

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501318

研究課題名(和文) S100A14の分子機能解析と乳癌の診断・治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of molecular function of S100A14 and its clinical application to diagnosis and therapy of breast cancer.

研究代表者

杉野 隆 (Sugino, Takashi)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：90171165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：S100A14は我々のマウス乳癌を用いた研究により、がんの転移を促進する分子として同定された。本研究はS100A14がヒト乳癌の診断や治療に応用できるかどうかの検証と、S100A14の分子機能を解明することを目的としている。その結果、S100A14が高発現する乳癌は患者の予後を悪くすることが明らかとなった。また、ヒト乳癌細胞株を用いた実験では、S100A14は細胞骨格系蛋白と結合して、細胞の運動や浸潤を促進することが示された。本研究により、S100A14による乳癌患者の予後を予測する診断法やS100A14を標的とした分子治療の開発への道が開かれた。

研究成果の概要(英文)：S100 family proteins have recently been identified as biomarkers in various cancers. The aim of the present study was to clarify the clinical significance and functional role of S100A14 in breast cancer. Immunohistochemical analysis of 167 breast cancer cases showed that higher expression levels of the proteins was significantly associated with a poorer prognosis. In the human breast cancer cell lines, S100A14 protein was colocalized on the cell membrane. Experimental analyses demonstrated that the S100A14 protein can bind to actin. A Boyden chamber assay showed that S100A14 knockdown suppressed the invasive activity. We demonstrated that coexpression of S100A14 and S100A16 correlates with poor prognosis of breast cancer patients. In addition, our findings indicate that these proteins can promote invasive activity of breast cancer cells via an interaction with cytoskeletal dynamics.

研究分野：病理学

キーワード：S100A14 S100A16 乳癌 予後 浸潤 細胞運動 がん転移

1. 研究開始当初の背景

一般に癌の転移には癌細胞の浸潤が不可欠であるとされるが、我々は浸潤を必要としない転移様式が存在することを発見し、その転移モデルを作製し、このモデルを用いた遺伝子発現の網羅的解析により転移関連遺伝子をクローニングした。S100A14 はこれらの候補遺伝子の発現操作により、転移を促進する作用があることが明らかになった分子群の1つである。S100A14 は他の S100 ファミリーと同様、他の分子と結合することによって、その分子機能を表すと推定される。しかしながら、その結合タンパクや局在、機能、癌の悪性形質との関わりはよく知られていない。

本研究では癌の浸潤・転移における S100A14 の役割を明らかにするために、この分子の結合タンパクを同定し、介在するシグナル伝達系を中心とした分子メカニズムを明らかにする。また、そのデータを基にこの分子を用いた癌の予後予測システムや分子標的治療法の開発など、臨床へ応用するための基礎研究を行う。

2. 研究の目的

本研究では S100A14 が浸潤や転移を促進する分子メカニズムを明らかにし、乳癌の診断・治療へ応用することを目的とする。

(1) S100A14 発現と乳癌症例の予後および予後に関わる因子との関連を免疫組織化学的に解析する。また、S100A14 が乳癌患者の予後を予測するバイオマーカーとしての有用性を検証するために、血清中のタンパクレベルと臨床データとの関連を検討する。

(2) S100 ファミリーと同様、S100A14 も細胞膜への局在や機能において他の分子との相互作用が重要であると推測される。このため、本研究ではまず、S100A14 の結合タンパクを同定し、その分子間相互作用のメカニズムを明らかにし、次に、S100A14 と結合タンパクとの相互作用の結果、引き起こされる生理的機能（増殖・運動・接着・代謝など）やこれに関与するシグナル伝達系を探索する。

