

機関番号：18001  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21791085  
 研究課題名(和文) 有棘細胞癌の浸潤・転移に関する microRNA および mRNA の網羅的検索  
 研究課題名(英文) Comprehensive survey of microRNAs and mRNAs involved in cutaneous squamous cell carcinoma invasion and metastasis  
 研究代表者  
 武居 公子 (TAKEI KIMIKO)  
 琉球大学・大学院医学研究科・助教  
 研究者番号：90325861

## 研究成果の概要(和文)：

有棘細胞癌の浸潤・転移機構を理解するため、マウスにおいて低転移性と高転移性の扁平上皮癌を形成する同一遺伝背景の形質転換ケラチノサイト株について、microRNA、mRNA、蛋白質の発現を網羅的に比較した。高転移性株はケラチン 8/18 ペアを異所性に高発現し、低転移株にこれらを発現させると基底膜浸潤性を獲得した。有棘細胞癌症例の免疫組織化学解析では、これらの異所性発現と浸潤能が有意に関連した。

## 研究成果の概要(英文)：

In order to understand the mechanism of invasion and metastasis of cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC), we have compared microRNA, mRNA and protein expression profiles between metastatic and non-metastatic transformed keratinocyte strains. Metastatic cells exhibited ectopic overexpression of the keratin 8/18 pair, and non-metastatic cells gained invasiveness after expression of exogenous keratin 8/18. Consistently an immunohistological analyses of these keratins in cSCC specimens revealed a significant correlation between ectopic keratin 8/18 and invasiveness.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：癌、ゲノム、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

有棘細胞癌は光線角化症 (AK) や Bowen 病 (BD) のような非浸潤性の表皮内癌が真皮への浸潤性を獲得した結果生じる。しかし浸潤や転移に至る機構は完全には明らかになっていない。マウスケラチノサイト細胞株である Pam212 細胞はマウスに接種すると有棘細胞癌 (SCC) を生じるが殆ど転移しない。しかしまれなリンパ節転移巣から樹立された LY 細胞は高率に転移する。同一の遺伝的背景を持つ両者を比較するこ

とで転移に関する遺伝子を効果的に同定出来ると考えた。

## 2. 研究の目的

マウスケラチノサイト細胞株 Pam212 細胞(低転移株)とその娘細胞株である LY 細胞(高転移株)を比較することで有棘細胞癌の浸潤・転移に関与する分子を同定する。

## 3. 研究の方法

(1) 材料:Pam212 細胞、LY 細胞(LY-1,LY-2)を対象とした。GFP 標識された keratin8 (GFP-K8)、keratin18 (GFP-K18) をウイルス発現系を用いて Pam212 細胞にいずれか単独または両方発現させ、薬剤耐性を用いて安定発現株を得た。

(2) 2-D DIGE と MALDI-TOF/MS:Pam212 細胞、LY-1 細胞から蛋白を抽出し、各々別の蛍光色素で標識後、1 次元目の電気泳動で pH による分離を行い、次いで 2 次元目の泳動で分子量による分離を行った。泳動後のゲルをレーザーキャナーでスキャンし、蛋白質スポットを可視化、%V 値を用いて変化比 (LY-1/Pam212) を決定した。独立した 3 回の実験で同様の結果であった。3 回の実験において有意な平均変化比 ( $P < 0.05$ ) を示した蛋白質スポットを PVDF 膜に転写し、金コロイド染色で可視化した。目的のスポットを切り出して膜上で蛋白質を酵素消化した。得られたペプチドを脱塩し alpha-cyano-4-hydroxymethyl acid matrix で MALDI target plate に溶出した。4700 Proteomics Analyzer (GE Healthcare) でマスペクトルを検出し、その結果に基づいて Data Explorer™ (Ver2.0, Applied Biosystems) 及び MASCOT (Ver 2.2.06) プログラムを使ってデータベース検索し、蛋白を同定した。

