

令和元年6月5日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10458

研究課題名(和文) Maspin が乳癌患者の不良予後に関与する分子機構の解明

研究課題名(英文) The elucidation of molecular mechanism of maspin related with unfavorable prognosis of human breast cancer patients

研究代表者

梅北 善久 (UMEKITA, Yoshihisa)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：80244226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Maspinは癌抑制遺伝子とされているが、ヒト乳癌では細胞質局在型Maspinの発現は独立した予後不良因子であることを我々は報告してきた。しかしながら、その詳細な分子機構は依然として不明である。

本研究では乳癌培養細胞株においてMaspinは細胞質に発現しており、増殖能および浸潤能の亢進によって癌の進展に関与していることが示唆された。また、網羅的遺伝子発現解析によって、細胞質局在型Maspin発現と複数の上皮間葉転換関連遺伝子の発現が正の相関を示すことを見出した。以上の結果は新知見であり、癌抑制遺伝子とされていたMaspinの機能に再検討を促すブレークスルーになることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、癌抑制遺伝子とされているMaspinが、ある種の乳癌培養細胞株において細胞質に発現しており、増殖能および浸潤能の亢進によって癌の進展に関与していることが示唆された。これらは、免疫組織化学を用いた我々の研究結果を支持するものであった。また、細胞質局在型Maspinの発現は、複数の上皮間葉転換関連遺伝子の発現と正の相関を示すことを見出した。これらの結果より、乳癌における新たな治療標的分子同定の基礎研究発展に繋がることが期待できる。また、Maspinは乳癌のみならず様々な癌腫に発現していることから、他の癌腫に対しても応用可能な基盤研究となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Maspin is known to be a tumor suppressor gene. However, we revealed that cytoplasmic maspin (cytMaspin) expression was an indicator of poor prognosis in human breast cancer patients. Therefore, we investigate the function of cytMaspin in human breast cancer cells. Expression of maspin in MDA-MB-231 mainly exhibited a cytoplasmic localization, whereas that in MCF10A (normal mammary epithelial cells) exhibited nuclear and cytoplasmic localization. Maspin overexpression promoted cell invasion in MDA-MB-231, while downregulation of maspin induced the opposite effect.

To investigate how cytoplasmic maspin regulates cancer cell invasion, we focused on the EMT. In MDA-MB-231 overexpressing maspin, E-cadherin expression was decreased, while N-cadherin expression was increased. Furthermore, Maspin overexpression increased EMT-related transcription factors (Slug, Twist, ZEB1 and ZEBs2). CytMaspin may contribute to the regulation of cancer cell invasion via a process related with EMT.

研究分野：病理学

キーワード：乳癌 Maspin 予後 上皮間葉転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

セリンプロテアーゼインヒビターファミリーに属する mammary serine protease inhibitor (maspin) は正常乳腺上皮細胞に発現しており、癌の進展に伴って発現が減少する遺伝子として単離された。Maspin はセリンプロテアーゼ活性の抑制能を示さない一方で、この遺伝子を過剰発現させると癌細胞の細胞増殖、遊走能、浸潤能の減少を誘導することから、癌抑制遺伝子として機能していると考えられており、そのメカニズムとして血管新生抑制やアポトーシス促進タンパク質 BAX の発現抑制に伴うアポトーシス誘導、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC1) との直接的な結合による活性阻害などが報告されている (Zhang M et al., Nat Med. 2000, Liu J et al., Cancer Res. 2004, Dzinic SH et al., PLoS One, 2013)。これらの報告から maspin は癌の発生や進展に重要な遺伝子であるとされており、癌治療や発癌過程の解析に有用であると考えられてきた。

