

# 人工的悪性細胞の作製とその評価について

小林 和香子、ガンフヤグ エンフジャブフラン、中尾 日香梨

## Production of artificial malignant cells and their evaluation

Wakako Kobayashi, Gankhuyag Enkhjavkhlan, Hikari Nakao

**Abstract:** The transcription factor Snail is involved in gastrula invasion, organogenesis, and cancer cell invasion/ metastasis during early embryogenesis. Snail also has the function of inducing epithelial-mesenchymal transition (EMT). The author introduced a Snail gene expression vector into human colon cancer cell line DLD-1 cells to prepare Snail overexpression cells (called DLD-1/Snail cells). DLD-1/Snail cells changed from epithelial-like morphology to mesenchymal cell morphology and decreased proteins levels such as epithelial makers and increased migration and invasion, inducing EMT. As a result of microarray analysis, the expression of  $\alpha$ -1,3/4 fucosyltransferase (Fuc-TIII) was decreased in DLD-1/Snail cells compared with control cells. Fuc-TIII is a glycosyltransferase required to produce the cancer-related chain antigen sialyl-lewis a (sLe<sup>a</sup>). It was a ligand that adhesive to vascular endothelial cells via E-selectin. It has been suggested that sLe<sup>a</sup> is involved in cancer cell metastasis. However, decreased expression of Fuc-TIII in DLD-1/Snail cells reduced sLe<sup>a</sup> antigens. The above results found that during EMT induction by Snail, the cells suppressed the fucosyltransferase expression and eliminated the cell surface's sLe<sup>a</sup> antigen.

**Key words:** Epithelial-mesenchymal transition (EMT), transcription factor Snail, sialyl-lewis a (sLe<sup>a</sup>)

### 1. 背景

上皮-間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT)は、組織リモデリングや臓器発達、創傷治癒や癌細胞転移でみられる必須のステップの一つである<sup>1-4)</sup>。EMTが誘導されると、上皮細胞の特性は失われ、間葉系細胞の特性が獲得される。EMT関連転写因子である Snail、Slug、および Zeb1/2 は、E-カドヘリンなどの上皮マーカーの発現を抑制する一方、間葉系マーカーである N-カドヘリンやフィブロネクチンの発現を増加させ、細胞の運動性及び浸潤能を増大させる。実際、MDCK 細胞や A431 といった細胞株で Snail を過剰発現させると EMT を誘導する<sup>5-6)</sup>。

糖鎖表面糖鎖シアリルルイス a (sialyl-lewis a; sLe<sup>a</sup>)は大腸癌などに発現しており、「癌関連糖鎖抗原」と呼ばれている。この糖鎖抗原は、血管内皮細胞で発現される E-セレクトインと結合し、癌細胞の血行性転移に積極的な役割を果たすとされる<sup>7)</sup>。過去の報告では、大腸癌細胞株を上皮成長因子 (Epithelial growth factor) や塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor) で処理した細胞では EMT を誘導し、sLe<sup>a</sup> 抗原の発現増加が示された<sup>8)</sup>。臨床的には、大腸癌患者での高い sLe<sup>a</sup> 発現が予後不良と相関し、血液中に糖鎖抗原が増加するため、「腫瘍マーカー」として認識されている<sup>7)</sup>。

本研究では、我々は大腸癌細胞株を用いて人工的に悪性化させた細胞を作製し、人工的悪性細胞株の癌細胞転移能の解析、評価を行った。転移の指標として、上皮マーカーのタンパク質発現、細胞の遊走能や浸潤能を調べ、上皮マーカーの発現低下と、遊走能、浸潤能の増加を見出した。人工的悪性細胞の性質をより詳しく解析するためマイクロアレイ解析を行った所、癌細胞転移に深く関わる sLe<sup>a</sup> 抗原を作るために必要な糖転移酵素の発現が減少していた。以上のことから、人工的悪性細胞株の作製には成功したが、作製した細胞の癌細胞転移に関わる糖鎖抗原は既報と一致しない結果を得た。

