

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09304

研究課題名(和文) 肺扁平上皮癌患者の不良予後に関するMaspinの分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of maspin associated with poor prognosis of patients with lung squamous cell carcinoma

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腫瘍細胞に対する機能が細胞内局在依存的に変化するmaspinの非小細胞肺癌における役割を検討した。Maspinの細胞内局在制御機構が、一部の細胞株で破綻していることをMaspin安定発現株の樹立によって明らかにした。また、核と細胞質にmaspinを発現するLK-2-maspin、A549-maspinでは細胞浸潤能の低下を認めたのに対して、細胞質で発現を示すRERF-LC-AI-maspin、RERF-LC-KJ-maspinでは細胞浸潤能の有意な増加を認めた。さらに、A549-maspinでの細胞浸潤能の抑制には、N-cadherin発現の低下が関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでmaspinは癌抑制遺伝子としての機能が注目されていたが、本研究によって癌に対する機能は細胞内局在に応じて変化し、抑制的に働くだけでなく促進的にも働くという新たな知見を得た。そのため、本研究結果は癌細胞生物学における新たな研究領域の確立に貢献するものであると考えている。また、細胞質に局在するmaspinは、癌細胞の悪性度に対して促進的に働くため、maspin発現を変化させることなく核内への移行を誘導することで抗腫瘍効果を発揮する新たな作用機序を有する新規癌治療薬開発の基盤研究となると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigate the role of maspin, whose function in tumor cells depend on its subcellular localization, in non-small cell lung cancer (NSCLC). We found that the regulatory mechanism of maspin subcellular localization is disrupted in some cell lines by establishment of NSCLC cell line stably expressing of maspin. Additionally, LK-2-maspin and A549-maspin, which express maspin in the nucleus and cytoplasm, showed decreased cell invasive capability, whereas RERF-LC-KJ-maspin and RERF-LC-AI-maspin, which express maspin in the cytoplasm, showed significantly increased cell invasive capability. Furthermore, we found that decreased expression of N-cadherin is associated with the suppression of cell invasion in A549-maspin.

研究分野：病理学

キーワード：Maspin 肺扁平上皮癌 細胞内局在 細胞間接着 細胞浸潤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌は、本邦の肺癌患者の約 85%を占めており、さらに腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌の 3 種類の組織型に分類され、それぞれの組織型は肺癌全体の 50%、30%、5%を占めている。近年の肺癌研究の進展に伴う細胞増殖や発癌に直接的に関わる「ドライバー遺伝子変異」の同定やこれを標的とする分子標的療法の開発によって肺腺癌 (LUAD)の治療成績は向上している。一方で、肺癌の中で 2 番目に多い肺扁平上皮癌 (LUSC)に対しては、分子標的治療薬の開発が進んでおらず、適応となる分子標的治療薬が少ないために治療の選択肢が限られることが問題となっている。そのため、肺癌患者の長期予後をこれまで以上に改善するためには、LUSC に対する新たな治療標的を同定し、効果的で適応可能な新規治療法を開発する必要があると考えられる。

セリンプロテアーゼインヒビター的一种である Maspin は、正常乳腺上皮細胞で発現しており、発癌および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。*In vitro*での解析において、Maspin の過剰発現は細胞増殖、遊走能、浸潤能を誘導したことから、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、アポトーシス促進タンパク BAX の発現亢進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, Dzinic SH *et al. PLoS One* 2013)。これらの知見から、Maspin は癌の発生、進展を抑制する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されてきた。しかし、我々はこれまでに乳癌患者などの癌組織において、核では発現せずに細胞質に局限して発現する Maspin (cytMaspin)は、患者予後不良と有意に相関することを報告してきた (Umekita Y *et al. in vivo* 2006, Tsuji T *et al. Histopathol* 2009)。同様に、LUSC・LUAD においても cytMaspin 陽性の患者は有意に予後不良であることを見出してきた (Matsuoka Y *et al. Histopathology* 2016, Ohno T, *et al. Anticancer Res* 2018)。これらの知見から、これまで癌抑制遺伝子であると考えられていた Maspin の機能は、その細胞内局在に応じて変化し、LUSC・LUAD における cytMaspin は癌遺伝子として機能していることが推定されるが、その詳細なメカニズムなどは未だに不明である。

2. 研究の目的

本研究では、LUSC を中心とした非小細胞肺癌において、cytMaspin がどのようなメカニズムで癌の進展に寄与しているかを明らかにするとともに、Maspin の細胞内局在制御機構を解明することで、新たな分子標的と成り得るかを検証することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 細胞株