(3) 免疫ブロットと RT-PCR:SDS 化した蛋白サンプルを電気泳動後ニトロセルロース膜に転写し、抗 K8 抗体 (Ks8.7)、抗 K18 抗体 (C-04)、抗 K14 抗体 (LL002) (Santa Cruz Biotechnology)、抗 beta-actin 抗体 (H11) (Applied Biological Materials Inc.) でウエスタン解析し、ECL で検出した。遺伝子発現は RT-PCR で検出した。

(4) 免疫蛍光染色:poly-L-lysine でコートしたカバースリップに細胞をまき、メタノール/アセトンで固定した。抗ケラチン抗体は(3)と同一の抗体を使用した。2 次抗体には Alexa 568 標識抗マウス IgG (Molecular Probes) を使用した。

(5) Chemotaxis アッセイ及び Chemoinvasion アッセイ:Matrigel™(人工基底膜)でコートされた有孔性 (ポアサイズ 8 $\mu$ m) の polyethylene phtalate 膜で境された上下 2 層からなる 24 ウェルの BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber (BD Biosciences) を使用した。上層には 0.1% BSA / DMEM を入れ、下層には 10% BSA / DMEM を入れた。上層には細胞間接着を減らす為に低密度で細胞を撒き ( $1 \times 10^4$  個/well)、37°C、5%CO<sub>2</sub> で培養した。24 時間後に膜上層側に残った細胞を綿棒で除去し、下層側の細胞をメタノール固定後、トルイジンブルー染色し計数した。Chemotaxis アッセイは膜を Matrigel™ でコートせずに行った。

(6) 免疫組織化学:2004 年 1 月 1 日から同年 12 月 31 日までの間に琉球大学附属病院を受診した AK 及び BD (表皮内癌) 21 例、SCC (浸潤癌) 24 例を対象とした。パラフィン包埋病理切片を上記 (3) と同一の K8, K18 で免疫染色した。

#### 4. 研究成果

(1) K8/18 は高転移性株で高発現である: 2D-DIGE の結果 LY-1 で高発現の蛋白スポットが 7 例、低発現の蛋白スポットが 7 例検出された (図 1A-a,-b,-c,-d、表 1)。これらのスポットを質量分析したところ K8 (42 倍以上増加)、K18 (12 倍以上増加) が最も高発現であった (表 1)。一方で、K14 は最も低発現であった (14 倍以上低下)。RT-PCR 及び Western blot、免疫蛍光染色による発現解析でも LY-1、-2 において K8, K18 の高発現とケラチンフィラメント形成が確認された。しかし K14 は LY-1 のみで発現低下しており LY-2 では発現低下はみられなかった (図 1B-D)、転移性とは無関係と考えられた。

(2) K8/18 の異所性発現により in vitro での浸潤性が増強する: Chemotaxis アッセイ及び Chemoinvasion アッセイで Pam212 と LY-1,-2 を比較したところ、K8/18 が発現している LY-1,-2 は高走化性、高浸潤性を示したが、Pam212 は低走化性、低浸潤性であった (図 2A)。Pam212 に GFP 標識 K8, K18 を共発現させた株 (Pam212-K8/18#1, Pam212-K8/18#2、図 2B,2C) では、野生型の Pam212 よりも走化性、浸潤性が有意に増強した (図 2A)。

(3) ヒト SCC でも K8/18 の異所性発現が浸潤に関与する: 24 例の SCC のうち、13 例が K8, K18 染色が両方陽性 (double positive) だった (表 2a、図 3)。しかし表皮内癌 21 例では double positive は 2 例のみであった。更に K8, K18 染色陽性は癌の浸潤性とよく相関していた ( $p=0.00021$ ,  $p=0.00003$  表 2c, d)。図 3 は正常皮膚及び癌病理組織の K8, K18 による免疫染色である。通常表皮は K8, K18 陰性であるが浸潤癌では陽性となる。表皮内癌での陽性所見は浸潤傾向を示すと思われる。注意深い経過観察を要すると考えられる。これらの結果から、K8, K18 の異所性共発現により癌化した表皮ケラチノサイトが基底膜への浸潤能を獲得し、有棘細胞癌の深部浸潤・転移に関与することが明らかになった。ケラチンに関してはマイクロアレイでも高転移性株における発現増強が確認されている。また、マイクロ RNA である mir-221/222 の発現増強も検出されており、現在更に検討を進めている。