申請者らは、これまでに maspin の細胞内局在に着目し、複数臓器の癌組織における maspin 発現解析および臨床病理学的解析を実施してきた (Umekita Y et al., in vivo. 2006, Tsuji T et al., Histopathol, 2009)。その結果、乳管癌の進展に伴って細胞質に局在する maspin (cytMaspin) が増加すること (Umekita Y et al., Histopathol. 2003)、乳癌、子宮体癌、肺癌などの患者癌部において cytMaspin 発現は全生存期間、無再発生存期間と有意な関連を示し、cytMaspin 陽性患者は予後不良であることを明らかにしてきた (Umekita Y et al., Int J Cancer. 2002, Tsuji T et al., Histopathol. 2007, Takagi Y et al., Histopathol. 2014, Takeda C et al., Diagn Pathol. 2014)。また、大腸癌や悪性黒色腫においても maspin 高発現患者は予後不良であることが報告されている (Snoeren N et al., Br J Cancer. 2013, Martinoli C et al., Mod Pathol. 2014)。さらに、maspin の過剰発現は癌抑制効果を示さないというこれまでとは逆の研究結果や、癌抑制遺伝子として機能するためには核への局在が必須であることが報告されてきた (Goulet B et al., Lab Invest. 2011, Teoh SS et al., Nat Commun. 2014)。

我々の研究結果や近年の知見から、癌組織において癌抑制遺伝子として機能しているのは核に局在する maspin であり、cytMaspin 発現は発癌や癌の悪性度に関与することで、癌抑制遺伝子と相反する癌遺伝子に似た振る舞いを示していることが推測される。しかし、maspin の核移行が阻害され、細胞質のみに発現するメカニズムや cytMaspin が癌の進展にどのように関与しているのかは未だ明らかになっていない。そこで、申請者らは maspin が細胞質に局在化する要因を解明し、癌抑制遺伝子として機能する分子機構を明らかにすることで、治療法開発への応用が期待できるという着想に至り、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、maspin の核移行阻害および細胞質への局在化メカニズムの解明、cytMaspin が乳癌の進展にどのように関与しているかを明らかにするとともに、cytMaspin を標的とする新規治療法開発や診断法開発など臨床応用に展開するための基礎的研究を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

3-1. 細胞株

ヒト乳癌細胞株 (MCF7, MDA-MB-452) は RIKEN BioResource Center (BRC) より、ヒト乳癌細胞株 (MDA-MB-231) およびヒト正常乳腺上皮細胞 (MCF10A) は American Type Culture Collection (ATCC) より、レンチウイルス産生細胞 (293FT) は Thermo Fisher Scientific より購入した。

3-2. real-time PCR

各細胞株から TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) によって回収した total RNA を用いて、High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) による cDNA 合成を行った。合成した cDNA をテンプレートとして、TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific)、LightCycler 96 system (Roche Diagnostics) による real-time PCR を実施することで遺伝子発現解析を行った。

3-3. ウェスタンブロット

RIPA buffer によって抽出したタンパクは、SDS-PAGE による泳動後、PVDF メンブレンへの転写、ブロッキング処理後に以下の特異抗体を用いてタンパクの検出を行った。GAPDH (clone D16H11, #5174, Cell Signaling Technology), maspin (clone EAW24, NCL-MASPIN, Leica Biosystems), HaloTag (G9281, Promega), Smad3 (clone C67H9, #9523, Cell Signaling Technology), Phospho-Smad3 (Ser423/425) (clone C25A9, #9520, Cell Signaling Technology), TWIST1 (#46702, Cell Signaling Technology), ZEB2 (clone E-11, sc-271984, Santa Cruz Biotechnology), Vimentin (clone D21H3, #5741, Cell Signaling Technology), Snail (clone C15D3, #3879, Cell Signaling Technology), Slug (clone C19G7, #9585, Cell Signaling Technology), TCF8/ZEB1 (clone D80D3, #3396, Cell Signaling Technology), TGFβ2 (clone B-10, sc-374658, Santa Cruz Biotechnology), and SRGN (HPA000759, Sigma-Aldrich)

