



## Induction of S100A4 gene expression inhibits in vitro invasiveness of human squamous cell carcinoma, KOSC-3 cells

魚住, 真樹

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2001-01-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2213

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002213>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【81】

氏名・(本籍) 魚住 真樹 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学位記番号 博い第1319号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成13年1月31日

【学位論文題目】

**Induction of S100A4 gene expression inhibits in vitro invasiveness of human squamous cell carcinoma, KOSC-3 cells**

(S100A4遺伝子の導入により見られた、in vitroでのヒト扁平上皮癌細胞KOSC-3の浸潤能の抑制)

審査委員

主査 教授 前田 盛

教授 天津 瞳朗 教授 尾原 秀史

## 緒言

癌細胞の浸潤、転移は、癌の生物学的・臨床病態的に極めて重要な現象で、様々な生物学的過程を経て成立する。現在では間葉系非腫瘍細胞の血管新生、細胞の運動性、matrix metalloproteinase, calcium homeostasisなどの点からも研究されている。

細胞増殖、癌転移に関する遺伝子として、S100A4遺伝子が近年注目されている。S100 familyは、カルシウム結合性を持ったEF-handを有する蛋白質で、アミノ酸配列の類似した16種類の蛋白質からなる。S100A4遺伝子は、S100 familyの一つでマウス乳癌細胞、ヒト乳癌細胞で転移関連遺伝子として研究されている。我々はS100A4遺伝子の癌における機能解析を目的として、S100A4遺伝子のセンス又はアンチセンスをヒト口腔底扁平上皮癌及びヒト胆嚢癌培養細胞株に導入し、これらの細胞の浸潤能に関する検討を行った。

## 材料と方法

### 細胞及び培養条件

ヒト口腔底扁平上皮癌の培養細胞株として、当科で樹立したKOSC-3、HSC-4を使用した。ヒト胆嚢癌培養細胞株として、SK-1、KMBC、NOZC-1を使用した。またヒト前立腺癌培養細胞株としてLNCapを使用した。これらの培養細胞株は、胎仔ウシ血性(FCS)を10%含むDulbecco's Eagle Modified Medium (DMEM)を用いて、5%CO<sub>2</sub>下、37℃加温条件下で100 mm ディッシュを用いて培養した。

### RNA抽出及び、RT-PCR 反応、S100A4、S100A6 cDNA断片の合成

サブコンフルエントに増殖した細胞からtotal RNAをAGPC法で抽出し精製した。エタノール沈澱後、50 μlのDPEC処理水に溶解後、吸光度を測定し定量した。100mm ディッシュ2皿あたり40~80ngのtotal RNAを得た。そのRNAにrandom hexamerをプライマーとして加え、M-MLV逆転写酵素でcDNAを合成した。S100A4、S100A6プライマーを以下のTableのように設計し、RT-PCRで得たcDNAを鋳型として、AmpliTaq DNAポリメラーゼを用いてS100 (S100A4、S100A6) cDNA断片を合成した。得られたDNA断片はアガロースゲルから回収した後、Tベクターにクローニング・精製後、DNAオーツークエンサーを用いてcDNA断片の塩基配列を決定した。欠失や突然変異のないことを確認した後、以下の実験に使用した。

Table Designation of oligodeoxynucleotides for RT-PCR

| Genes            | Primers | Deoxynucleotide sequences         | Mer | Product size (bp) |
|------------------|---------|-----------------------------------|-----|-------------------|
| S100A4<br>(CAPL) | F       | 5'-AATCATATGGCGTGCCCTCTGGAG-3'    | 24  | 340               |
|                  | R       | 5'-GTAGGATCCCAACCACATCAGAGGAGT-3' | 27  |                   |
| S100A6<br>(CACY) | F       | 5'-AAGCCCAGCCCTCAGCCATG-3'        | 20  | 338               |
|                  | R       | 5'-GACTCAGAGAGGACCCCCAGAG-3'      | 22  |                   |

F, forward; R, reverse;

#### トランスフェクション用ベクターの作成

Stratagene社のpRc/CMVベクターに合成したS100A4、S100A6DNA断片をセンス又はアンチセンスの向きに組み込み、トランスフェクション用ベクターとした。

#### ノーザンプロット法

ノーザンプロット法は、<sup>32</sup>PでラベリングしたS100A4 cDNAをプローブにして行った。Image Analyzer BAS2000を用いてmRNAのバンドを画像化した。

