

## 平成 25 年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21 世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	偽足突起のプロテオミクスに基づく新規癌転移浸潤促進分子の探索	
研究者所属・氏名	研究代表者：病理学・萩山 満 共同研究者：	

### 1. 研究目的・内容

偽足突起は癌細胞が間質内を浸潤性に遊走する際の必須の構造物と考えられている。我々はエキシマレーザーを用いて癌細胞の偽足突起を選択的、かつ蛋白変性なく採取する方法の開発に成功した。本研究では、偽足突起のプロテオミクスを行い、偽足突起に特異的に局在する分子を網羅的に同定し、浸潤・転移を司る effector 分子の探索を行う。

### 2. 研究経過及び成果

浸潤・転移能の高い乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞は、穴あき透過膜（ポアサイズ 1 と 3  $\mu\text{m}$ ）上で培養すると、走化性因子の濃度勾配依存性にポア内に偽足突起を伸長させた。このポア内に形成した偽足突起を、眼科領域において角膜屈折矯正手術（LASIK）に使用されるエキシマレーザーを用いて、選択的かつ蛋白変性なく採取した。本方法によって採取した偽足突起蛋白抽出液と通常培養の細胞蛋白抽出液とを 2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE) にて比較解析し、Liquid chromatography-tandem mass spectroscopy (LC-MS/MS) にて偽足突起に特異的に局在する分子を網羅的に同定した (Ito, Hagiya, et al. *Lab Invest*, 2012)。

我々は、アクチン結合アダプタータンパク質である  $\alpha$ -parvin に注目し研究を行った。偽足突起形成を誘導していない MDA-MB-231 細胞において、 $\alpha$ -parvin は focal adhesion に好んで局在し、誘導させると偽足突起に集積することを見出した。

MDA-MB-231 細胞に  $\alpha$ -parvin の cDNA あるいは siRNA を遺伝子導入し発現レベルを一過性に変化させ、穴あき透過膜上（ポアサイズ 3  $\mu\text{m}$ ）で培養した後、細胞 1 個当たりの偽足突起の長さや密度を算出し、創傷治癒アッセイと穴あき透過膜遊走（ポアサイズ 8  $\mu\text{m}$  の transmigration）アッセイに供したところ、偽足突起形成能と運動・遊走能は  $\alpha$ -parvin の発現量に比例していることを明らかにした。

浸潤性小葉乳癌（invasive lobular carcinoma; ILC）（56 例）と浸潤性腺管乳癌（invasive ductal carcinoma; IDC）（21 例）を抗  $\alpha$ -parvin 抗体にて免疫組織化学に供したところ、ILCs では 56 例中 21 例（37.5%）が  $\alpha$ -parvin 陽性であったのに対して、IDCs では 21 例全て陰性であった（ $p < 0.001$ ）（図 1）。さらに  $\alpha$ -parvin 陽性であった ILCs では、単変量解析にてリンパ浸潤（ $p = 0.038$ ）とリンパ節転移（ $p = 0.003$ ）に、多変量解析にてリンパ節転移（ $p = 0.020$ ）に相関を認めた。

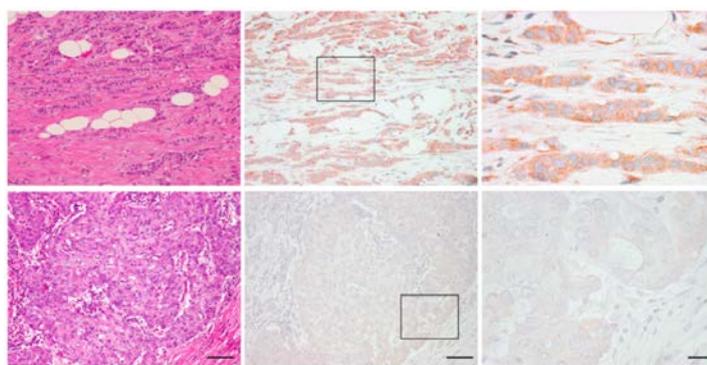


図1 免疫組織化学の代表例  
(H&E染色[左]と抗 $\alpha$ -parvin抗体の免疫染色[真ん中と右])  
上段:浸潤性小葉乳癌、下段:浸潤性腺管乳癌

以上の結果より、偽足突起構成要素である  $\alpha$ -parvin は乳癌細胞の浸潤・転移を促進し、ILCs に特異的に発現することを明らかにした。また、 $\alpha$ -parvin は ILCs の浸潤・転移を司る effector 分子と考えられ、ILCs の悪性群のバイオマーカーとして臨床的有用性をもつ可能性が示唆された。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

本研究では、形態的に特徴を示す ILCs と IDCs に注目し研究を行った。現在、乳癌組織マイクロアレイを実施し、 $\alpha$ -parvin について網羅的に解析を進めている。

本方法によって採取した偽足突起蛋白抽出液と通常培養の細胞蛋白抽出液とを 2D-DIGE にて比較解析し、質量分析によって偽足突起特異的に局在する分子を網羅的に同定した。他の分子についても本研究と同様に偽足突起形成能や運動・浸潤能、さらにマウスへの移植実験を行い浸潤・転移能を調べる。また、種々の癌の臨床病理検体を用いて、浸潤先進部や転移巣の癌細胞において、同定分子の発現が上昇しているかを調べる予定である。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Breast Cancer Res Treat	学术论文	2014年1月23日
日本癌学会総会	口頭発表	2014年9月