

Breast cancer cell motility is promoted by 14-3-3 $\gamma$

(乳癌細胞運動能は 14-3-3 $\gamma$  により促進される)

平岡 恵美子, 見前 隆洋, 伊藤 正興,  
角舎 学行, 宮田 義浩, 伊藤 彰彦, 岡田 守人

## 緒言

乳癌をはじめあらゆる浸潤癌において、ひとたび遠隔転移を起こしてしまえば完全な治癒は困難である。癌細胞の浸潤・転移そのものを抑制する有効な治療法は未だ存在せず、それ故に癌細胞浸潤能の制御は、乳癌治療において新しい治療標的になると考えられる。

Pseudopodia は *in vitro* の細胞培養においてアクチンが豊富な細胞腹側より突出する突起であり、細胞運動を介して癌細胞の転移・浸潤に重要な役割を果たしていると考えられる。伊藤らによる先行研究において、眼科治療で使用される LASIK を用いて pseudopodia のみを細胞から単離する技術が確立された。単離したヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 の pseudopodia から抽出したタンパク質を 2D-DIGE と LC-MS/MS に供して 46 種類の pseudopodia 特異的候補分子を同定した。

46 種類の候補分子の 1 つである 14-3-3 $\gamma$  は、肝細胞癌、肺癌、胃癌、大腸癌、乳癌におけるその発現と癌悪性度との関係が報告されている。14-3-3 $\gamma$  の発現は肝細胞癌の細胞増殖を促進し 14-3-3 $\gamma$  の過剰発現は肝細胞癌の肝外進展や肝細胞癌患者の予後に関連することが報告されている。非小細胞肺癌において、14-3-3 $\gamma$  の過剰発現はリンパ節転移や遠隔転移に有意に促進しているとの報告もある。乳癌においては、14-3-3 $\gamma$  の高発現が見られる症例は、低発現症例に比べ予後が不良であることが報告されている。また、乳癌患者の検体において 14-3-3 $\gamma$ /Snail 1 複合体が、正常組織と比べ頸部リンパ節転移巣や脳転移巣より有意に高検出されたことが報告されている。

しかし、乳癌の浸潤や転移を含む悪性化進展における 14-3-3 $\gamma$  の詳しい分子生物学的役割は未だに解明されていない。本研究では、乳癌細胞浸潤の最初の足掛かりとなる Pseudopodia の増減と伸長について、14-3-3 $\gamma$  の役割を明らかとすることを目的とした。我々の研究結果は、14-3-3 $\gamma$  が乳癌の浸潤を予防する新しい治療標的になりうる可能性を示唆している。

## 材料と方法

ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231、MCF7、SKBR3、BT474 細胞株より抽出したタンパク質を、14-3-3 $\gamma$  や EMT 関連タンパク質についてウェスタンブロッティングを行った。

12-well 培養皿の下層に NIH3T3-conditioned medium を入れ、上層に 3- $\mu$ m 多孔 PET 膜インサートを挿入し 14-3-3 $\gamma$  過剰発現またはノックダウンした MDA-MB-231 細胞株を培養し pseudopodia の伸長を促進した。PET 膜上の細胞を抗 14-3-3 $\gamma$  抗体、Alexa Fluor® 488 抗体、phalloidin で二重免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。X-Y を 0.3- $\mu$ m 毎に Z 軸の位相を変えて撮影し、X-Y 画像を蓄積して pseudopodia を示す Z 軸画像を 3D 再構築した。

同様に、MDA-MB-231 細胞株を 8- $\mu$ m 多孔 PET 膜上で培養し transmigration assay を行った。6 時間後と 12 時間後に膜上の細胞を phalloidin で染色した。膜裏に移動した細胞を、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。次に、14-3-3 $\gamma$  過剰発現またはノックダウンした MDA-MB-231、MCF7、SKBR3、BT474 細胞株を 35-mm  $\mu$ -培養皿で培養し wound healing assay を行った。0,6,12 時間ごとに創縁の細胞の様子を CCD カメラで撮影し、無細胞領域を計測した。

14-3-3 $\gamma$  をノックダウンした MDA-MB-231、MCF7、SKBR3、BT474 細胞株 35-mm  $\mu$ -培養皿で培養し、抗 ki-67 抗体、Alexa Fluor® 488 抗マウス抗体で免疫染色を行い、細胞核を DAPI で染色した。細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

広島大学病院で 2016 年 9 月から 2018 年 3 月まで手術を行った、高度リンパ管侵襲を伴う 10 人の患者を選出し、14-3-3 $\gamma$  の免疫染色を行った (Approval number:

15K19854, hi-160)。染色強度を肉眼的に分別し、0 (negative)、1 (weak)、2 (moderate)、3 (strong)に分類した。

Pseudopodiaの密度と長さ、浸潤アッセイ、細胞増殖アッセイ、ウェスタンブロッティングに対しWelch-t-testを用いた。創傷治癒アッセイにおいてのみ、Mann-Whitney U testを用いた。すべての実験結果は、Image J software を用いて計測・定量され、EZRを用いて統計解析を行った。全ての統計結果は両側検定であり、統計学的有意差は $P < 0.05$ とした。

