

令和元年6月17日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08727

研究課題名(和文)新たに同定されたがん転移促進分子EMU1の機能解析と臨床的意義の探索

研究課題名(英文) Functional analysis and clinical significance of EMU1 newly identified as a candidate of metastasis-promoting molecule

研究代表者

杉野 隆 (Sugino, Takashi)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：90171165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は転移促進分子候補EMU1の機能と癌における発現の解析である。細胞へのEMU1遺伝子導入実験では転移は増強しなかったが、EMU1に細胞-基質間の接着阻害作用と細胞の増殖促進作用という2つの分子機能があることが明らかとなった。人体におけるタンパクの発現解析では、EMU1は胃底腺主細胞と膵島β-cellに特異的に発現し、腫瘍では乳癌や大腸癌に発現頻度が高かった。EMU1は発現の特性から細胞特異的な生理作用が推定され、また、癌における高発現から癌治療における新たな標的分子となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EMU1は2004年にクローニングされて以来論文がなく、分子機能や疾患との関わりは不明であった。本研究ではEMU1が多機能性分子であり、細胞外では細胞-基質間の接着を阻害し、細胞内では増殖を促進することが明らかとなった。また、EMU1が特定の細胞にのみ発現することから、何らかの生理機能に関わると考えられる。さらに、癌に発現頻度が高いことから、癌治療の分子標的になり得ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Our previous analysis using mouse metastasis model identified EMU1 as a potential candidate of the metastasis-promoting genes. We sought to clarify the molecular function of EMU1 and the protein expression in the human tissues. Overexpression and knockdown studies demonstrated two novel molecular functions of EMU1; inhibition of cell-matrix adhesion and promotion of cell growth, whereas the high-expressor did not exhibited enhanced metastatic activity. Expression analysis revealed exclusive expression in the chief cells of the stomach and the beta-cells of the pancreatic islet in normal tissues. In cancers, EMU1 was expressed in breast and colon cancers with high incidence. Because of its limited expression in the normal tissues, cell-specific functions of this molecule are presumed. In addition, increased expression in human cancer cases implies that EMU1 may be a new molecular target in cancer therapy.

研究分野：実験病理

キーワード：癌転移 分子機能 細胞接着 細胞増殖 発現分布

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

- 1) 転移は腫瘍の悪性形質を決定づける最も重要な因子であるが、転移のメカニズムは十分解明されておらず、転移に的を絞った治療薬の開発は立ち後れている。我々は転移のメカニズムを明らかにし、責任分子を同定してがん治療へ応用するために、マウス乳癌から種々の様式で転移するモデルを作製し、解析を行ってきた（図1）。その結果、Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), Semaphorin 3B (SEMA3B), S100A14 など転移を促進する分子群を同定し、報告した。EMU1 はこれらの分子とともに転移を促進する分子候補の1つである（表1）。
- 2) EMU1 は腎の発生後期に一過性に発現するタンパクとして2004年にクローニングされ、細胞外基質との相互作用が推定されているが、分子機能や発現分布、疾患との関わりは不明であった。我々は本研究に先立ち、EMU1 の分子機能やがん転移における役割を明らかにするために、EMU1 遺伝子の発現を操作できる実験システムの構築と病理標本で検出可能なEMU1 特異抗体を作製してきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) がん転移における EMU1 の役割、2) EMU1 の分子機能、3) EMU1 の臨床的意義である。

- 1) EMU1 の転移における役割：EMU1 が転移にどのように関与するのかを実験的に明らかにする。マウス乳癌細胞株の EMU1 を増強または抑制し、転移への影響と転移に関わる要因について解析する。
- 2) EMU1 の分子機能：予備実験から、EMU1 には反接着作用と増殖促進作用が推測されている。本研究では EMU1 と細胞外基質との相互作用および EMU1 と増殖シグナル伝達の関連を明らかにする。
- 3) EMU1 の臨床的意義：EMU1 抗体を用いて正常ヒト組織における EMU1 の分子発現を免疫組織化学的に調査する。また、種々のがん症例の病理標本を用い、EMU1 タンパクの発現と臨床病理学的因子との相関を解析する。

