

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 3 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22790760

研究課題名(和文) 肺癌細胞の転移浸潤能におけるサイトケラチン8分子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of cytokeratin-8 on invasion and metastasis of lung cancer cell lines

研究代表者

石井 知也 (ISHII, TOMOYA)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80467836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：細胞骨格であるサイトケラチン(CK)が肺癌細胞株の浸潤能に及ぼす影響について検討するために、A549、H11017に対してマトリゲルアッセイを行った。繰り返しマトリゲルに通して浸潤能を高めた細胞株は、いずれも細胞自体が小型化しCK-8、18の発現量も減少していた。逆に通常CK-19を持たないH11017に外因性にCK-19を発現させると浸潤能は抑制された。RNA干渉を用いてH11017におけるCK-8ないしCK-18の発現を抑制すると浸潤能は高まった。以上の結果から、肺癌細胞の浸潤能はCKの発現量と密接に関係しており、CKの発現量を調節することが非小細胞肺癌の治療に生かせる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the role of CKs in the invasion of lung cancer cells, we investigated the expression levels of CKs in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines by quantitative immunoblotting. H11017 expressed CK8 and 18; A549 expressed CK8, 18 and 19, respectively. Invasive sublines were established by repeated selection of invasive cells using Matrigel system and showed lower expression levels of CKs compared with the parental cells. Exogenous CK19 also resulted in a decrease in invasiveness of the H11017. Suppression of either CK8 or CK18 by short interfering RNAs led to a decrease in the total CKs and increased invasiveness of both cell lines. A549 expressed very low levels of CK19. Suppression of CK19 affected neither invasive ability nor total CK amount in the A549. Our observations indicate that CK expression levels were inversely associated with invasiveness of the NSCLC cell lines, and suggest that expression levels of dominant CKs may affect invasive ability.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：サイトケラチン8 マトリゲルアッセイ 浸潤能

## 1. 研究開始当初の背景

サイトケラチン (Cytokeratin) は主として細胞形態の維持に関わる細胞骨格蛋白であり、ヒトにおいては現在まで約 20 種が同定されている。これらのサイトケラチンの中でも近年、サイトケラチン 8 が大腸癌をはじめとする癌細胞および癌組織において高発現している事実が明らかとなり、その腫瘍化や増殖・転移に果たす役割が注目されている。我々はサイトケラチン 8 が肺癌細胞において高発現していることに早くから着目し、過去 4 年間 (平成 13 年度から平成 16 年度の科学研究費による研究) の研究において肺癌培養細胞および肺癌患者血清中におけるサイトケラチン 8 測定を行ってきた。その結果、培養細胞レベルでは非小細胞癌において遺伝子発現レベルでサイトケラチン 8 の高発現が確認でき、臨床的には肺癌患者の血中サイトケラチン 8 値 (ELISA 測定) は病期および予後と良い相関が認められた。これらの結果はサイトケラチン 8 が新たな肺癌の臨床的マーカーとなり得ることを証明するものであり、海外の医学雑誌に論文として発表した (Fukunaga Y, Bandoh S et al. Lung Cancer 38, 31-38: 2002)。

さらに我々のデータは血中サイトケラチン 8 測定の臨床的有用性を示唆するのみならず、サイトケラチン 8 が肺癌の浸潤および転移に深く関わっている可能性も示唆するものであったことから、今後は基礎的実験により、サイトケラチン 8 がどのようなメカニズムで肺癌の浸潤・転移に関わっているのかを明らかにしていきたい。また同時に、サイトケラチン 8 の遺伝子発現を mRNA レベルで抑制する手法 (siRNA) を用いてサイトケラチン 8 が新たな肺癌治療の分子標的となり得るかも検討したい。これまでの科学研究費を用いた研究において、肺癌細胞内におけるサイトケラチン 8 の遺伝子発現調節および転写制御メカニズム (Tojo Y, Ishii T et al. Lung Cancer 42, 153-161: 2003) や、アポトーシス後の細胞外へのサイトケラチン放出メカニズム (Ishii T et al. Tumor Biol. 29, 57-62: 2008) について明らかとなっており、さらに他のサイトケラチンの解析も進めていく。

