的（遺伝子とその産物）ならびに分子基盤を解明することは未産婦へも応用し得る生理的かつ安全な乳癌予防法の確立に必須である。経産による乳癌抑制はラットの乳腺化学発癌モデルを用いてくり返し実証されている。申請者らは、ras 遺伝子変異が未産・経産ラット乳腺で同等に認められること、両ラット間でラテント癌（前癌病変→微小癌）の発生数に差がないこと、経産乳腺では発癌刺激後の細胞増殖が抑制されていること

を発見し、経産による乳癌抑制は発癌イニシエーション期ではなく、主にプロモーション期での増殖抑制によることを他に先駆けて提唱した。この事実は、ヒトにおいてもプロモーション期での乳癌予防が可能であることを強く支持している。経産により獲得される乳癌抵抗性形質の重要な特徴は、1回のみの満期妊娠によっても獲得され、また長期（おそらく生涯）にわたって持続することである。これまで、経産による乳癌抑制の分子機構について多くの仮説が提起されてきたが、実験的に妥当性の示された仮説として、1) 癌抑制因子 p53 の核内移行亢進によるアポトーシス誘導 (Medina ら)、2) IGF-1 低下による細胞増殖抑制 (Talamantes ら) の2つがある。しかしながら、仮説 1) は発癌イニシエーション期での作用を主張しており、プロモーション期での強い抑制効果を見出した我々や Nandi らの実験結果と整合しない。さらに重要なことは、p53 の核内移行、IGF-1 の低下ともに出産後（離乳1ヶ月後までに）には妊娠前の状態へ復するため、両仮説とも経産による乳癌抑制効果の持続性を十分説明できない。そこで申請者らは、この抑制効果の持続性を説明するため、乳腺上皮が妊娠・出産という情報をゲノムに記録し、このゲノム情報が細胞世代を超えて安定的に伝達され、その情報の1つに乳癌抵抗性なる形質が含まれているものと想定するに至った。

2. 研究の目的

乳腺は性成熟期から本格的な発育・分化を始め、妊娠・出産を経て最終的な分化段階に至る。細胞分化は発現オン・オフ状態の遺伝子セットの組み合わせで規定され、さらにこの発現パターンは細胞世代を超えて安定的に伝達される。事実、我々は、未産・経産ラット乳腺の遺伝子発現には差があり、経産乳腺での抑制および亢進遺伝子群にそれぞれ一部の増殖関連遺伝子と分化関連遺伝子が含まれ、発癌刺激後の細胞増殖活性も経産乳腺で抑制されていることを見出した。すなわち、乳腺上皮での“経産型”遺伝子発現パターンと発癌抵抗性形質との密接な関連が示唆される。本研究では、未産および経産ラット乳腺から単離したDNA（特にプロモーター領域）のメチル化状態に焦点を絞って比較し、1) 両乳腺間で差次的にメチル化・脱メチル化されているプロモーターをゲノム網羅的に同定する。次いで、2) 既に解析を終えた両乳腺の遺伝子発現プロファイルと比較検討し、プロモーターメチル化の変動により特異的に差次的発現を示す分化関連遺伝子群を決定する。最終的に、プロモーション期での発癌抑制を念頭に置き、3) 同定した遺伝子を単独あるいは種々の組み合わせで乳癌細胞へ導入あるいは発現を阻害し、癌予防遺伝子

としての機能を確認する。

3. 研究の方法

(1) 免疫沈降

乳腺組織および3Y1細胞の可溶化は免疫沈降緩衝液(50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% TritonX-100, 0.5% IGEPAL-CA630, 1mM dithiothreitol, 1mM Na₃VO₄, 1μM okadaic acid, 1mM PMSF, and 10μg/ml leupeptin)にて行った。乳腺組織については各時点5匹分の試料を混和し、以下の手順に賦した。1ml 可溶性画分を50ml プロテインG 磁性ビーズにて前処理後、各抗体と4°C、2時間反応させた。抗原抗体複合体をプロテインG ビーズにて捕捉し、低塩洗浄液(20mM Tris-HCl, pH 8.1, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100)1ml×2回、TE緩衝液(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) 1ml×1回の洗浄後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。

(2) イムノブロット

イムノブロットは以下の抗体を使用し、以前記載の方法に従って行った。ヤギ抗 ODC 抗体(sc-21515)、ウサギ抗 HDAC1 抗体(sc-7872)、ウサギ抗 c-Myc 抗体(sc-764)、ウサギ抗 Mnt 抗体(sc-769)、ウサギ抗 Mad1 抗体(sc-222)、ウサギ抗 Max 抗体(sc-765) 以上 Santa Cruz Biotechnology、ウサギ抗アセチル化ヒストン H3K9 抗体(#9671)、ウサギ抗アセチル化ヒストン H3K18 抗体(#9675)、ウサギ抗アセチル化ヒストン H3K23 抗体(#9674)、ウサギ抗ヒストン H3 抗体(#9715) 以上 Cell Signaling Technology、マウスモノクロナル抗β-actin 抗体(A5441; Sigma)。