### 2. 材料と方法

#### 2.1 プラスミド

HA タグを付加したヒト Snail 発現ベクター (pC-Snail-HA) とそのコントロールベクターである pCAGGS-neo は鹿児島大学大学院医歯学総合研究科の小澤政之教授に分与頂いた<sup>5)</sup>。

#### 2.2 細胞と遺伝子導入

ヒト結腸直腸癌細胞株である DLD-1 細胞は、10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) を加えたダルベッコ改変イーグ

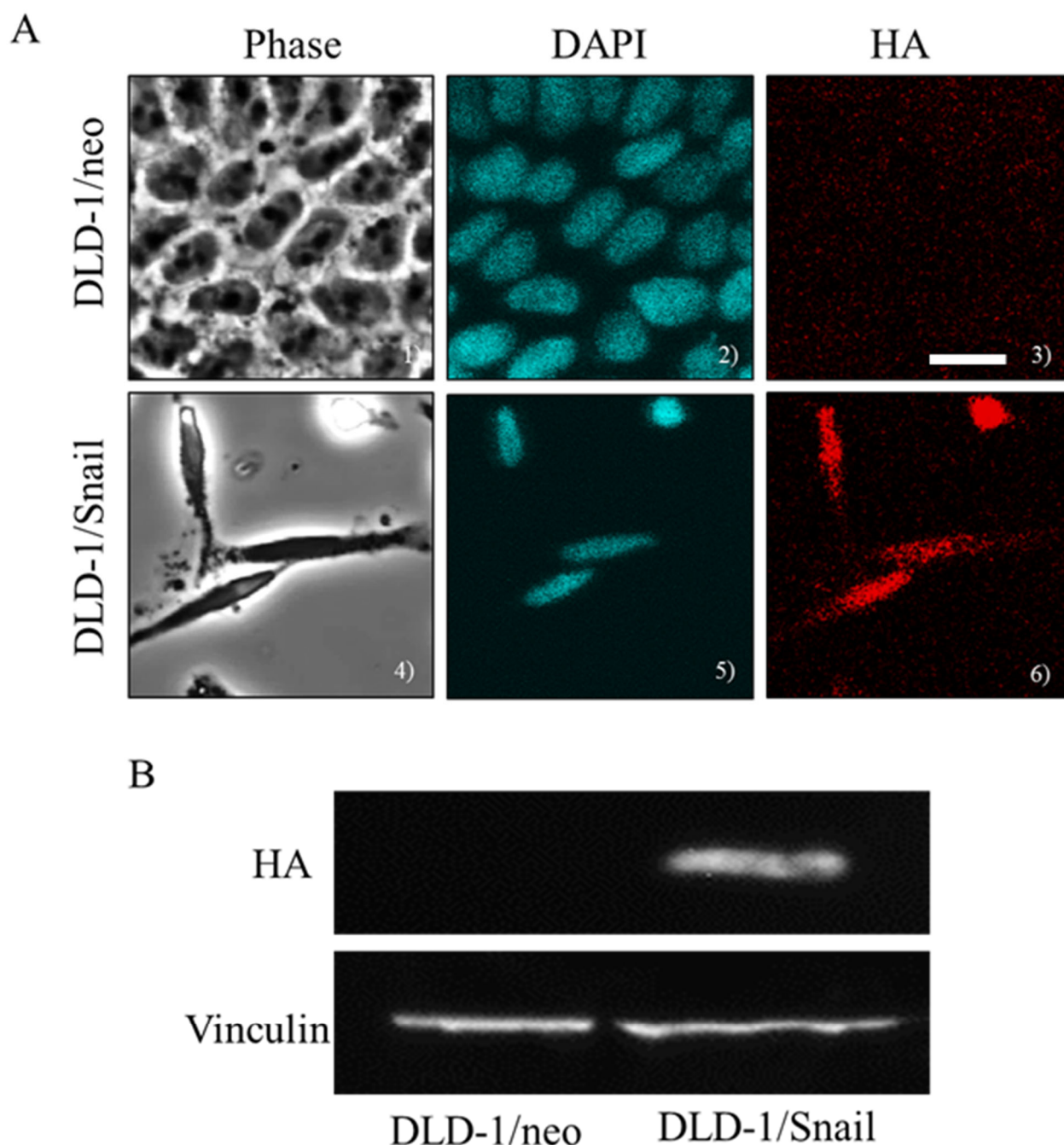


図1. Snail導入による形態変化。(A) 細胞の様子を観察した図では、コントロールのDLD-1/neo細胞では上皮形態を維持している。DLD-1/Snail細胞では繊維芽細胞様の形態変化が観察され、抗HA抗体によりSnailが核に局在していることが示された。DAPIは核の局在を確認するために使用した。(B) 免疫ブロットによりSnail-HAのタンパク発現量を検出した。抗Vinculin抗体は同量のタンパク量を流したとするローディングコントロールとして使用した。スケールバーは50  $\mu\text{m}$ 。

ル培地 (DMEM) で培養した。細胞 ( $5 \times 10^5$  個) は 8  $\mu\text{g}$  分のベクターをリン酸カルシウム法で遺伝子導入した<sup>5)</sup>。48 時間後、G418 でセレクションし、シングルコロニーを単離した。HA タグ Snail 発現は蛍光免疫染色と免疫ブロットで評価し、最低 3 つのクローンを得た。

### 2.3 抗体

一次抗体である E-カドヘリン、 $\beta$ -カテニン、p120-カテニン

に対するマウスモノクローナル抗体は Transduction Laboratories (Lexington, KY) から購入した。Vinculin に対するマウスモノクローナル抗体は Sigma (St Louis, USA) から購入した。Snail に対するマウスモノクローナル抗体は Cell signaling technology (Beverly, USA) から購入した。sLe<sup>a</sup> に対するマウスモノクローナル抗体 (MX-KM231) は協和メデックス株式会社 (日本) から購入した。HA に対するラットモノクローナル抗体は Roche Applied Science (Mannheim, Germany) から購入した。二次抗体

