

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 21 日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893153

研究課題名(和文) エイズ細胞侵入蛋白を利用したTNBC悪性化を司るマスターシグナル伝達分子の同定

研究課題名(英文) Identification of master regulator on TNBC malignant using TAT protein system

研究代表者

渡邊 健司 (WATANABE, Kenji)

山口大学・大学研究推進機構・助教

研究者番号：50711264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、トリプルネガティブ乳ガン(TNBC)に着目し、分子標的となりうるマスターシグナル伝達物質の同定を目的として検討を行った。目的を達成するため、TNBCのモデル細胞株 MDA-MB-231 細胞からタンパク質を抽出し、陰イオン交換カラムを用いて分画し、回収した。脱塩・濃縮後のタンパク質をTATシステムを利用し、エストゲン非依存性乳がん株 HCC38 細胞に導入した。各フラクションについて細胞増殖活性を測定したが、顕著な変化は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Triple-negative breast cancer (TNBC) is one of breast cancer subtype and often shows more malignant phenotype compared to other subtype of breast cancer. Although there are many reports about TNBC, the master regulator involved in malignancy of TNBC is unclear. In this study, we paid our attentions to TNBC and tried to identify the master regulator involved in proliferation activity of TNBC. To achieve our purpose, we extracted the proteins from TNBC cell line, MDA-MB-231 cells, and fractionated them using ion-exchange chromatography. We transfected the each fractionated proteins into HCC38 cell by TAT system, and measured cell proliferation activity. However, the remarkable change was not detected.

研究分野：分子生物学

キーワード：TNBC TAT protein

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の死因の第一位は、ガンである。ガンは、染色体に様々な変異が発生し、細胞増殖や細胞死などのシグナル伝達分子活性が異常に上昇する（あるいは抑制される）ことが知られている。特定のシグナル伝達分子の活性化が下流のシグナルを制御しており、ガン細胞の増殖に決定的な役割を果たしている。これら上流のシグナル伝達分子をマスターシグナル伝達分子と呼び、その分子の同定は、死因第一位であるガンの根本的な治療法として最も注目を集めている。ガンの中でも乳ガンは、日本を含めた先進国で、女性の罹患率トップのガンである。乳ガンはエストロゲンレセプター (ER)、プロゲステロン受容体 (PgR)、Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) の発現解析によって分類され、ホルモン療法、トラスツズマブなどの分子標的薬の開発により、比較的予後が改善された。しかしながら一方で、乳ガンには、上記3分子の発現がすべて低いトリプルネガティブと呼ばれる乳ガン (TNBC) が存在する。TNBC は、新規に発見される乳ガンの 10-20%を占めるとも言われ、進行・再発率が高く、極めて予後が不良であり、乳ガンによる患者死亡の主な原因である。従って、TNBC に対する治療薬の開発が強く望まれているが、未だ一つも開発されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、TNBC の治療薬開発を最終目標とし、TNBC の治療標的となりうる、いわゆるマスターシグナル伝達分子の同定を行うことを目的とした。本研究では、エイズウイルスの Trans-activator of transcription (TAT) タンパク質を利用したタンパク質導入法により、TNBC における活性タンパク質の同定を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

TNBC モデル細胞株 MDA-MB-231 細胞

の培養には、Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) high glucose (Life technologies) に、56 で 30 分間加熱して非動化した Fetal bovine serum (FBS) (Biowest) を 10% になるように添加した培養液を用いた。

### (2) タンパク質回収

TNBC モデル細胞株 MDA-MB-231 細胞 ( $8.0 \times 10^7$  cells/150×25 mm セルカルチャーディッシュ (Falcon)) を回収し、1×Phosphate buffered saline (PBS) (-) にて洗浄し、遠心機 CF7D (HITACHI) で 4、600 rpm の条件で 20 分間遠心を行った。遠心後のペレットは、使用するまで -80 に保存した。タンパク質を抽出するため、Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、Protease inhibitor cocktail, Phosphatase inhibitor cocktail (sigma) を加えた 10mM Tris-HCl pH 8.5 に懸濁した。SONIFIER 250 (BRASON) による超音波処理後、遠心機 CR21 (HITACHI) で 4、7850 rpm の条件で 15 分間遠心を行い、上清を回収した。