#### マトリゲルによる invasion assay

FALCON社製の8μmポアサイズの9mmセル・カルチャーインサートと24well Plateを使用した。セル・カルチャーインサートのメンブレンにマトリゲル (Growth Factor Reduced Matrigel Matrix, Collaborative Biomedical Product, USA, EHSマウス腫瘍から得た再構成基底膜) を42μg/cm<sup>2</sup>でコーティングした。FCS(-)-DMEMを用いて細胞懸濁液を作成した。腺癌細胞は2×10<sup>6</sup>cell/mlの濃度で、扁平上皮癌細胞は7×10<sup>5</sup>cell/mlの濃度で懸濁した。これらの細胞懸濁液300μlを各Insert内で培養し、走化性因子としてEGF添加FCS(-)-DMEM 800μlを各well内に加えた。37℃、5%CO<sub>2</sub>下で48時間インキュベーションした後、メンブレンをヘマトキシリン染色の後、包埋固定し、光学顕微鏡を用いてメンブレンを通過した細胞数を計測した。

## 結果

### 腺癌細胞と扁平上皮癌細胞のマトリゲル薄膜への浸潤性

腺癌細胞4種と扁平上皮癌細胞2種における浸潤能とS100A4 mRNAの発現とを比較した。高い浸潤能を示したのは2種の腺癌細胞NOZC-1、SK-1と2種の扁平上皮癌細胞KOSC-3、HSC-4であった。走化性因子としてEGF、PDGF、TGF- $\beta$ をそれぞれの細胞株に対して使用したところ、EGFのみが濃度依存性に走化性を与えることが判明した。セル・カルチャー・インサート内に播く細胞の数を変えて浸潤能を比較した。KOSC-3では、 $7 \times 10^5$  cell/mlの濃度の時、最大の浸潤能を示した。

### KOSC-3細胞におけるS100A4 mRNAの発現とS100A4 cDNAの遺伝子導入

S100A4 mRNAの発現は、腺癌細胞NOZC-1、SK-1のみでみられ、他の2種の腺癌細胞KMBC、LNCap、2種の扁平上皮癌細胞ではみられなかった。これら4種の細胞株では、S100A4のシグナルはRT-PCR法でのみ検出可能なレベルであった。。EGFは培養細胞株にマトリゲルへの浸潤性を誘導するが、SK-1のS100A4 mRNAの発現は、invasion assayと同じ条件下では変化しなかった。すなわちDMEMにEGFを添加しても、S100A4 mRNAの発現には変化を与えるなかった。更に、EGFをFCS(-)-DMEMに添加して培養した場合でもS100A4 mRNAの発現には変化がなかった。

一方、4種の腺癌細胞では、S100A4発現が高いNOZC-1、SK-1は、マトリゲルへの高い浸潤能を示し、S100A4の発現強度とマトリゲルへの浸潤能との間に正の相関が見られた。他のS100 familyの発現としてS100A6の発現を検討したが、これはLNCapを除くすべての細胞株で発現しており、細胞株の浸潤能との相関は認めなかった。

S100A4センスを遺伝子導入したKOSC-3の3つの細胞株は、KOSC-3野生株やベクターのみを遺伝子導入した細胞株に比べて、増殖能に差は無かった。一方、マトリゲルへの浸潤能は、S100A4センス導入株が、著明な減少を示した。これに対し、S100A4アンチセンスを導入したSK-1由来の3種の細胞株は、S100A4の発現の程度に相関して浸潤能の低下を示した。これらの3種の細胞株のS100A6 mRNAの発現、及び増殖能は、SK-1の野生株やベクターのみ導入した細胞株と差はなかった。以上のことから、扁平上皮癌細胞株KOSC-3では、その浸潤能はS100A4の発現と逆相関の関係であった。

## 考察

我々は、4種の腺癌と2種の扁平上皮癌で、浸潤能とS100A4 mRNAの発現を検討した。腺癌では浸潤能とS100A4 mRNAの発現に相関が見られた。一方2種の扁平上皮癌 KOSC-3、HSC-4では、浸潤能とS100A4の発現との間に相関が見られなかった。逆にS100A4遺伝子をKOSC-3細胞に強制発現させた場合、明らかな浸潤能の低下がみられた。以上より、扁平上皮癌ではS100A4が浸潤能に対して抑制的な役割を果たしている可能性が示された。

S100A4遺伝子は、元々マウス3T3細胞の細胞分裂周期S期に特異的に発現する遺伝子の一つとして分離同定されたもので、ヒト上皮系腫瘍細胞でもその発現がみられる。EGFによる刺激では、SK-1細胞でのS100A4の発現に影響を与えたかった。最近の研究では、腺癌でのS100A4の発現の増大は遺伝子の転写制御領域におけるメチレーションと関係していることが示されており、S100A4の発現は、EGFが介する転写調節の影響を受けないと推定される。