3. 研究の方法

1. 実験的解析

マウス乳がん細胞株 MCH66 から分離した高転移細胞（66Lu10, 66HM）と低転移細胞（66LM, 66Lu1, 66-4）を用い、がん転移への影響と分子機能の解析を行った。

1) がん転移との関連

- a) EMU1 のがん転移促進作用を検討するために、複数の細胞株に EMU1 を安定に発現亢進または抑制する細胞を作製し、マウスに移植して転移能の変化を観察した。
- b) EMU1 の発現ベクターを導入した一過性発現系や EMU1 に対する特異的な siRNA によるノックダウン系を用いて、がん細胞の EMU1 分子発現を変動させ、増殖、浸潤、運動、細胞接着などがんの悪性形質に関わる性質を解析した。

2) 分子機能解析

- a) EMU1 の発現が低い細胞に EMU1 の発現ベクターを導入して発現を亢進させ、EMU1 タンパクの細胞内局在や分泌されたタンパクの分布、細胞外基質中の構造をマウス EMU1 抗体 (IBL) を用い、Western blotting、免疫蛍光法、免疫組織化学により観察した。さらに、EMU1 を強制発現またはノックダウンした細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、EMU1 に関わる pathway 解析を行った。
- b) EMU1 と細胞外基質成分との相互作用を調べるために、EMU1 と結合する細胞外基質タンパクの同定を行った。EMU1 高発現細胞を培養した後、細胞を剥離した plate に laminin とそのペプチド、collagen-I, collagen-IV, fibronectin などの細胞外基質成分を入れ、ELISA-like assay を行った。
- c) EMU1 と細胞増殖との関連を明らかにするために、EMU1 を強制発現またはノックダウンした細胞の細胞周期を flow cytometry により解析した。

2. EMU1 の臨床的意義：静岡がんセンター病理診断科の手術症例のパラフィン標本を用い、正常組織や種々のがん組織を抗ヒト EMU1 抗体 (IBL) を用いて免疫染色し、EMU1 タンパクの発現分布や細胞内局在、悪性度との関わりを調べた。

4. 研究成果

1) EMU1 の高・低発現細胞の作製：マウス乳がん細胞 MCH66 の高転移細胞 66HM, 66Lu10 は EMU1 の発現が高く、低転移性細胞 66LM は EMU1 の発現が低かった (図 1)。66LM に EMU1 の発現 vector を導入し、安定高発現細胞 66LM-EMU1 を作製した (図 2)。また、siRNA を用いて 66HM, 66Lu1 の EMU1 発現をノックダウンした (図 3)。

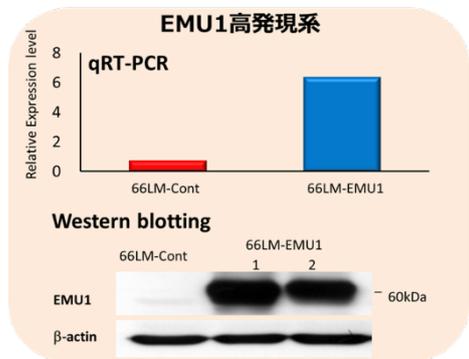
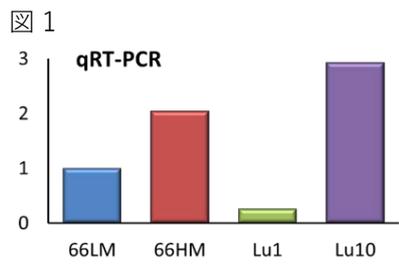
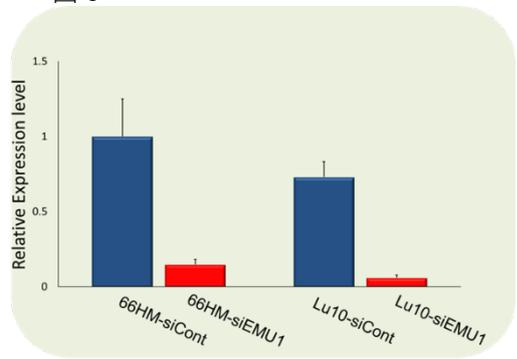


