

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659184

研究課題名(和文)エキシマレーザー照射による癌偽足突起の選択的単離法の樹立

研究課題名(英文) Selective isolation of pseudopodia by using excimer laser ablation

研究代表者

井上 敬夫 (INOUE, Takao)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：00441006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞を穴あき透過膜上で培養することにより、浸潤に重要と考えられている偽足突起を透過膜の穴の中へ伸長させた。この時、偽足突起部分を選択的に回収する手段としてレーシック手術に用いられるエキシマレーザーを利用した。このレーザーにより穴あき膜上に存在する細胞本体のみを除去し、膜の穴の中に存在する偽足突起部分だけを残すことに成功した。この偽足突起部分に存在するタンパク質は偽足突起の伸長などに関係している可能性が高いので、これらのタンパク質を同定して一部機能を調べた。その結果、偽足突起に多く発現がみられるタンパク質では、突起の密度や長さ、癌細胞の移動速度に関係しているものがあることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Pseudopodia (actin-rich protrusion) are considered to be important for cancer metastasis. Tumor cells were cultured on a porous membrane to form pseudopodia in membrane pores. An excimer laser, which was used for LASIK, was employed for removing cell body on a membrane to selectively isolate pseudopodia in membrane pores. The proteins extracted from pseudopodia were analyzed and identified. Of those proteins, alpha-Parvin, which highly expressed in pseudopodia, was characterized. The results showed that the protein was involved in pseudopodial length and density, and cell migration ability.

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：癌の浸潤・転移 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

癌の浸潤・転移に関する分子機序については未だ不明な点が多いが、最近の研究成果では、癌浸潤の初期段階における上皮-間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition) 能の獲得とそれに伴う遊走能の上昇が重要とされる。癌細胞が上皮性の性格を失い間葉系細胞の性格を獲得することにより、基底膜を越えて浸潤し間質内を遊走するとの考え方である。癌細胞の遊走能を規定する重要な要素は、種々の走化性因子に対する反応性であり、癌細胞は走化性因子の濃度勾配に従って、細胞質を突起状に伸長することにより、その方向へと移動する。この構造物は偽足突起と呼ばれ、癌細胞が間質内を浸潤的に遊走するために必須の構造物と考えられている。

癌浸潤・転移を司る重要な分子としては、癌細胞に発現する一群の接着分子を挙げることができる。癌細胞と細胞外マトリックスとの接着を媒介するインテグリンや、癌細胞と血管内皮細胞や線維芽細胞との接着を媒介するセレクチン型或いはIgCAM型接着分子の重要性が示されている。我々はIgCAM型の接着分子 cell adhesion molecule-1 (CADM1) を骨芽細胞の新規接着分子として同定し、ヒトの骨肉腫でも高頻度に発現していることから、骨肉腫の鑑別診断マーカーとして有用であることを明らかにした。以来本分子と骨肉腫の悪性形質との関連性の解析に携わっている。興味深いことに最近、CADM1 は成人 T 細胞白血病細胞に強発現し、その浸潤・転移を促進することが報告された。CADM1 は骨肉腫においても同様の役割を担っている可能性があり、今後の解析が待たれる。しかしながら、個々の分子が如何に癌の浸潤・転移に関わっているかという視点でのアプローチでは癌浸潤・転移の分子機構の一端を明らかにすることが出来ても、その全容を解明するためには、浸潤に関与する分子群の包括的な同定が必要である。

2. 研究の目的

癌細胞の浸潤・遊走能を規定する要素の1つに、走化性因子の濃度勾配依存性に偽足突起を伸長する能力がある。この能力は *in vitro* の培養系で再現できる。穴あき透過膜上で癌細胞を培養すると、膜の下に走化性因子が存在すれば、高浸潤能の癌細胞は透過膜のポア内へ偽足を伸長する。本研究課題では、様々な癌細胞がこの培養系で形成する偽足突起を選択的かつ効率的に単離する方法の確立を目指す。そのためにエキシマレーザーを用いる。このレーザーは、生体組織・細胞に集光されると、組織・細胞

を水平平滑に切離できるので、透過膜上面を切離面に設定すれば、照射によって細胞本体は除去され、一方、透過膜内には偽足突起が残存するはずである。この方法が成功すれば、偽足突起のプロテオミクスを革新的に発展させる原動力になると期待される。

3. 研究の方法

(1) 培養系における癌細胞偽足突起形成

穴あき (直径 1 あるいは 3 μm のポア) 透過膜 (直径 1 cm、厚さ 10 μm 、fibronectin でコート) が底面を成すカルチャーインサートを走化性因子 (NIH3T3 馴化培地) 含有ウェル内 (12-well plate) に置き、MDA-MB-231 乳癌細胞を穴あき透過膜上で培養した。2 日間培養 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2) 後、ホルマリン固定して HE 染色にて偽足突起の形成を確認した。