マウス乳癌細胞株では、S100A4の標的蛋白質の可能性として、non-muscle myosinのheavy chainが想定されている。他の細胞株でも、S100A4の標的蛋白質の候補がいくつか報告されている。S100A4とその標的蛋白質は、相互に作用することで、様々な細胞の中で細胞骨格の変化に関する制御を行っている可能性がある。しかし、S100A4は、扁平上皮細胞の分化過程ではそのような働きを持たず、扁平上皮癌細胞では、従来の腺癌細胞などで知らされてきた細胞骨格の変化とは逆の形質導入を行うことが示された。

総括：扁平上皮癌へのS100A4の遺伝子導入は、マトリゲル薄膜に対する浸潤能に抑制的に作用する。

| 論文審査の結果の要旨 |   |        |      |
|------------|---|--------|------|
| 受付番号       | 甲 第1320号  | 氏名     | 鬼作真樹 |
| 論文題目       | <p>Induction of S100A4 gene expression<br/>inhibits in vitro invasiveness of human<br/>squamous cell carcinoma, KOSC-3 cells</p> <p>S100A4遺伝子の導入により見られた、in vitroでの<br/>ヒト扁平上皮癌細胞KOSC-3の浸潤能の抑制</p> |        |      |
| 審査委員       | 主査  | 前田 盛   |      |
|            | 副査  | 天津 腹 郎 |      |
|            | 副査  | 尾島 有史  |      |
| 審査終了日      | 平成12年12月28日   |        |      |

(要旨は1,000字~2,000字程度)

癌細胞の浸潤、転移についての研究は、近年飛躍的進歩を遂げ、多方面での検討が行われている。

S100 familyは、カルシウム結合性を持ったEF-handを有する蛋白質で、アミノ酸配列の類似した16種類の蛋白質からなる。S100A4遺伝子は、S100 familyの一つでマウス乳癌細胞、ヒト乳癌細胞で転移関連遺伝子として研究されている。本研究者はS100A4遺伝子の癌における機能解析を目的として、S100A4遺伝子のヤンス又はアンチセンスをヒト口腔底扁平上皮癌及びヒト胆嚢腺癌培養細胞株に導入し、これらの細胞の浸潤能に関する検討を行った。

## 材料と方法

### 細胞及び培養条件

ヒト口腔底扁平上皮癌の培養細胞株として、当科で樹立したKOSC-3、HSC-4を使用した。ヒト胆嚢腺癌培養細胞株として、SK-1、KMBC、NOZC-1を使用した。またヒト前立腺癌培養細胞株としてLNCapを使用した。これらの培養細胞株は、胎仔ウシ血性(FCS)を10%含むDulbecco's Eagle Modified Medium(DMEM)を用いて、5%CO<sub>2</sub>下、37°C加湿条件下で100 mm ディッシュを用いて培養した。

### RNA抽出及び、RT-PCR反応、S100A4、S100A6 cDNA断片の合成

サブコンフルエントに増殖した細胞からtotal RNAをAGPC法で抽出し精製した。エタノール沈澱後、50 μlのDPEC処理水に溶解後、吸光度を測定し定量した。100mm ディッシュ 2皿あたり40~80ngのtotal RNAを得た。そのRNAに random hexamer をプライマーとして加え、M-MLV 逆転写酵素でcDNAを合成した。S100A4、S100A6プライマーを以下のTableのように設計し、RT-PCRで得たcDNAを鋳型として、AmpliTaq DNA ポリメラーゼを用いてS100(S100A4、S100A6) cDNA断片を合成した。得られたDNA断片はアガロースゲルから回収した後、Tベクターにクローニング・精製後、DNAオートシークエンサーを用いてcDNA断片の塩基配列を決定した。欠失や突然変異のないことを確認した後、以下の実験に使用した。

### トランسفエクション用ベクターの作成

Stratagene社のpRc/CMVベクターに合成したS100A4、S100A6DNA断片をセ

ンス又はアンチセンスの向きに組み込み、トランスフェクション用ベクターとした。

### ノーザンプロット法

ノーザンプロット法は、<sup>32</sup>PでラベリングしたS100A4 cDNAをプローブにして行った。Image Analyzer BAS2000を用いてmRNAのバンドを画像化した。