表 1 同定された蛋白質群

番号 (図 1 と 対応)	名称 (accession no.)	相対比 (LY-1/ Pam212)	P 値 (paired <i>t</i> test)
1	Keratin 8 (AAI06155)	53.73	0.025
2	Keratin 8 (AAI06155)	119.85	0.0004
3	Keratin 8 (AAI06155)	42.94	0.012
4	Keratin 18 (NP_034794)	15.58	0.007
5	Keratin 18 (NP_034794)	12.24	0.039
6	Translationally controlled tumor protein (NP_033455)	2.82	0.021
7	Fatty acid binding protein 5 (NP_001435)	2.54	0.015
8	Keratin 14 (NP_058654)	0.06	0.007
9	Keratin 14 (NP_058654)	0.07	0.002
10	Latexin (NP_058033)	0.07	0.002
11	Latexin (NP_058033)	0.26	0.003
12	Stratifin (NP_061224)	0.11	0.013
13	ATP synthase, H <sup>+</sup> -transporting mitochondrial F0 complex, subunit d (NP_082138)	0.34	0.006
14	Ribosomal protein large P2 (NP_080296)	0.17	0.037

図 1A-a 蛋白の 2 次元電気泳動 (Pam212 全体図)

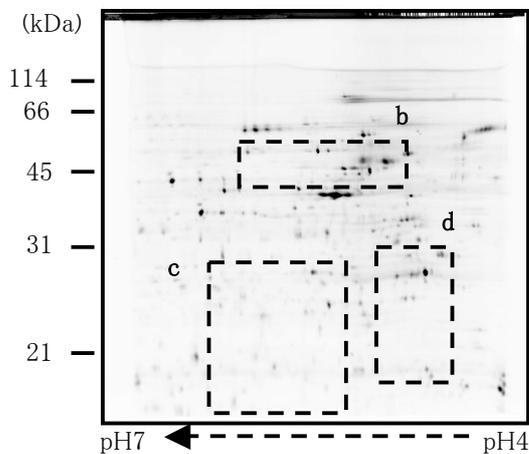


図 1A-b 破線内比較拡大図

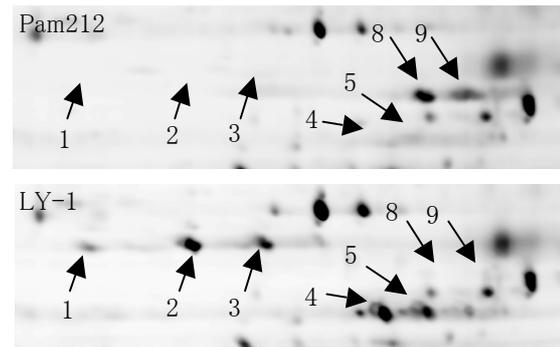


図 1A-c 破線内比較拡大図

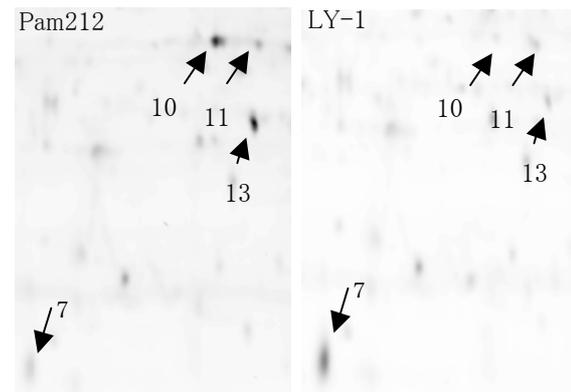


図 1A-d 破線内比較拡大図

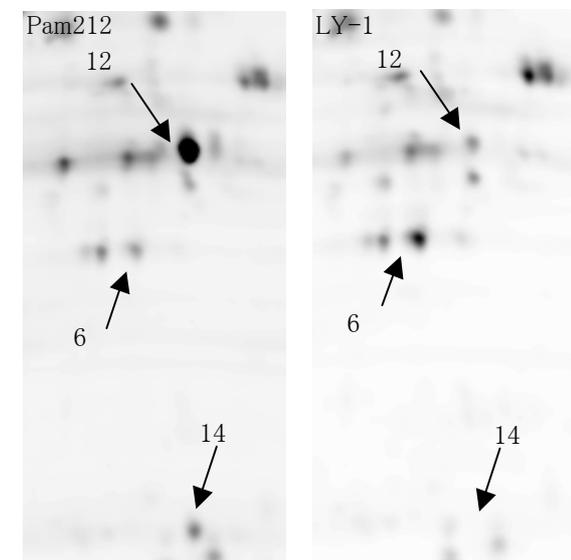


図 1B Pam212(低転移性)と LY-1, LY-2(高転移性)における K8, K18, K14 の蛋白発現

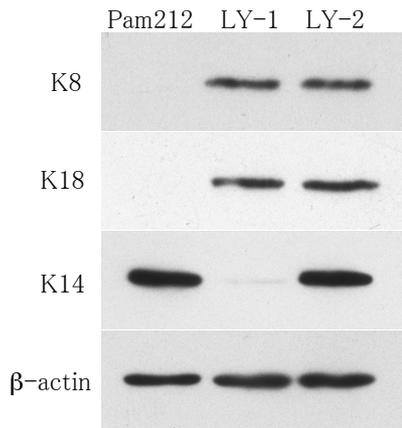


図 1C Pam212(低転移性)と LY-1, LY-2(高転移性)における K8, K18, K14 の mRNA 発現

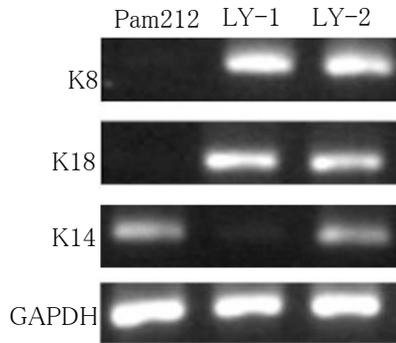


図 1D Pam212(低転移性)と LY-1, LY-2(高転移性)における K8, K18, K14 の発現(免疫染色)

