

令和元年5月16日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07165

研究課題名(和文) 癌細胞浸潤を阻害抑制する因子の解明

研究課題名(英文) Study of the suppressor protein of cancer cell invasion

研究代表者

中村 律子 (NAKAMURA, Ritsuko)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：20632657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではNeural EGFL like (NELL)の乳癌における発現および機能解析を行った。乳腺組織ではNELL2は筋上皮細胞、NELL2のレセプターであるRoundabout Guidance Receptor 3 (ROBO3)は乳管上皮および乳癌細胞で発現していた。NELL2とレセプターの反発作用による細胞の住み分けを想定し、in vitroでの細胞移動阻害を確認したところ全長NELL2およびC未欠損型NELL2が乳癌細胞の移動を抑制した。乳癌細胞表面へのNELLの結合は、TSPドメインが関与していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞の移動を抑制する因子を明らかにすることは、細胞の生物学的特性を明確にするのみならず、癌の浸潤や転移を阻害する薬剤などの開発につながる可能性がある。また、正常乳管の乳管上皮細胞におけるレセプターと、筋上皮細胞におけるリガンドの発現は、異なる細胞の住み分けや位置づけがレセプター・リガンドの反発作用により誘導されていると推測され、正常乳管の構造形成解明の一助となると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated the expression and function of Neural EGFL like (NELL), which is a secretory protein in breast tissues. NELL2 was expressed in the myoepithelial cells, and Roundabout Guidance Receptor 3 (ROBO3), which is one of the receptors of NELL2, was expressed in the luminal epithelial cells and breast cancer cells. From the breast ductal structure that composed inside of the luminal epithelial cells and outside of the myoepithelial cells, we suspected the distribution of these cells by ligand (NELL2)-receptor (ROBO3) repulsion. N-terminal thrombospondin-like (TSP) domain contained constructs were bound the surface of breast cancer cell lines. Full-length NELL2 and c-terminal deleted NELL2 construct suppressed the breast cancer cell migration in vitro, however, TSP domain alone was increased migrated cells. It might be suggested that TSP domain of NELL2 related to the binding on the surface of breast cancer cells, but not enough for the cell repulsive signal.

研究分野：腫瘍学

キーワード：浸潤 細胞移動 乳癌 NELL

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

正常な細胞移動には、走化性(chemotaxis)と呼ばれる、ある特定の物質に向かって動く現象や、特定の物質と接触した後、反発作用(repulsion)を生じて、対象となる物質から離れる現象などが知られている。このような走化性や反発作用を示す物質はいくつか報告があるが、その中で Neural EGFL like (NELL)という分泌型蛋白質に注目した。NELL はドメイン構造を有する蛋白質であり、N 末より、N-terminal thrombospondin-like(TSP), 3 個の Cysteine-rich (CR), 6 個の EGF-like および 2 個の CR ドメインを有しており(図 1)、ヒトでは NELL1 と NELL2 が知られている。ニワトリ発生期に視神経が中脳視蓋に投射されるとき、中脳の表面に達した視神経軸索は中脳内部に侵入する。しかし視神経軸索は中脳のある一定の決まった層までしか侵入できない。その層には Nel(ヒトにおける NELL2 に相当)が発現しており、Nel が視神経軸索に対し反発作用を生じさせ、あたかもバリアとなるかのように軸索の適切な侵入部位を決定している。発生期に発現・機能する遺伝子は癌でも発現し特定の機能を示すことがあり、我々は以前に腎細胞癌での NELL の発現および機能解析を施行し報告している。腎細胞癌細胞株に対して NELL は細胞移動や細胞接着を制御し、'反発作用'を示す物質であることを示した。

2. 研究の目的

神経細胞や腎細胞癌の結果から、NELL の細胞侵入を防ぐバリアとしての役割を癌浸潤の抑制因子として利用できないかと考え、NELL の蛋白質構造から各ドメイン機能を明らかにすること、また腎細胞癌のみでなく、他の癌細胞に対しても同様の効果があるのか、他臓器発生の癌でも NELL は発現がみられるのか調べることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト組織における免疫染色