ヒト正常気道上皮細胞株 (BEAS-2B)、ヒト肺扁平上皮癌細胞株 (RERF-LC-AI, LK-2, LC-1/sq, KNS-62, EBC-1, HARA)、ヒト正常肺腺癌細胞株 (A549, RERF-LC-KJ, PC-9, NCI-H23)を使用した。

(2) Maspin 安定発現株樹立

Maspin 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクター、および GFP 遺伝子を組み込んだコントロールウイルスベクターを、各細胞株にそれぞれ MOI=25 で感染させた。10 μ g/mL blasticidin による薬剤セレクションで生存した細胞をプールして安定発現株として以降の実験に使用した。

(3) 遺伝子発現解析

各細胞株から回収した 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。cDNA をテンプレートとして、TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific)および LightCycler 96 system (Roche Diagnostics)による real-time qPCR を実施することで遺伝子発現解析を行った。

(4) 細胞分画の単離

各細胞株における細胞分画の単離には、Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (Thermo Fisher Scientific)を用いた。キット付属の CEB buffer および NEB buffer によって、細胞質分画、核分画をそれぞれ単離した。単離した細胞分画はウエスタンブロットによるタンパク発現解析に使用した。

(5) タンパク発現解析 (ウエスタンブロット)

各細胞株から 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し、5% ECL Prime Blocking Reagent (Cytiva)によるブロッキング処理後に各タンパクによる特異抗体、HRP 標識二次抗体を用いてタンパクの検出を行った。

(6) 細胞内局在解析 (蛍光免疫染色)

Nunc Lab-Tek II 8-well chamber slide (Thermo Fisher Scientific)に接着させた細胞は、4%パラホルムアルデヒドで固定後、透過処理を行い10% goat serum/PBSでブロッキングを行った。細胞内のMaspin染色は抗Maspin抗体 (clone EAW24, Leica Biosystems)およびAlexa Fluor 488 標識二次抗体 (Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor 647 標識二次抗体、TMRDirect ligand (Promega)を用いた。染色後のスライドは、ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific)を用いて封入、対比染色を行、共焦点顕微鏡を使用して発現を検出した。

(7) 細胞浸潤能解析

細胞浸潤アッセイはQCM ECMatrix Cell Invasion Assay, 24-well (8.0 μm), colorimetric 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上段に播種し、インキュベート後に浸潤細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、クリスタルバイオレットで染色後に細胞数をImageJ/Fijiソフトウェアでカウントした。

(8) 網羅的遺伝子発現解析

Maspin 安定発現株およびコントロール株からRNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いてtotal RNAを抽出し、ユーロフィンジェノミクス株式会社に送付後、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を実施した。発現変動遺伝子を用いたジーンオンロジー (GO)ターム解析、KEGGパスウェイ解析はDAVID online tool (<https://david.ncifcrf.gov>)を用いて行った。

(9) Maspin 結合タンパクの探索

Maspin に結合して細胞内局在を制御しているタンパクを同定するために、Pull-down アッセイによる結合タンパク探索を行った。HaloTag 融合 Maspin を組み込んだアデノウイルスベクターをMOI=100で感染させ、48時間後にセルスクレイパーで細胞を回収した。HaloTag Mammalian Pull-Down System (Promega)を用いた細胞溶解液からのタンパク抽出、Pull-down アッセイを実施し、Amicon Ultra-2 (Merck Millipore)によって濃縮処理を行った。回収したタンパクを5-20%アクリルアミドゲルによるSDS-PAGEで泳動し、銀染色およびCBB染色を行った。コントロールサンプルと比較してHaloTag 融合 Maspin 発現サンプルのみに確認されたバンドをゲルから切り出して和研薬株式会社 (京都)へ送付し、nanoLC-MS/MS タンパク質同定サービスによる質量分析を行った。

4. 研究成果

(1) 非小細胞肺癌における Maspin 発現および細胞内局在解析

各細胞株における Maspin 発現を real-time qPCR、ウエスタンブロットによって検討した結果、Maspin 発現は高発現株 (BEAS-2B, LC-1/sq, KNS-62, EBC-1, HARA, PC-9)、低発現株 (LK-2, RERF-LC-KJ)、非発現 (RERF-LC-AI, A549, NCI-H23)に分類されること、一部の非小細胞肺癌株では正常細胞株と同程度の Maspin 発現が維持されていることを明らかにした。さらに、蛍光免疫染色を用いて高発現株における Maspin 細胞内局在を検討したところ、すべての高発現株で細胞質と核の両方に Maspin の発現が確認された (panMaspin)。これらの結果から、Maspin 高発現の非小細胞肺癌株は正常細胞株と同様の細胞内局在プロファイルが維持されていることが示唆された。一方、低発現株 (LK-2, RERF-LC-KJ)および非発現株 (RERF-LC-AI, A549)から樹立した Maspin 安定発現株 (LK-2-maspin, RERF-LC-AI-maspin, RERF-LC-KJ-maspin, A549-maspin)における細胞内局在を確認した結果、LK-2-maspin と A549-maspin は panMaspin、RERF-LC-AI-maspin と RERF-LC-KJ-maspin は cytMaspin の細胞内局在プロファイルであることを明らかにした。また、安定発現株における異なった細胞内局在については、単離した細胞分画におけるウエスタンブロットにおいても同様の結果であったことから、一部の非小細胞肺癌株では Maspin の核移行制御機構破綻が生じていることが明らかとなった。

