

論文内容要旨

Breast cancer cell motility is promoted by 14-3-3 γ

(乳癌細胞の運動能亢進における 14-3-3 γ の重要性)

Breast Cancer, 2019, in press.

主指導教員：岡田 守人 教授

(原爆放射線医科学研究所 腫瘍外科)

副指導教員：有廣 光司 教授

(広島大学病院 病理診断学)

副指導教員：角舎 学行 講師

(原爆放射線医科学研究所 腫瘍外科)

平岡 恵美子

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

Pseudopodia (偽足突起) は *in vitro* において培養細胞腹側から垂直方向に突出するアクチンに富んだ構造物で、がん細胞の運動を通して浸潤・転移に関わるとされる。我々はこれまでに、Triple negative breast cancer (TNBC) 細胞株 (MDA-MB-231 細胞) から excimer laser を用いて pseudopodia を単離する技術を確立した。Pseudopodia から抽出したタンパク質を二次元電気泳動と LC-MS/MS に供して、46 種類の pseudopodia に特異的に発現する候補分子を同定した。本研究ではそれら候補分子の中から、がん悪性度との関連が報告されている 14-3-3 γ の機能解析を行った。14-3-3 γ は 14-3-3 タンパク質ファミリーの 7 つのアイソザイムのうちの一つであり、乳癌、肺癌、肝癌の原発巣およびリンパ節転移や脳転移の臨床検体で 14-3-3 γ の高発現が報告されている。さらに、乳癌、肺癌、肝癌の高発現症例は、低発現症例に比べ予後が不良であると報告されている。しかし、乳癌の浸潤・転移のメカニズムに関わる 14-3-3 γ の具体的な役割は報告がなく、今回我々は乳癌細胞運動能における 14-3-3 γ の役割を明らかにすることを目的とした。

最初にマウス胎児線維芽細胞株 (NIH3T3 細胞) を培養した DMEM 培地を回収し、遠心した上清を conditioned medium とした。Conditioned medium を加えた 12-well plate に多孔 ($\phi 3\mu\text{m}$) PET 膜トランスウェルインサートを挿入し、MDA-MB-231 細胞を PET 膜上で培養し、pseudopodia を形成させた。細胞培養 48 時間後に、pseudopodia の positive control となる F-actin が染色される Phalloidin と抗 14-3-3 γ 抗体による二重細胞蛍光免疫染色を施行し、共焦点レーザー顕微鏡で 14-3-3 γ が MDA-MB-231 細胞の pseudopodia に実際に局在することを確認した。

次に pseudopodia 形成における 14-3-3 γ の必要性を検証するため、MDA-MB-231 細胞で 14-3-3 γ の強制発現 またはノックダウンによる発現低下を行い、共焦点レーザー顕微鏡で撮影を行い pseudopodia の数と長さの増減を測定した。14-3-3 γ の強制発現により pseudopodia の数の増加・伸長が促進され、ノックダウンにより減少・抑制された。この結果により、14-3-3 γ は MDA-MB-231 細胞の pseudopodia 形成において重要な分子である事が示唆された。

同様に 14-3-3 γ の細胞運動能に関わる役割を検証するため、MDA-MB-231 細胞で 14-3-3 γ の強制発現 またはノックダウンによる発現低下を行い、migration assay と wound healing assay を行った。Migration assay では強制発現により多孔 ($\phi 8\mu\text{m}$) PET 膜通過細胞数が増加し、ノックダウンにより減少した。Wound healing assay では、14-3-3 γ 強制発現により無細胞面積が有意に減少、発現抑制により無細胞面積が有意に増加した。別の乳癌細胞株である MCF7、BT474、SKBR3 を用いた wound healing assay も同様に、14-3-3 γ 発現抑制により無細胞面積が有意に増加した。MDA-MB-231、MCF7、SKBR3、BT474 乳癌細胞株を用いて proliferation assay を行い増殖能の評価を行ったが、コントロール群と 14-3-3 γ 発現抑制群で増殖能に有意な差を認めなかった。このことから、乳癌細胞株において、14-3-3 γ は増殖能ではなく細胞運動能を亢進させることで、浸潤・転移に関与する可能性が示唆された。

乳癌細胞の運動・浸潤能獲得のきっかけとして上皮間葉転換が多く報告されており、western blotting で 14-3-3 γ と上皮間葉転換に関わるタンパク質との関連も検証した。Western blotting

では、MDA-MB-231、MCF7、SKBR3、BT474 のいずれ乳癌細胞株においても 14-3-3 γ 発現抑制で上皮間葉転換に関わるタンパク質とは有意な関連を認めなかった。以上により、14-3-3 γ は上皮間葉転換とは別機序により細胞運動能亢進を引き起こし、乳癌細胞の運動・浸潤に関わる可能性が考えられた。

さらに乳癌臨床検体で高リンパ管侵襲 (ly3+) を認めた 10 例に免疫染色を行い、乳癌臨床検体における 14-3-3 γ の発現を確認した。乳癌臨床検体の免疫染色では、いずれの症例も腫瘍とリンパ管侵襲部位に 14-3-3 γ の発現が認められた。染色強度を比較し、腫瘍の中心よりも辺縁、腫瘍の辺縁よりもリンパ管侵襲部位の方に強染色を認めた。腫瘍の辺縁やリンパ管浸潤部位に 14-3-3 γ がより強く発現していることは、14-3-3 γ が浸潤・転移における重要な分子である可能性が示唆された。

乳癌細胞株において 14-3-3 γ の細胞運動能に関わる役割を検証し、14-3-3 γ は細胞運動能に重要な分子である可能性が示唆された。細胞運動能は癌の浸潤・転移への密接な関与が予想され、14-3-3 γ を抑制することが乳癌細胞の浸潤・転移の抑制につながる可能性がある。浸潤・転移が抑制されれば、浸潤性乳癌も非浸潤性乳癌と同様に手術や放射線療法による局所治療で制御可能になると考えられる。また TNBC は他の乳癌のサブタイプと比べ、高頻度に転移再発をきたすにも関わらず、有効な再発予防となる術後補助療法が確立されていない。MDA-MB-231 細胞は TNBC 由来の細胞であり、14-3-3 γ の抑制は TNBC に対して術後補助療法の選択肢となる可能性もある。以上により、14-3-3 γ は乳癌の新規治療標的分子になりうると考えられた。