## 結果

MDA-MB-231 細胞における 14-3-3 $\gamma$  と F-actin を、免疫蛍光染色と phalloidin 染色で可視化し、phalloidin と 14-3-3 $\gamma$  が pseudopodia に一致して認められ、14-3-3 $\gamma$  が pseudopodia に特異的に局在していることが確認された。

14-3-3 $\gamma$  を過剰発現した pseudopodia の平均密度は、コントロールと比べ有意に高かったが、14-3-3 $\gamma$  ノックダウンにおいては有意に低かった。同様に 14-3-3 $\gamma$  を過剰発現した pseudopodia の長さは、コントロールに比べ明らかに長かった。逆にノックダウンにおいては有意に短かった。この結果により、14-3-3 $\gamma$  が MDA-MB-231 乳癌細胞の pseudopodia 形成において重要な役割を担っていることが示唆された。

14-3-3 $\gamma$  が MDA-MB-231 細胞の運動能を促進するか確かめるため、transmigration assay と wound healing assay を行った。14-3-3 $\gamma$  を過剰発現した MDA-MB-231 細胞が、コントロールよりも多く膜裏に移動していた。逆に、ノックダウンにおいてはコントロールよりも有意に少なく移動していた。wound healing assay では、無細胞面積は 14-3-3 $\gamma$  過剰発現において明らかにコントロールより小さかった。一方で、ノックダウンにおいては有意に大きかった。wound healing assay は他の乳癌細胞株である MCF7、SKBR3、BT474 も用いて行ったが、MDA-MB-231 とほぼ同様の結果が得られた。これらのことから乳癌細胞運動において 14-3-3 $\gamma$  が必要であることが考えられた。

さらに MDA-MB-231、MCF7、SKBR3、BT474 細胞株を用いて増殖能を評価した。Ki-67 陽性細胞の比率は 14-3-3 $\gamma$  ノックダウンとコントロールの間に有意な差を認めなかった。以上の結果からは、14-3-3 $\gamma$  が細胞増殖には大きな影響を与えていないことが示唆された。ウェスタンブロッティングを MDA-MB-231、MCF7、SKBR3、BT474 細胞株を用いて行ったところ、14-3-3 $\gamma$  発現抑制の有無による EMT 関連のタンパク質の発現の有意な変化は認められなかった。これらの結果から、14-3-3 $\gamma$  が EMT 以外の他のメカニズムで細胞運動を促進していることが予想された。

高度なリンパ管侵襲 (ly3+) を認める乳癌症例の 14-3-3 $\gamma$  に対する免疫染色において、リンパ管侵襲部位の 14-3-3 $\gamma$  の発現は、腫瘍の中心や辺縁よりも強い発現を認めた。これらの所見により、14-3-3 $\gamma$  が乳癌細胞の浸潤に関与していることが推察された。

## 考察

本研究は、14-3-3 $\gamma$  が pseudopodia の数と長さを増加させることで乳癌細胞運動および浸潤を促進させる役割を初めて示した報告である。また、リンパ管侵襲を伴う乳癌患者の全ての症例において、腫瘍に 14-3-3 $\gamma$  の発現を認めたが、14-3-3 $\gamma$  の発現はリンパ管侵襲部位において、腫瘍の中心や辺縁よりも強く認められた。過去の報告では、肝細胞癌、非小細胞肺癌、乳癌の患者において、14-3-3 $\gamma$  の高発現を認める症例は予後が不良とされている。本研究の結果は、14-3-3 $\gamma$  高発現症例が予後不良である原因として、分子生物学的機序に基づいた 1 つの説明を与えていると考えられる。

14-3-3 $\gamma$  が他のタンパク質とどのように関係して乳癌細胞運動を促進しているのかは未だに不明であるが、46 種類の pseudopodia 特異的候補分子のうちの RAB1A、

$\alpha$ -parvin、14-3-3 $\gamma$ がいずれも pseudopodia の伸長を促進したことにより、これら pseudopodia 特異的候補分子が浸潤に関わるシグナル伝達の一部を担っていると考えられる。14-3-3 $\gamma$  と他の 45 の候補分子との関係を調べることで、細胞運動を介して癌細胞の浸潤・転移を促進する分子生物学的機序が解明される可能性がある。

乳癌は様々な治療法が確立されているが、転移再発乳癌の治療は未だに根治が困難である。14-3-3 $\gamma$  を阻害することで浸潤・転移が抑制されれば、転移再発乳癌の新規治療標的となりうることが考えられる。もし 14-3-3 $\gamma$  を標的とした治療で転移再発を制御できれば、乳癌は手術と放射線療法のための局所療法と組み合わせて治療することで根治や癌との共存が可能になると考えられる。ホルモン受容体陽性乳癌や HER2 陽性乳癌には有効な術後補助療法が確立されているが、高度に浸潤転移をきたすトリプルネガティブ乳癌においては、従来の化学療法以外に未だ有効な術後補助療法が確立されていない。MDA-MB-231 細胞はトリプルネガティブ乳癌由来の細胞であり、14-3-3 $\gamma$  の阻害はトリプルネガティブ乳癌や 14-3-3 $\gamma$  高発現乳癌を有する患者への新規治療法になる可能性がある。