

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590700

研究課題名(和文) NADPHオキシターゼとスタニオカルシンを用いた乳癌の新規転移マーカーの開発

研究課題名(英文) Evaluation of stanniocalcin-1 and NADPH oxidase as marker of metastasis in breast cancer

研究代表者

田中 真樹 (TANAKA, MAKI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40207139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、乳癌の転移予測マーカーの開発を目指した。癌の転移に影響を与える因子にNADPHオキシターゼ(Nox)から産生される活性酸素があり、細胞運動能を亢進させる。一方、カルシウム調節タンパクのスタニオカルシン-1(STC-1)が腫瘍細胞で高発現している。そこで、カルシウムにより活性化されるNox5およびSTC-1の分子に着目し研究を行った。乳癌細胞にSTC-1を高発現させると運動能が亢進し、さらにマウスの肺転移能が増強した。しかしながら、Nox5を高発現させても運動能に変化はなかった。以上より、STC-1は乳癌の転移能を亢進させ、新たな転移予測マーカーとなり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to evaluate potential marker of metastasis in breast cancer. Reactive oxygen species, produced from NADPH oxidase (NOX), affect cancer metastasis and accelerate cell migration. Stanniocalcin-1 (STC-1), a regulator of calcium metabolism, is highly expressed in tumor cells. Therefore, we focused our research on calcium-dependent NOX5 and STC-1 molecules. High levels of STC-1 in breast cancer cells accelerated cell motility and enhanced lung metastasis in mice. However, no difference in cell migration was observed with high levels of NOX5. Thus, we conclude that STC-1 enhances the metastatic potential of breast cancer cells and our results suggest that STC-1 may have utility as a novel prediction marker of metastasis.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：Stanniocalcin-1 NADPH オキシターゼ 乳癌 転移能 浸潤能

1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞の転移能は、悪性腫瘍が持つ特性の一つで患者の生命予後を規定する重要な因子である。腫瘍細胞は、常に炎症細胞や自身が産生する活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)に暴露されている。これまで申請者は、ROS の一種である superoxide が、腫瘍細胞の運動能・浸潤能を亢進させることを報告してきた。ヒトの生体内で ROS は、各組織に発現している Nox と呼ばれる一群の酵素系とミトコンドリア呼吸鎖により産生されている。Nox には7つのファミリーがあり、その中でも Nox5 と甲状腺に特異的発現している Dual oxidase 1(Duox1)はカルシウム結合モチーフである EF ハンドを有しており、カルシウムによって活性化され superoxide を産生する特徴を有している。

一方、STC-1 は魚類特有のカルシウム調節ホルモンとして同定された糖タンパク質である。その後、ヒトでも同定されカルシウム調節作用の他に成長、増殖、分化等に関与し、その発現は正常組織より乳癌、大腸癌、白血病で高いことが明らかとなっている。腫瘍細胞はエネルギー源に多量の ATP を必要とし、その生成でカルシウムやリンイオンを調整するために STC-1 の発現が高まっていると考えられる。さて、卵巣癌細胞では STC-1 を高発現させると、アポトーシスの低下や細胞増殖能が亢進すること、また末梢血中の STC-mRNA が乳癌、肺癌や白血病で発現していることが確認されている。

以上の知見から、乳癌で高発現している STC-1 により細胞内カルシウム濃度が増加することで、Nox5 が活性化する。その結果、ROS の産生が起こり細胞運動・浸潤能が亢進し、転移能を獲得していることが予想された。

2. 研究の目的

腫瘍細胞の転移能に影響を及ぼす因子の一つに ROS がある。ROS は NADPH オキシターゼにより生体では主に産生され、細胞運動や

浸潤能を亢進させる。Nox は7つのファミリーがあり、その中でもカルシウムにより活性化されるものに Nox5 がある。また、細胞内カルシウムを調節する STC-1 が各種癌で高発現することが確認され、転移能を規定する分子として想定される。そこで本研究は、Nox5 と STC-1 が乳癌の転移能に影響を与えるか否かを検討した。さらに、Nox5 および STC-1 を指標とした乳癌の転移能を評価することができる、新規の転移マーカーの開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 対象としたヒト乳癌細胞株