図 3



2) EMU1 発現の転移への影響：EMU1 安定高発現細胞 66LM-EMU1 をマウスの乳腺内に同所移植したが、肺転移結節数に有意の増加・減少は認めなかった。EMU1 分子単独での転移能増強作用はないと考えられた。引き続き、安定低発現系による検討が必要である。

3) EMU1 の局在

a) In vitro: 66LM-EMU1 の各分画を抽出し、EMU1 タンパクを Western blot した。EMU1 タンパクは細胞内と細胞外基質に単量体として、培養上清中に多量体として局在すると考えられた (図 4)。EMU1 遺伝子の強制発現細胞では EMU1 タンパクは細胞内のみならず、細胞外に分泌され、細胞外基質にブラン状に沈着した (図 5)。

図 4

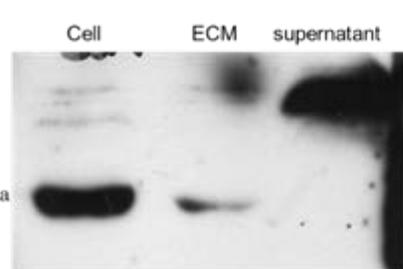
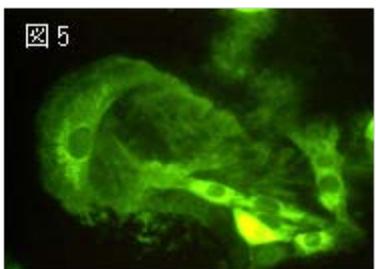
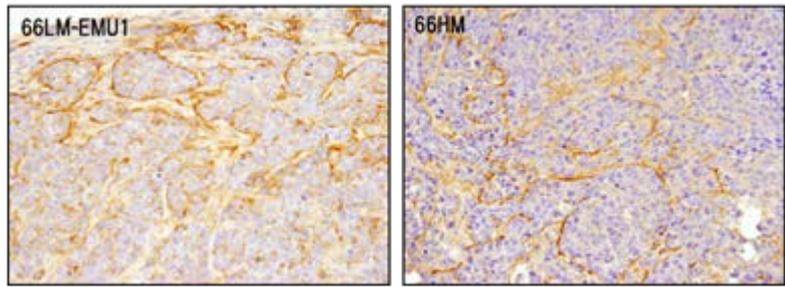


図 5



b) In vivo: マウス乳癌の移植腫瘍では EMU1 タンパクは腫瘍胞巣周囲の細胞外基質に局在していた (図 6)。

図 6



- 4) 反接着作用：強制発現した細胞は培養初期には培養皿に付着して増殖するが、コンフルエント状態になると剥離し、凝集してスフェロイドを作り、浮遊して増殖した。細胞が剥離した培養皿には新たに撒いた細胞は接着しなかった (図7, 8)。さらに、リコンビナント EMU1 タンパクをコーティングした培養皿に細胞を撒く実験では、EMU1 の濃度依存性に細胞の接着が阻害された (図9)。このことは EMU1 タンパクに細胞-基質間の接着を阻害する作用があることを意味する。