3. 研究の方法

(1) ヒト乳癌における臨床病理学的解析：福島医大で切除された乳癌症例における S100A14 および S100A14 との関連が推測されている S100A16 の発現を免疫組織化学的に検出し、臨床データや患者の予後、治療効果との関連を解析する。また、乳癌細胞株を用いた S100A14 の細胞外放出や乳癌患者血清中の S100A14 タンパクのレベルを測定し、血清診断の可能性を解析する。さらに、S100A14 のシグナル系を標的とした薬剤を探索し、その制癌効果を検討する。

(2) S100A14 の分子機能解析：ヒト乳癌細胞を用いて、S100A14 と結合するタンパクを網羅的解析により同定する。また、結合タンパクや細胞運動との関連から想定されるシグナル伝達系を解析する。さらに、S100A14

を強制発現または抑制することにより癌細胞の浸潤性や転移能への影響を検討する。

4. 研究成果

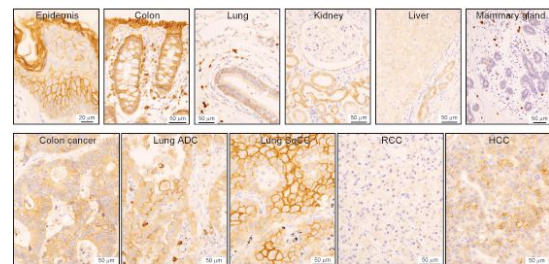
(1) ヒト乳癌における臨床病理学的解析

まず、種々のヒト癌症例における S100A14 タンパクの発現をスクリーニングした。S100A14 は種々の癌に発現するが、乳癌では約半数の症例が発現亢進していた（図 1）。このことから、乳癌症例を用いて予後との相関を解析することとした。また、S100A14 との相互関係が推測されている S100A16 も合わせて解析した。

図 1

S100A14 expression in Normal and cancerous tissues

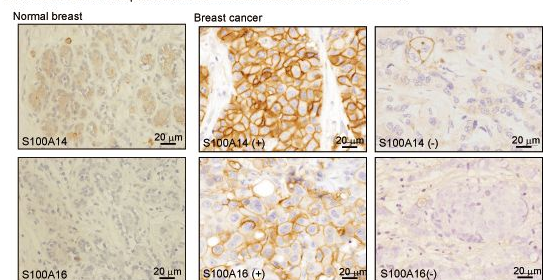
Origin of cancer	Lung	Colon	Breast	Stomach	Liver	Kidney
Positive cases (%)	7/10 (70)	8/8 (100)	88/167 (53)	8/8 (100)	5/9 (56)	2/10 (20)



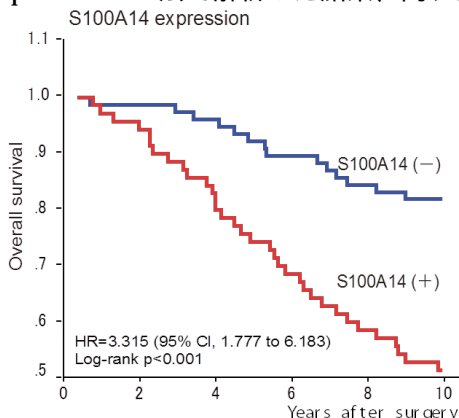
乳癌における S100A14・A16 タンパクの発現は各特異抗体を用い、免疫組織化学的手法で検出した。S100A14・A16 とともに細胞膜に限局した発現することから、HER2 タンパクの判定に準じ、発現強度と発現細胞率を加味してスコアリングし、陽性・陰性（図 2）の判定を行った。

