

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659162

研究課題名(和文)接着分子とLINC complexとの相互作用の解明

研究課題名(英文)Elucidation of interaction between of LINC complex with adhesion molecule

研究代表者

濱田 吉之輔 (Hamada, Yoshinosuke)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10362683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：細胞実験によりmRNAおよびタンパク質の発現を検討するとSUN2とnesprin2の発現が低下していた。また組織標本で免疫染色によりタンパク質の発現を検討するとlaminA/C, SUN1, SUN2, nesprin2の発現が低下し、さらに統計解析の結果、乳癌の悪性化に影響するのはlaminA/Cとnesprin2であった。過去の報告では細胞レベルでも、laminA/Cの発現低下と乳癌の悪性化との関連が指摘されている。よって乳癌ではLINC complexタンパク質の発現が低下し、中でもlaminA/Cとnesprin2の発現低下が乳癌の悪性化に関与していると示唆された。

研究成果の概要(英文)：The evaluation of mRNA and protein expression by cellular experiments revealed a decrease in the expression of SUN2 and nesprin 2, and the evaluation of the expression of these proteins by immunostaining of tissue samples revealed a tendency for a decrease in the expression of lamin A/C, SUN1, SUN2, and nesprin 2. Furthermore, results of the statistical analysis showed that lamin A/C and nesprin 2 contributed to the exacerbation of breast cancer. Previous cellular-level studies have also reported the existence of a relationship between decreased lamin A/C expression and the exacerbation of breast cancer. These evidences suggest that the expression of LINC complex proteins tends to be decreased in patients with breast cancer and that a decreased expression of lamin A/C and nesprin 2, in particular, is involved in the exacerbation of breast cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 実験病理学

キーワード：LINC complex nesprin laminA/C SUN1 SUN2

## 1. 研究開始当初の背景

細胞が癌化すると様々な形態学的変化が生じる。特に核に関する変化は細胞診断・組織診断を行う上で重要な所見であり、核形不整や大小不同、クロマチンの増量や不均等分布、核/細胞質比(N/C比)などが見られることが古くから知られている。

腫瘍細胞においてなぜこのような形態学的変化が生じるのかについて現在研究が行われているが、その1つとして、生物種や組織によって多様である核の体積・形態の決定には細胞質も関係しているという報告がある。そこで本研究では、核と細胞質を繋ぐ一連のタンパク質群、LINC complexに着目した。

## 2. 研究の目的

構成要素としては、核の外膜に発現し、細胞骨格であるアクチンと結合している nesprin、核の内膜に発現している SUN, lamin, emerin などがある。

また LINC complex タンパク質をコードしている遺伝子の変異による疾患も報告されており、laminA/C をコードする LMNA の変異が原因となるハッチンソン・ギルフォードプロジェリア症候群の患者の細胞の核は、正常細胞の核と比較すると著明な形態異常が見られる (Alexandre Méjat et al. Nucleus .2010)。これらの事実から、癌細胞で見られる核の形態異常に LINC complex タンパク質が関係しているのではないかと考えた。また核の形態変化は様々な組織から起こる腫瘍に共通する所見だが、乳癌においては核異型度と核分裂像から判定された病理組織学的分類(核グレード)が予後を推定する上で非常に重要な因子の一つとして考えられており、早期乳癌における治療法選択の際にも考慮されるなど、その臨床的意義は大きい。

以上のことから本研究では、乳癌で LINC complex タンパク質の発現がどのように変化しているのか解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)RT-PCR