### マトリゲルによる invasion assay

FALCON社製の8μmポアサイズの9mm セル・カルチャーアイナーサートと24well Plateを使用した。セル・カルチャーアイナーサートのメンブレンにマトリゲル (Growth Factor Reduced Matrigel Matrix, Collaborative Biomedical Product, USA, EHSマウス腫瘍から得た再構成基底膜) を42μg/cm<sup>2</sup>でコーティングした。FCS(-)-DMEMを用いて細胞懸濁液を作成した。腺癌細胞は2×10<sup>6</sup>cell/mlの濃度で、扁平上皮癌細胞は7×10<sup>5</sup>cell/mlの濃度で懸濁した。これらの細胞懸濁液300μlを各Insert内で培養し、走化性因子としてEGF添加FCS(-)-DMEM 800μlを各well内に加えた。37°C、5%CO<sub>2</sub>下で48時間インキュベーションした後、メンブレンをヘマトキシリン染色の後、包埋固定し、光学顕微鏡を用いてメンブレンを通過した細胞数を計測した。

## 結果

### 腺癌細胞と扁平上皮癌細胞のマトリゲル薄膜への浸潤性

腺癌細胞4種と扁平上皮癌細胞2種における浸潤能とS100A4 mRNAの発現とを比較した。高い浸潤能を示したのは2種の腺癌細胞NOZC-1、SK-1と2種の扁平上皮癌細胞KOSC-3、HSC-4であった。走化性因子としてEGF、PDGF、TGF-βをそれぞれの細胞株に対して使用したところ、EGFのみが濃度依存性に走化性を与えることが判明した。セル・カルチャーアイナーサート内に播く細胞の数を変えて浸潤能を比較した。KOSC-3では、7×10<sup>5</sup>cell/mlの濃度の時、最大の浸潤能を示した。

### KOSC-3細胞におけるS100A4 mRNAの発現とS100A4 cDNAの遺伝子導入

S100A4 mRNAの発現は、腺癌細胞NOZC-1、SK-1のみでみられ、他の2種の腺癌細胞KMBC、LNCap、2種の扁平上皮癌細胞ではみられなかった。これら4種の細胞株では、S100A4のシグナルはRT-PCR法でのみ検出可能なレベルであった。EGFは培養細胞株にマトリゲルへの浸潤性を誘導するが、SK-1のS100A4

mRNAの発現は、invasion assayと同じ条件下では変化しなかった。

一方、4種の腺癌細胞では、S100A4発現が高いNOZC-1、SK-1は、マトリゲルへの高い浸潤能を示し、S100A4の発現強度とマトリゲルへの浸潤能との間に正の相関が見られた。他のS100 familyの発現としてS100A6の発現を検討したが、これはLNCapを除くすべての細胞株で発現しており、細胞株の浸潤能との相関は認めなかった。

S100A4センスを遺伝子導入したKOSC-3の3つの細胞株は、KOSC-3野生株やベクターのみを遺伝子導入した細胞株に比べて、増殖能に差は無かった。一方、マトリゲルへの浸潤能は、S100A4センス導入株が、著明な減少を示した。これに対し、S100A4アンチセンスを導入したSK-1由来の3種の細胞株は、S100A4の発現の程度に相関して浸潤能の低下を示した。これらの3種の細胞株のS100A6 mRNAの発現、及び増殖能は、SK-1の野生株やベクターのみ導入した細胞株と差はなかった。以上のことから、扁平上皮癌細胞株KOSC-3では、その浸潤能はS100A4の発現と逆相関の関係であった。

## 考察

4種の腺癌と2種の扁平上皮癌で、浸潤能とS100A4 mRNAの発現を検討した。腺癌では浸潤能とS100A4 mRNAの発現に相関が見られた。一方2種の扁平上皮癌KOSC-3、HSC-4では、浸潤能とS100A4の発現との間に相関が見られなかった。逆にS100A4遺伝子をKOSC-3細胞に強制発現させた場合、明らかな浸潤能の低下がみられた。以上より、扁平上皮癌ではS100A4が浸潤能に対して抑制的な役割を果たしている可能性が示された。

S100A4遺伝子は、元々マウス3T3細胞の細胞分裂周期S期に特異的に発現する遺伝子の一つとして分離同定されたもので、ヒト上皮系腫瘍細胞でもその発現がみられる。EGFによる刺激では、SK-1細胞でのS100A4の発現に影響を与えたかった。最近の研究では、腺癌でのS100A4の発現の増大は遺伝子の転写制御領域におけるメチレーションと関係していることが示されており、S100A4の発現は、EGFが介する転写調節の影響を受けないと推定される。

本研究は、癌の浸潤について、S100A4遺伝子のトランスフェクションによる発現の変化による癌細胞の性質の変化を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったS100A4遺伝子の癌の浸潤における役割について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。