

# アダプター分子 STAP-2 による癌細胞浸潤・転移制御メカニズムの解明

Yale University School of Medicine, Department of Neurology

関根 勇一

## 1. はじめに

癌における大きな脅威の1つである、浸潤・転移の過程には様々な分子が関与しており、その全貌は未だ明らかとなっていない。各組織・臓器の原発巣から癌細胞は、足場としている基底膜を破り周囲の組織に侵入し(浸潤)、浸潤した癌細胞は血液やリンパ液の流れに乗って遠くの組織や臓器に辿り着くことで新たな癌巣を形成する。

アダプター分子STAP-2は、細胞接着や遊走に関与するチロシンキナーゼFAKの分解を促進することによりT細胞の接着を抑制することを申請者らは解明している(1)。また、走化性因子であるケモカインSDF-1  $\alpha$  誘導性のT細胞遊走能をSTAP-2が亢進することを明らかにしている(2)。このように、STAP-2はT細胞の運動能を制御する分子であることがこれまでに明らかとなっている。また、マクロファージにおいてもSTAP-2がその運動能を調節することも明らかにしている(3)。リンパ球の運動メカニズムは癌細胞のそれに共通した点が多く、乳癌細胞の遊走と転移はリンパ系細胞と類似したケモカインとそのレセプターによる制御が報告されている(4)。STAP-2は、乳癌特異的チロシンキナーゼBrkの基質であるBksのマウスホモログとして同定されており、このBrkは細胞の遊走・浸潤に関与することも報告されている(5)。これらのことから、STAP-2が乳癌細胞の浸潤・転移などに関与している可能性が考えられる。

本研究において、アダプター分子STAP-2の乳癌細胞及びその他癌細胞の浸潤・転移能への関与について解析を行った。STAP-2による癌細胞運動制御機構の解明は、癌・悪性腫瘍の転移をターゲットとした治療薬開発の手がかりとなると考えられる。

## 2. 方法

①STAP-2の恒常的高発現(gain of function)またはノックダウン(loss of function)細胞株の作製

乳癌細胞株MDA-MB231細胞、MCF7細胞、及びT47D細胞にエレクトロポレーション法により各種プラスミドを導入し、恒常的STAP-2発現、またはノックダウン細胞株の樹立を行った。

マウス悪性黒色腫細胞株B16F10細胞に、エレクトロポレーション法によってSTAP-2恒常的高発現、及びノックダウン細胞株を作製した。

②浸潤・転移能に対するSTAP-2の影響の解析

作製した細胞株を用い、*in vitro*における細胞移動能を、Wound-healing アッセイにより解析した。また、作製した細胞株をマウスに移植し癌細胞の転移を観察することで、*in vivo*におけるSTAP-2の癌細胞転移能への影響を解析した。

③細胞内シグナル伝達機構解析

細胞運動に重要なF-アクチンの重合状態を、F-アクチン特異的に結合する蛍光標識Phalloidinで染色し、蛍光顕微鏡やFACSを用いてF-アクチン重合を観察することでSTAP-2がアクチン重合に影響を与えているか解析を行った。ウェスタンブロット法により、作製した細胞株の様々な細胞内シグナル伝達分子のリン酸化状態を比較することで、STAP-2の発現によるシグナル伝達分子活性化への影響を検討した。

### 3. 結果

乳癌細胞におけるSTAP-2の機能を解析するため、内在性STAP-2の高発現が認められている乳癌細胞株MCF7及びT47D細胞において、shベクターを用いたSTAP-2ノックダウン細胞株の樹立に成功した。さらに、内在性STAP-2の発現が認められていない乳癌細胞株MDA-MB231細胞においてSTAP-2発現プラスミドを導入し、恒常的STAP-2高発現細胞株を樹立した。これら細胞株を用いて乳癌細胞の運動能に対するSTAP-2の関与について検討を行った。樹立した細胞株をクリスタルバイオレットで染色し顕微鏡観察を行ったところ、STAP-2過剰発現及びノックダウンによりそれぞれの細胞株で細胞形態、特に仮足と呼ばれる細胞突起に変化が認められた。また、MDA-MB231細胞を用いたWound-healingアッセイより、STAP-2の発現により細胞運動能が亢進することが観察された。