### (3) 陰イオン交換クロマトグラフィーによる分離

クロマトグラフィー装置 (BIO-CAD) のセットアップ

タンパク質分離の前に高速液体クロマトグラフィー装置 BIO-CAD (Perseptive Biosystems) のセットアップを行った。今回の分離では A ラインと B ラインの 2 つを使用するため、この 2 つの流路に脱気水をセットし、Purgeバルブに 50 ml シリンジを挿して流路のエアー抜きを行い、サンプルループを含む流路全体に脱気水を流して流路洗浄を行った。その後、A ラインに 10 mM Tris-HCl pH 8.5 (以降 A バッファーとする) をセットし、B ラインに 10 mM Tris-HCl pH 8.5 に 1 M NaCl を加えたもの (以降 B バッ

ファーとする) をセットした。サンプルループを含む流路全体に A→B→A の順でバッファを流して流路を洗浄した。陰イオン交換カラム Hi-TRAP HQ 5 ml (GE Healthcare) を A ラインのバッファを流しながら BIO-CAD に取り付けた。吸光度の波形がベースラインに戻るまで A→B→A の順でバッファを流し、カラムの平衡化を行った。

陰イオン交換カラムによる分離  
セットアップした BIO-CAD および陰イオン交換カラム Hi-TRAP HQ を用いてタンパク質の分離を行った。細胞より抽出したタンパク質 24 mg を A バッファで平衡化した陰イオン交換カラム Hi-TRAP HQ に吸着させた。その後、吸着させたタンパク質を、B バッファの濃度にグラジエントをかけ、タンパク質を溶出した。バッファ流速は 2 mL/min、タンパク質は、280 nm の波長で検出した。各フラクションは 2 mL ずつ分注した。分離したフラクション溶液 500 µL を、それぞれ限外ろ過スピンカラム UFV5BG00 (MILLIPORE) を用いて脱塩・濃縮し、約 50 µL のサンプルを得た。サンプル溶液の一部は、SDS-PAGE に使用し、残りのサンプルは 4 に保存した。

#### **(4) SDS-PAGE 及び CBB 染色によるバンドの検出**

脱塩・濃縮後のサンプル溶液 5 µL に、それぞれ 2.5 µl の 3×Sodium dodecyl sulfate (SDS) Sample Buffer (3 % v/v β-メルカプトエタノール) を加え 96 ヒートブロックで 1 分間ボイルし、サンプルを調製した。調製したサンプルについて、10% ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを容器にいれ、DW を用いた洗浄を行い、CBB Stain One (nacalai tesque) を用いてゲルの染色を行った。容器から染色液を回収し、DW を用いてバンドがはっきりと確認できるようになるまで DW を交換し脱

色を行った。脱色後のゲルは Amasham imager (GE Healthcare) を用いて撮影した。

#### **(5) TAT タンパク質を用いたタンパク質導入**

96 ウェルプレートにエストロゲン非依存性乳がん細胞株 HCC38 細胞を 1 ウェル当たり  $2.0 \times 10^5$  /mL の濃度で撒き、TAT タンパク質を用いたタンパク質の導入を行った。タンパク質導入試薬には Xfect Protein Transfection Reagent (Takara Bio) を用いた。また、今回の実験では導入するフラクションに加え、タンパク質導入コントロールとして蛍光色素 Cy3 を導入に用いた。

##### 導入タンパク質の調製

まず、空の 96 ウェルプレートを用意し、脱塩・濃縮後のタンパク質溶液または Cy3 溶液 1.5 µL と Xfect Reagent 溶液 5 µL を混合した。その後、室温にて 30 分間インキュベートした。

##### HCC38 細胞へのタンパク質導入

HCC38 細胞をまいた 96 ウェルプレートから、培養液を取り除き、各ウェルに暖めた 1×PBS (-) 100 µL を加え洗浄した。1×PBS (-) をデカントにより除去し、DMEM serum (-) 40 µL を各ウェルに加えた。タンパク質と Xfect Reagent の混和物全量を各ウェルに加えた。その後 37 で 1 時間培養を行い、DMEM serum (+) を各ウェルに 100 µL ずつ加えた。2 時間後、蛍光顕微鏡 IX70 (OLYMPUS) で Cy3 の細胞内への導入を確認した。