ヒト乳癌細胞株として、MDA-MB-231、MDA-MB-453、MCF-7、OCUB-M、T-47D、YMB-1-E、ZR75-1 の7種を用いた。

(2) Nox5 および STC-1 の mRNA 発現評価

7種の乳癌細胞株から mRNA を抽出し、RT-PCR 法にて解析した。

(3) Nox5 および STC-1 遺伝子導入細胞の作製
MDA-MB-231 細胞に、STC-1 の全長(分泌型)、シグナルペプチドを除いた(非分泌型)、あるいは Nox5 遺伝子を導入した、MB231-S、MB231-NS、および MB231-Nox5 細胞を各々作製した。比較対照にはベクターのみを導入した MB231-mock 細胞を用いた。

(4) 浸潤能と運動能の解析法

浸潤能はマトリジェルを固相化した Transwell chamber(ポアサイズ $8\mu\text{m}$)に 1×10^5 個の細胞を播種し、24 時間でマトリゲルを通過した細胞数をギムザ染色で測定した。運動能は Transwell chamber のみを用いて、通過する細胞または wound healing assay にて移動した距離を計測し、クリスタルバイオレット染色で測定した。

(5) 細胞増殖能、接着能および基質分解能の解析法

細胞増殖能は細胞播種後、12、24、48 および 72 時間後の生細胞数をトレパンブルー染色

で測定した。接着能はマトリゲル固相プレートに1時間で接着する細胞をクリスタルバイオレット染色にて測定した。基質分解能は、細胞培養液を濃縮し、ゼラチンザイモグラフィで検討した。

(6) *in vivo*における転移能の検討

1 x 10⁵個の細胞を6週齢のNOD/SCIDマウスの尾静脈から移植し、8週間後に肺転移結節数および肺重量を測定した。

(7) MB231-S と MB231-NS 細胞の FBS 未添加 medium で 48 時間培養した細胞培養液を濃縮し、発現を western blotting 法で確認した。さらに Transwell chamber に同培養液を添加し、細胞運動能の変化を計測した。

(8) PI3K および MAPK の解析法

親細胞(MDA-MB-231)に MB231-S、MB231-NS あるいは MB231-mock 細胞の培養上清液を添加し、15、30、45、60 分後にそれぞれ whole cell lysate を回収し、western blotting 法を行った。PI3K は Akt および PKC のリン酸化量、MAPK は ERK のリン酸化量の変化を評価した。

(9)細胞内 Ca 濃度の測定

5 x 10³個の細胞を播種し、24 時間に free Ca²⁺ リン酸緩衝液で洗浄し Fluo 4-AM を用いて吸光度計にて測定した。

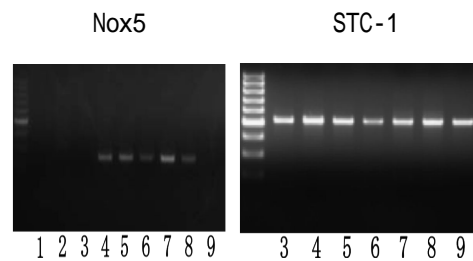
(10)乳癌患者の原発巣および所属リンパ節組織の免疫組織染色による Nox5 および STC-1 の発現評価

乳癌組織を抗 Nox5 抗体および抗 STC-1 抗体を用いて免疫組織で検討した。

4. 研究成果

(1) Nox5 および STC-1 は乳癌細胞株に高発現する

Nox5 は 5 種類、STC-1 においてはすべての細胞株で mRNA の発現が確認された(Fig 1)。



1:Distilled water、2:Neutrophile、3:OCUB-M、4:YMB-1-E、5:T-47D、6:ZR75-1、7:MDA-MB-231、8:MDA-MB-453、9:MCF-7

Fig 1: RT-PCR 法によるヒト乳癌細胞株における Nox5 と STC-1 遺伝子の発現解析

(2) 全長(分泌型)STC-1 遺伝子導入細胞は浸潤能・運動能が亢進する

MB231-S 細胞の浸潤能と運動能は、対照の MB231-mock 細胞と比較すると約 1.7 倍と有意に亢進した(Fig 2 a、b)。細胞増殖能、接着能および基質分解は、両細胞で差異は認められなかった(Fig 2 c、d、e)。

