

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08657

研究課題名(和文) がん浸潤・転移を制御する新規標的分子：EMP1のがん細胞における分子作用機序

研究課題名(英文) Novel cancer therapeutic target, epithelial membrane protein 1 (EMP1), investigation of the molecular mechanism inducing invasion and metastasis

研究代表者

清水 昭男 (Akio, Shimizu)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：30769279

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)：がんの浸潤・転移の制御機構を解明する研究を行なった。がん細胞と周囲組織の接触モデル作製しがん細胞でEpithelial membrane protein 1 (EMP1) の発現が上昇していることを見出した。マウスモデルまたは細胞培養系においてEMP1発現の上昇ががんの浸潤・転移を亢進することを明らかにした。悪性度の高いがん患者の検体でEMP1が有意に高く発現していることを明らかにした。EMP1の細胞内領域に結合する分子Copine-IIIを質量分析法で新たに見出し、その複合体はSrc、Vav2、Rac1を活性化することでがん細胞の運動を亢進させ、がんの浸潤・転移を促進していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、がん細胞と正常細胞の相互作用によってEMP1の発現が上昇することを明らかにし、浸潤・転移への寄与を明らかにした点に新規の学術的意義がある。EMP1は悪性度の高いがん患者検体においてその発現が上昇していたことを明らかにしたが、EMP1は細胞膜タンパク質であり、外部から抗体や薬剤などでその作用を阻害しやすいことは臨床応用へ進む上で大きな利点である。本研究の成果から、がんの治療標的あるいは分子マーカーとしてEMP1は有用である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Metastatic cancer is frequently led to fatality. Thus, understanding of the underlying mechanism is important to reduce it. The expression of epithelial membrane protein 1 (EMP1) was upregulated in prostate cancer cells by contacting with surrounding stroma cells. EMP1 has four transmembrane domains. Overexpression of EMP1 in prostate cancer, LNCaP cells (EMP1-LNCaP cells) enhanced invasiveness, which was also observed in other types of cancer cells. In in vivo analysis, EMP1-LNCaP cells implanted in the prostate metastasized to lymph nodes and the lung but the parental LNCaP did not. Next, copine-III was identified by usage of tandem mass spectrometry as a novel molecule binding to the intracellular region of EMP1. The EMP1-copine-III complex induced the signal via Src, Vav2, and Rac1, leading to the enhanced cancer cell migration and invasion. As clinical implications, increased EMP1 expression was observed in the samples from prostate cancer patients with higher Gleason scores.

研究分野：血管新生

キーワード：がん 浸潤 転移 EMP1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

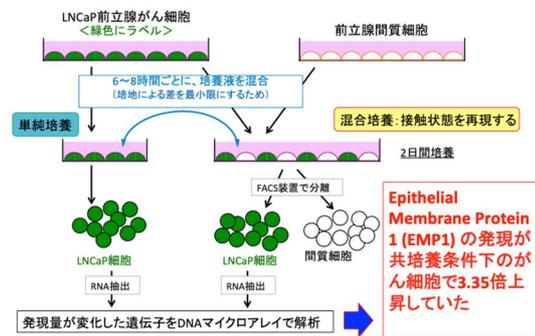
世界的に生命を脅かす疾患であるがんの日本における罹患者数は、毎年およそ100万人であり、その死亡者数は年々増加しており、2017年のがんによる死亡者は40万人弱であった(1)。その死亡原因の約90%はがんの転移によるものである。がんは自己増殖能を獲得した後、基底膜構造を分解し、間質組織へと浸潤する。さらに血管、リンパ管内への浸潤し、遠隔臓器へと転移する(2)。がんの浸潤・転移は一連の過程が生物学的に複雑であるため、その詳細な分子機構について十分に解明されていない。近年のがん研究において、浸潤・転移を誘発する要因としてがん細胞自身のみならず、がん細胞周囲のがん微小環境が非常に重要であることが明らかになってきている(3、4)。

