

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659455

研究課題名(和文) FXYD5の甲状腺癌細胞接着への関与とプロテオーム解析による関連蛋白質の検討

研究課題名(英文) FXYD5 expression and proteomic analysis of the associated proteins in the thyroid carcinoma cell

研究代表者

佐藤 温洋 (SATO, Haruhiro)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：70317808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：FXYD5(ディスアドヘリン)は上皮細胞接着分子Eカドヘリン発現調節を介して細胞-細胞接着に関与する。細胞接着能が著しく低下し予後が極めて不良な甲状腺未分化癌において、FXYD5の発現の検討と、強制発現およびRNA干渉(RNAi)による細胞接着能の変化およびプロテオーム解析により不明な点が多かったFXYD5関連蛋白質について検討した。RNAi効果が恒常的に持続する細胞株を10クローン作成した。これらクローンにおいて形態は上皮様に変化し、細胞遊走能は低下した。プロテオーム解析では、S-100蛋白質とRAS蛋白質の増加を認め、FXYD5は、これら蛋白質発現を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：FXYD5 (Dysadherin) is a cancer-associated cell membrane glycoprotein and believed to down-regulate the expression of E-cadherin, the prime mediator of cell-cell adhesion in epithelial cells, by a post-transcriptional mechanism and to promote the metastasis of carcinoma cells. To evaluate the proteins associated with FXYD5, transfection and RNA interference (RNAi) of FXYD5 were performed in thyroid carcinoma cell lines. 10 clones of FXYD5 knocked down were gained. Features of the clones were morphologically changed epithelial, and migration potency was promoted. Proteomics analysis was performed, using the 10 clones. It was revealed that S-100 protein and RAS protein were overexpressed. The results indicated that FXYD5 was associated with migration potential and down-regulation of S-100 protein and RAS protein in the thyroid carcinoma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：FXYD5 Dysadherin 甲状腺癌

1. 研究開始当初の背景

FXVD5(ディスアドヘリン)は細胞膜を一回貫通する糖蛋白質で、 $\text{Na}^+/\text{k}^+\text{TATPase}$ 活性を有するイオンチャネルである。このイオンチャネルは古典的な $\text{Na}^+/\text{k}^+\text{TATPase}$ として 3Na^+ を細胞外に放出し 2k^+ イオンを細胞内に取り込むのみでなく上皮細胞の主たる細胞細胞間細胞接着分子である E カドヘリン発現を抑制し上皮細胞の細胞と細胞間の接着を抑制する。

甲状腺濾胞上皮細胞から発生する甲状腺癌は病理組織学的に分化型癌(乳頭癌と濾胞腺癌)と未分化癌に大別される。分化型癌は予後が比較的良好であるが、未分化癌は異型が強く予後は極めて不良で1年以内に約80%が死亡し分化型癌とは生物学的性質が全く異なる。未分化癌は多くの場合、正常甲状腺濾胞上皮細胞から発生するのではなく分化型癌を母地として発生する未分化転化という現象を示す。未分化転化には、*p53*、*RAS*、*PTEN* などの癌遺伝子変異の関与が考えられているが不明な点が多い。上皮細胞由来の癌細胞が上皮様形態を示す場合と、上皮様形態を喪失し紡錘形や多型等の異型を示す場合では、細胞接着分子や細胞骨格等の細胞形態を維持するための蛋白質の発現が異なる。特に、上皮細胞で強く発現し主要な細胞接着分子として機能する E カドヘリンが重要である。E カドヘリンは発現の低下や機能喪失は細胞接着の低下をまねき、癌細胞の浸潤や遠隔転移の原因となり予後に大きく関与する。このように癌の予後の悪化を決定づける E カドヘリン発現低下の機序を解明することは、癌細胞の浸潤および転移を抑制する治療の開発につながると考えられている。

我々は甲状腺癌の未分化転化の分子機序に興味をいだき、特に細胞接着分子に注目して研究してきた。未分化癌は上皮構造を完全に喪失し E カドヘリンを全く発現していないことから、未分化転化には E カドヘリンの消