6cm dish に 100%の細胞密度にしておいた細胞にセパゾール RNA superG(nacalaitesque, Kyoto, Japan)を 1ml 加え、スクレーパーを用いてエッペンに回収した。そしてそのエッペンにクロロホルムを 200  $\mu$ l 加えて震盪し、12000rpm、15 分間、4 で遠心分離した。その上清を新しいエッペンに移し、イソプロパノールを上清と同量の 300  $\mu$ l 加えて転倒混和した後 15 分間放置し、12000rpm、15 分間、4 で遠心した。次に上清を捨て、ベレットに 80%エタノールを 500  $\mu$ l 加えて 12000rpm、7 分間、4 で遠心分離した。遠心後上清を捨ててベレットを乾燥させ、diethylpyrocarbonate(DEPC)水で溶解した。続いてこの RNA 溶液の濃度を nano drop で測定し、RNA の総量が 5  $\mu$ g になる溶液量をそれぞれの細胞について計算した後、DEPC 水と混合して全体で 15  $\mu$ l とした。そしてこの RNA 溶液を用いて逆転写反応を行い、cDNA を得た。逆転写反応は 42 60分、65 10分、4 の条件で行った。続いて得られた cDNA を用いて PCR(Polymerase Chain Reaction)を行った。PCR は 94 で 2 分反応させた後、94 30秒、アニーリング温度 30 秒、72 30秒の反応をそれぞれのサイクル数行った。アニーリング温度とサイクル数は、laminA/C は 57 、32 サイクル、SUN1 は 56 、32 サイクル、SUN2、nesprin2 は 57 、35 サイクルである。

最後に、得られた cDNA 溶液を 2%アガロースゲルにアプライして 100V、30 分間電気泳動を行った。

### (2)蛍光免疫染色

2mm 径のカバーガラスを入れた 24well プレートに乳腺細胞株および乳癌細胞株を播種し、細胞接着後、0.5%TritonX-100 を加え 1%PFA(para formaldehyde) /PBS(phosphate buffered saline)溶液で 10 分間固定した。

その後 PBS 溶液で 5 分間、3 回洗浄し、5%BSA(bovine serum albumin)(nacalaitesque)/PBS 溶液で 30 分間ブロッキングした。ブロッキング後、PBS で 200 倍に希釈した抗 laminA/C 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa cruz, CA, USA)、抗 SUN1 抗体(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、抗 SUN2 抗体(Millipore, Billerica, MA)、抗 Nesprin2 抗体(Sigma-Aldrich)で 4、一晩反応させた。反応終了後、PBS で 5 分間、3 回洗浄し、2 次抗体として laminA/C では PBS で 200 倍に希釈した FITC(fluorescein isothiocyanate)標識 anti goat IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA, USA)を、SUN1、SUN2、nesprin2 では PBS で 2000 倍に希釈した Cy3(Cyanine3)標識 anti rabbit IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc)を室温で 40 分間反応させた。反応終了後、PBS で 5 分間、3 回洗浄し、DAPI(4',6-diamino-2-phenylindole)含有水溶性封入剤 (Invitrogen life Technologies)で封入した。その後、蛍光顕微鏡で観察を行った。

### (3)組織学的評価

パラフィン包埋された乳癌組織のブロックを 2 $\mu$ m の厚さで薄切した。この薄切標本をキシレンによって脱パラフィンした後、laminA/C については 0.01M クエン酸バッファー (pH6.0)を、SUN1、SUN2、nesprin2 では DAKO Target Retrieval solution(pH9.0)を用いて、Pascal で抗原賦活を行った。そして 10 分間流水水洗の後、3.7%過酸化水素/メタノール溶液で 15 分間ブロッキングした。続いて PBS-T(tween 20)で 5 分間、3 回振動させながら洗浄し、5%BSA 溶液にて 1 時間ブロッキングした。そして 1 次抗体として PBS-T で 100 倍に希釈した抗 laminA/C 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc)、200 倍に希釈した抗

