

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20770096

研究課題名（和文） 乳腺における Hair keratin の機能解析

研究課題名（英文） Function analysis of Hair keratin in mammary gland

研究代表者

七島 直樹（NANASHIMA NAOKI）

弘前大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：80333730

研究成果の概要（和文）：Hair keratin欠損ラットHHRでは乳腺の発達異常が認められるため、Hair keratinの乳腺における機能を解析した。正常なSDラットではHair keratin Kb21が乳腺で発現しており、Kb21はribosomal proteinなどと結合することが示唆された。HHRではKb21の欠損によりこれらのタンパクと相互作用することができないため、授乳期におけるタンパク合成が低下していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Because Hair keratin genes deleted rat HHR show mammary gland developmental abnormality, I analyzed function of Hair keratin in mammary gland. Hair keratin Kb21 gene expressed in mammary gland in wild SD rat, and it was suggested that Kb21 bound to proteins such as ribosomal protein. Because these proteins could not interact with deleted Kb21 protein, it was suggested that proteins synthesis decreased at lactation in HHR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：細胞骨格

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Keratin は細胞骨格を構成するタンパク質である。Keratin には上皮細胞の中間径フィラメントである Cytokeratin と毛、爪、羽毛などを構成する Hair keratin が存在する。Cytokeratin は約 20 種類報告され、その発現している細胞（組織）が知られており、ガン

のマーカーとしても活用されている。Hair keratin については約 15 種類知られているが、単なる爪や毛の構成成分でしかないと考えられており、その研究もあまり進んでいなかった。

(2) Hirosaki hairless rat (HHR) は Sprague-Dawley rat (SDR) から突然変異で生

じ、弘前大学動物実験施設において発見された乏毛を呈するラットである。HHR の雌は正常の出産能力を有するが、乳腺が授乳期早期に退縮するために子育てが出来ない。この乳腺の早期退縮に対して我々は①乳腺の早期退縮がアポトーシスによること、②HHR の乳腺細胞では、乳腺の分化に必須の転写因子である STAT5A の機能的異常が認められることを明らかにした (Nanashima et. al., J. Biol. Chem. 280, 43010-43016, 2005)。

(3) HHR の表現型は常染色体性劣性遺伝するがその責任遺伝子は不明だった。最近になって、HHR には第7染色体の長腕(7q36)に K<sub>b</sub>21、K<sub>b</sub>23、K<sub>b</sub>26 などの塩基性 Hair keratin 遺伝子を含む約 80-kb の欠失があり、これら遺伝子の欠失が HHR の責任遺伝子群であることが明らかになった。

(4) これまで、Hair keratin は単なる毛や爪の構造タンパクでしかないと考えられてきた。毛と乳腺は哺乳類特有の器官で、毛周期と乳腺の発達というサイクルは似た現象である。現に、乳腺と皮膚(毛)は外胚葉由来であり、乳腺と毛は皮膚の付属器官である。毛と乳腺を結ぶ因子として Hair keratin が候補として考えられる。また、ヒト乳がん細胞では N 末端が欠けた異常な Hair keratin が発現している報告例 (J. Biol. Chem. 2001, Br. J. Cancer, 1998) などからも、Hair keratin と乳がんとの関連が注目されつつある。

(5) HHR で乳腺が早期に退縮することから、Hair keratin はアポトーシス関連遺伝子や乳腺の退縮を促進させる CCAAT/enhancerbindingprotein (C/EBP)  $\delta$  などの遺伝子の制御因子として機能している可能性があり、Hair keratin の新たな機能を知る上で本研究は意義深い。また、乳腺での Hair keratin の機能を知ることによって乳がんの新たな治療法への発展性・将来性がある。

## 2. 研究の目的

(1) K<sub>b</sub>21 は乳腺細胞内で中間径フィラメントとして機能している可能性が高く、K<sub>b</sub>21 の欠失の影響によってチューブリン、アクチンなどの細胞骨格分子も異常をきたしている可能性が示唆される。また、単に Cytokeratin が細胞、組織の機械的強度を保持するだけでなく、シグナル伝達などの細胞内機能の一端を担っていることが報告されつつあり、K<sub>b</sub>21 も乳腺の退縮に関与する遺伝子発現の制御因子になっている可能性が示唆される。

(2) これまでの学術的知見だと、Hair keratin の欠失では乳腺の早期退縮は説明がつかない。そもそも、Hair keratin は乳腺で発現しているとは考えられておらず、着目する研究者も少なかった。申請者は、「Hair keratin は乳腺の発達・維持に寄与している」という

独創的な仮説を導き、本研究では乳腺における Hair keratin の機能解明を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 乳腺組織における K<sub>b</sub>21 の発現