(3) メチル化DNA断片の単離

未産ならびに経産ラット乳腺からゲノムDNAを単離、精製後、制限酵素MseI消化により断片化する。DNA断片と抗メチル化シトシン抗体(Calbiochem)を混和、インキュベートし、抗体に結合したメチル化DNA断片のみをProtein Gビーズにて回収。回収DNAの1部は以降のスクリーニングに使用するためMseI断端相補的プライマーによりPCR増幅後、ビオチン標識する。また、全DNA断片につきPCR後TAクローニングし、未産・経産乳腺それぞれの“メチル化DNA”ライブラリーを作製する。DNAメチル化はプロモーター領域に焦点を絞り、未産・経産ラット乳腺間で、メチル化既知の80プロモーターの比較ならびに差次的にメチル化されるプロモーターの検索を実施する。

(4) プロモーターマイクロアレイによるメチル化の比較

既に網羅的DNAアレイ解析により経産乳腺で発現抑制されていることを見出した遺伝子(cdc2, Igf2, Igfbp4)を含むCpGメチル化既知の代表的80プロモーター(ヒト、マウス

で確認されたもの)を選び、そのアンチセンス DNA (40mer) をシグマアルドリッチジャパンへ合成委託する。アンチセンス DNA をナイロンメンブランへスポットし、プロモーターアレイを作製する。ヒト、マウスについては同様のアレイが市販されているがラットのもの未発売である。ビオチン標識した未産・経産乳腺由来メチル化 DNA 断片をそれぞれプロモーターアレイにハイブリダイズし、HRP 標識ストレプトアビジンにてプロモーター相補鎖 (メンブランスポット) に結合したメチル化 DNA を検出、比較のためデンストメーターにて結合 DNA 量 (メチル化量に相関) を定量化する。未産・経産乳腺間でプロモーターのメチル化に差を認めた場合は遺伝子発現差をリアルタイム PCR にて確認し、シーケンスにてメチル化部位を決定する。

4. 研究成果

(1) 発癌刺激後の未産・経産乳腺における細胞増殖と細胞死の比較

未産・経産乳腺を MNU にて発癌刺激後、乳管上皮の経時的な細胞増殖活性を BrdU 取り込み率にて比較した。MNU 投与前 19 週齢時の未産・経産乳腺での細胞増殖活性は低くそれぞれ $2.4 \pm 0.6\%$ 、 $2.3 \pm 0.5\%$ であった。MNU 投与後 3 日でも両乳腺とも低値のままであったが、投与後 7 日で未産乳腺 $3.6 \pm 1.4\%$ 、経産乳腺 $1.3 \pm 0.4\%$ と未産乳腺でのみ有意な ($P < 0.05$) 増殖活性の上昇が認められた。投与後 35 日では未産乳腺 $1.7 \pm 0.5\%$ 、経産乳腺 $1.3 \pm 0.5\%$ と両乳腺とも低値であった。MNU 投与後 7 日の細胞死には両乳腺間で有意差を認めなかった (未産乳腺 $1.07 \pm 0.46\%$ 、経産乳腺 $0.93 \pm 0.09\%$)。

(2) MNU 投与後経産乳腺における Myc 抑制因子 Mnt の発現上昇と HDAC1/c-Myc/Mnt/Max 複合体形成

経産によって発癌刺激後の細胞増殖の一過性上昇が抑制される機構の解析を行った。まずはじめに、細胞増殖の制御に重要な c-Myc、Mnt、Mad1、Max の発現量を両乳腺につき MNU 投与前と投与後 7 日で比較した。両乳腺間での最も重要な相違は投与後 7 日の Mnt 発現量に認められ、Mnt 発現が経産乳腺で有意に高かった。経産乳腺では Mnt は投与前と比較して投与後上昇傾向を示す一方、未産乳腺では投与後顕著に低下した。Max が経産乳腺でのみ投与後有意に発現上昇したことは興味深い。投与前両乳腺間で上記 4 分子の発現に差はなく、c-Myc、Mad1 の発現には投与前後で変動は認めなかった。