失が大きな役割をすると考えた。そこで、FXVD5 は新たに E カドヘリン発現抑制作用を有することが発見されたので、FXVD5 発現増加が、甲状腺癌未分化癌発症の原因であるという仮説をたて、FXVD5 の発現とノックダウンにより甲状腺癌細胞の形態、細胞接着力、遊走能の変化と、プロテオーム解析により不明な点が多かった FXVD5 の関連蛋白質を検討することにした。

2. 研究の目的

FXVD5(ディスアドヘリン)は細胞膜を一回貫通する糖蛋白質で、 $\text{Na}^+/\text{k}^+\text{TATPase}$ 活性を有するイオンチャネルである。このイオンチャネルは古典的な $\text{Na}^+/\text{k}^+\text{TATPase}$ として 3Na^+ を細胞外に放出し 2k^+ イオンを細胞内に取り込むのみでなく、上皮細胞接着分子 E カドヘリン発現調節を介して細胞細胞接着に関与すると考えられている。細胞接着能が著しく低下し予後が極めて不良な甲状腺未分化癌において、FXVD5 の発現の検討と、強制発現およびノックダウンによる細胞接着能の変化およびプロテオーム解析により不明な点が多かった FXVD5 関連蛋白質について検討する。

3. 研究の方法

(1) 甲状腺癌細胞培養

甲状腺未分化癌由来培養細胞:HTC/C3、TCO-1、8305C、8505C、ARO、FRO、甲状腺分化型癌由来培養細胞株:TPC-1、NPA-1、WRO、以上9種を培養し対象とする。

(2)FXVD5・E カドヘリンの発現量の定量と細胞内局在の観察

A. 蛋白質の発現量:上記細胞を、trypsin-EDTAにて浮遊させ、抗FXVD5・マウス・モノクローナル抗体(Clone 3G-10、廣橋説雄博士より分与)および抗Eカドヘリン・マウス・モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットおよび蛍光色素ラベル-抗マウス抗体にて染色後 FACS Aria Cell

Sorter(BECKTON DICKINSON)にて解析し FXYD5 シグナルと E カドヘリンシグナルの強度を測定する。

B. mRNA の発現量：9 種から TRIZOL (Invitrogen)により RNA を抽出する。cDNA を合成し、SYBR 存在下に定量的 PCR を行ない、FXYD5mRNA の定量をする。

C. 培養細胞各株を chamber slide に培養し抗 FXYD5・マウス・モノクローナル抗体および抗 E カドヘリン・マウス・モノクローナル抗体にて免疫染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で細胞内の局在を観察する。

(3)各細胞株の凝集能の測定。

各培養細胞を 0.01%trypsin、5mM CaCl₂ 添加 HCMF にて単離・浮遊させる。10mM Hepes(pH 7.4)、150mM NaCl、1%BSA、5mM Ca²⁺中にて 80rpm、30 分間攪拌後、細胞凝集塊をカウントする事により細胞凝集能を評価し、FXYD5 と E カドヘリン発現による細胞凝集能の差異を検討するとともに、以下の強制発現とノックダウンのコントロールとする。

(4)FXYD5 低発現細胞株に対する FXYD5 強制発現の影響

方法(2)で解析した 5XDYD5 低発現細胞株を対象とする。FXYD5 発現ベクター(L3 HSV/pcDNA3)を用いて(廣橋説雄博士より分与)、Lipofectamine Transfection Reagent により L3 HSV を transfection し、Geneticin により FXYD5 安定発現株を選択する。得られた細胞株に対し抗 FXYD5・マウス・モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットと免疫染色で FXYD5 蛋白質の発現を確認し最も発現の強いクローンを以下の実験に用いる。

(5) RNA 干渉(RNAi)による FXYD5 ノックダウンの影響。

方法(2)で解析した FXYD5 低発現細胞株を

対象とし RNA 干渉(RNAi)発現ベクターの作製と細胞への導入を行う。そして定量 RT-PCR を用いて RNA 発現抑制能を検討し、最も発現抑制効率の良い塩基配列を選択して、その配列を