図 2

A: S100A14 and A16 expressions in normal and cancer tissues of the breast

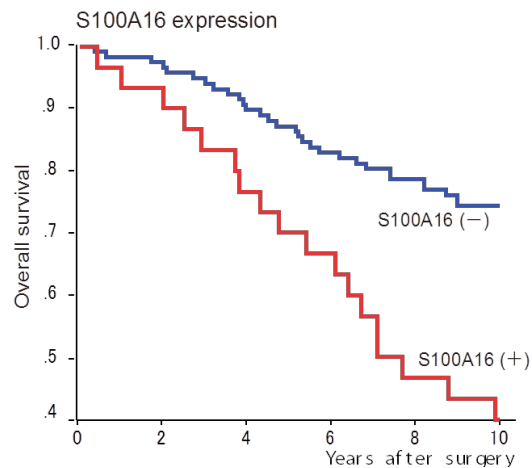


S100A14・S100A16 発現と予後との相関を Kaplan-meier 法で解析した結果、両タンパ



クの高発現は乳癌の不良な予後 (overall survival)と有意の相関を示した (図 3, 4)

図 3  
図 4



多変量解析の結果、S100A14 ( $p<0.001$ )、PgR ( $p=0.024$ )、組織学的グレード ( $p<0.001$ )が独立した予後因子であることが明らかとなった。

また、乳癌症例において S100A14 と S100A16 の発現は有意の相関を示し ( $p<0.001$ )、臨床病理学的因子において S100A14、S100A16 タンパクの発現は若年齢 (<60 歳、各  $p=0.041, 0.046$ )、ER-negative ( $p=0.014, 0.030$ )、HER2-positive ( $p=0.001, <0.001$ )と有意に相関した。また、S100A16 の高発現は腫瘍径 ( $p=0.007$ )、リンパ節転移 ( $p<0.001$ )と有意の相関を示した。

(3) S100A14 の分子機能解析

S100A14 および S100A16 の分子機能や乳癌における意義を明らかにするために、ヒト乳癌細胞株を用いた実験的解析を行った。

(a) ヒト乳癌細胞における S100A14・S100A16 の発現：ヒト乳癌細胞株 MCF7, SK-BR-3, ZR-75-1, MDA-MB-231 における S100A14 と S100A16 の mRNA 発現を qRT-PCR を用いて測定し、タンパクの発現を免疫蛍光染色を用いて観察した。MDA-MB-231 を除き、両分子の発現は SK-BR-3, ZR-75-1, MCF7 の順で発現が高く、mRNA, タンパクともほぼ一致していた。MDA-MB-231 では S100A14 は mRNA, タンパクとも発現しないが、S100A16 は mRNA が高値であるにもかかわらず、タンパク発現がみられなかった (図 5, 6)。

図 5

A. mRNA expression (qRT-PCR)

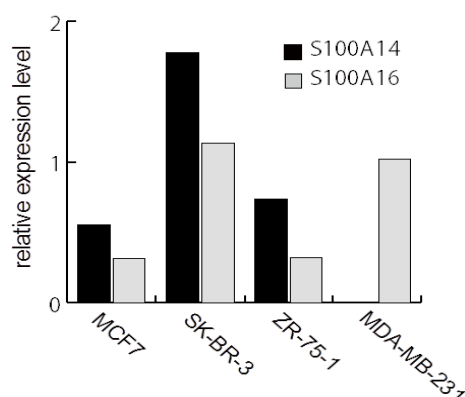
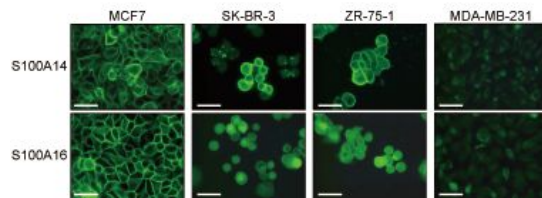


図 6

B. Protein expression (Immunofluorescence)



(b) S100A14・S100A16 タンパクの細胞内局在：培養皿に接着して増殖する MCF7 細胞をコンフルエント状態にし、特異抗体を用いて蛍光染色し、レーザー顕微鏡で観察した。両タンパクとも細胞間接着部位の lateral surface に沿った局在が見られた (図 7)。また、界面活性剤 Triton-X100 での前処理を行わなかった場合には染色性が見られなかったことから、これらのタンパクは細胞内に存在することが示された (図 8)。さらに、Ca イオン非存在下でもタンパクの膜での発現が観察されたことから、両タンパクの膜への局在はカルシウム非依存生であることが明らかとなった (図 9)。