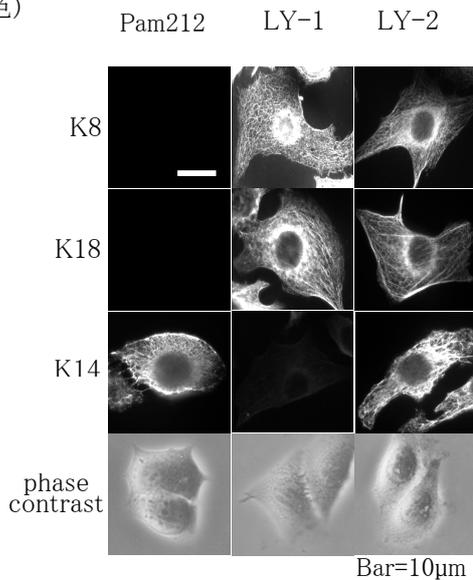


図 2A K8/K18 共発現による Pam212 の浸潤性獲得

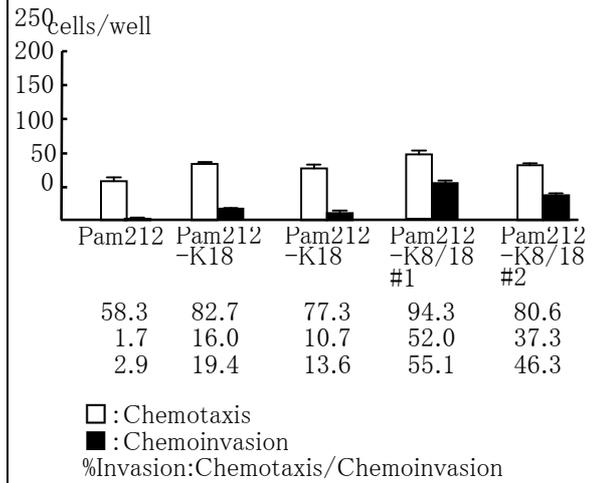
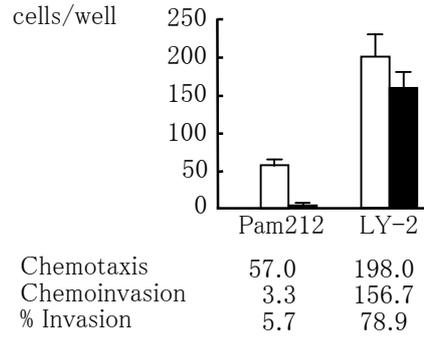


図 2B Pam212 への K8, K18 発現誘導

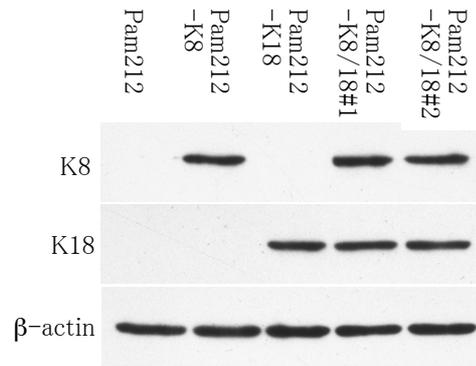


図 2C Pam212 への K8, K18 発現誘導 (免疫染色)

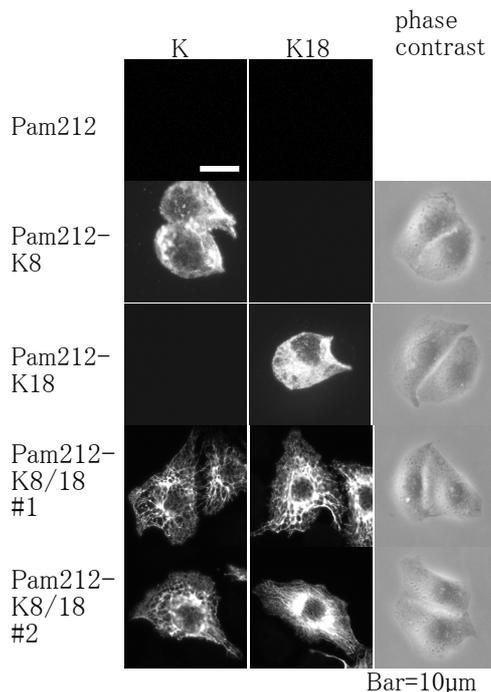


表 2 浸潤癌と表皮内癌組織の K8/18 染色

	陽性	陰性	p 値
a. K8/18 double -positive			
浸潤癌	13 (54.2%)	11 (45.8%)	0.00164
表皮内癌	2 (9.5%)	19 (90.5%)	
b. K8/18 double -negative			
浸潤癌	2 (8.0%)	22 (92.0%)	0.00000
表皮内癌	17 (81.0%)	4 (19.0%)	
c. K8-positive			
浸潤癌	18 (75.0%)	6 (25.0%)	0.00021
表皮内癌	4 (19.0%)	17 (81.0%)	
d. K18-positive			
浸潤癌	17 (70.8%)	7 (29.2%)	0.00003
表皮内癌	2 (9.5%)	19 (90.5%)	

図 3A 正常皮膚における K8, K18 の免疫組織化学染色 (x100)