金沢大学附属病院にて手術され保管されている乳腺検体(ホルマリン固定パラフィン包埋標本)109 例について、学内倫理委員会承認後、NELL1, NELL2 および NELL2 のレセプターとして報告されている Roundabout Guidance Receptor 3 (ROBO3)の発現分布を免疫染色にて確認した。薄切切片を脱パラフィン、クエン酸バッファーでの不活化およびブロッキングの後、抗 NELL1(HPA051535), 抗 NELL2(HPA035715)および抗 ROBO3(HPA011310、いずれも Sigma aldrich)にて反応、LSAB 法および DAB にて発色させた。染色の評価は発色の程度を 0 (染色なし) から 3+ (強染色)、NELL2 は染色された細胞を考慮しさらに乳管周囲の発色細胞の割合を 0~100% で表した。

(2) NELL2 および NELL2 ドメイン蛋白質の作成

培養細胞を用いた *in vitro* の実験で使用するために、NELL2 の各ドメインのみおよび全長蛋白質を作成した(図 1)。蛋白質の生成や検出を容易にするため、C 末端に alkaline phosphatase (AP) を融合させた。各ドメインに相当する塩基配列を pAP-Tag5 に挿入、プラスミドを 293T 細胞へ導入、細胞培地内に分泌された NELL-AP 融合蛋白質は anti-AP-agarose を充填したカラムに通し精製した。精製蛋白質は AP 活性の測定および SDS-PAGE ゲルにて確認している。

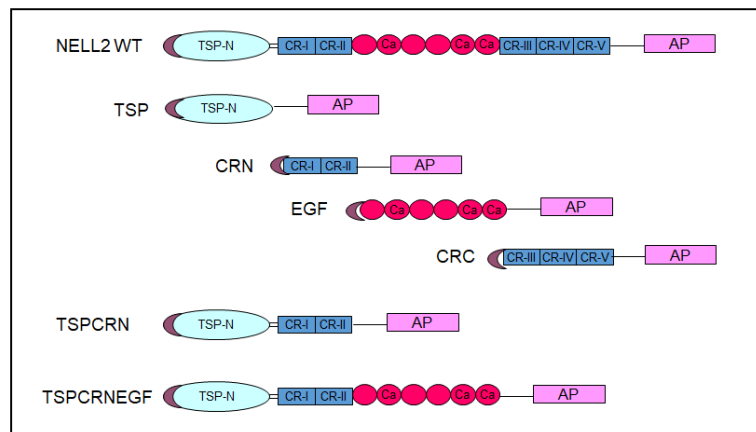


図 1. 使用した NELL2 ドメイン蛋白質

(3) Cell migration assay

In vitro での癌細胞移動を調べるため、Corning 社の Transwell を使用した。Transwell は、細胞培養皿内に設置できる、底に細胞が通過できる小さな穴の開いた膜が張られた入れ物で、Transwell の下面のみ各 NELL ドメイン蛋白質でコートした後、Transwell の内部および細胞培養皿内に培地を入れた。培養細胞は Transwell 内に入れ、37 にて一晚培養後、下面に現れた細胞数を数えた。細胞数が少ないほどコートした蛋白質により細胞移動が抑制されたといえる。

(4) NELL2 結合性の評価

乳癌細胞表面に結合する NELL2 のドメインを同定するため、乳癌細胞株を培養皿上で培養した後、表面に各 NELL2-AP 蛋白質を含む溶液を加え室温にて反応させた。洗浄、固定および内因性 AP 不活化(高温処理)後に NBT/BICP で発色させた。濃い紫色が検出されたものが細胞表面と蛋白質の結合性を示している。