(2) エキシマレーザーを用いた偽足突起の回収

(1) の条件で培養した MDA-MB-231 乳癌細胞の偽足突起回収のための細胞体除去条件を設定した。細胞体の除去には、エキシマレーザー (193nm, 10Hz; EC-5000 CXIII, Nidek) を用い、直径 8mm、レーザーパルスエネルギー 14mJ、12 パルス/スキャンで照射を行った。細胞体の除去は除去時に発生する光の拡散の消失を指標として、スキャン回数を設定した。細胞体の除去は、スキャン後の膜をホルマリン固定して HE 染色にて確認した。

(3) 2D-DIGE 法を用いた偽足突起と細胞体における発現タンパク質の解析

(2) の条件で回収した偽足突起タンパク質と細胞体抽出タンパク質を用いて 2D-DIGE 解析を行った。発現差 (高発現、低発現) が確認されたものに対して質量分析を用いてタンパク質の同定を行った。

(4) 偽足突起発現タンパク質の機能解析

偽足突起に発現が強くみられたタンパク質の中から α -Parvin について詳細な機能解析を行った。MDA-MB-231 乳癌細胞に対して本タンパク質を強発現及び発現抑制を行った。また、実際の乳癌手術検体を用いた免疫染色を行って評価を行った。

4. 研究成果

(1) 研究方法 (1) の条件で MDA-MB-231 乳癌細胞を培養したとき、メンブレン内に偽足突起が確認された。偽足突起の直径は、1 μm ポアにおいては $<10\text{nm}$ 、3 μm ポアでは 1 μm であり、偽足突起の長さは両ポアサイズにおいて 2 ~ 10 μm と様々であった。高浸潤性メラノーマ細胞である B16-F10 細胞においても同条件で同様の偽足突起が

確認されたが、非癌細胞である NIH3T3 では偽足突起の形成はみられなかった。

(2) 研究方法(2)の条件で細胞体の除去を行った結果、およそ 18 から 24 回のスキャン回数で細胞体は完全に除去された。回収した偽足突起タンパク質の純度の解析として偽足突起に蓄積することが知られているインテグリン $\alpha 2$ に対するウェスタンブロッティングを行った。その結果、細胞体より抽出したものと比較して非常に高濃度のインテグリン $\alpha 2$ が偽足突起由来のタンパク質に確認され、タンパク質分解もみられなかった。また、インテグリン $\alpha 2$ に対する免疫染色は偽足突起に局在が高いことも観察された。

(3) 2D-DIGE による偽足突起発現タンパク質の解析を行うために、上記の条件で 100 メンブレン分(直径 5mm をカット)よりタンパク質の抽出した。2D-DIGE では 2508 のタンパク質スポットが確認され(図 1)、そのうち細胞体タンパク質と比較して 1 μm ポアでは 6 倍以上、3 μm ポアでは 4 倍以上の差が認められたものを選び出した。その結果、偽足突起で発現が高かったものが 67(1 μm ポア)と 132(3 μm ポア)あり、発現の下がったものが 29(1 μm ポア)と 74(3 μm ポア)確認された。これらを質量分析に供したところ、高発現タンパク質 21(1 μm ポア)と 45(3 μm ポア)、低発現タンパク質 19(1 μm ポア)と 36(3 μm ポア)が明らかとなった。1 μm ポアで確認されたタンパク質のうち 2 つ以外は 3 μm ポアで共通にみられた。

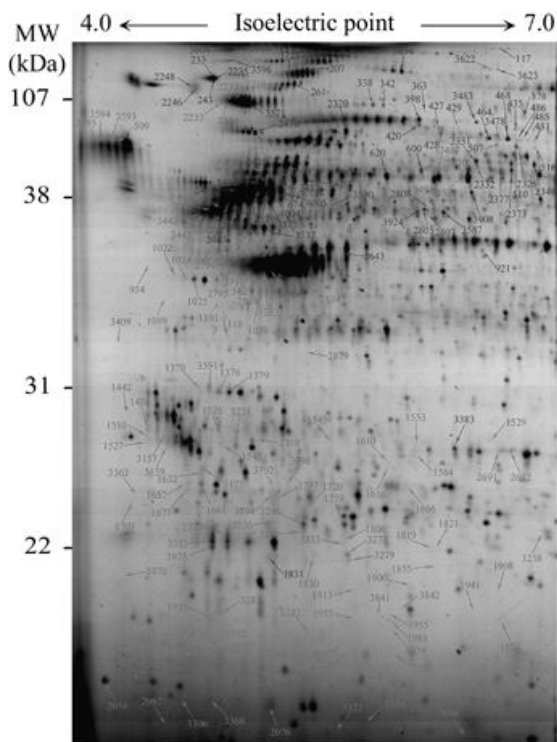


図 1. 2D-DIGE による偽足突起タンパク質の解析

これらのタンパク質の中から、偽足突起に発現の高い RAV1A、HSP90B、TDRD7 及び Vimentin に対して MDA-MB-231 乳癌細胞の免疫染色を行ったところ、走化性因子として NIH3T3 馴化培地を用いたときにのみ、偽足突起上に強い局在が確認された。走化因子を用いないときは、偽足突起は形成されず、核や細胞質内などタンパク質の個々で局在は様々であった。