## 2. 研究の目的

- 1) サイトケラチン 8 の遺伝子発現抑制が肺癌培養細胞株の浸潤能に及ぼす影響を明らかにする。
- 2) サイトケラチン 8 の遺伝子発現抑制が細胞接着に及ぼす影響、および細胞接着分子の発現に与える影響を明らかにする。
- 3) 肺癌細胞株を皮下に接種したヌードマウスにおいて、サイトケラチン 8 に対する siRNA を静脈内投与した場合の腫瘍増殖能および浸潤・転移能への影響を明らかにする。

以上の様な *in vitro* および *in vivo* の研究を通じて、サイトケラチン 8 の発現抑制が肺癌の進展にいかなる影響を与えるかを知るとともに、臨床応用への可能性を探る。同時に同じ実験系で他のサイトケラチン (サイトケラチン 18 および 19) への影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1) 培養肺癌細胞株における siRNA および発現ベクターを用いたサイトケラチン 8 遺伝子発現制御システムの確立

サイトケラチン 8 の遺伝子発現を特異的に抑制する siRNA 配列は、既に我々の予備実験で判明している (サイトケラチン 8 のみならず、肺癌細胞が有する各種サイトケラチンに対してそれぞれ複数の siRNA を作成している) この配列を持つ複数の siRNA を使用し、培養肺癌細胞株内に遺伝子導入を行う。この遺伝子導入によりサイトケラチン 8 の遺伝子発現が特異的にノックダウン出来たか否かは、RT-PCR 法、蛍光免疫染色法および Western blot 法にて検証する。同時にサイトケラチン 18、19 に対する siRNA およびヒトのいかなる遺伝子発現にも影響しない事が想定されている non-specific siRNA も合成し、本実験のコントロールとして用いる。サイトケラチン 8 は通常の状態ではサイトケラチン 18 と heterodimer を形成しているため、サイトケラチン 8 の遺伝子発現抑制に伴いサイトケラチン 18 の発現にも影響が出る可能性も十分考えられる。従って、この実験段階では、サイトケラチン 8 の遺伝子発現抑制時の他のサイトケラチン発現パターンも複数の培養肺癌細胞株において Western blot 法にて確認する。発現抑制実験と平行してサイトケラチン 8 を恒常的に発現する培養肺癌細胞株を作成し、この細胞株内でのサイトケラチン遺伝子発現パターンも Western blot 法にて確認する。これらの方法により、発現を人工的に制御された細胞株の形態および増殖速度などを検討する。また、siRNA の細胞内導入効率の至適条件設定を行う。

### 2) サイトケラチン 8 が培養肺癌細胞株の細胞接着に及ぼす影響の検討

サイトケラチンは細胞・細胞間ではデスモプラキンを介して細胞接着に関与しており、細胞・細胞外基質間ではインテグリンを介して細胞接着に関与していると考えられている。そのためサイトケラチンの異常発現や発現低下は細胞接着に何らかの影響を与える可能性が大きく、特に癌細胞においては細胞間接着の減弱化が遠隔転移に直接関係していることが報告されている。本実験では siRNA によるサイトケラチン 8 遺伝子発現抑制が細胞・細胞外基質間にどのような影響を与えるかを検討する。第一にはサイトケラチン 8 の発現を siRNA によって著しく低下させた細胞を用いて、そのデスモプラキンおよびインテグ

リンなどの接着分子の発現変化を蛍光免疫染色および Western blot 法を用いて確認する。他の接着分子についてもマイクロアレイのキットを用いてサイトケラチン 8 の発現抑制前後でいかなる遺伝子群の発現に変化が生じているのかを検討する。

さらに細胞と基質の接着強度の検討にはトリプシン法を用いて解析する。トリプシン法は細胞と基質の接着力の弱い細胞が低濃度のトリプシンにより短時間で基質から遊離する現象を定量化するものであり、この際には細胞外基質としてラミニンや各種コラーゲンを用意し、どの細胞外基質において最も細胞が siRNA の影響を受けて遊離しやすくなるかも併せて検討する。

3) サイトケラチン 8 が培養肺癌細胞の浸潤能に及ぼす影響の検討 (in vitro)

培養肺癌細胞の浸潤能を計測する方法として、マトリゲルアッセイを行う。マトリゲルアッセイは in vivo での癌細胞の転移能と相関性のある結果が得られることが報告されている。