Mnt は Myc 標的遺伝子のプロモーター (E-box) 上で Max および HDAC1 と複合体を形成し遺伝子発現を抑制する。そこで、MNU

投与後経産乳腺で高発現している Mnt と HDAC1 が複合体を形成しているかにつき抗 Mnt 抗体による免疫沈降法で検討した。予想通り、投与後 7 日の未産乳腺に比較して経産乳腺でより多くの HDAC1 が Mnt-Max 複合体に結合していた (図 1)。さらに驚くべきことに、投与後の経産乳腺由来 HDAC1/Mnt/Max 複合体には明らかに c-Myc も結合していた。抗 HDAC1 抗体、抗 c-Myc 抗体、抗 Max 抗体による免疫沈降実験でも投与後経産乳腺での HDAC1/c-Myc/Mnt/Max 複合体形成が確認された (結果未提示)。MNU 投与前の両乳腺でもこの複合体は確認されるが、未産乳腺では投与後 c-Myc が複合体から遊離するようである (図 1)。さらに、投与前経産乳腺ではより大量の Mad1 が Mnt-Max 複合体に結合していた。以上のことから、経産乳腺では MNU 投与前形成されていた HDAC1/Mad1/Mnt/Max 複合体が投与後 HDAC1/c-Myc/Mnt/Max 複合体により置換されると考えられる。

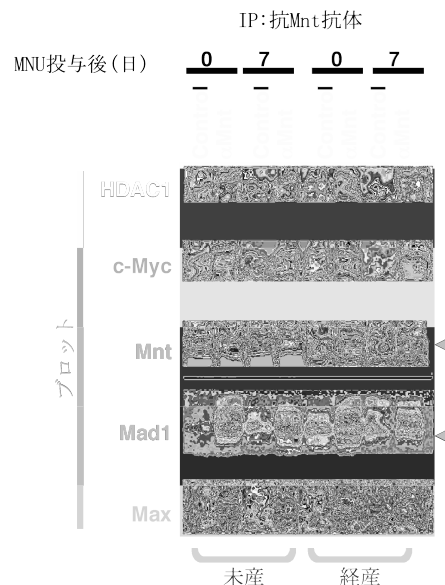


図 1 MNU 投与後経産乳腺における HDAC1/c-Myc/Mnt/Max 複合体形成

(3) HDAC1/c-Myc/Mnt/Max 複合体が転写抑制活性をもつ可能性

HDAC1/c-Myc/Mnt/Max 複合体形成と細胞増殖抑制ならびに Myc 標的遺伝子の転写抑制が直接関連しているか検討した。3Y1 ラット線維芽細胞を低血清培地で培養すると経時的に核内の c-Myc、Mnt が増加し、これと平行して Myc 標的遺伝子 *ODC*、*Ccnd2*、*Tgfb1* の発現が低下した。この静止期細胞では抗 Mnt 抗体による免疫沈降物に HDAC1 とともに c-Myc も共沈し、血清添加による増殖刺激でこの複合体は解離した。すなわち、MNU 投与後経産乳腺においても HDAC1/c-Myc/Mnt/Max 複合体形成が細胞増殖抑制ならびに Myc 標的遺伝子の転写抑制に関わっていることを示唆する。

(4) 未産・経産乳腺におけるヒストンアセチル化の比較

著者は、経産による乳癌抑制効果の持続性を説明するため、乳腺上皮が妊娠・出産という情報をエピジェネティクスによりゲノムに記録し、この情報が細胞世代を超えて安定的に伝達され、その情報の1つに乳癌抵抗性なる形質が含まれるものと想定している。上述のごとく、経産乳腺では発癌刺激後の細胞増殖が強く抑制されており、その機構にエピジェネティクス制御の重要分子であるヒストン脱アセチル化酵素HDAC1の関与が示唆された。そこで、未産・経産乳腺におけるヒストンアセチル化の比較検討を行い興味深い結果を得た。MNU投与前経産乳腺においてヒストンH3リジン9、リジン23のアセチル化亢進ならびにリジン18の脱アセチル化が認められた(図2)。

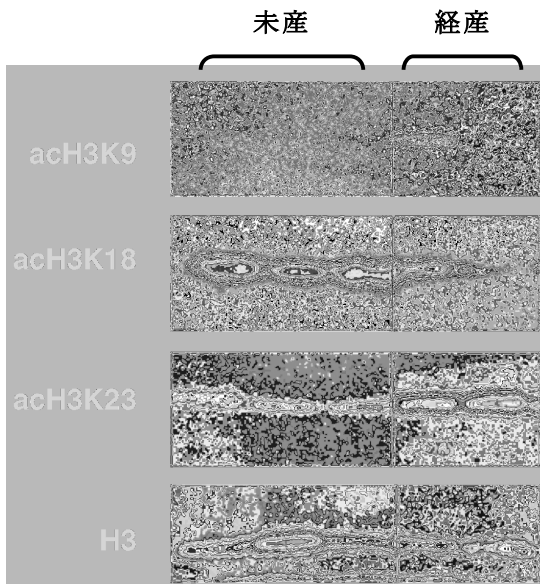


図2 未産・経産乳腺におけるヒストンアセチル化の比較

(acH3K9: リジン9アセチル化ヒストンH3 ;
acH3K18: リジン18アセチル化ヒストンH3 ;
acH3K23: リジン23アセチル化ヒストンH3 ;
H3: ヒストンH3)