3-4. 蛍光免疫染色

Nunc Lab-Tek II 8-well chamber slide (Thermo Fisher Scientific)に播種した細胞は、接着後に 4%パラホルムアルデヒドで室温、15 分間固定し、100%氷冷メタノールによる透過処理、10% goat serum/PBS でブロッキングを行った。細胞内の maspin 発現は抗 maspin 抗体および Alexa Fluor 488 標識二次抗体 (Thermo Fisher Scientific)、TMRDirect ligand (Promega)を用いて検出した。また、スライドの封入および対比染色は ProLong Diamond Antifade Moutant with DAPI (Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。

3-5. 細胞増殖アッセイ/細胞浸潤アッセイ

各細胞株を用いた細胞増殖アッセイは、Cell Counting Kit-8 (Dojin Kagaku)を用いて実施した。細胞を 96-well プレートには播種後、24, 48, 72 時間の時点における吸光度 (450 nm)を測定することで細胞の増殖能を検討した。各細胞株を用いた細胞浸潤アッセイは QCM ECMatrix Cell Invasion Assay, 24-well (8.0 μ m), fluorimetric kit (Merck Millipore)を用いて実施した。無血清培地で 24 時間培養した細胞株をトランスウェルに播種し、48 時間後に蛍光プレートリーダーによって蛍光値を測定することで細胞の浸潤能を検討した。

3-6. DNA マイクロアレイ

レンチウイルスによる遺伝子導入によって MDA-MB-231 細胞をもとに樹立した 2 種類の細胞株 (MB-231-control, MB-231-maspin)から RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した後、Agilent 2100 Bioanalyzer によって純度を確認した。Total RNA は Cy5 で標識し、3D-Gene human mRNA oligo chip 25k (Toray)にハイブリダイゼーションし DNA マイクロアレイを実施した。測定結果は、シグナル強度の総和の中央値が 25 になるように補正した global normalization 値を用いて、maspin 高発現株とコントロール株どちらかの global normalization 値が 10 以上になった遺伝子について発現変動遺伝子とした。

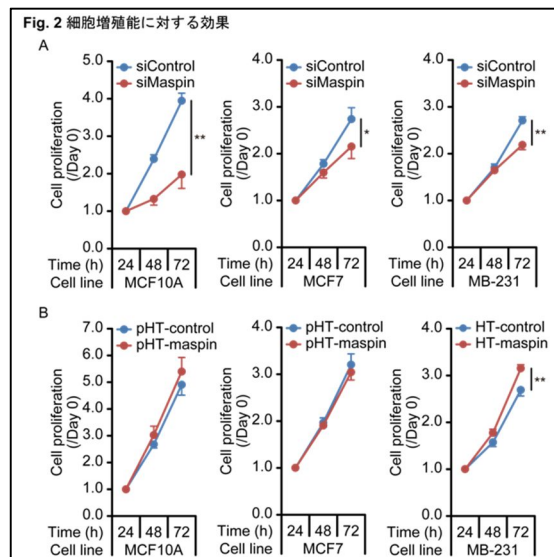
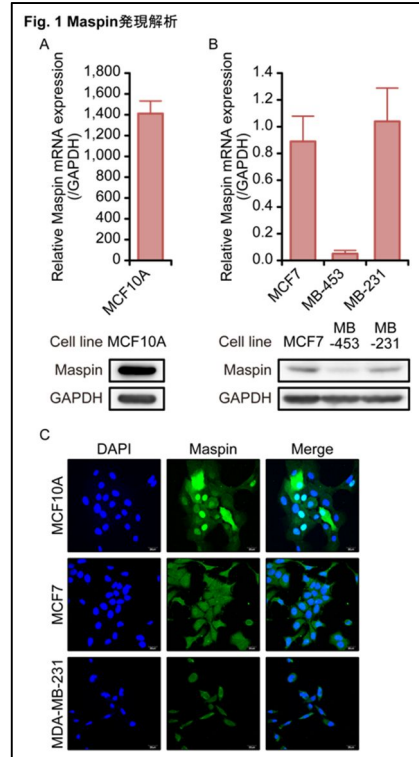
4. 研究成果