マウス悪性黒色腫細胞株B16F10細胞を用いた転移能に対するSTAP-2の機能解析のため、STAP-2恒常的高発現、及びノックダウンB16F10細胞を作製した。樹立した細胞株をクリスタルバイオレット染色により観察すると、STAP-2過剰発現及びノックダウンによりそれぞれの細胞株で仮足の形状に変化が認められた。また、Wound-healingアッセイによりSTAP-2の過剰発現によって細胞運動能が抑制されることが観察され、反対に、STAP-2ノックダウン細胞株では細胞運動能が亢進することが認められた。続いてB16F10細胞の尾静脈投与により *in vivo*における転移能に対するSTAP-2の機能解析を行った。するとSTAP-2を過剰発現させたB16F10細胞では、移植によるマウス肺へのB16F10細胞の転移が亢進し、さらにマウス生存日数の短縮が認められた。反対に、STAP-2ノックダウン細胞を移植したマウスにおいては肺への転移が全く認められなくなった。しかし、マウス生存日数についてコントロール細胞を移植したマウスと比べ顕著な差は認められず、さらにSTAP-2ノックダウンB16F10細胞は肝臓など肺以外への転移が亢進していることが観察された。続いて、これらB16F10細胞株のライゼートをウェスタンブロット法により解析したところ、MAPKやAktといった様々な細胞内シグナル伝達分子のリン酸化がSTAP-2の発現の有無により変化していることが明らかになった。また、蛍光標識Phalloidinを用いたFACS解析により、STAP-2ノックダウンによりコントロール細胞に比べF-アクチン量が有意に減少していることが認められた。さらに、STAP-2ノックダウンB16F10細胞において、低血清下における細胞培養でのアポトーシスが顕著に抑制されることがAnnexin V染色による解析により観察された。

### 4. 考察

これまでにSTAP-2はT細胞やマクロファージ細胞の運動能を制御していることを

我々は明らかにしていたが(1-3)、本研究において様々な癌細胞においてもSTAP-2が運動能を制御していることが示唆された。内在性STAP-2の発現が認められないMDA-MB-231細胞において、STAP-2の発現により細胞運動能が亢進することから、乳癌細胞においてSTAP-2は細胞運動能を制御する可能性が考えられる。今後、作製したSTAP-2ノックダウンMCF7およびT47D細胞株も用いて詳細な解析を行う予定である。また、B16F10細胞を用いた研究では、STAP-2の発現量の変化により細胞運動能の変化や異所性の転移が認められたことから、黒色腫細胞においてもSTAP-2が細胞運動能を制御していることが考えられる。そのメカニズムとして細胞内シグナル伝達分子の活性制御と、細胞運動に重要なアクチン重合の調節によることが示唆される。本研究では、STAP-2による運動能制御の詳細なメカニズム解明には至っていないが、癌細胞の浸潤・転移を制御する様々な分子の活性にSTAP-2が影響を与えていることを予備実験により見出している。また、乳癌細胞で多く発現していることが知られているBrkの活性を、基質として同定されているSTAP-2が亢進させることを最近明らかにしている(6)。Brkは乳癌細胞の転移にも関与していることが報告されており、今後はBrk等の癌細胞転移に関わる分子とSTAP-2との詳細な相互作用を解析することで、癌細胞浸潤・転移能のSTAP-2による制御機構を解明していく予定である。また、慢性骨髄性白血病の原因遺伝子であるBCR-ABLとSTAP-2が相互作用し、免疫不全マウスへの皮下移植による腫瘍形成がSTAP-2ノックダウンにより阻害されることも明らかにしており(7)、STAP-2は異なった癌細胞で様々な働きを有していることが示唆される。

これまでSTAP-2は免疫系細胞において機能し、免疫応答を制御する分子であることが明らかにされてきたが、様々な癌細胞においても発現が認められ、癌細胞におけるSTAP-2の機能解明により新たな癌治療の標的になり得ると考えられる。

## 5. 参考文献

1. Sekine, Y., et al. STAP-2 regulates integrin-mediated T-cell adhesion through protein degradation of FAK. *J. Immunol.* 179: 2397-2407. 2007
2. Sekine, Y., et al. Signal-transducing adaptor protein-2 regulates stromal cell-derived factor-1{alpha}-induced chemotaxis in T cells. *J. Immunol.* 183: 7966-7974. 2009
3. Ikeda O, et al. STAP-2 regulates c-Fms/M-CSF receptor signaling in murine macrophage Raw 264.7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358: 931-937. 2007
4. Müller, A., et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410: 50-56.2001
5. Chen, H.Y., et al. Brk activates rac1 and promotes cell migration and invasion by phosphorylating paxillin. *Mol. Cell. Biol.* 24: 10558-10572. 2004
6. Ikeda, O., et al. Interactions of STAP-2 with Brk and STAT3 participate in cell growth of human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 285: 38093-38103. 2010
7. Sekine, Y., et al. STAP-2 interacts with and modulates BCR-ABL-mediated tumorigenesis. *Oncogene* in press.