SUN1 抗体(Sigma-Aldrich)、抗 SUN2 抗体 (Millipore)、抗 Nesprin2 抗体 (Sigma-Aldrich)を用い 4 で一晩反応させた。反応終了後、PBS-T で 5 分 $\times$ 3 回振動させながら洗浄した。次に laminA/C については、2 次抗体として PBS-T で 200 倍希釈した ビオチン化 anti goat IgG 抗体 (Dako)を用いて室温 40 分間反応させ、その後 PBS-T で 100 倍希釈した SA-HRP(streptavidin Horseradish Peroxidase Conjugate)(GE Healthcare UK Ltd. Amersham Place, UK)を用いて室温 40 分間反応させた。一方 SUN1、SUN2、nesprin2 については 2 次抗体として ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO(MULTI) (NICHIREI BIOSCIENCE INC, Tokyo, Japan)を用いて室温 40 分間反応させた。2 次抗体反応後 PBS-T で 5 分間、3 回洗浄し、DAB(3,3'-diaminobenzidine) 10mg と 37%過酸化水素 11.25 $\mu$ l を加えた 0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH7.6)を発色剤として発色反応を行い、5 分間流水水洗の後ヘマトキシリンで核を染色した。そして再び 5 分間流水水洗し、脱水、透徹、封入を行った。その後、光学顕微鏡で観察を行った。

### (4)統計解析

免疫染色を行った乳癌組織標本について各タンパク質の発現量を評価し、2 グループに分類した。そのグループ間で、乳癌の悪性度や予後を決定する因子に差があるか調べるため<sup>2</sup>独立性の検定を行った。p<0.05 をもって有意とした。

## 4. 研究成果

(1) 乳腺細胞株 HBL-100、乳癌細胞株 MCF7、MDA-MB-231、SK-BR-3、ZR-75-30 について mRNA の発現を検討した。laminA/C、SUN1 では、全ての細胞株でそれぞれ明確なバンドが見られた。一方で nesprin2 は 5 種類全ての細胞株で発現していると評価したが、サイクル数

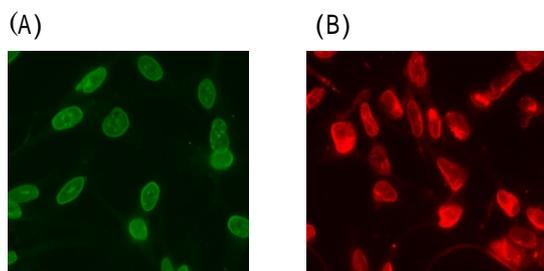
を増やしてようやく検出できる程度だった。さらに SUN2 では SK-BR-3 と ZR-75-30 で発現していると評価したが、PCR のサイクル数を増やしても非常に薄いバンドしか見られなかった。このことから、SUN2 と nesprin2 の mRNA レベルでの発現が著明に低下していることが分かった。

LINC complex が核と細胞骨格を繋ぐ上で SUN2 と nesprin2 の結合が特に重要だとする報告もあることから、SUN2 と nesprin2 の mRNA レベルでの発現低下が乳癌細胞に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。

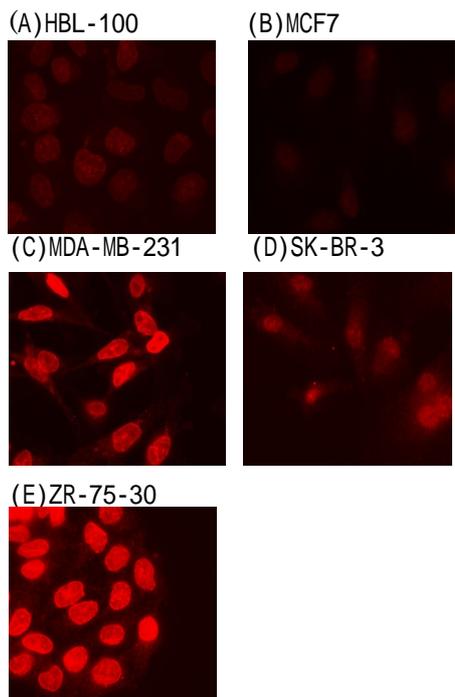
(2)RT-PCR で使用したのと同じ 5 種類の細胞株を用いて、laminA/C, SUN1, SUN2, nesprin2 の細胞内局在を調べた。その結果、laminA/C と SUN1 はいずれも、5 種類全ての細胞株で核膜への局在が見られた (Fig. 1A, B)。一方で SUN2 と nesprin2 では、細胞株によって発現パターンに差が見られた。SUN2 は MDA-MB-231 および ZR-75-30 で核膜に局在していたのに対し、HBL100, MCF7, SK-BR-3 では核質に弱い発現を認めたものの核膜への局在は見られなかった (Fig. 2A-E)。また nesprin2 は HBL-100 および ZR-75-30 で核膜に局在していたのに対し、MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 では核質に弱い発現を認めたものの核膜への局在は見られなかった (Fig. 3A-E)。Fig. 1-3 の結果をまとめると、SUN2 および nesprin2 の発現が低下している細胞株が見られた。