(2) 細胞浸潤能に対する Maspin 細胞内局在の影響

樹立した Maspin 安定発現株を用いて、細胞内局在の違いが非小細胞肺癌株の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、panMaspin の局在プロファイルを示した LK-2-maspin、A549-maspin では、コントロール株と比較して細胞浸潤能の有意な低下を認めた。一方、cytMaspin の局在プロファイルを示した RERF-LC-AI-maspin、RERF-LC-KJ-maspin では、浸潤細胞数がコントロール株より有意に増加していた。また、panMaspin の高発現株である KNS-62 における siRNA による発現抑制これらの結果から、癌の悪性度の指標の一種である細胞浸潤能に対して、panMaspin は抑制的に働くのに対して、cytMaspin は促進的に機能しており、Maspin の癌に対する相反する機能はその細胞内局在に依存していることが明らかとなった。

(3) panMaspin、cytMaspin による細胞浸潤能促進・抑制における分子メカニズムの解明

非小細胞肺癌株の細胞浸潤能における panMaspin による抑制効果、cytMaspin による促進効果がどのようなメカニズムによるかを検討した。cytMaspin を発現する RERF-LC-AI-maspin とコントロール株における網羅的遺伝子発現解析の結果、cytMaspin の過剰発現株では「MAPK signaling

pathway」に含まれる遺伝子が増加遺伝子群にエンリッチされており、「cell-cell adhesion」、「cell adhesion」、「adherens junction」などの細胞間接着に関連する GO タームや KEGG パスウェイに含まれる遺伝子が減少遺伝子群にエンリッチされていることが明らかとなった。さらに、RERF-LC-AI-maspin では様々な癌腫で細胞浸潤能の関連が報告されている PYK2 や SRC のリン酸化が増加していることが確認された。これらの結果から、cytMaspin による LUSC 株の浸潤能促進には、PYK2 および SRC の活性化が関与していることが示唆された。一方、panMaspin を発現する A549-maspin とコントロール株における遺伝子発現解析を実施した結果、panMaspin の過剰発現によって間葉系カドヘリンである N-cadherin 発現の有意な減少が認められた。このことから、panMaspin による癌進展の抑制には間葉系形質の獲得阻害による細胞浸潤能の抑制が関与していることが示唆された。

(4) Maspin 結合タンパクの探索

HaloTag 融合 maspin を用いた pull-down assay および SDS-PAGE の結果、結合タンパクと推測されるバンドが分子量 27 kDa 付近に 1 本確認された。質量分析によってこのタンパクの推定を行ったところ、14-3-3 protein zeta/delta (YWHAZ)、Ribosomal RNA small subunit-methyltransferase NEP1 (EMG1)、60S ribosomal protein L15 (RPL15)、60S ribosomal protein L19 (RPL19) の 4 種のタンパクが候補として推測された。しかし、各タンパクに対する特異抗体を用いた Maspin 結合における検証実験では、これらのタンパクの結合は検出できなかった。今後、pull-down assay 時の条件最適化などによって効率を高めることで、結合タンパクのさらなる探索が必要であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsushige T, Sakabe T, Umekita Y.	4. 巻 65
2. 論文標題 Investigation of the Subcellular Localization-Dependent Anti- or Pro-Tumor Functions of Maspin in Human Lung Adenocarcinoma Cell Line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Yonago Acta Med	6. 最初と最後の頁 44-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33160/yam.2022.02.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松重 貴大, 坂部 友彦, 野坂 加苗, 梅北 善久
2. 発表標題 非小細胞肺癌株における細胞質局在型maspinは浸潤能を促進させる
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松重 貴大, 坂部 友彦, 野坂 加苗, 梅北 善久
2. 発表標題 非小細胞肺癌株におけるmaspinの機能解析
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	坂部 友彦 (SAKABE Tomohiko) (50639747)	鳥取大学・医学部・助教 (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------