妊娠前、妊娠中、授乳期のラットの乳腺から RNA を抽出し RT-PCR 法で遺伝子の発現量を比較した。また、抗 K<sub>b</sub>21 抗体を作製し、免疫染色法で乳腺における K<sub>b</sub>21 の局在を調べた。

### (2) 酵母 Two-Hybrid system による K<sub>b</sub>21 と結合するタンパク質の同定

GAL4 タンパクの BD ベクターに K<sub>b</sub>21 の完全長 cDNA を組んだもの、BD と結合して DNA の転写を活性化する activation domain と SDR 授乳 1 日目の乳腺由来の cDNA を酵母 AH109 にトランスフェクトし、選択培地で培養した。陽性コロニーについて PCR で候補遺伝子を増幅、ダイレクトシーケンス後 BLAST 検索した。

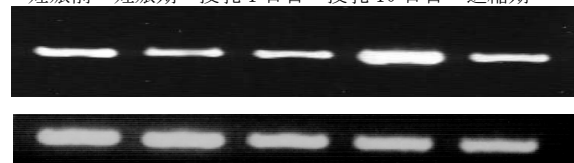
### (3) 乳腺の退縮に関連する遺伝子の発現解析

乳腺の退縮には C/EBP  $\delta$  など種々の遺伝子が関与している。これらの遺伝子の発現異常を DNA マイクロアレイで網羅的に解析した。

## 4. 研究成果

(1) RT-PCR および免疫染色の結果から、SDR の乳腺組織において、Hair keratin は K<sub>b</sub>21 のみが発現し、K<sub>b</sub>23、K<sub>b</sub>25、K<sub>b</sub>26、K<sub>rt</sub>2-25 は発現していなかった。K<sub>b</sub>21 は妊娠前、妊娠 14 日目、授乳 1 日目、授乳 10 日目いずれにおいても発現しており、特に授乳 10 日目での発現が亢進していた (図)。また、K<sub>b</sub>21 は乳腺腺管上皮で発現していた。K<sub>b</sub>21 は授乳期以外でも常に発現しているが、乳腺の発達に伴い、発現が亢進していることから、K<sub>b</sub>21 は乳腺の授乳期における発達に関与していることが示唆された。

妊娠前 妊娠期 授乳 1 日目 授乳 10 日目 退縮期



図：Hair keratin K<sub>b</sub>21 の発現  
上段：K<sub>b</sub>21 下段： $\beta$ -アクチン

(2) 酵母 Two-hybrid 法により、K<sub>b</sub>21 と結合するタンパク質として、 $\alpha$  や  $\beta$  カゼインなどの casein 系、細胞骨格系タンパク質として  $\alpha$  アクチン、アポトーシス関連タンパクとして Milk fat globule - EGF factor 8 protein、proteasome、タンパク質合成にかかわるタンパクとしてリボソームの large unit である ribosomal protein、小胞体上のシグナルペ

プチドのレセプターである signal sequence receptor、mRNA のキャップ構造を除き、その分解を促す DCP2 decapping enzyme などが同定された。

HHR では K<sub>b</sub>21 が欠失しているため上記のタンパクと相互作用することができず、タンパク質合成能力が低下している可能性が示唆された。

(3) HHR における早期乳腺退縮に関与する遺伝子を DNA マイクロアレイで検討した結果、正常な乳腺退縮に寄与している *STAT3*、*C/EBP $\delta$* 、*IGFBP5* (Insulin-like growth factor binding proteins) の発現が亢進しており、さらには HHR の乳腺退縮に特異的に働いていると推測される遺伝子 *c-Jun*、*KLF5* (*Kruppel-like factor 5*)、*TSP-1* (*Thrombospondin-1*) の発現が亢進していた。また、DNA 複製に寄与する遺伝子 (*topoisomerase 2 $\alpha$* 、*proliferation associated nuclear element 1*、*ATPase family, AAA domain, cyclin E, DNA primerase, DNA polymerase  $\delta$  1*、*DNA polymerase  $\epsilon$  2*、*CDK inhibitor 2D*、*Replication factor C, geminin*) や細胞分裂に寄与する遺伝子 (*centromere protein E*、*spindle pole body, component 2A*、*spindle assembly 6*、*syugoshin 1*、*spindle associated protein 1*、*cdc 20*、*MAD 2*、*condensin complex, subunit 2*、*chromatin assembly factor 1 subunit A*、*polo-like kinase 1*) などの発現が低下していた (data not shown)。これらの結果は乳腺上皮細胞の分化や細胞増殖が低下している事が反映されていると考えられる。