レトロウイルスに組み込み、Puromycin 耐性の RNAi 発現レトロウイルスベクターを作製する。

48-72 時間培養した後にウイルス上清を回収する。定量的 RT-PCR を用いて RNAi が細胞内で機能していることを確認する。以上により RNAi 効果が恒常的に持続する細胞株を作製する。得られた細胞株に対し抗 FXYD5・マウス・モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットと免疫染色で FXYD5 蛋白質の発現を確認しノックダウンの効果が最も高いクローンを以下の実験に用いる。

(6) FXYD5 強制発現細胞と RNAi による FXYD5 ノックダウン細胞の特性解析。

方法(4)および(5)で得られた細胞の特性解析を下記の方法にて行う。

A. 細胞形態の確認。

B. 細胞遊走能の解析。

Wound healing assay により細胞の移動軌跡を可視化し、細胞遊走能を測定する。また boyden chamber 法も用いて細胞遊走能を評価する。

(7)プロテオミクス解析を用いた FXYD5 強制発現およびノックダウン細胞における蛋白質発現変化の観察による FXYD5 関連蛋白質の同定。

方法(4)および(5)で得られた FXYD5 強制発現およびノックダウン細胞から蛋白質を抽出、100μg/strip に対して 2 次元電気泳動を行い、Coomassie blue 染色で分離した蛋白質を spot として表出させる。ディスアドヘリンを強制発現させる前の細胞をコントロールとして、その spot を比較し、FXYD5 強制発現もしくはノックダ

ウンにより発現が誘導された、あるいは減弱した spot を同定する。

Spot から蛋白質を抽出し濃縮した後に、Burker 社 Autoflex MALDI-TOF-MS および Shimazu 社 AXIMAQIT-TOF にかけて解析し現変化のある既知および未知の蛋白質の同定を行う。同定は少なくとも 2 回以上行い、蛋白質の発現変化の確認はウェスタンブロットにて行う。これにより全く不明だったディスアドヘリンの下流で機能する蛋白質の同定が期待される。

(8)FXVD5 関連蛋白質の細胞内局在の観察。

方法(7)で同定した FXVD5 関連蛋白質のモノクロナール抗体もしくはポリクロナール抗体を用いて免疫染色を行い細胞内局在を観察する。

4. 研究成果

(1) HTC/C3、TCO-1、8305C、8505C、ARO、FRO、TPC-1、NPA-1、WRO の培養を行った。ウェスタンブロットおよび FCAS Cell Sorter にて解析したところ、FXVD5 が蛋白質レベルで全ての培養細胞株で発現し、E カドヘリンを発現している培養細胞株は無かった。定量的 PCR では FXVD5 および E カドヘリンの PNA 発現を認め、E カドヘリンの蛋白質レベルでの消失は post-transcriptional mechanism によると考えられた。免疫染色では FXVD5 は細胞膜に発現していた。

(2) 細胞形態を含む特性から 8505C を対象として RNA 干渉による FXVD5 のノックダウンを行い、10 クローンを得た。ノックダウンの効果はウェスタンブロットと免疫染色で確認した。これらのクローンを用い以下の成果を得た。

細胞形態は、FXVD5 ノックダウン前は紡錘形、線維芽細胞様だったが

上皮様形態に変化した。

細胞遊走能は、FXVD5 ノックダウン前と比べて低下した。

細胞凝集能は、FXVD5 ノックダウン前と比べて上昇した。

プロテオーム解析では、S-100 蛋白質と RAS 蛋白質の増加を認め、免疫染色による観察では、これら蛋白質は細胞質内に局在した。

以上の考察

FXVD5 は今回検討した甲状腺癌培養細胞株全てに発現しており甲状腺癌の生物学的特性への関与が示唆された。E カドヘリン蛋白質の消失は post-transcriptional mechanism であり、これまで報告されている肝細胞癌、大腸癌などの所見に一致した。FXVD5 をノックダウンすると、形態学的に分化型に変化し、遊走能が低下し、凝集能が上昇するので FXVD5 の発現は甲状腺癌の予後を不良にする可能性が示唆された。FXVD5 のノックダウンにより S-100 蛋白質と RAS 蛋白質の増加を認めることから FXVD5 発現は、これら蛋白質の発現を低下させることにより甲状腺癌の生物学的特性に関与している可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
無し。

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 温洋 (SATO, Haruhiro)
東海大学・医学部・准教授

研究者番号：70317808