図 7

C. Subcellular localization (MCF7)

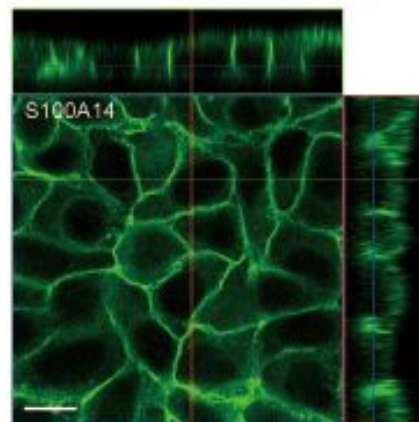


図 8

D. Immunofluorescence under permeable condition (MCF7)

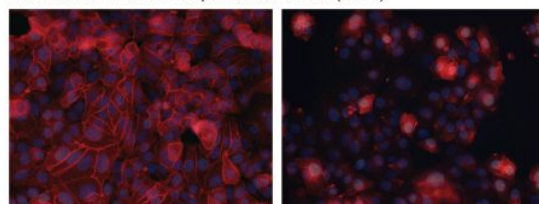
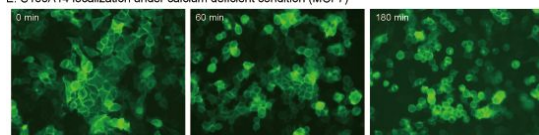


図 9

E. S100A14 localization under calcium deficient condition (MCF7)

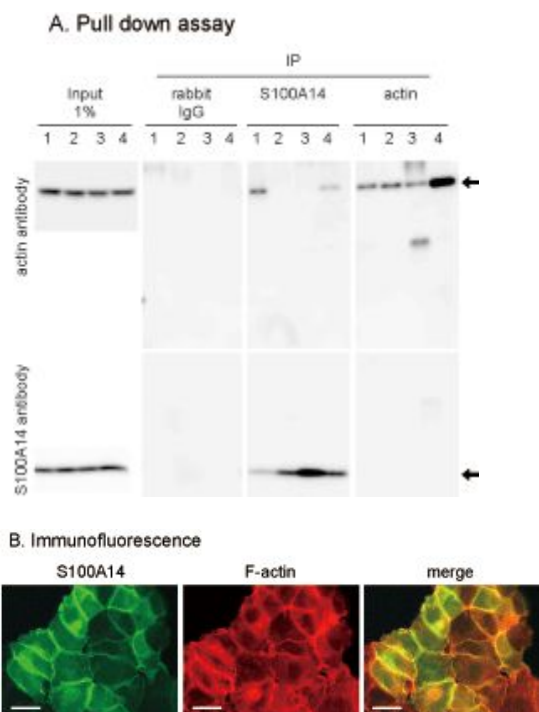


(c) S100A14 が結合するタンパクの同定：S100A14 抗体を用いた pull down assay により、MCF7 細胞抽出液中での標的タンパクを探索した。S100A14 と結合したタンパクを電



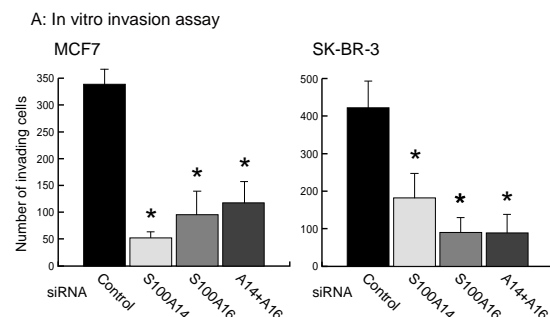
気泳動し、クマシーブリリアントブルー染色で観察しうるバンドを切り出し、質量分析にてタンパクを同定した。その中の1つである actin との相互作用を図 10 に示した。Phalloidin を用いた二重蛍光染色では S100A14 と F-actin の共局在が示され、S100A14 の膜局在が F-actin 等の cortical actin との結合によるものと推測された。