4-1. 乳腺上皮細胞株、乳癌細胞株における maspin 発現解析

乳腺上皮細胞株 (MCF10A)、乳癌細胞株 (MCF7, MDA-MB-453, MDA-MB-231)における mRNA、タンパク発現を real-time PCR およびウエスタンブロットで確認した。乳癌細胞株における maspin 発現は、正常乳腺上皮細胞株と比較すると mRNA、タンパクともに発現が低下していた (Fig. 1A, B)。さらに、MCF10A、MCF7、MDA-MB-231 における maspin の細胞内局在を蛍光免疫染色によって確認した結果、MCF10A では細胞質および核に発現しているのに対して、乳癌細胞株 (MCF7, MDA-MB-231)では主に細胞質に発現が認められた (Fig. 1C)。これらの結果から、乳癌細胞株において maspin 発現低下および細胞質への局在変化が生じていることが示唆された。

4-2. 細胞増殖能に対する maspin 発現の影響

細胞増殖能に対して maspin がどのような影響を与えるかを確かめるために、RNA 干渉を用いた解析を行った。siRNA による maspin 発現抑制の結果、正常乳腺上皮細胞株 (MCF10A)、乳癌細胞株 (MCF7, MDA-MB-231)ともに細胞増殖の有意な低下が認められた (Fig. 2A)。また、発現プラスミド DNA による maspin 過剰発現による細胞増殖への影響も検討した。各細胞株における外来性の maspin の発現を蛍光免疫染色で確認した結果、内在性 maspin 発現と同様に MCF10A では細胞質および核に発現しており、MCF7、MDA-MB-231 においては主に細胞質に発現していた (data not shown)。この時の細胞増殖能を解析したところ、MCF10A および MCF7 では有意な発現変動は確認出来なかったが、MDA-MB-231 において細胞増殖の有意な低下が認められた (Fig. 2B)。これらの結果から、maspin 発現は細胞増殖能の制御に関与しており、特に正常細胞において最も寄与して



いることが示唆された。

4-3. 細胞浸潤能に対する maspin 発現の影響

細胞増殖能に対する影響の解析と同様に、maspin 発現変化が細胞浸潤能に対してどのような影響を与えるかを検討した。解析の結果、細胞浸潤能を持たない MCF10A、MCF7 においては、maspin 発現抑制、過剰発現による細胞浸潤能の変化は認められなかった。一方、細胞浸潤能を有する MDA-MB-231 においては、発現抑制による浸潤能の有意な低下、過剰発現による有意な亢進が認められた (Fig. 3A, B)。これらの結果から、maspin 発現は細胞浸潤能の直接的な付与には関与しないが、一部の乳癌細胞株が本来有する細胞浸潤能の制御に関与していることが示唆された。

4-4. 網羅的遺伝子発現解析による cytMaspin 関連遺伝子の同定

cytMaspin がどのようなメカニズムによって、MDA-MB-231 細胞の浸潤能制御に関わっているかを確認するために、maspin 安定発現株を樹立してコントロール株との網羅的遺伝子発現比較解析を実施した (Fig. 4)。この内、標準化シグナル値が 10 以上の遺伝子に着目した結果、コントロール株と比較して maspin 高発現株では 23 個の遺伝子が 2 倍以上高発現しており、11 個の遺伝子の発現が 0.5 倍以下に低下していた。