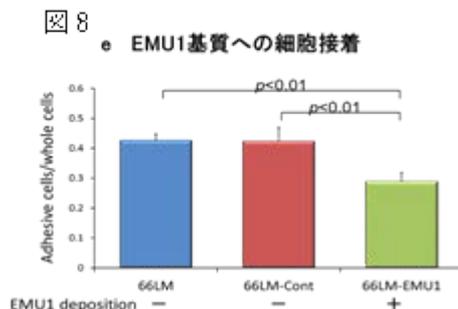
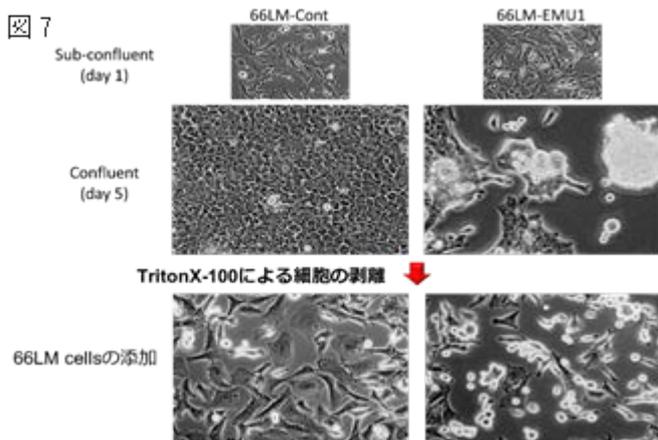
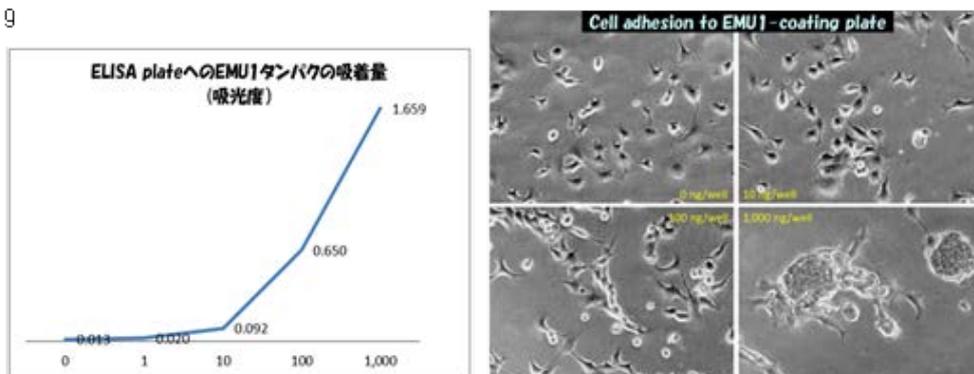
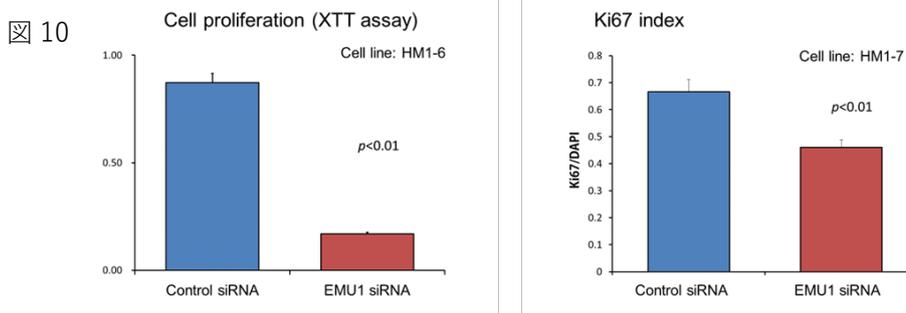


図9



- 5) EMU1 の増殖促進作用：以下の a-c の実験により、EMU1 には cell cycle を促進し、細胞の増殖を促す分子機能があることが明らかになった。