(4) 偽足突起に発現が強くみられた α -Parvin(actin-binding adaptor protein) を強制発現及び発現抑制を行ったところ、偽足突起の密度が多くなり、突起の長さも長くなった(図 2)。これに対して発現抑制を行った場合は、偽足突起の密度は少なく、突起の長さは短くなった(図 2)。

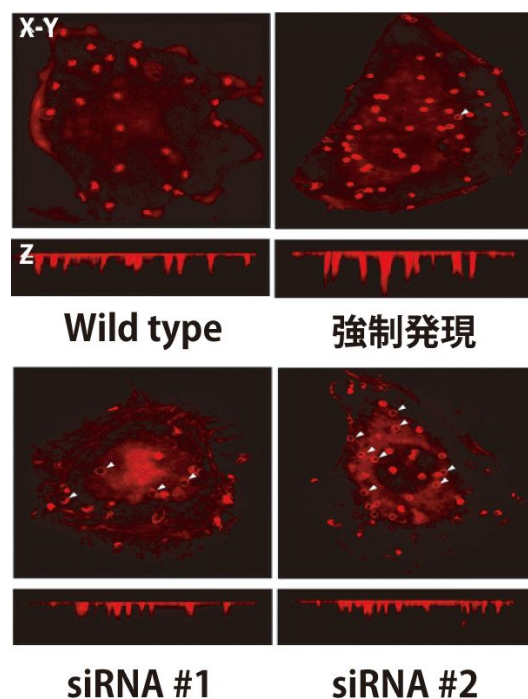


図 2. α -Parvin の発現に対する偽足突起の密度と長さ

wound healing 試験においては、 α -Parvin を強制発現した時には、wound 部分が閉じられるのが有意に速くなった。これに対して発現抑制したものでは有意に閉じられるのが遅くなった。これらの結果は、 α -Parvin が偽足突起の伸長と細胞移動に重要な役割を果たしていることが示唆された。

実際の乳癌手術症例を用いて α -Parvin に対する免疫染色を行ったところ、invasive lobular carcinoma(ILC) に対しては 37.5%(21/56) の陽性像を示したが、invasive ductal carcinoma(IDC)に対しては試験した全症例(21 症例)において陰性であった。また、ILC における陽性像は、リンパ節転移と有意な相関関係が認められた。

これらの結果は、 α -Parvin が ILC の浸潤に対するバイオマーカーとして使用できる可能性が示唆された。

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 4 件)

Ito M, Hagiyaama M, Mimae T, Inoue T, Kato T, Yoneshige A, Nakanishi J, Kondo T, Okada M, Ito A、 α -Parvin, a pseudopodial constituent, promotes cell motility and is associated with lymph node metastasis of lobular breast carcinoma、Breast Cancer Res Treat、査読有、144(1)、2014、59-69
doi: 10.1007/s10549-014-2859-0.

Mimae T, Hagiyaama M, Inoue T, Yoneshige A, Kato T, Okada M, Murakami Y, Ito A、Increased ectodomain shedding of lung epithelial cell adhesion molecule 1 as a cause of increased alveolar cell apoptosis in emphysema、Thorax、査読有、69(3)、2014、223-231.

doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-203867

Inoue T, Hagiyaama M, Enoki E, Sakurai MA, Tan A, Wakayama T, Iseki S, Murakami Y, Fukuda K, Hamanishi C, Ito A、Cell adhesion molecule 1 is a new osteoblastic cell adhesion molecule and a diagnostic marker for osteosarcoma、Life Sci、査読有、92(1)、2013、91-99.

doi: 10.1016/j.lfs.2012.10.021

Hagiyaama M, Inoue T, Furuno T, Iino T, Itami S, Nakanishi M, Asada H, Hosokawa Y, Ito A、Increased expression of cell adhesion molecule 1 by mast cells as a cause of enhanced nerve-mast cell interaction in a hapten-induced mouse model of atopic dermatitis. Br J Dermatol、査読有、168(4)、2013:771-778.

doi: 10.1111/bjd.12108.

[学会発表](計 1 件)

井上敬夫、萩山満、榎木英介、伊藤彰彦
新規骨芽細胞接着分子 cell adhesion molecule 1 は骨芽細胞分化過程において一過性に発現する。第101回 日本病理学会総会 2012.4.26~28、東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上敬夫 (INOUE, Takao)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：00441006