図 10



(d) S100A14・S100A16 の浸潤性への関わり：MCF7, SK-BR-3 細胞に siRNA を transfect することにより、S100A14 や S100A16 を低発現する細胞を作製した。これらの細胞を用いて、種々の浸潤・運動能のアッセイを行った。マトリゲルをコートした Boyden chamber による in vitro invasion assay では、S100A14 または S100A16 の発現を抑制した MCF7, SK-BR-3 はともに浸潤細胞が有意に減少し、浸潤が抑制された(図 11)。

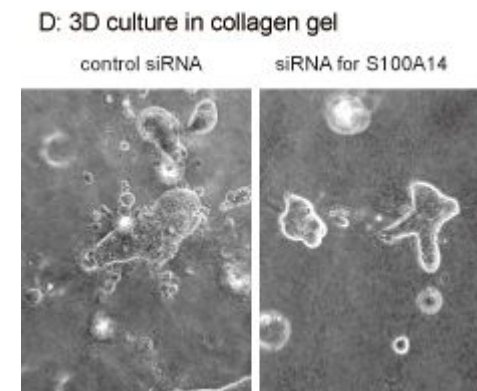
図 11



また、傷付けアッセイ法では S100A14 のノックダウンにより MCF7 の運動が有意に抑制された。

さらに、コラーゲンゲルを用いた三次元培養では S100A14 発現が低下した MCF7 の遊走が阻害された(図 12)。

図 12



結論

本研究により、S100A14 と S100A16 は乳癌の予後を予測するバイオマーカーの候補となりうることを示された。両分子は actin などの細胞骨格系に働き、ヒト乳癌細胞の浸潤・運動能を促進する機能が示され、乳癌の分子治療の新しいターゲットとして期待される。

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6件)

1. T. Tanaka, N. Ichikawa-Tomikawa, N Shishito, K Nishiura, T Miura, A Hozumi, H. Chiba, S Yoshida, T Ohtake, T. Sugino, “Co-expression of S100A14 and S100A16 correlates with a poor prognosis in human breast cancer and promotes cancer cell invasion.” BMC Cancer, 2015, 53, 10.1186/s12885-015-1059-6
2. G Ogura, T. Sugino, T Suzuki, N Nakamura. “Establishment of highly metastatic cell line (Lu10) from murine mammary carcinoma cell line MCH66 and biological characteristics of Lu10”. Tokai J Exp Clin Med., 2014, 39(2), 72-79.

[学会発表](計3件)

1. Takashi Sugino, Mizuko Tanaka, Takuma Oishi and Takashi Nakajima, Expression of S100A14 promotes cancer cell invasion and metastasis and is associated with poor prognosis in breast cancer. 37th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, 2014年12月09日~2014年12月13日, San Antonio, USA
2. 杉野隆, 千葉英樹, 中島孝, マウス転移モデルの作製と microarray, in vivo knockdown を用いた転移関連分子の同定, 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月04日, 神奈川県横浜市
3. 穴戸奈美子, 田中瑞子, 富川直樹, 千葉英樹, 杉野隆, マウス乳癌転移モデルの開発と転移関連遺伝子の探索, 第102回日本病理学

会総会、2013年06月08日、北海道札幌市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉野 隆 (Takashi Sugino)  
静岡県立静岡がんセンター・研究所・研究員  
研究者番号：90171165

(2) 連携研究者

田中 瑞子 (Mizuko Tanaka))  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40583638

(3) 連携研究者

富川 直樹 (Naoki Tomikawa)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80468587

(4) 連携研究者

千葉 英樹 (Hideki Chiba)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00295346