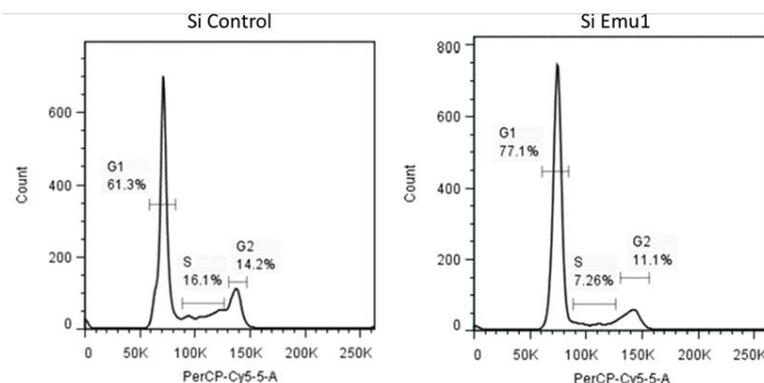
- a) Cell lines の siRNA による KD 実験により、EMU1 を KD した細胞は細胞増殖が抑制され、Ki67 index が有意に減少した (図10)。



- b) 細胞への EMU1 強制発現系と KD 系により発現が変化した遺伝子の発現データを用いたパスウェイ解析から、EMU1 は細胞周期の促進に関与することが示された。

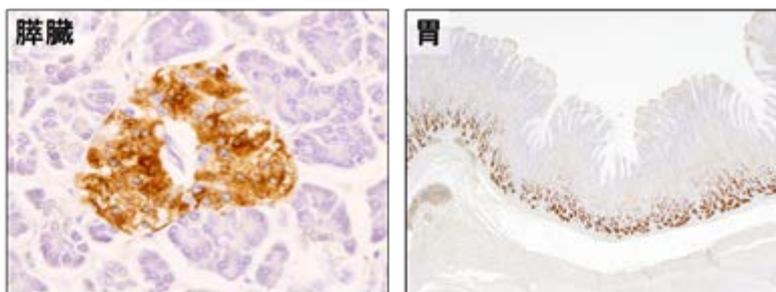
- c) ヨウ化プロピジウムを用いた細胞周期のフローサイトメトリー解析では、EMU1 のKDによりHMのS期への導入が遅延した(図11)。

図 11 HM1-7



- 6) ヒト正常組織における EMU1 タンパクの分布：パラフィン標本を用いた抗ヒト EMU1 抗体での免疫染色では、EMU1 タンパクは成人の正常臓器において、膵ラ氏島β細胞、胃底腺主細胞に特異的に発現していた(図12)。

図 12



- 7) がん症例における EMU1 タンパクの発現：HOPE project のデータを用いた解析では EMU1 mRNA の発現亢進は全がん種の 24%に見られ、特に乳がん、大腸がんに頻度が高かった。また、がん症例の免疫染色でも乳がん、腎がん、大腸がん EMU1 タンパクが高発現していた。

結論：本研究では EMU1 の多機能性分子であり、細胞外では細胞-基質間の接着阻害、細胞内では増殖促進に関与することを明らかにした。また、EMU1 が特定の正常細胞に限定的な発現をすることが明らかになり、何らかの生理機能に関わると考えられる。さらに、がん発現頻度が高いことから、がんのバイオマーカーや治療の分子標的になり得ることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- ① Sugino T, et al. Identification of S100A14 as a metastasis-promoting molecule in a murine organotropic metastasis model. Clin. Exp. Metastasis, In print.
- ② Iizuka A, Sugino T, et al. A T-cell-engaging B7-H4/CD3-bispecific Fab-scFv Antibody Targets Human Breast Cancer. Clin Cancer Res. 2019, 25(9): 2925-34. doi: 10.1158/1078-0432.
- ③ Akiyama Y, Kiyohara Y, et al. Immune response-associated gene profiling in Japanese melanoma patients using multi-omics analysis. Oncol Rep. 2018, 39(3): 1125-31. doi: 10.3892/or.2017.6173.

〔学会発表〕(計2件)

- ① 杉野隆、新規がん転移促進分子 EMU1 の同定と機能解析、第 105 回日本病理学会総会、2016
- ② 宍戸奈美子、杉野隆、新規がん転移促進分子 EMU1 の細胞内局在と正常・腫瘍組織における発現分布、第 105 回日本病理学会総会、2016

〔図書〕(計1件)

杉野隆、西村書店、ルービン病理学 臨床医学への基盤、2017、161-215

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。