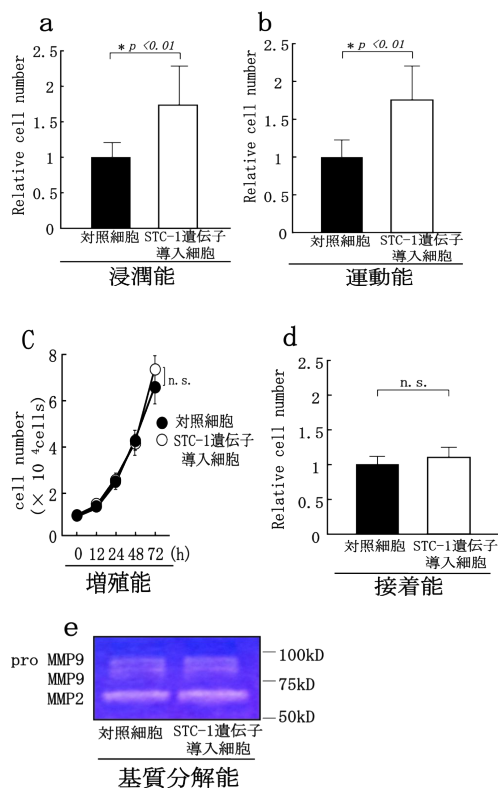


Fig 2: STC-1 遺伝子導入による MDA-MB-231 細胞の *in vitro* における転移能への影響

(3) 全長(分泌型)STC-1 遺伝子導入細胞はマウスの肺転移能を増加させる

MB231-S 細胞は、対照の MB231-mock 細胞と比較すると肺転移結節数で約 3.9 倍、肺重量で約 1.8 倍増加させた(Fig 3 a、b、c)。

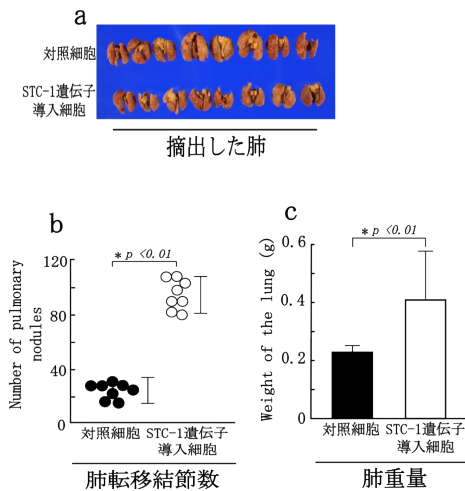


Fig 3: STC-1 遺伝子導入による MDA-MB-231 細胞の *in vivo* における転移能への影響

(4) 全長(分泌型)STC-1 遺伝子導入細胞の培養上清は MDA-MB-231 細胞の運動能を亢進させる

MB231-S 細胞の培養上清は、MB231-NS や対照の MB231-mock 細胞の培養上清と比較して、親細胞(MDA-MB-231)の運動能を約 1.9 倍亢進させた(Fig 4)。

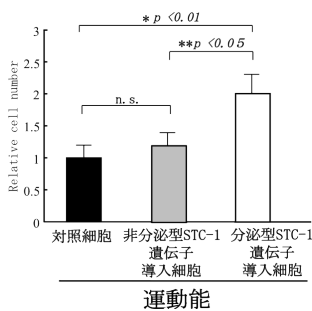


Fig 4: MDA-MB-231 細胞における全長型 STC-1 遺伝子導入細胞の培養上清による浸潤能と運動能への影響

(5) 全長型 STC-1 遺伝子導入細胞の培養上清は MDA-MB-231 細胞における AKT のリン酸化を促進させる

各細胞の培養上清を MDA-MB-231 細胞に添加すると、MB231-S 細胞の培養上清は MB231-NS や MB231-mock と比べ、15 分後から Akt のリン酸化が高まった。一方、PKC および ERK に関してはいずれの培養上清を添加してもリン酸化亢進は見られなかった(Fig 5 a、b、c)。