本研究では細胞株は MCF-7, UACC812, MDA-MB-361 および MDA-MB-231 を使用した。

4. 研究成果

(1) 乳腺組織および乳癌での NELL の発現；

腎臓以外の臓器での NELL の発現を確認するため、いくつかの癌および正常臓器にて NELL1 および NELL2 の免疫染色を施行したところ、乳腺で特徴的な染色性が認められたため乳腺を中心に研究を進めることとした。図 2 に乳腺での NELL1, NELL2 および ROBO3 の免疫染色結果の一例を示す。正常乳管では、NELL1 および ROBO3 は管腔内腔側に存在する乳管上皮細胞 (図 2A, 2C、図の左端)、NELL2 は管腔外側に存在する筋上皮 (図 2B、図の左端) で染色性を認めた。各図の右側は非浸潤性乳管癌であるが、正常乳管と同様に、NELL1 と ROBO3 は内側の癌細胞で、NELL2 は筋上皮で発現を認めた。NELL2 の筋上皮での発現は、正常乳管と比較し、非浸潤性乳管癌で染色性の減弱がみられた。次に乳管あるいは非浸潤性乳管癌周囲の染色された領域を比較した。図 3 に 3 例の非浸潤性乳管癌を示した。図 3B ではほぼ全周性 (100%) に茶色の染色が認められているが、図 3A では約 10%、図 3C では 50% で陽性と判定した。測定可能な症例を平均すると、正常乳管では周囲約 68% の領域に染色性を認めたのと比較し、非浸潤性乳管癌周囲では約 35% と低下していた。ROBO3 の染色性は正常乳腺上皮と比較し、非浸潤性乳管癌、浸潤性乳管癌で低下していた。NELL1 は正常乳腺上皮、非浸潤性乳管癌および浸潤性乳管癌で染色性に有意な差は認められていない。

(2) NELL2 による細胞移動抑制；

我々は以前に腎癌細胞株に対する NELL2 の細胞移動抑制を報告したが、同様の現象が乳癌細胞株に対しても生じるか検討した。全長の NELL2 をコートした Transwell では使用した 4 つの乳癌細胞株すべてにおいて細胞移動がコントロールと比較し低下していた (図 4A)。代表として MCF-7 を用いて、NELL2 ドメインによる同様の実験を施行した。TSPCRNEGF (C 末の CR ドメインを削除したもの) では全長 NELL2 に近い細胞移動抑制がみられたが、TSP ドメインのみでは移動した細胞数はコントロールより増加し、他のコンストラクトはコントロールと比較し有意な差は認められなかった (図 4B)。

(3) NELL2 の乳癌細胞株表面への結合；

反発作用を起こすためには、はじめにレセプターとリガンドが結合する必要がある。レセプターと結合する NELL2 のドメインを特定するため、作成した各 NELL2-AP 蛋白質を乳癌細胞株と反応させたところ、全長、TSP, TSPCRN および TSPCRNEGF が結合性を示した