(4) HHR では *Kb21* が欠失していることが、*STAT3* の発現や *STAT5A* の O-GlcNAc 化を亢進していると予想され、*STAT3* は従来知られている *C/EBP $\delta$* 、*IGFBP5* の発現を亢進させアポトーシスを誘導する機構が考えられた。この経路の他に HHR では *STAT5A* の O-GlcNAc 化が、*C/EBP $\delta$*  の発現を亢進し、さらには *KLF5* や *TSP-1* の発現を亢進させアポトーシスを誘導するという従来とは異なる機構で乳腺が退縮していることが示唆された。TSP-1 はがん細胞や毛包のアポトーシスに関与していることが知られており、乳腺でもアポトーシスの誘導に強く関与していることが示唆された。しかし、K<sub>b</sub>21 と相互作用するタンパク質と STAT との関連が未だ不明であり、今後の検討課題となる。

## 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 7 件)

1. Shimizu Takeshi, Fan Yang, Yamana Daisuke, Miura Takuya, Nanashima Naoki, Yamada Toshiyuki, Tsuchida Shigeki, *Cancer Sci.*, 査読有, 101, 2010, 1093-1098
2. Asano Jumpei, Kudo Toshihiro, Shimizu Takeshi, Fan Yang, Nanashima Naoki, Yamana Daisuke, Miura Takuya, Yamada Toshiyuki, Tsuchida Shigeki, *Cancer Sci.*, 査読有, 101, 2010, 869-875
3. Akita Miki, Nanashima Naoki, Yamada Toshiyuki Nakano, Hajime, Shimizu Takeshi, Fan Yang, Tsuchida Shigeki, *Hirosaki Med. J.*, 査読有, 60, 2009, 1-11
4. Masanori Horie, Keiko Nishio, Katsuhide Fujita, Shigehisa Endoh, Arisa Miyauchi, Yoshiro Saito, Hitoshi Iwahashi, Kazuhiro Yamamoto, Hideki Murayama, Hajime Nakano, Naoki Nanashima, Etsuo Niki, Yasukazu Yoshida, *Chem. Res. Toxicol.*, 査読有, 22, 2009, 543-553
5. Yang Fan, Toshiyuki Yamada, Takeshi Shimizu, Naoki Nanashima, Miki Akita, Kohji Suto, Shigeki Tsuchida, *Toxicol. Pathol.*, 査読有, 37, 2009, 209-217
6. Toshiyuki Yamada, Takeshi Shimizu, Takuya Sakurai, Naoki Nanashima, Fumiko Kihara-Negishi, Mitsuhiro Suzuki, Yang Fan, Miki Akita, Tsuneyuki Oikawa, Shigeki Tsuchida, *Leuc. Res.*, 査読有, 33, 2008, 483-489
7. Naoki Nanashima, Miki Akita, Toshiyuki Yamada, Takeshi Shimizu, Hajime Nakano, Yang Fan, Shigeki Tsuchida, *J. Biol. Chem.*, 査読有, 2008, 283, 16868-16875

[学会発表] (計 5 件)

1. Naoki Nanashima, Toshiyuki Yamada, Takeshi Shimizu, Takuya Miura, Daisuke Yamana, Shigeki Tsuchida, Expression of Hair keratin K<sub>b</sub>21 and interaction for ribosomal protein in rat mammary gland, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 22 日, 神戸ポートアイランド
2. Naoki Nanashima, Toshiyuki Yamada,

Takeshi Shimizu, Takuya Miura, Daisuke Yamana, Shigeki Tsuchida, Deletion of phospholipase A2 group IV c gene and altered steroid hormone metabolism in Hirosaki hairless rat, 第 67 回日本癌学会学術総会, 2009, 10 月 2 日, パシフィコ横浜

3. Naoki Nanashima, Miki Akita, Toshiyuki Yamada, Takeshi Shimizu, Yang Fan, Shigeki Tsuchida, The hairless phenotype of the Hirosaki Hairless Rat is due to the deletion of an 80-kb genomic DNA containing five basic keratin genes and the expression of fusion gene, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 2008, 12 月 12 日, 神戸ポートアイランド
4. Naoki Nanashima, Toshiyuki Yamada, Takeshi Shimizu, Miki Akita, Yang Fan, Shigeki Tsuchida, STAT5A Modified with *O*-Linked *N*-Acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) induces apoptosis in the Mammary Gland, 第 66 回日本癌学会学術総会, 2008, 10 月 28 日, 名古屋国際会議場
5. 七島直樹, 秋田美季, 山田俊幸, 清水武史, 中野創, 范洋, 葛西宏介, 土田成紀, 遺伝性の Hirosaki hairless rat における塩基性ケラチン遺伝子群の欠失と融合遺伝子の発現, 日本生化学東北支部第 74 回例会・シンポジウム, 2008, 5 月 17 日, アイーナ いわて県民情報交流センター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

七島 直樹 (NANASHIMA NAOKI)  
弘前大学・大学院保健学研究科・助教  
研究者番号：80333730

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：