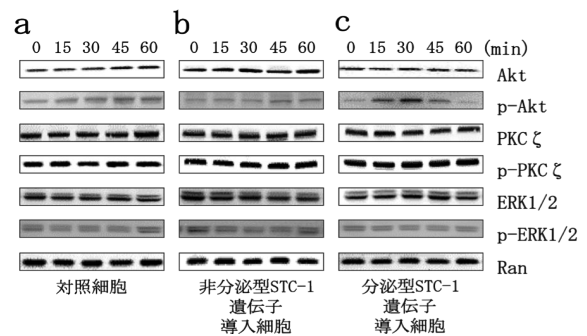


Fig 5: Western blotting 法による分泌 STC-1 の PI3K シグナル伝達経路の活性化

(6) PI3K の特異的インヒビターLY294002 は全長(分泌型)STC-1 遺伝子導入細胞の培養上清による MDA-MB-231 細胞の運動能亢進を抑制する

MB231-S 細胞の培養上清による親細胞(MDA-MB-231)の運動能亢進は、LY294002 により有意に抑制された(Fig 6)。

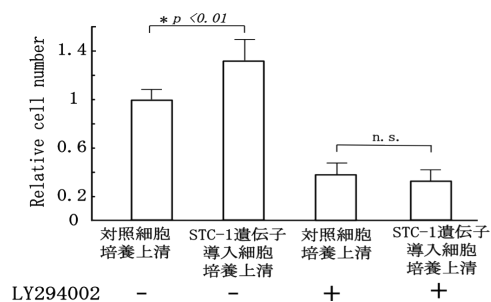


Fig 6: MDA-MB-231 細胞における全長型 STC-1 遺伝子導入細胞の培養上清による運動能亢進に対する PI3K のインヒビターLY294002 の効果

(7) 全長(分泌型)STC-1 遺伝子は細胞内 Ca²⁺濃度に影響を与えない

MB231-S 細胞の細胞内カルシウム濃度は、

対照の MB231-mock の両細胞で差異は認められなかった(Fig 7)。

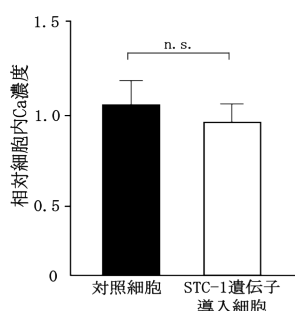


Fig 7: STC-1 遺伝子導入による MDA-MB-231 細胞内 Ca^{2+} 濃度への影響

(8)Nox5 遺伝子はMDA-MB-231細胞の運動能に影響を与えない

MB231-Nox5 細胞の運動能は、対照の MB231-mock の両細胞を比較して差異は認められなかった(Fig 8)。

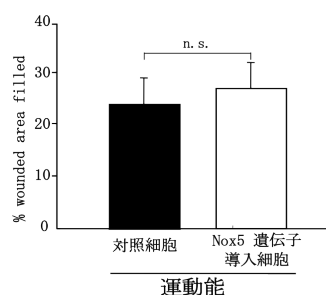


Fig 8: Nox5 遺伝子導入による MDA-MB-231 細胞の運動能への影響

(9)乳癌の原発巣および所属リンパ節組織の STC-1 と Nox5 に対する免疫組織染色

7 例の原発巣および所属リンパ節組織を 3 種類の抗体、その濃度および反応時間等を様々な条件で行ったが、STC-1 と Nox5 とともに陽性細胞を確認できなかった。

総括

本研究では、最初にSTC-1 が乳癌細胞株で高発現していることに注目し転移能に影響を及ぼす因子であるか否か検討した。全長(分泌型) STC-1発現細胞(MB231-S)を作製し、浸潤能を測定すると、対照細胞(MB231-mock)