今回、mRNA レベルで発現が低下していた SUN2 と nesprin2 では、細胞株によって発現パターンに差が見られた。MCF7 の nesprin2、MDA-MB-231 の nesprin2、SK-BR-3 の SUN2 と nesprin2 は mRNA レベルでは発現していてもタンパク質レベルで発現が低下しており、翻訳の過程に異常が生じている、または合成されたタンパク質が何らかのメカニズムによって早期に分解されている可能性が考えら

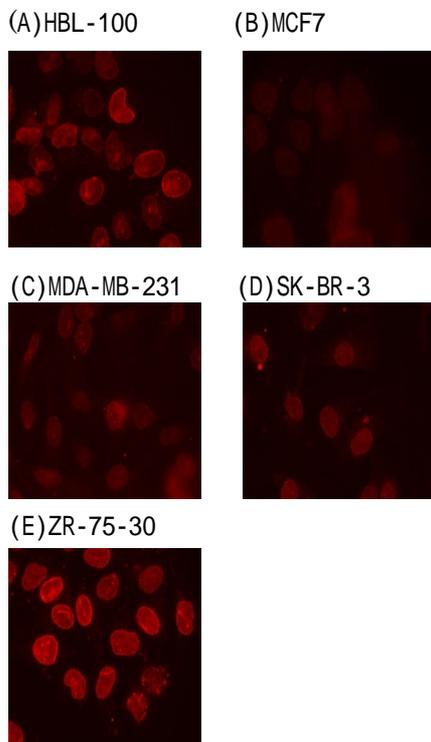
れる。また SUN2 と nesprin2 では発現あり(+)とした細胞株でも発現量が少なかったことから、蛍光染色では抗体の検出感度以下でタンパク質の発現が認められなかった可能性も考えられる。そして、MDA-MB-231 の SUN2 に関しては mRNA レベルで発現が低下しているにも関わらずタンパク質レベルでは発現が認められた。その原因について、プライマーと抗体の検出感度の違いが考えられる他、プライマーの認識部位と抗体の認識部位が異なることが考えられるので、今後、プライマーと抗体の認識部位を同じにして、再度 RT-PCR と蛍光染色を行う必要がある。



(Fig.1) laminA/C(A)と SUN1(B)の細胞内局在の検討.



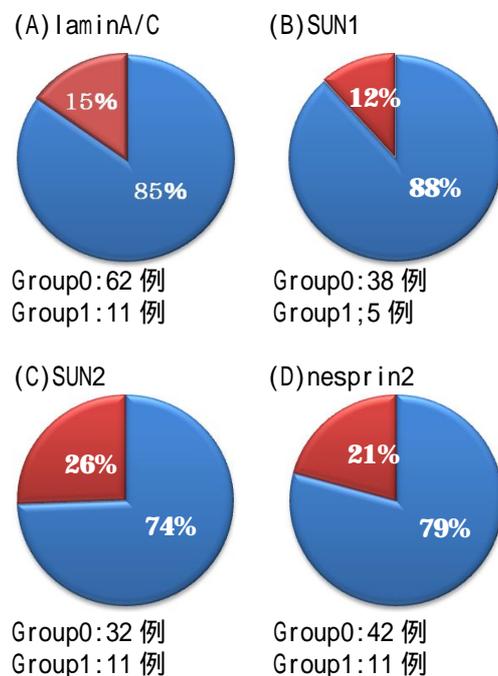
(Fig.2) SUN2 の細胞内局在の検討.