は全て Jackson Immuno Research Laboratories (West Grove, PA) から購入した。

#### 2.4 蛍光免疫染色

タンパク質の局在を解析するために、蛍光免疫染色を行った。細胞をカバーガラス上で増殖させ、3%パラホルムアルデヒド/PBSで細胞を固定し(室温20分間)、0.1% Triton X-100で透過処理した。カバーガラスは一次抗体と二次抗体で免疫染色した<sup>9)</sup>。抗体は、一次抗体としてHA、E-カドヘリン、 $\beta$ -カテニン、p120-カテニン、sLe<sup>a</sup>抗体、二次抗体としてCy3-マウス抗体を使用し、それぞれ室温で30分反応させた。細胞はDAPIを含むグリセリン封入剤で封入し、FLUOVIEW FV10i (OLYMPUS, 日本)で撮影した。

#### 2.5 免疫プロット

タンパク質発現レベルを解析するために免疫プロットを行った。細胞をSample bufferで溶解後、8%又は15%ポリアクリルアミドゲルでタンパク質を分離し、ポリフッ化ビニリデンメンブレン(PVDF)に転写した。メンブレンをブロッキング後、一次抗体で2時間又はover nightで反応させた。その後ペルオキシダーゼ結合二次抗体と反応させた。0.1% Tween-20/PBSで洗浄後、enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham International, Little Chalfont, UK)によって検出した。検出器はLAS-3000 (FUJIFILM, 日本)を使用した。

#### 2.6 遊走能実験

細胞遊走能実験は8.0  $\mu$ m ポアポリカーボネート膜インサートのTranswell (Corning, NY, USA)を使って評価した。下のチャンバーには5% FBS含有DMEMを入れた。上のチャンバーには無血清培地に $4 \times 10^4$ 個の細胞を播いた。37°Cで22時間インキュベーション後、細胞を固定、染色して計測した。

#### 2.7 浸潤能実験

細胞浸潤能実験はBioCoat MatriGel Invasion Chambers (BD Biosciences)を使って評価した。下のチャンバーには5% FBS含有DMEMを入れた。上のチャンバーには無血清培地に $2.5 \times 10^4$ 個の細胞を播いた。37°Cで22時間インキュベーション後、細胞を固定、染色して計測した。

#### 2.8 遺伝子発現マイクロアレイとデータ解析

RNAをRLZol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を使ってSnail導入細胞とコントロール細胞から抽出した。Agilent Whole Human Genome microarrayで遺伝子発現解析を行った。

### 3. 結果

#### 3.1 DLD-1細胞へのSnail遺伝子導入の確認と形態変化

DLD-1細胞はヒト直腸結腸癌細胞株であり、もともと上皮形態を維持している。遺伝子導入のコントロールとして、ネオ

マイシン耐性遺伝子を持つpCAGGS-neoベクターを細胞に導入し、DLD-1/neo細胞を作製した。形態は親株DLD-1細胞と変わらず上皮形態を維持していた(図1A-1)。癌細胞転移に関わるSnail遺伝子(pC-Snail-HA)を導入したDLD-1細胞(DLD-1/Snail細胞)は、細長い繊維芽細胞様の形態に変化した(図1A-4)。遺伝子導入を確認するため抗HA抗体を用いて蛍光免疫染色と免疫プロットを行った(図1B)。DLD-1/Snail細胞ではHAの核での染色を確認でき、免疫プロットでもHAの発現が示された。

以上のことから、Snail遺伝子の導入に成功し、細胞の形態変化が示された。

#### 3.2 上皮マーカーや細胞間接着分子の発現解析

先ほどの結果でSnail遺伝子導入によって細胞の形態変化が示された。次に、EMTの指標の一つであるE-カドヘリンとそれに関わる細胞接着分子の発現を解析した。抗E-カドヘリン抗体を用いた蛍光免疫染色では、DLD-1/neo細胞は細胞膜での染色を確認できたが、DLD-1/Snail細胞では細胞膜の染色を確認できなかった(図2A)。免疫プロットにより、E-カドヘリンのタンパク質発現を調べたところ、蛍光免疫染色同様DLD-1/Snail細胞での発現が低下していた(図2B)。E-カドヘリンに結合し、裏打ちタンパク質として機能する $\beta$ -カテニンやp120-カテニンの発現を調べたところ、蛍光免疫染色ではDLD-1/neo細胞の $\beta$ -カテニンとp120-カテニンはE-カドヘリンと同じ局在を示していた。しかし、DLD-1/Snail細胞では、細胞質中に蓄積しているようであった(図2A)。免疫プロットでは、 $\beta$ -カテニンのタンパク質発現量に差は見られなかった。p120-カテニンのタンパク質発現は、選択的スプライシングによりDLD-1/neo細胞では上皮パターンが発現が見られるが、DLD-1/Snail細胞では間葉系パターンが発現が見られた(図2B)。

#### 3.3 細胞の遊走能、浸潤能の評価

癌細胞は原発巣から転移を開始する際、細胞自身が動く能力、血管に浸潤する能力を獲得する<sup>10)</sup>。そのため、EMTの指標として、細胞の遊走能、浸潤能が挙げられる。DLD-1/neo細胞とDLD-1/Snail細胞の遊走能、浸潤能を調べた(図3)。遊走能評価では、DLD-1/neo細胞に比べDLD-1/Snail細胞では、約7倍細胞が動きやすいことが分かった(図3A)。浸潤能評価では、DLD-1/neo細胞に比べDLD-1/Snail細胞では、約4倍の浸潤能の増加を示した(図3B)。

今までの結果をまとめると、癌細胞転移を引き起こすSnail遺伝子を導入したDLD-1/Snail細胞では、細胞の形態変化、上皮マーカーのタンパク質発現低下、細胞の遊走能、浸潤能の増加が見出された。このことから、DLD-1/Snail細胞ではEMTを誘導していることが分かった。

3.4 Snail過剰発現による癌関連糖鎖抗原sLe<sup>a</sup>の発現低下  
癌細胞の悪性化に伴い、細胞表面の糖鎖が変化することは以

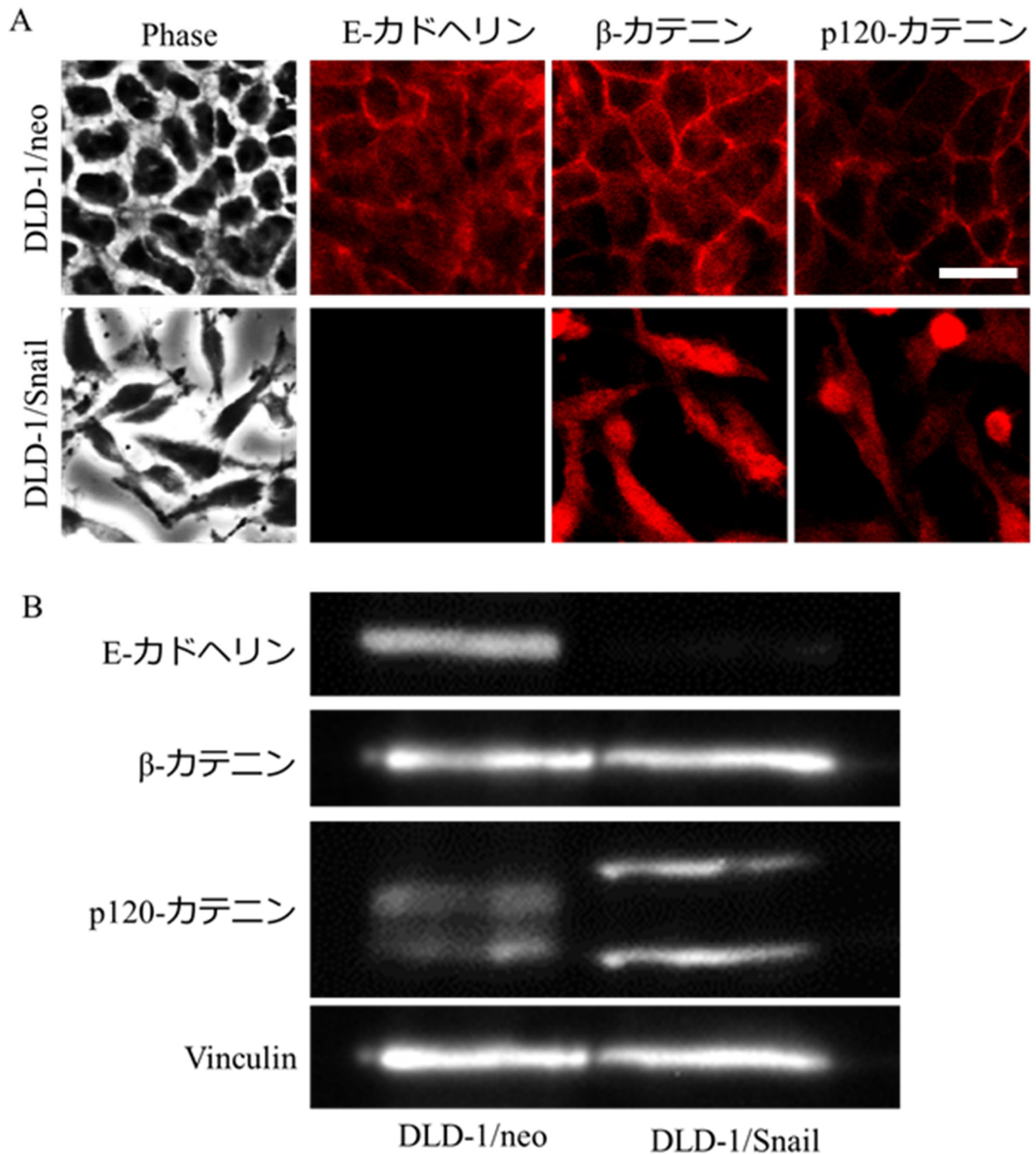


図 2. 上皮マーカーと細胞間接着分子の発現。(A) 蛍光免疫染色による図。上段がDLD-1/neo細胞、下段がDLD-1/Snail細胞で、左からphase、E-カドヘリン、β-カテニン、p120-カテニンの局在を示している。(B) 免疫プロットによる上皮マーカーと細胞間接着分子の発現。抗Vinculin抗体は同量のタンパク量を流したとするローディングコントロールとして使用した。スケールバーは50 μm。

前から知られており、特に癌関連糖鎖抗原である sLe<sup>a</sup> が増加することが報告されている<sup>7)</sup>。DLD-1/Snail 細胞を作製した後、細胞の遺伝子発現を網羅的に解析するため、Agilent Whole Human Genome microarray で遺伝子発現解析を行った。その際コントロールとして使用した細胞はDLD-1/neo細胞ではなく、DLD-1/DsRed 細胞である (DLD-1 細胞に赤色蛍光タンパク質である DsRed 遺伝子を遺伝子導入した細胞である)。DLD-

1/DsRed 細胞と DLD-1/Snail 細胞を比較したところ、癌関連糖鎖抗原 sLe<sup>a</sup> を作るために必要な α-1,3/4 フコース転移酵素III (fucosyltransferase; Fuc-TIII)の発現が DLD-1/Snail 細胞で約 100 倍低下していることを見出した。

そこで、DLD-1/neo 細胞と DLD-1/Snail 細胞での sLe<sup>a</sup> 抗原の発現を蛍光免疫染色と免疫プロットで解析した (図 4)。蛍光免疫染色では、DLD-1/neo 細胞は膜上での sLe<sup>a</sup> 抗原の染色が見ら

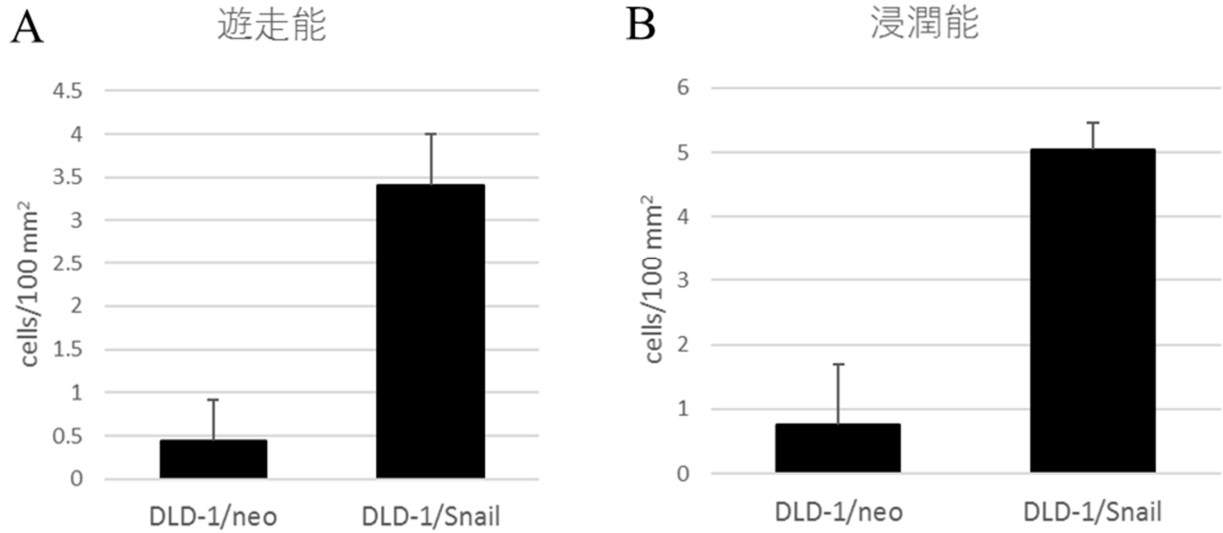


図3. 遊走能、浸潤能評価。(A) 細胞遊走能評価。細胞をTranswellに $4 \times 10^4$ 個播き、22時間後にポアを通り抜けた細胞を固定、染色し顕微鏡で観察した。(B) 細胞浸潤能評価。細胞をMatrigel Invasion Chambersに $2.5 \times 10^4$ 個播き、22時間後にマトリゲルを浸潤した細胞を固定、染色し顕微鏡で観察した。

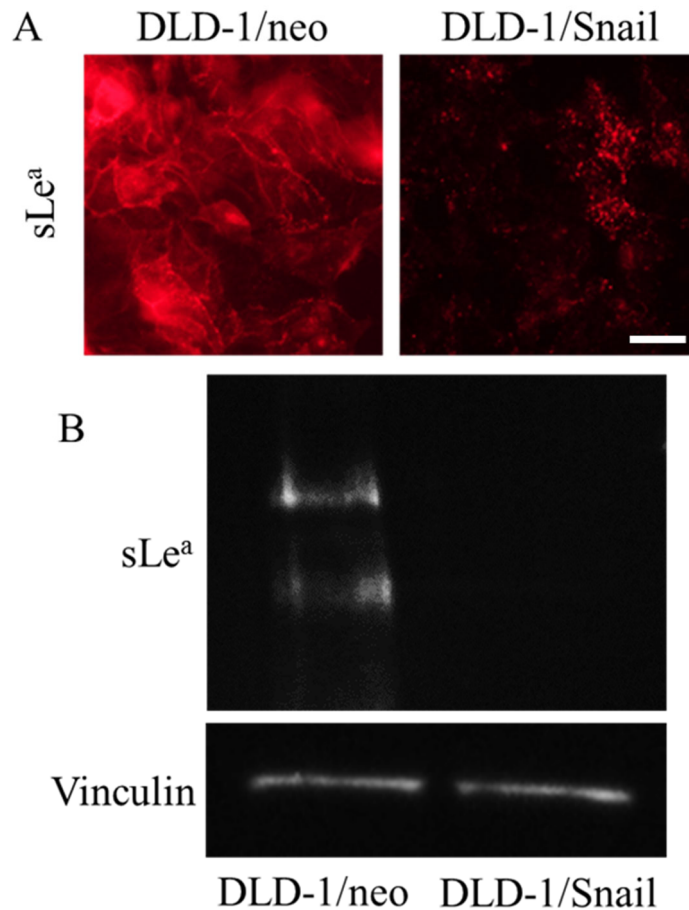


図4. 癌糖鎖抗原sLe<sup>a</sup>の発現。(A) 抗sLe<sup>a</sup>抗体による蛍光免疫染色画像。左がDLD-1/neo細胞で、右がDLD-1/Snail細胞である。DLD-1/neo細胞ではsLe<sup>a</sup>の膜での染色を確認できたが、DLD-1/Snail細胞では染色が弱まっていた。(B) 抗sLe<sup>a</sup>抗体による免疫ブロット。蛍光免疫染色同様、DLD-1/neo細胞ではsLe<sup>a</sup>抗体に反応するバンドが検出されたが、DLD-1/Snail細胞ではsLe<sup>a</sup>の発現が減少していた。抗Vinculin抗体は同量のタンパク量を流したとするローディングコントロールとして使用した。スケールバーは50  $\mu$ m。



れたが、DLD-1/Snail 細胞でははっきりとした染色が見られなかった (図 4A)。免疫プロットによる sLe<sup>a</sup> 抗原の発現を調べたところ、蛍光免疫染色の結果同様、DLD-1/neo 細胞ではいくつかのバンドが検出されたが、DLD-1/Snail 細胞ではその発現が見られなかった。DLD-1/neo 細胞でいくつかのバンドが検出されるのは、sLe<sup>a</sup> 抗原が結合するタンパク質が何種類かあるからだと示唆される。

#### 4. 考察

本研究において、我々はヒト大腸癌細胞である DLD-1 細胞に癌細胞転移を誘導すると報告されている Snail 遺伝子を導入し、人工的悪性細胞を作製した。癌細胞転移が起きる際、細胞は EMT を引き起こすことが報告されている<sup>1)</sup>。EMT の指標としては、細胞の形態変化、上皮マーカーの消失、細胞の遊走能、浸潤能の増加が挙げられる。我々は作製した DLD-1/Snail 細胞を用いて EMT を誘導したかどうかを調べた。顕微鏡観察や蛍光免疫染色、免疫プロットの結果、DLD-1/Snail 細胞では繊維芽細胞様の形態変化が見られ、上皮マーカーである E-カドヘリンの発現低下、細胞の遊走能、浸潤能の増加が見られた。以上のことから、DLD-1 細胞に Snail 遺伝子を導入することにより、EMT を引き起こした人工的悪性細胞の作製に成功した。

細胞は、細胞膜を構成しているタンパク質には糖鎖が結合しているが、細胞が悪性化することによってその糖鎖発現が変わることが知られている<sup>7)</sup>。癌関連糖鎖抗原の 1 つである sLe<sup>a</sup> は、癌の悪性化と関連している。今回 Agilent Whole Human Genome microarray で遺伝子発現解析を網羅的に行ったところ、sLe<sup>a</sup> 抗原の合成に関わる FUT-III の遺伝子発現量が DLD-1/Snail 細胞で減少していることを見出した。実際、DLD-1/Snail 細胞での sLe<sup>a</sup> 抗原の発現を蛍光免疫染色、免疫プロットで解析したところ、DLD-1/Snail 細胞では細胞膜上での染色低下と免疫プロットでのタンパク質発現低下が見られ、マイクロアレイ解析の結果と一致している。しかし、本実験で得られた結果は、既知の報告とは一致しない。この事に関しては、まだはっきりとはわからないが、sLe<sup>a</sup> 抗原が癌の悪性化と関連しているという報告は、臨床研究での報告であり、今回我々は培養細胞を用いて癌細胞転移の初期段階の解析を行った。その違いによるものかもしれない。

今後は、Snail がどのように FUT-III の発現を抑制しているのか、E-セレクトリンへの接着などを解析していく。

#### 参考文献

- 1) J.P. Thiery: Epithelial-mesenchymal transition in tumor progression, *Nature Reviews Cancer*, 2, 442-454, 2002
- 2) Nawshad A., LaGamba D., Polad A., Hay E.D.: Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling during Epithelial-Mesenchymal Transformation: Implications for Embryogenesis and Tumor Metastasis, *Cells Tissues Organs*, 179, 11-23, 2005
- 3) MA. Hubber, N. Kraut, H. Beug: Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression, *Current Opinion in Cell Biology*, 17, 548-558, 2005
- 4) JJ. Christiansen, AK. Rajasekaran: Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis, *Cancer research*, 66, 8319-8326, 2006
- 5) T. Ohkubo, M. Ozawa: The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation, *Journal of cell science*, 117, 1675-1685, 2004
- 6) M. Haraguchi, T. Okubo, Y. Miyashita, Y. Miyamoto, M. Hayashi, TN. Crotti, KP. McHugh, M. Ozawa: Snail Regulates Cell-Matrix Adhesion by Regulation of the Expression of Integrins and Basement Membrane Proteins, *Journal of Biological Chemistry*, 283, 23514-23523, 2008
- 7) R. Kannagi: Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer, *Glycoconjugate Journal*, 14, 577-584, 1997
- 8) K. Sakuma, M. Aoki, R. Kannagi: Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced epithelial-mesenchymal transition, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 7776-7781, 2012
- 9) Y. Miyashita, M. Ozawa: Increased internalization of p120-uncoupled E-cadherin and a requirement for a dileucine motif in the cytoplasmic domain for endocytosis of the protein; *Journal of Biological Chemistry*, 282, 11540-11548, 2007
- 10) R. Kalluri, RA. Weinberg: The basics of epithelial-mesenchymal transition, *The Journal of Clinical Investigation*, 119, 1420-1428, 2009

(西暦 2021 年 1 月 19 日受理)

\*責任著者：小林和香子 宇部工業高等専門学校物質工学科