

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月18日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590081

研究課題名（和文） 乳癌幹細胞におけるサイクリンD1の役割の解析

研究課題名（英文） Analysis of the roles of cyclin D1 in breast cancer stem cells

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（和文）：Cyclin D1 が DNA メチル基転移酵素（Dnmt1, Dnmt3a 及び Dnmt3b）の発現を誘導し、その結果 Musashi1 のプロモーターのメチル化を亢進させる可能性が示された。これにより、Cyclin D1 がエピジェネティックな機構により、Musashi1 を介して Notch1 シグナルを制御し、乳癌幹細胞の癌化において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cyclin D1 induces the expression of Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b, and increases methylation in the promoter region of Musashi1. These results demonstrate that Cyclin D1 may play an important role in tumorigenesis of breast stem cells by epigenetically affecting Notch1 signaling through Musashi1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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。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。

一方で、最近、癌における幹細胞の重要性が注目されて来ており、乳癌を含む様々な癌で

癌幹細胞の存在が確認されている。幹細胞は自己複製能と多分化能を有しており、従来の癌治療で除去されなかった癌幹細胞が癌再発の引き金になっている可能性も指摘されている。乳癌の癌幹細胞では、CD24、CD29、CD44、Aldehyde dehydrogenase 1 などの分子が幹細胞のマーカーとして考えられているが、我々の共同研究や別のグループの研究は、Notch シグナルの正の制御因子である Musashi1 を介して、Notch シグナルが乳癌幹細胞で重要な働きをしている可能性を報告している。さらに我々は、乳腺上皮細胞に Cyclin D1 を過剰発現させた際に、DNA メチ

ル基転移酵素 Dnmt3a 及び Dnmt3b の発現量が増加することを見出した (未発表データ)。また最近の共同研究では、ErbB2 シグナルが乳癌細胞において Notch1 シグナルを活性化することを見出し、そこで Cyclin D1 が Musashi1 あるいは Notch シグナルの負の制御因子である Numb の発現を制御することによって関与している可能性を報告した。以上から、ErbB2 による乳腺の癌化において、この Cyclin D1 による DNA メチル基転移酵素の発現制御が何らかの重要な働きをしているのではないかと、またこの働きが Notch1 シグナルという幹細胞の維持に重要なシグナルとリンクしているならば、乳腺幹細胞の癌化にも関与しているのではないかと考えて、本研究を起案した。

## 2. 研究の目的

(1) Cyclin D1 は、DNA メチル化に影響を与えることにより、Notch1 シグナルを制御しているか、(2) ErbB2 は、幹細胞において Notch1 シグナルを活性化しているか、(3) ErbB2 による乳腺の癌化に、幹細胞における Notch1 シグナルの活性化が関与しているか、(4) ErbB2 による乳腺の癌化に、幹細胞において Cyclin D1 による DNA メチル化の影響により、Notch1 シグナルの活性化が起こることが関与しているか、という目的を設定し、本研究を開始した。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト乳腺上皮細胞株 MCF10A に Cyclin D1 を過剰発現させた細胞 (MCF10A/Cyclin D1) 及びそのコントロール細胞を用いて、DNA メチル基転移酵素 (Dnmt1, Dnmt3a 及び Dnmt3b) の発現をリアルタイム RT-PCR 及びウエスタンブロッティングにより解析した。

(2) MCF10A/Cyclin D1 細胞及びそのコントロール細胞を用いて、Notch1 シグナルの制御に関与する Musashi1 のプロモーターのメチル化状況の変化について比較検討を行った。細胞から、ゲノム DNA を精製した後 Bisulfite 処理をし、Musashi1 のプロモーター配列から CpG アイランドを検索した後、適切なプライマーを設計し、上記の Bisulfite 処理したサンプルをテンプレートとして PCR を行った。PCR 産物を TA クローニングベクターに組み込んだ後、DNA 配列を解読し、メチル化の度合いを MCF10A/Cyclin D1 とそのコントロール細胞間で比較した。

(3) 雌の野生型 FVB マウスから乳腺上皮細胞を初代培養し、Sca-1 に対する抗体を反応させた後、MACS マグネティックセルソーター (Miltenyi Biotec) を用いて、陽性細胞及び陰性細胞を分離・培養した。得られた陽性

細胞及び陰性細胞から RNA 及びタンパク質を抽出し、リアルタイム RT-PCR 及びウエスタンブロッティングを用いて、Notch1 の発現を解析した

(4) (3) で得られたマウス乳腺幹細胞様細胞に ErbB2 を発現するベクターをトランスフェクションし、ErbB2 を過剰発現させた。ErbB2 を過剰発現させたマウス乳腺幹細胞様細胞とコントロールベクターをトランスフェクションした細胞間では発現する分子の相違を調べるために、それぞれの細胞から total RNA を抽出・精製した。

## 4. 研究成果

(1) MCF10A/Cyclin D1 細胞では、Cyclin D1 の過剰発現に伴って、Dnmt1, Dnmt3a 及び Dnmt3b の発現が増加することが、リアルタイム RT-PCR 及びウエスタンブロッティングのいずれにおいても認められた。

(2) MCF10A/Cyclin D1 細胞及びそのコントロール細胞を用いてゲノム DNA の bisulfite シークエンス解析により、それぞれ 10 個のクローンのシークエンスが調べたところ、MCF10A/Cyclin D1 細胞では、Musashi1 プロモーターの中でメチル化の亢進が見られる領域があった。

(3) 初代培養した乳腺上皮細胞から分離した Sca-1 陽性及び陰性細胞のリアルタイム RT-PCR 及びウエスタンブロッティング解析の結果、Sca-1 陽性細胞では Notch1 の発現が有意に上昇した。

(4) マウス乳腺上皮細胞から分離した Sca-1 陽性細胞に ErbB2 発現ベクターを導入した細胞から、total RNA を精製し、マイクロアレイによる発現分子の網羅的解析を進行している。

上記の結果から、マウス乳腺の幹細胞様細胞では、Notch1 シグナルが亢進している可能性が考えられる。また、Cyclin D1 による Musashi1 のエピジェネティックな発現制御が Notch1 シグナルに影響を与える可能性が考えられる。

## 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)

① Adachi R, Horiuchi S, Sakurazawa Y, Hasegawa T, Sato K, Sakamaki T. "ErbB2 down-regulates microRNA-205 in breast cancer." Biochem Biophys Res Commun. Vol.

41 査読有 804-808 (2011)  
DOI : 10.1016/j.bbrc.2011.07.033

②Liu M, Sakamaki T, Pestell RG. (他 12 名、2 番目) “The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion.” Cancer Res. Vol. 70 査読有 10464-10473 (2010)  
DOI : 10.1158/0008-5472.CAN-10-0732

③Liu M, Sakamaki T, Pestell RG. (他 11 名、6 番目) “Nuclear factor-kappaB enhances ErbB2-induced mammary tumorigenesis and neoangiogenesis in vivo.” Am J Pathol. Vol. 174 査読有 1910-1920 (2009)  
DOI : 10.2353/ajpath.2009.080706

[学会発表] (計 2 件)

① Sakamaki T. “ErbB2 down-regulates microRNA-205 in breast cancer.” EPS Anticancer drugs 2011, Stockholm, Sweden, Oct. 26-27 (2011)

②安達 亮平、堀内 翔太、櫻澤 喜之、佐藤 浩二、酒巻 利行、「ErbB2 過剰発現乳癌における hsa-miR-205 の役割の解析」、日本薬学会第 131 年会 (静岡, Mar. 28-31, 2011)

[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  
<http://www.nupals.ac.jp/~kosyu/>

## 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