本法は特殊に調整されたゲル内を癌細胞が浸潤する程度を定量化するものであり、siRNA がこの浸潤能を変化させるか否かを検討する。逆にサイトケラチン 8 を恒常的に発現する細胞の浸潤能が亢進しているか否かも併せて検討する。サイトケラチン 8 の遺伝子発現制御により、浸潤能が変化した場合には、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の発現についても検討し、その発現がサイトケラチン 8 の発現と相関性があるか否かを検討する。サイトケラチン 18 および 19 についても浸潤能に影響を与えるか否かを検討した上、複数のケラチンの遺伝子発現抑制が浸潤能にどのような変化をもたらすかについても検討していく。

4) siRNA の in vivo (マウス) における遺伝子導入法の確立

本研究では生体内への siRNA の導入経路は静脈内投与を考えているため、まず皮下に腫瘍を移植したヌードマウスに対し尾静脈内に蛍光標識した siRNA を投与し、数日後に腫瘍細胞及び正常気管支上皮内への導入効率を確認する。正常気管支上皮に対する腫瘍細胞の導入効率の比が最も大きくなるような条件を探る。この際、一回に投与する siRNA の総量、濃度およびリポフェクションに必要な薬剤の量の最適化が必要である。また単回投与にするか連続投与にするのかの最適化も図る必要がある。

5) サイトケラチン 8 siRNA の in vivo における抗腫瘍効果および転移抑制効果の検討

培養非小細胞肺癌株である A549 細胞はヌードマウスにおいて皮下に接種した場合、局所で増殖し腫瘍を形成するだけでなく、急速に遠隔転移し、肝臓に多発転移巣を形成することが報告されている (予備実験として、A549 細胞を一定量皮下に接種した場合の局所での腫瘍形成速度および肝転移速度 (結節

の個数) を調べておく)。本研究ではヌードマウスの皮下に A549 細胞を接種すると同時に尾静脈内に最適化された条件のサイトケラチン 8 に対する siRNA を投与し、移植した腫瘍の変化を観察する。本実験における抗腫瘍効果の評価項目は皮下に形成される腫瘍の腫瘍径であり、siRNA を投与しない場合、non-specific siRNA を投与した場合およびサイトケラチン 18 あるいは 19 に対する siRNA を投与した場合等をコントロールとして比較検討する。さらにサイトケラチン 8 に対する siRNA が遠隔転移抑制効果を持つか否かについては、評価項目を肝転移数としてコントロール群と比較検討する。

#### 4. 研究成果

サイトケラチンの培養肺癌細胞株の浸潤能に及ぼす影響についての検討を行うために、まず非小細胞肺癌細胞株である A549 および HI1017 に対してマトリゲルアッセイを行った。マトリゲルに 18 回通して浸潤能を高めた HI1017 は、細胞自体が小型化し細胞質も少なくなることを確認し、細胞骨格であるサイトケラチン (CK-8, 18) の発現量も減少していた。同様の変化が A549 に対しても起こっており、CK-8, 18 および 19 の発現量は減少していた。このことは、癌細胞が浸潤するにあたって細胞骨格を形成しているサイトケラチンの発現量を減らすことで、その浸潤能を高めていると推測される。逆に通常 CK-19 を持たない HI1017 に外因性に CK-19 を発現させたところ、癌細胞の浸潤能が抑制された。また、RNA 干渉を用いて HI1017 における CK-8 ないし CK-18 の発現を抑制したところ、いずれの CK も発現量が低下し、浸潤能も干渉前に比べて 4 倍に高まった。A549 についても同様に、CK-8 ないし CK-18 の発現を抑制したところ、その浸潤能は 3 倍に高まることが確認できた。以上より、肺癌細胞の浸潤能はサイトケラチンの発現量と密接に関係しており、サイトケラチンの発現量を調節することが非小細胞肺癌の治療に生かせる可能性を見出した。

#### 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 1 件)

Nobuhiro Kanaji, Shuji Bandoh, Tomoya Ishii, Jiro Fujita, Toshihiko Ishida, Takuya Matsunaga, Akihito Kubo.

Cytokeratins negatively regulate the invasive potential of lung cancer cell lines.

Oncology Reports 2011;26(4): 763-768

[学会発表](計 1 件)

石井知也, 金地伸拓, 坂東修二.

サイトケラチン 8 および 18 が非小細胞肺癌  
の浸潤能に与える影響の検討.  
第 52 回日本呼吸器学会学術講演会.  
2012.04.21

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
石井知也 ( 助教 )

研究者番号：80467836

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：