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 10件)

1) Lai, Y-C., Yuri, T., Uehara, N., Matsuoka, Y., Kanematsu, S., and Tsubura, A. (2009) Biphasic effect of short-term pregnancy hormone treatment on N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis in young and old rats. *Mol. Med. Rep.*, 2: 213-220 (査

読有り)

- 2) Matsuoka, Y., Fukamachi, K., Uehara, N., Tsuda, H., and Tsubura, A. (2008) Induction of a novel histone deacetylase 1/c-Myc/Mnt/Max complex formation is implicated in parity-induced refractoriness to mammary carcinogenesis. *Cancer Sci.*, 99: 309-315 (査読有り)
- 3) Uehara, N., Matsuoka, Y., and Tsubura, A. (2008) Mesothelin promotes anchorage-independent growth and prevents anoikis via extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.*, 6: 186-193 (査読有り)
- 4) Tsubura, A., Uehara, N., Matsuoka, Y., Yoshizawa, K., and Yuri, T. (2008) Estrogen and progesterone treatment mimicking pregnancy for protection from breast cancer. *In Vivo*, 22: 191-201 (査読有り)
- 5) Matsuoka, Y., Hamaguchi, T., Fukamachi, K., (他5名、1番目) (2007) Molecular analysis of rat mammary carcinogenesis: an approach from carcinogenesis research to cancer prevention. *Med. Mol. Morphol.*, 40: 185-190 (査読有り)
- 6) Matsuoka, Y., Kawaguchi, H., Yoshida, H., Tsuda, H., and Tsubura, A. (2007) Rat mammary preneoplasia and neoplasia: a model for human breast cancer research. *Trend. Cancer Res.*, 3: 1-13 (査読有り)
- 7) Ohnishi, T., Fukamachi, K., Ohshima, Y., (他9名、10番目) (2007) Possible application of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats in a medium-term bioassay model for carcinogens. *Toxicol. Pathol.*, 35: 436-443 (査読有り)
- 8) Tsubura, A., Yoshizawa, K., Uehara, N., Yuri, T., and Matsuoka, Y. (2007) Multistep mouse mammary tumorigenesis through preneoplasia to neoplasia and acquisition of metastatic potential. *Med. Mol. Morphol.*, 40: 9-17 (査読有り)
- 9) Tsukamoto, R., Mikami, T., Miki, K., (他5名、5番目) (2007) N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis is promoted by short-term treatment with estrogen and progesterone mimicking pregnancy in aged female Lewis rats. *Oncol. Rep.*, 18: 337-342 (査読有り)
- 10) 深町勝巳、松岡洋一郎、津田洋幸 (2007) 発がん高感受性ラットと毒性学 病理と臨床 25:736-743 (査読なし)

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 松岡洋一郎 経産乳腺の発癌刺激低感受性に関する研究 第97回病理学会総会、2008年5月、金沢
- 2) 上原範久 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の乳癌細胞増殖抑制機序と p38MAPK 活性化の関与 第97回病理学会総会、2008年5月、金沢
- 3) Matsuoka, Y. Induction of a novel histone deacetylase 1/c-Myc/Mnt/Max complex formation is implicated in parity-induced refractoriness to mammary carcinogenesis 26th Congress of the International Association for Breast Cancer Research、2008年9月、倉敷
- 4) Lai, Y-C. Effects of short-term treatment with estrogen and progesterone mimicking pregnancy on development of MNU-induced mammary carcinomas in aged female Lewis rats 26th Congress of the International Association for Breast Cancer Research、2008年9月、倉敷
- 5) 松岡洋一郎 妊娠・出産による乳腺発癌抑制についての基礎的研究 第96回病理学会総会、2007年3月、大阪
- 6) 上原範久 Mesothelin 過剰発現乳癌細胞株における足場非依存的増殖促進と ERK シグナル経路を介したアノイキス抑制機序 第17回乳癌基礎研究会、2007年7月、大阪

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 洋一郎 (MATSUOKA YOICHIRO)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60219409

(2) 研究分担者

螺良 愛郎 (TSUBURA AIRO)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：90098137
上原 範久 (UEHARA NORIHISA)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：30368211

(3) 連携研究者