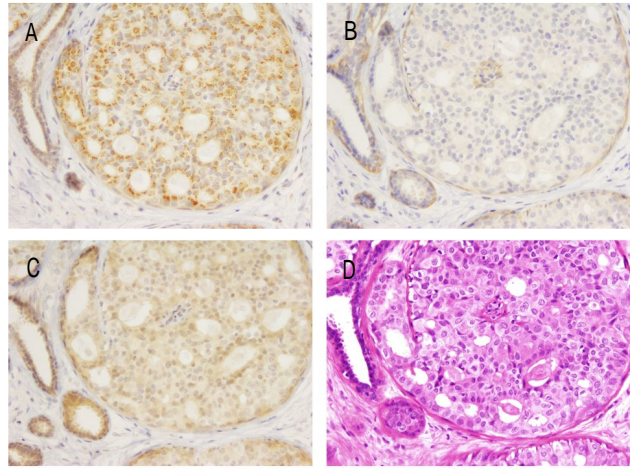


図 2. 乳腺における NELL1(A), NELL2(B) および ROBO3(C) の免疫染色. D: HE 染色

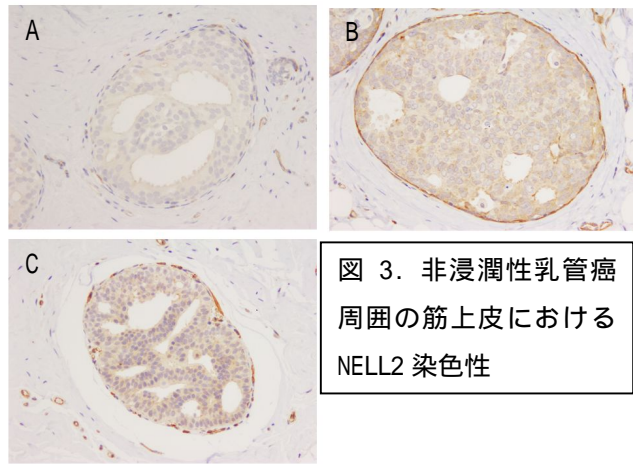


図 3. 非浸潤性乳管癌周囲の筋上皮における NELL2 染色性

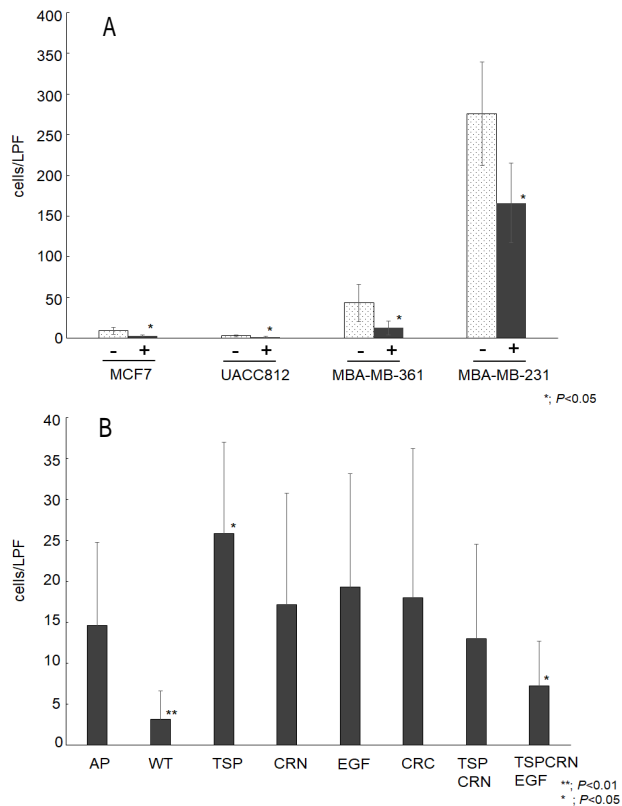


図 4. NELL2 全長(A)およびドメイン (B)による乳癌細胞株の細胞移動抑制

(図5)。結合したコンストラクトはいずれも TSP を含んでおり、このドメインが乳癌細胞株表面のレセプターと結合していると推測される。ROB03 が NELL2 のレセプターではあるが、既報告では NELL2 の EGF-like ドメインが ROB03 と結合するとされており本結果とは一致しない。そのため NELL2 には ROB03 以外のレセプターが存在する可能性があると考えている。

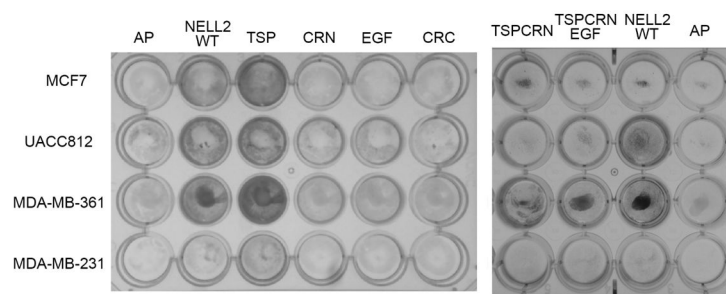


図5. NELL2 の乳癌細胞株表面への結合

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Ooi A, Inokuchi M, Horike SI, Kawashima H, Ishikawa S, Ikeda H, Nakamura R, Oyama T, Dobashi Y.

Amplicons in breast cancer analyzed by multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization

Human Pathology, 査読有, 85, 2019, 33-43

Doi: 10.1016/j.humpath.2018.10.017

〔学会発表〕(計3件)

中村 律子、尾山 武、大井 章史

乳腺組織における NELL の発現分布

第 107 回 日本病理学会総会, 2018 年

中村 律子、尾山 武、大井 章史

乳腺組織および乳癌における NELL1, NELL2 の発現分布

第 76 回 日本癌学会学術総会, 2017 年

中村 律子、尾山 武、田尻 亮輔、大井 章史

分泌型蛋白質 NELL1/NELL2 の大腸癌における発現解析

第 105 回日本病理学会, 2016 年

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：尾山 武

ローマ字氏名：OYAMA, Takeru

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：助教

研究者番号（8桁）：00515314

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。