#### **(6) ミトコンドリア活性測定**

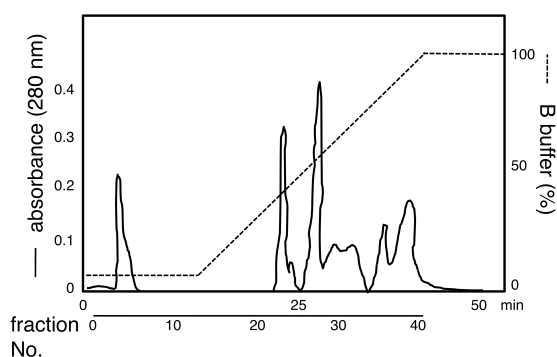
タンパク質導入後、48 時間培養を行った。培養プレートから培養液を除き、DMEM serum (+) を各ウェルに 100 µL を用いた洗浄を行った。その後、1 mg/mL Hoechst 33342、5 mg/mL JC-1 の最終濃度が、1 µL/mL となるように DMEM serum (+) に溶解し、混合液 100 µL を各ウェルに加えた。

37 で60分間インキュベートし、マイクロプレートリーダーFlex Station3 (Molecular Device) を用いてHoechst 33342は励起355 nm、吸収465 nm、JC-1は励起550 nm、吸収600 nmの波長で測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 陰イオン交換カラムによる分離

TNBCモデル細胞株MDA-MB-231より抽出したタンパク質24 mgを陰イオン交換カラムHi-TRAP HQを用いて分離し、40本のフラクションに分画した(図1)。その結果、フラクション20番から、40番の間で、280 nmに吸光を示すピークが認められた。



**図1 陰イオン交換カラムを用いた抽出タンパク質の分画** TNBCモデル細胞株MDA-MB-231より抽出したタンパク質を陰イオン交換カラムにインジェクションし、リニアグラジェントによりタンパク質を溶出させた。図は、ピークのグラフを模式的に表したものである。実線は280 nmの吸光度、破線は、塩濃度を示す。

分画したフラクションについてSDS-PAGE後CBB染色を行い、バンドを検出した。その後、分離したフラクションの活性を細胞レベルで確認するために、各フラクションを脱塩・濃縮し、タンパク質導入に用いた。

##### (2) 各フラクションによるミトコンドリア活性測定

分離したタンパク質の中にTNBCの細胞増殖に関するタンパク質の有無を確認す

るため、分離したフラクション20番から40番について、Xfect reagentを用いたHCC38へのタンパク質導入を行った。細胞増殖活性を確認するため、各フラクションタンパク質導入後のミトコンドリア活性を測定した。まず、核を染色するHoechstおよび、ミトコンドリアの膜電位を測定するJC-1を用いたタンパク質導入細胞の染色を行った。次に、マイクロプレートリーダーFlex Station3 (Molecular Device)を用いて、HoechstおよびJC-1の蛍光を検出し、得られたデータをもとに細胞あたりのミトコンドリアの活性を測定した。このとき、タンパク質が含まれていない20番のフラクションにおけるミトコンドリアの活性をコントロールとして検討を行った。その結果、どのフラクションを導入した場合においても、細胞あたりのミトコンドリア活性に顕著な変化は認められなかった。

##### (3) 結論

本研究では、TNBCのマスターシグナル伝達分子の同定するために、MDA-MB-231細胞から抽出したタンパク質をエイズウィルスのTATタンパク質を利用したタンパク質導入を行い、活性タンパク質の同定を試みた。今回の実験では、TNBCの増殖活性に関する活性タンパク質を見出すことはできなかった。これは、細胞から抽出し、分離できたタンパク質量が想定よりも少なかったことが原因の一つであると考えている。しかしながら、本検討により、タンパク質抽出から活性測定までの一連の手法を確立することができた。今後は、抽出、分離条件を精査し、検討を行っていきたいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

宇留島裕、泉友則、渡邊健司、濱野公一、水上洋一、エイズ侵入タンパク質を用いた

乳癌発症因子のハイスループットスクリーニング、山口大学生命医工学研究センター開設記念シンポジウム、平成26年12月26日、山口大学（山口県宇部市）

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 健司 (WATANABE, Kenji)  
山口大学・大学研究推進機構・助教  
研究者番号：50711264

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

水上 洋一 (MIZUKAMI, Yoichi)  
宇留島 裕 (URUSHIMA, Yutaka)