4-5. cytMaspin による細胞浸潤能亢進メカニズムの解明

DNA マイクロアレイの結果から、maspin 高発現株で発現亢進を認めた 23 遺伝子のうち、申請者らは epithelial mesenchymal transition (EMT) を介した癌細胞浸潤と関連が報告されている serglycin (SRGN) に着目した (Zhang Z et al., *Oncogenesis*. 2017, Guo JY et al., *Oncogene*. 2017)。MB-231-maspin 細胞では maspin mRNA に加えて、SRGN mRNA およびタンパクが高発現しているのを確認した (Fig. 5A, B)。さらに、EMT 関連タンパクおよび TGF-シグナル関連タンパクの発現を比較した結果、maspin 高発現細胞株では、TGFB2 の発現増加、Smad3 のリン酸化が亢進しており、N-cadherin、Snail、Slug、ZEB1、ZEB2 の発現増加が認められた (Fig. 5B)。これらの結果から、cytMaspin は SRGN の発現増加に伴う TGF-シグナルの活性化によって、EMT 関連タンパクの発現を増加させることで EMT を促進し、乳癌細胞の細胞浸潤能を促進していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Wakahara M, Sakabe T, Kubouchi Y, Hosoya K, Hirooka Y, Yurugi Y, Nosaka K, Shiomi T, Nakamura H, Umekita Y. Subcellular Localization of Maspin Correlates with Histone Deacetylase 1 Expression in Human Breast Cancer. *Anticancer Res* 37 (9): 5071-5077, 2017. (査読有り)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 坂部 友彦, 野坂 加苗, 梅北 善久, Cytoplasmic maspin increases EMT-associated gene expression and promotes breast cancer cell invasion. 第 77 回日本癌学会学術総会
2. 坂部 友彦, 野坂 加苗, 梅北 善久, 乳癌細胞株における maspin 細胞内局在および機能解析, 第 107 回日本病理学会総会, 2018
3. 梅北 善久, Maspin (mammary serine protease inhibitor) の局在と機能解析, 日本臨

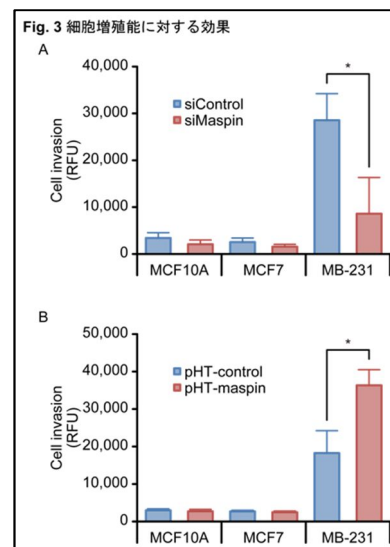


Fig. 4 網羅的遺伝子発現解析

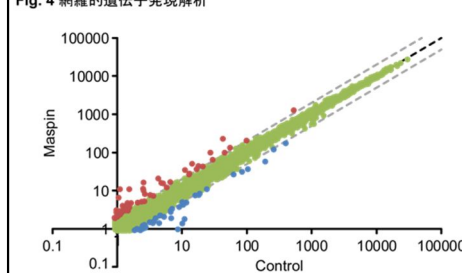
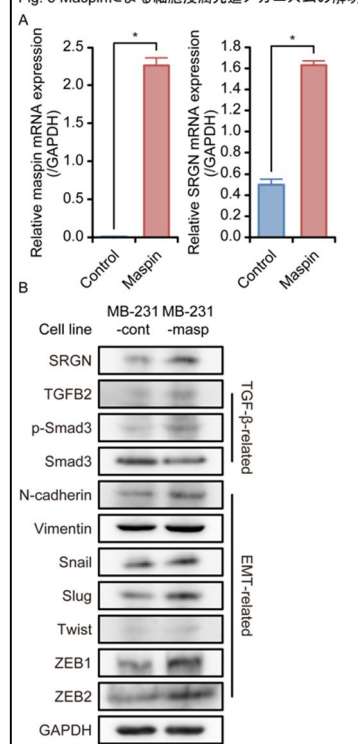


Fig. 5 Maspinによる細胞浸潤亢進メカニズムの解明



床細胞学会鳥取県支部総会, 2017

4. 坂部 友彦, 若原 誠, 野坂 加苗, 塩見 達志, 梅北 善久, 細胞質に発現する maspin は乳癌細胞株の浸潤能亢進によって癌の進展や悪性化に寄与する, 第 106 回日本病理学会総会, 2017

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：坂部 友彦 (SAKABE, tomohiko)

所属研究機関名：鳥取大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号 (8 桁): 50639747

(2)研究協力者

研究協力者氏名：若原 誠

ローマ字氏名：(WAKAHARA, makoto)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。