と比べ約1.7倍亢進していた。浸潤能は、細胞増殖能、運動能、接着能や基質分解能の総和であるが、MB231-S細胞では運動能のみが高まっていた。さらに、両細胞をマウス尾静脈から投与した *in vivo*の実験でも、MB231-S細胞の肺表面転移結節数はMB231-mock細胞と比較し約3.9倍増加した。これらの結果から、STC-1は運動能の亢進を介し転移能を高めていることが、明らかになった。STC-1による運動能亢進が、細胞内、細胞外あるいは両者のうち、いずれのシグナル伝達で起こっているのか調べるため、非分泌型STC-1発現細胞(MB231-NS)を作製し解析した。その結果、MB231-S細胞でのみ運動能の亢進が確認された。さらに、各細胞の培養上清を親細胞であるMDA-MB-231に添加すると、MB231-S細胞のそれのみが運動能を高めた。すなわち、STC-1は細胞外からのシグナル伝達を介し、運動能を亢進させることが証明された。次に、STC-1がMDA-MB-231細胞の運動能を亢進させる機序について検討した。STC-1はカルシウム調節蛋白であるため、まず、MB231-S細胞とMB231-mock細胞の細胞内カルシウム濃度を調べたが、差異はなかった。一方、増殖因子や走化性因子などの刺激で運動能が亢進する機序として、PI3KやMAPKの活性化が知られている。そこで、MB231-S、MB231-NSやMB231-mock細胞の培養上清を親細胞であるMDA-MB-231に添加し、Akt、PKC およびERKのリン酸化量の変化を解析した。その結果、STC-1を含むMB231-S細胞の培養上清を添加した際に、MB231-NSやMB231-mock細胞のそれと比べ、Aktのリン酸化が亢進することが明らかとなった。すなわち、STC-1は運動能の亢進を介して浸潤能を高め、癌の予後規定因子である転移能獲得に重要な役割を担っていた。また、その機序として、STC-1刺激によるPI3K/Aktの活性化が示唆された。次に、ROSを産生するNox5が運動能に影響を与えるか検討したが、変化は認められなかった。さらに本研究では、乳癌患者の原発巣および所属リ

ンパ節組織の免疫組織染色による Laser Captured Microdissection を用いた、Nox5 とSTC-1 の発現と病気分類との相互関係を解析する予定であった。しかしながら、両分子に対する特異的な抗体を同定できず、免疫染色で陽性細胞を確認できなかった。今後、更なる検討を重ね、Nox5 とSTC-1 の乳癌組織での発現解析を行う必要がある。

本研究は STC-1 が乳癌の転移能を規定している因子であることを明らかにした。その結果、転移能を評価することができる、新規の転移マーカーの開発に向けた最初の基盤を提供できたと考えられる。

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 1 件)

Murai R, Tanaka M, Takahashi Y, Kuribayashi K, Kobayashi D, Watanabe N. Stanniocalcin-1 promotes metastasis in human breast cancer cell line through activation of PI3K. Clin Exp Metastasis 査読有,31:787-794,2014.

[学会発表] (計 3 件)

1. 村井良精 (田中真樹)
癌細胞の転移能獲得における Ca 調節蛋白 Stanniocalcin-1 の意義. 第 53 回日本臨床化学会年次学術大会.2013 年 8 月 30 日～9 月 1 日、あわぎんホール(徳島市)

2. 村井良精 (田中真樹)
癌細胞の転移能獲得における Ca 調節蛋白 Stanniocalcin-1 の意義. 第 47 回日本臨床検査医学会北海道支部総会.2013 年 9 月 11 日、札幌医科大学臨床教育研究棟(札幌市)

3. 村井良精 (田中真樹)
Stanniocalcin-1 promotes metastasis in a human breast cancer cell line through activation of PI3K. 第 24 回日本がん転移学会学術集会総会 2015 年 7 月 23 日～24 日、シティプラザ大阪(大阪市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

田中 真樹 (TANAKA MAKI)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 40207139

(2) 研究分担者

高橋 聡 (TAKAHASHI SATOSHI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 30332919

小林 大介 (KOBAYASHI DAISUKE)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 50295359

渡邊 直樹 (WATANABE NAOKI)
札幌医科大学・医学部・名誉教授
研究者番号 : 10158644

栗林 景晶 (KURIBAYASHI KAGEAKI)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 50381257