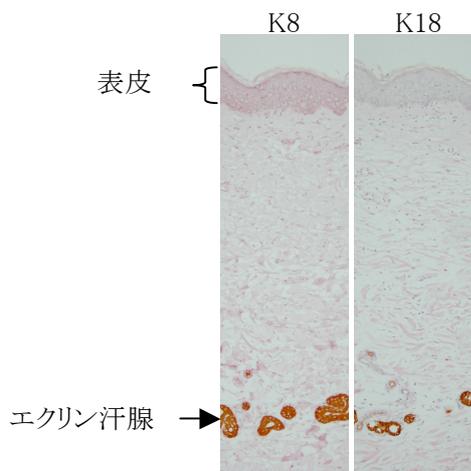
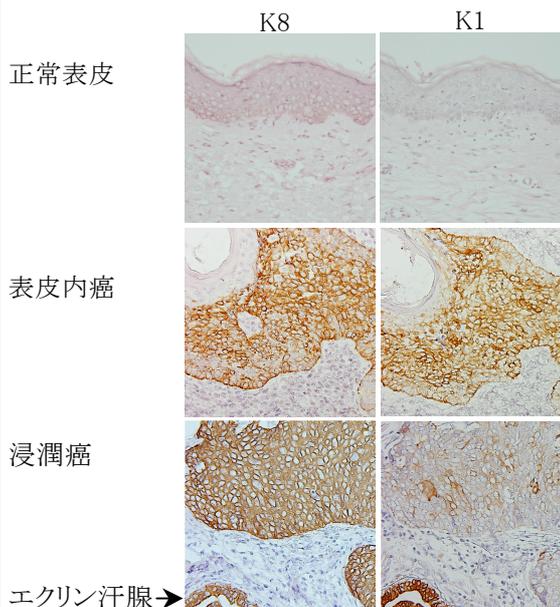


図 3B 正常表皮、表皮内癌、浸潤癌における K8/18 の免疫組織化学染色 (x200)



## 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 2 件)

① Yamashiro, Y. \*, Takei, K. \*, Umikawa, M., Asato, T., Oshiro, M., Uechi, Y., Ishikawa, T., Taira, K., Uezato, H., Kariya, K., Ectopic coexpression of keratin 8 and 18 promotes invasion of transformed keratinocytes and is induced in patients

with cutaneous squamous cell carcinoma.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有,  
399, 2010, 365-372 (\*co-first author)

②Arakaki, O., Asato, Y., Yagi, N., Taira, K.,  
Yamamoto, Y., Takei, K., Hosokawa, A., Kayo,  
S., Hagiwara, K., Uezato, H.

Phaeohyphomycosis caused by *Exophiala*  
*jeanselmei* in a patient with polymyalgia  
rheumatica. *J. Dermatol.*, 37, 363-373, 2010

[学会発表] (計 2 件)

① Yoshito Yamashiro (代表発表者),  
Kimiko Takei, Masato Umikawa, Tsuyoshi  
Asato, Kiyohito Taira, Hiroshi Uezato,  
and Ken-ichi Kariya, The proteomic  
search for prognosis markers of  
cutaneous squamous cell carcinoma.:  
MBSJ2009(第 32 回日本分子生物学会年会)  
プログラム: 3P-0743: 418, 2009 年 12 月  
11 日: パシフィコ横浜

②Maitsetseg Bayarjargal (代表発表者),  
Yukiko Uechi, Shogo Endo, Kimiko  
Nonaka-Takei, Minoru Oshiro, Masato  
Umikawa, Tsuyoshi Asato, Yoshito  
Yamashiro, Tomohiko Taguchi, and  
Ken-ichi Kariya, Localization of Rap2 in  
recycling endosome in a palmitoylation-  
dependent manner.: *Biochemistry*  
*Molecular Biology (BMB)* 2008(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)プログラム: 1P-0444: 219,  
2008 年 12 月 9 日: 神戸国際展示場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武居 公子 (TAKEI KIMIKO)  
琉球大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 90325861

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: