

## Ⅲ-1 ヒキガエル由来生薬成分による血中循環腫瘍細胞の抑制機構の解明

学術研究部薬学・和漢系 助教 藤井 拓人

### 【研究目的】

最近、植物由来の強心配糖体が血中循環腫瘍細胞 (CTC) の悪性化に関与するクラスター化を阻害することが報告されたが、その分子機構の詳細は不明である。我々は、これまでに癌細胞におけるナトリウムポンプの病態生理機能について研究を行っており、強心配糖体が、特殊な膜環境下に存在するナトリウムポンプに作用して、癌細胞の増殖を選択的に抑制するメカニズムを明らかにした (Fujii et al., BBA, 2018)。また最近、様々な癌細胞では、ほぼすべての細胞の原形質膜に普遍的に存在する  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 1$ -isoform ( $\alpha 1\text{NaK}$ ) に加えて、別の種類の  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (論文発表前のため  $\text{nNaK}$  とする) が細胞内に異常に発現していることを見出した。本研究では、強心配糖体を多数含むヒキガエル毒素由来生薬成分による CTC 抑制効果、および抑制機構の分子メカニズムを解明することで、ナトリウムポンプを標的とした新規 CTC 治療薬の開発につながる研究基盤を構築する。

癌細胞は様々な過程を経て転移するが、CTC として血中を循環する前に原発巣からの剥離が引き起こされる。本年度は、原発巣からの癌細胞の剥離に伴うナトリウムポンプの発現と機能の変化に着目した研究を行った。また、ヒキガエル由来の 8 種類の強心配糖体がヒト大腸癌細胞の増殖能に及ぼす効果を検討した。

### 【方法】

#### 細胞培養および siRNA トランスフェクション

ヒト大腸癌由来 HT-29、胃癌由来 MKN45、肝癌由来 HepG2 細胞を実験に用いた。HT-29 細胞は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (和光純薬工業)、MKN45 細胞は、RPMI 1640 (和光純薬)、HepG2 細胞は、Eagle's Minimum Essential Medium (和光純薬) に、100 units/mL penicillin (和光純薬)、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin (和光純薬)、10% FBS を加えた培地を用いて 37°C、5%  $\text{CO}_2$  存在下で培養した。

HT-29 細胞における  $\text{nNaK}$  のノックダウンは、Nucleofector (Lonza) を用いて HT-29 細胞 ( $1 \times 10^6$  個) へ  $\text{nNaK}$  に対する siRNA (Thermo; 100 pmol) および negative control siRNA (Thermo; 100 pmol) をプログラム W-017 でヌクレオフェクションし、その後 48 時間培養した細胞を実験に使用した。

#### 細胞表面ビオチン化

各癌細胞を、0.5 mg/ml sulfo-NHS-LC-biotin (Thermo) を含む PBS (++) で 37°C、30 分間インキュベーションした。反応停止液 (0.2% bovine serum albumin、0.05M glycine in PBS

(++) を加えた後に洗浄し、lysis buffer (150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH7.4)、1 mM EDTA、1% Triton X-100 in PBS(++)) で可溶化した。可溶化サンプルに avidin ビーズ (Sigma-Aldrich) を加えて、4°C、4 時間ローテーションした後に洗浄し、sample buffer (4% SDS、20% グリセロール、2%  $\beta$ -mercaptoethanol、130 mM Tris-HCl (pH6.8)) を加えて溶出し、ウェスタンブロットに用いた。

### ウェスタンブロット

ビオチン化サンプルを、SDS-PAGE sample buffer (2% SDS、10% glycerol、65 mM Tris-HCl (pH6.8)) および 5%  $\beta$ -mercaptoethanol で処理した。全量を SDS-polyacrylamide gel にアプライし、泳動した。SDS-PAGE で分離後、48 mM Tris および 39 mM glycine を含んだ溶液中で PVDF 膜に転写 (100 V で 60 分間) した。転写した PVDF 膜を 5% スキムミルクを含む TBS-T (150 mM NaCl、0.1% Tween20、25 mM Tris-HCl (pH7.4)) を用いて、室温で 1 時間ブロッキングした。一次抗体として、抗  $\alpha$ 1NaK 抗体、抗 nNaK 抗体、抗  $\beta$ -actin 抗体をいずれも 1:5,000 希釈で使用した (4°C、15 時間)。二次抗体として HRP 標識した抗マウス IgG 抗体および抗ウサギ IgG 抗体を 1:5,000 希釈で使用し、室温で 1 時間インキュベーションした。Western Lightning ECL pro (PerkinElmer) を用いて化学発光させ、LAS-4000 plus system (富士フィルム) により検出した。

### 免疫細胞染色

24-well plate にカルチャーカバーガラス (松浪硝子) を入れ、カバーガラス上で細胞を培養した。剥離した細胞は、OCT コンパウンド (サクラファインテック) で包埋し、クライオスタットを用いて薄切切片を作製した。氷冷した 100% methanol を用いて細胞を固定し、permeabilization buffer (0.3% Triton X-100 および 0.1% BSA 含有 PBS (++)) 中で 15 分間室温にてインキュベーションした。次に GSDB (17% goat serum、450 mM NaCl、0.3% TritonX-100 含有 20 mM phosphate buffer pH 7.4) を用いて、室温で 1 時間インキュベーションしてブロッキングし、一次抗体を 4°C にて 16 時間反応した。洗浄した後、二次抗体を遮光状態で室温にて 1 時間反応した。DAPI 溶液 (1:1,000) 希釈で室温にて 15 分間反応させた。蛍光を観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM 700) を用いた。なお、一次抗体として、抗 nNaK 抗体または抗 flotillin-2 抗体を 1:100 希釈で用いた。二次抗体として、Alexa 488 標識抗マウス IgG 抗体または Alexa 546 標識抗ウサギ IgG 抗体を 1:100 希釈で用いた。

### パッチクランプ法を用いた膜容量の測定

pClamp software (Axon Instruments) および Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments) を用いて HT-29 細胞の膜容量を測定した。ピペット溶液 (細胞内) は、7 mM NaCl、133 mM potassium aspartate、3 mM MgCl<sub>2</sub>、0.062 mM CaSO<sub>4</sub>、0.1 mM EGTA、10 mM HEPES、2 mM

ATP (pH 7.3)、バス溶液 (細胞外) は 136 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM sodium aspartate, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaSO<sub>4</sub>, 7 mM Tris, 10 mM HEPES, 5 mM EDTA (pH 7.3)を用いた。

### ミトコンドリア酵素活性測定

ミトコンドリア酵素活性は MTT cell proliferation assay kit (Cayman) を用いて測定した。96-well plate に接着させた HT-29 細胞と 5 mM EDTA を用いて plate から剥離した HT-29 細胞におけるミトコンドリア酵素活性を測定した。剥離細胞は CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 3 時間懸濁培養し測定に用いた。

### アポトーシスの測定

HT-29 細胞および nNaK 発現 Colon-38 細胞の接着状態と剥離状態におけるアポトーシスを、Caspase-Glo 3/7 Assay System (Promega)を用いて測定した。剥離細胞は CO<sub>2</sub> インキュベーターで 3 時間懸濁培養し、Caspase Glo 3/7 試薬を加え室温で 30 分反応させ、発光を検出した。

### <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>取り込み測定

HT-29 細胞 (1×10<sup>6</sup> 個) を 12-well plate に播き、37°C で 24 時間培養した。上清を除去し、10 μM DIOA、100 μM furosemide および 20 μM ouabain を加えた DMEM に置換し、37°C にて 10 分間インキュベーションした。<sup>86</sup>RbCl (1×10<sup>6</sup> cpm/sample) を加えた DMEM を添加し、37°C で 10 分間インキュベーションした。氷上で反応を停止させ、冷却した DMEM で 3 回洗浄し、細胞を可溶化後、液体シンチレーションで放射活性を測定した。剥離細胞での測定では、10 mM EDTA で剥離し、非接着状態で <sup>86</sup>RbCl (1×10<sup>6</sup> cpm/sample) との反応および洗浄を行った。洗浄の際は 300 xg で 3 分間遠心した。

### 細胞増殖能測定

24-well plate 上の全細胞数をカウントすることで細胞増殖能を測定した。それぞれの well に HT-29 細胞 (1×10<sup>5</sup> 個) を播き、2% FBS-DMEM を用いて 37°C で 24 時間培養した。その後、各種強心配糖体を含む 2% FBS-DMEM を用いて 37°C にて 24 時間インキュベーションし、薬物処理前と処理後の細胞数をカウントし、増殖能を評価した。

## 【結果】

### 細胞剥離刺激による nNaK の原形質膜移行

まず、通常培養時（ディッシュに接着した状態）での nNaK の局在を免疫染色において検討した。HT-29 細胞、MKN45 細胞、HepG2 細胞のいずれにおいても nNaK の局在は、原形質マーカーである flotillin-2 と一致せず、細胞質内に観察された（図 1 A）。他方、 $\alpha$ 1NaK は、いずれの細胞においても原形質膜において局在が観察された（data not shown）。しかし、興味深いことに、EDTA または trypsin-EDTA を用いて細胞を剥離した細胞を免疫染色したところ、いずれの細胞においても nNaK の局在は flotillin-2 と一致した（図 1 B）。さらに、剥離した細胞をディッシュに蒔き再接着させたところ、nNaK の局在は再度細胞質内に観察された（図 1 B）。

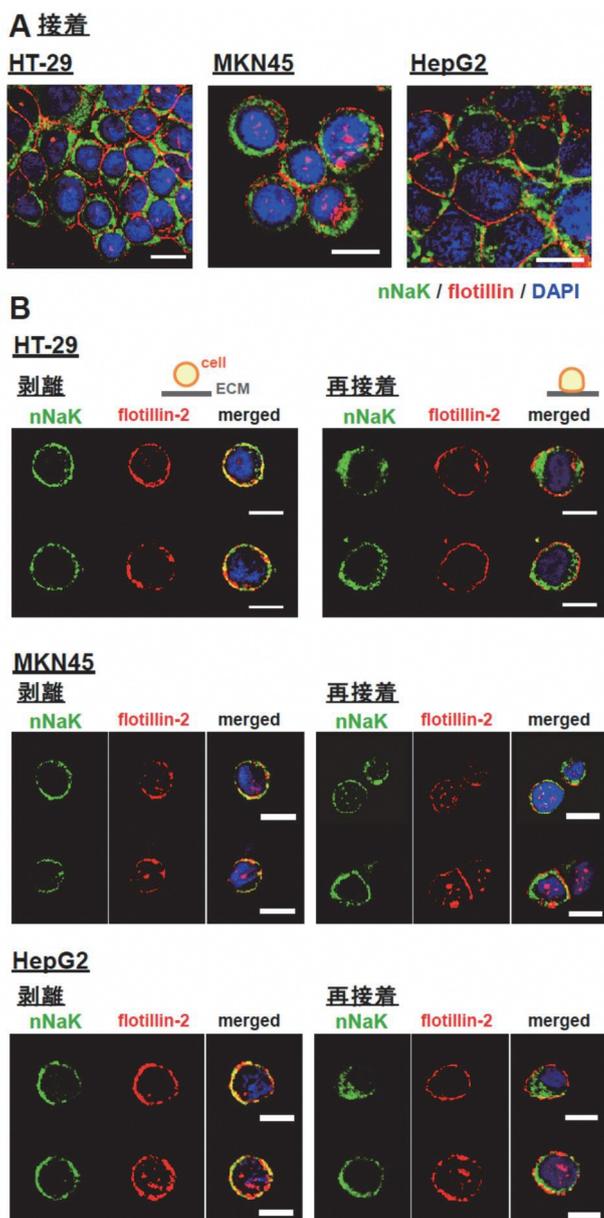
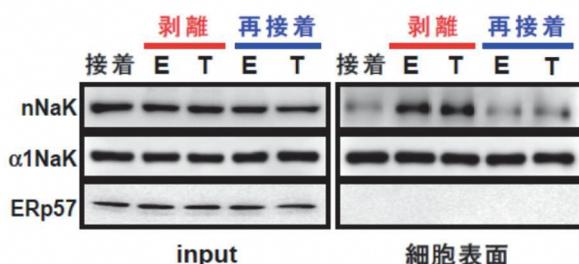


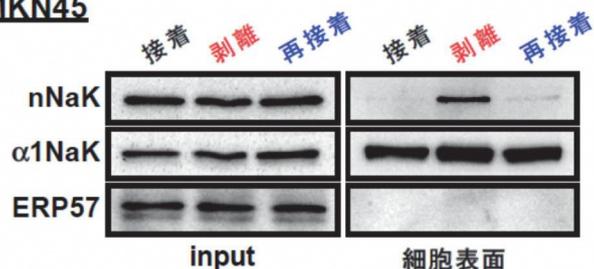
図 1 接着、剥離、再接着させた癌細胞における nNaK の局在

次に、癌細胞の細胞表面に存在するタンパク質をビオチンで標識し、アビジンビーズを用いて精製したサンプルを用いて nNaK の発現を検討した (図 2)。HT-29 細胞において nNaK の発現はトータルライセートにおいては接着、剥離、再接着の全てにおいて観察されたが、細胞表面サンプルにおいては、接着状態において発現は低く、EDTA (E) もしくは trypsin-EDTA (T) で剥離した際に有意に上昇した。また、剥離した細胞をディッシュに再接着させることで、細胞表面サンプルにおける nNaK の発現は接着状態と同レベルまで減少した。他方、通常原形質膜に存在する  $\alpha$ 1NaK の発現は、細胞剥離により有意な変化は見られなかった。また、細胞質内において分子シャペロンとして機能している ERp57 は剥離時においても細胞表面サンプルにおいて発現が観察されなかったことから、剥離操作によりビオチンが細胞内に流入していないことが確認された。HT-29 細胞と同様に、MKN45 細胞および HepG2 細胞においても trypsin-EDTA を用いた細胞剥離を行ったところ、細胞表面サンプルにおける nNaK の発現レベルが有意に上昇し、再接着することで発現が減少した。以上の結果より、癌細胞が接着状態においては細胞質内に存在する nNaK が、細胞剥離により原形質膜へ移行し、再接着により細胞質内へ再移行することが明らかとなった。

### HT-29



### MKN45



### HepG2

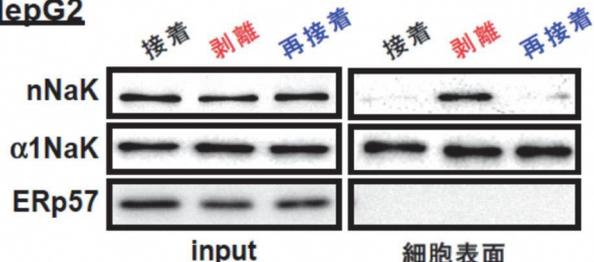


図 2 各癌細胞の細胞表面ビオチン化サンプルにおける nNaK のウェスタンブロット

### 細胞剥離による原形質膜における $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase のイオン輸送能の検討

細胞剥離により細胞質内に存在する nNaK が原形質膜へ移行することから、原形質膜における  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase のイオン輸送能が上昇している可能性が考えられた。そこで、 $\text{K}^+$ と水和半径が類似しており、広く代替イオンとして用いられる  $\text{Rb}^+$ の放射性同位体  $^{86}\text{Rb}^+$ を用いて、 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の  $\text{K}^+$ 取込み能を評価したところ、接着細胞に比べて、剥離細胞の  $^{86}\text{Rb}^+$ 取込み活性は有意に上昇していた (図 3A)。また、siRNA により nNaK をノックダウンする (ノックダウンにおける nNaK の発現レベルは図 5A を参照) と剥離時の  $^{86}\text{Rb}^+$ 取込み活性の上昇は阻害された (図 3B) ことから、剥離時の  $^{86}\text{Rb}^+$ 取込み上昇は原形質膜へ移行した nNaK によるものであることが示唆された。

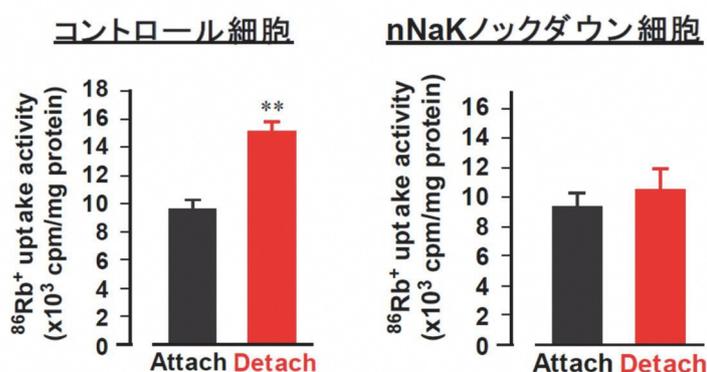


図 3 HT-29 細胞の  $^{86}\text{Rb}^+$ 取込み活性の測定

### 細胞剥離に伴うエキソサイトーシス誘導の検討

細胞剥離に伴う nNaK の原形質膜移行にエキソサイトーシスが関与している可能性について検討した。パッチクランプ解析により、細胞の膜容量を測定した。エキソサイトーシスが誘導されると、細胞膜容量の増加が観察される。HT-29 細胞における膜容量を測定したところ、接着状態では経時的な膜容量変化は観察されなかった (図 4A) が、剥離することで有意な膜容量の増加が観察された (図 4B)。従って、癌細胞が剥離されることでエキソサイトーシスが惹起されることが示唆された。

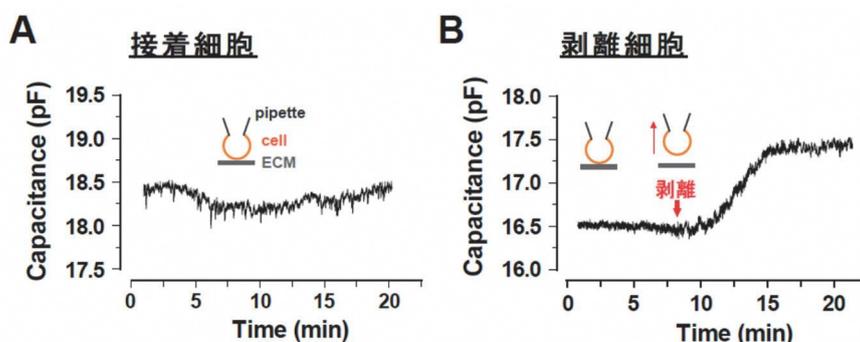


図 4 パッチクランプ法による HT-29 細胞の膜容量測定

## 細胞剥離により誘導される細胞死に対する nNaK の機能解析

正常な細胞は、基質から剥がれることでアポトーシスによる細胞死が引き起こされるが、癌細胞は細胞剥離により誘導される細胞死から逃れる機構を有しており、CTC として血中を巡り他の臓器へ転移する。nNaK は癌細胞の剥離時に原形質膜に移行し、ナトリウムポンプ機能が上昇することから、細胞剥離が誘導する細胞死に対する nNaK の機能を検討した。nNaK に対する特異的な siRNA を HT-29 細胞にトランスフェクションすることで、nNaK の発現は有意に減少した (図 5A)。また、siRNA に加えて遺伝子クローニングしたヒト nNaK 発現ベクターを同時にトランスフェクションした細胞 (O/E) では nNaK の発現は回復した (図 5A)。

まず、MTT アッセイにより、ミトコンドリア活性を測定することで HT-29 細胞のバイアビリティを評価した。接着細胞では nNaK ノックダウンにより、ミトコンドリア活性に有意な変化は見られなかったが、剥離細胞では、nNaK ノックダウン細胞の活性が有意に減少した (図 5B)。この活性減少は、ヒト nNaK を過剰発現させることで回復した (図 5B)。次に、caspase 3/7 活性を測定することで、アポトーシスについて検討した。MTT アッセイと同様に、接着状態では nNaK ノックダウンによる有意な変化は見られなかったが、剥離細胞において nNaK ノックダウン細胞で有意に caspase 3/7 活性の上昇が観察された (図 5C)。従って、nNaK は剥離がん細胞の生存に重要に誘導機能を担っている可能性が明らかとなった。

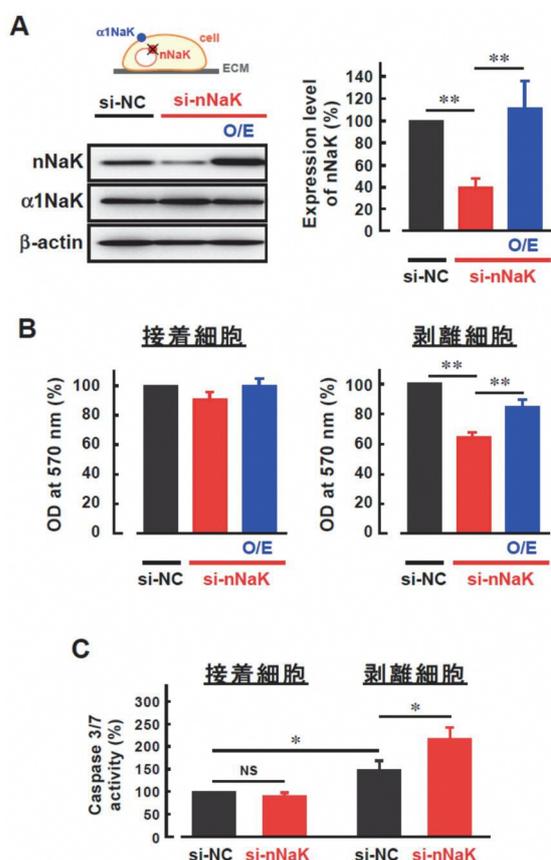


図 5 nNaK ノックダウンが剥離 HT-29 細胞のバイアビリティおよびアポトーシス誘導に与える効果の検討

## ヒキガエル由来強心配糖体のヒト大腸癌細胞の増殖能に与える効果の検討

ヒキガエル毒素由来強心配糖体の HT-29 細胞の増殖能に対する効果を検討した。本研究では、8 種類の強心配糖体 (bufalin、gamabufotalin、telocinobufagin、cinobufagin、cinobufotalin、resibufogenin、desacetylcinobufagin、3 $\alpha$ -resibufogenin) を用いた (図 6)。各薬物について、30 nM と 300 nM の両濃度について HT-29 細胞の増殖能を検討した。30 nM では、bufalin と gamabufotalin は HT-29 細胞の増殖を有意に抑制したが、他の強心配糖体は有意な効果を示さなかった (図 7)。300 nM では bufalin と gamabufotalin に加えて、telocinobufagin、cinobufagin、cinobufotalin が HT-29 細胞の増殖を有意に抑制したが、resibufogenin、desacetylcinobufagin、3 $\alpha$ -resibufogenin では有意な効果は見られなかった (図 7)。

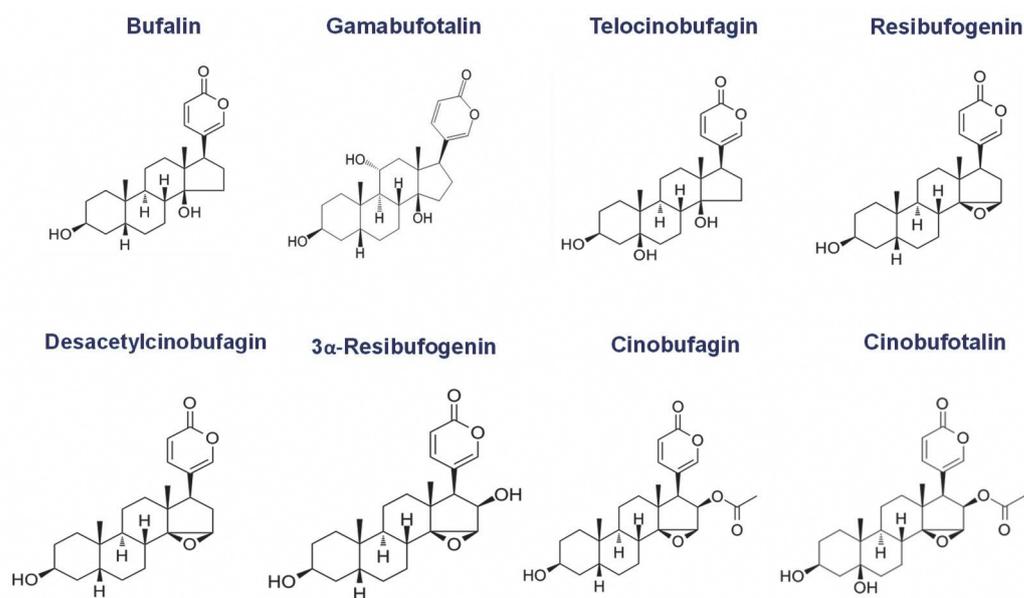


図 6 本研究で用いたヒキガエル毒素由来強心配糖体

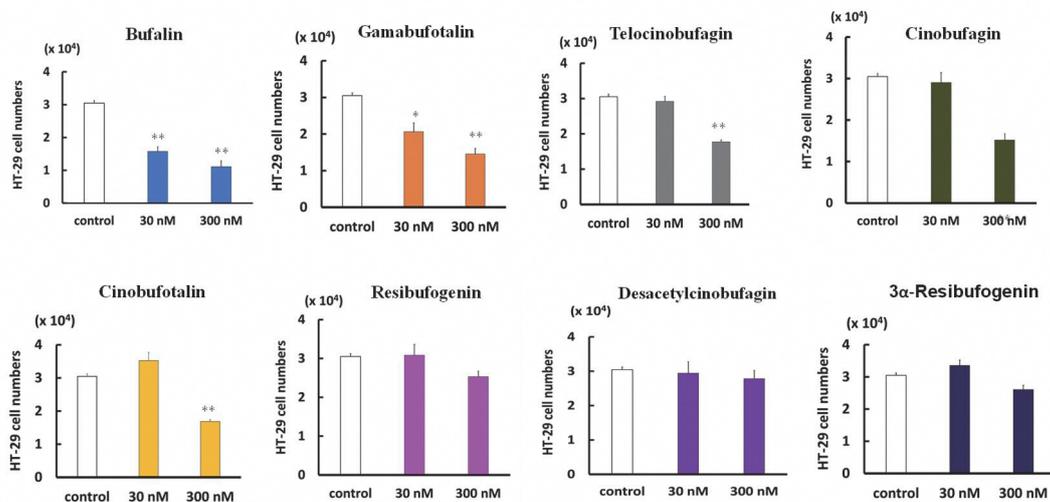


図 7 ヒキガエル毒素由来強心配糖体の HT-29 細胞の増殖能に対する効果

### 【まとめ】

以上、本年度の成果より、CTC の発生につながる原発巣からのがん細胞の剥離により、細胞質内に存在する nNaK が原形質膜へ移行し、がん細胞のナトリウムポンプ機能を亢進させることで転移癌細胞の生存に関与することを見出した。他方、これまでに我々は、強心配糖体の抗がん作用に、膜マイクロドメインに存在する非ポンプ型の  $\alpha$ 1NaK が関与することを報告している。今後、奥村らが作成する新規の CTC 研究モデルを用いて、CTC における nNaK および非ポンプ型  $\alpha$ 1NaK の病態生理機能、およびヒキガエル由来の強心配糖体の CTC 抑制機構におけるナトリウムポンプの新規機能について明らかにすることで、ナトリウムポンプが関与する新規 CTC 制御機構および新規 CTC 治療法開発の研究基盤の構築を目指す。

### 【学会発表】

藤井 拓人, 清水 貴浩, 永森 收志, 小泉 桂一, 田渕 圭章, 奥村 知之, 藤井 努, 竹島 浩, 酒井 秀紀. がん細胞膜と細胞接着面との接着解消にともなう細胞内ナトリウムポンプの動態変化. 2020 年度 生理研研究会「生体コモンスペース研究会」2021 年 2 月 19 日.