(Fig.3)nesprin2 の細胞内局在の検討.

(3) 癌細胞と非癌部の細胞とでは染色性が異なっていた。そこで今回は、非癌部の中でも乳管の細胞を比較対照とした。乳管は内側の乳管上皮細胞と外側の筋上皮細胞から成る二層構造を呈しているが、いずれのタンパク質も乳管上皮細胞および筋上皮細胞の核膜に局在していた。nesprin は横紋筋や平滑筋に特に多く分布するため、乳管でも乳管上皮細胞と比較して筋上皮細胞の方が高発現していた。laminA/C および SUN でも同様の傾向が見られた。一方、癌細胞は症例によって染色性に差が見られ、今回は2つのグループに分類した。まず非癌部と比較し、染色性が弱いものを Score0 とし Group0 と分類し発現が低下しているとした。また同等以上の染色性を示すものを Score1 とした。さらに Score1 の中でタンパク質の発現面積が50%未満を Group0 とし、50%以上を Group1 と分類し発現が亢進しているとした。Score0 の中には癌細胞のほとんどが陰性の症例や、染色性が弱いながらも多くの癌細胞で発現が認められる症例など様々な発現パターンが見られたが、Score1 に分類した症例に関してはほ

とんどが 50%以上の癌細胞で発現が認められた。各タンパク質で、Score0 が全体の70%以上を占めた (Fig.4)。すなわち、LINC complex タンパク質の発現が低下傾向にあった。続いて4種類のタンパク質に関する評価をまとめて、Group0 と Group1 の個数によって再分類した。4種類すべてが Group1 という症例はなく、4種類全てが Group0 という症例が過半数を占めた。この分類から、多くの乳癌症例において LINC complex タンパク質の複数が連動して発現低下を示すことが分かった。



(Fig.4) LINC complex タンパク質の細胞レベルでの発現の検討.

(4) 個々のタンパク質に関する評価では Group0 と Group1 の間で、4種類のタンパク質をまとめた評価では Group1 が0個の群と1個以上の群の間で、乳癌の予後や悪性度を決める因子に差があるか調べるため、臨床病理学データと照らし合わせて統計解析を行った。その結果、LaminA/C については Group1 と比べて Group0 の方が HER2 陰性あるいは弱陽性の割合が有意に高く、また再発の見られる割合が有意に高かった。HER2 は EGFR ファ

ミリーに属する受容体型チロシンキナーゼであり、細胞の増殖や悪性度に関係するタンパク質である。現在では HER2 陽性の乳癌患者に対する分子標的薬が導入され予後は良くなっているが、本来 HER2 陽性とは予後不良であることを表す。nesprin2 については Group1 と比べて Group0 の方が浸潤癌の割合が有意に高く、また MIB1 index が高発現している、すなわち増殖能のより高い症例が有意に多かった。さらに Group0 と比べて Group1 の方が luminal B subtype の割合が有意に高かった。

そして今回は癌細胞で見られる核の異型に注目していたが、免疫染色の結果、いずれの LINC complex タンパク質についても、また 4 種類のタンパク質が核異型度と関連しているという結果は得られなかった。これについては、乳癌組織で評価した核グレードは核分裂像に関する所見も含まれており、核の異型度のみの評価ではないことが関係しているのではないかと考えられる。今後は核の異型度と核分裂像の個数に分けて評価する必要がある。

以上より乳癌組織では多くの症例で LINC complex タンパク質が連動して発現低下を示したが、統計解析の結果、実際に乳癌の悪性度や予後に影響を及ぼすのは主に laminA/C と nesprin2 であると考えられる。

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

濱田 吉之輔 (HAMADA, Yoshinosuke)  
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教  
研究者番号：10362683

### (2) 研究分担者

松浦 成昭 (MATSUURA, Nariaki)  
大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：70190402

河口 直正 (KAWAGUCHI, Naomasa)  
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：70224748

森 誠司 (MORI, Seizi)