2. 研究の目的

がん細胞と間質細胞の接触によって発現が上昇する“がん浸潤・転移亢進遺伝子”を同定し、その分子機構を解明し、がん治療の基礎として貢献することである。

3. 研究の方法

(1) がんの浸潤・転移の分子機構を研究するにあたり、その第一段階である、がん細胞が基底膜を超えて周辺組織に浸潤した際に生じる“がん細胞と間質細胞の接触”に焦点を当て、近年日本や欧米での発症率が急激に増加している前立腺がんの細胞をモデルにして研究を開始した。ヒト前立腺がん由来 LNCaP 細胞と前立腺間質細胞を新規に独自開発した混合培養系で培養し、両細胞の接触によってがん細胞での発現が変化する遺伝子のスクリーニングを行った。具体的には、ヒト前立腺がん由来 LNCaP 細胞を緑色蛍光タンパク質で標識した後、前立腺間質細胞と2日間共培養した。その際、培養液中の液性因子の影響をできるだけ排除するために、共培養中の培養上清と、コントロールとして単独培養している LNCaP 細胞の培養上清とを6~8時間おきに交換した。培養終了後、共培養した細胞から緑色蛍光タンパク質標識された LNCaP 細胞をフローサイトメトリーで分離・回収した。この LNCaP 細胞および単独培養の LNCaP 細胞から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイで遺伝子発現の差異を比較解析した。単独培養したコントロールの LNCaP 細胞と比較して、共培養した LNCaP 細胞で発現が亢進する遺伝子を選別した(図1)。



(2) 上記の方法によって同定した分子と相互作用をする細胞内分子を同定するために、この9アミノ酸で構成されるペプチドを固相化した樹脂を作製した。LNCaP 細胞の細胞溶解液をそのペプチド樹脂と混合し、結合したタンパク質を SDS-PAGE によって分離した。コントロール樹脂と比較してペプチドを固相化した樹脂に特異的に結合したタンパク質を質量分析した。

(3) 滋賀医科大学泌尿器科との共同研究により、ヒト前立腺がん患者のがん切除標本を用いて上記の方法によって同定した分子の発現量を解析した。

4. 研究成果

(1) 共培養の結果同定した遺伝子は Epithelial Membrane Protein1 (EMP1) であり EMP1 ががんの浸潤・転移に関してどのように作用するか検討するため、EMP1 を過剰発現させた LNCaP (EMP1-LNCaP) 細胞と EMP1 をほとんど発現していない親株の LNCaP 細胞をそれぞれヌードマウスの前立腺に移植し6週間観察した。その結果、親株の LNCaP 細胞を移植したマウスでは遠隔臓器への転移はまったくみられなかったが、EMP1-LNCaP 細胞を移植したマウスでは肺、腹部リンパ節への転移が有意に増加した。一方、EMP1-LNCaP 細胞と親株細胞の増殖速度は同じであり、ヌードマウスの前立腺に形成された原発巣腫瘍の大きさに差がなかった。このことより、EMP1 の高発現はがん細胞の増殖とは独立して、がん細胞の転移能を亢進していることが示された。

次に、EMP1 ががん転移を促進する機序を検討した。トランズウェルを用いた実験で、EMP1 高発現 LNCaP 細胞株は、EMP1 低発現 LNCaP 細胞株と比較して、遊走能が有意に亢進していた。集合性細胞遊走を解析する実験でも EMP1 高発現 LNCaP 細胞株の細胞移動度は顕著に高いことが示された。さらに、マトリゲルを基底膜とみなした浸潤実験においても同様の結果が得られた。これらの結果から EMP1 を高発現することによって、がん細胞で運動能および浸潤能が亢進することが明らかになった。

(2) EMP1 の二つの細胞外ドメイン間に存在する細胞内ドメインは九つのアミノ酸で構成されている。この領域で EMP1 と結合する分子を探索したところ、質量分析により Copine-III を同定した。Copine-III は 537 アミノ酸からなる分子量約 60 kDa の細胞内タンパク質である。N 末端側にカルシウム依存性タンパク質結合ドメイン (C2 ドメイン) が繰り返されており (C2-1 と C2-2) 続いてタンパク質間の相互作用を担うロスマンフォールド構造を有している von Willebrand Factor type A (vWA) ドメインが存在する。Copine-III と EMP1 とがどのように結合しているか共免疫沈降実験で検討したところ、Copine-III の C2-2 および vWA ドメインが EMP1 の細胞内領域との結合に必要である (C2-1 ドメインは結合に必要な) ことがわかった。EMP1 高発現 LNCaP 細胞株で Copine-III をロックダウンすると、細胞遊走は有意に低下した。この細胞に野生型 Copine-III または EMP1 に結合できない Copine-III を再発現させると、野生型 Copine-III を再発現させた細胞では細胞遊走が元に戻ったのに対し、EMP1 に結合できない Copine-III を再発現させた細胞では細胞遊走は低下したままであった。この結果から、EMP1 と Copine-III の結合が LNCaP 細胞の遊走亢進に重要であることがわかった。さらに詳細な解析により、EMP1 と Copine-III が結合することで、チロシンリン酸化酵素 Src が活性化され、活性化された Src は、低分子量 G タンパク質 Rac1 のグアニンヌクレオチド交換因子の Vav2 をリン酸化して活性化し、最終的に Rac1 の活性化が促進されることを明らかにした (図 2)。Rac1 の活性化により、LNCaP

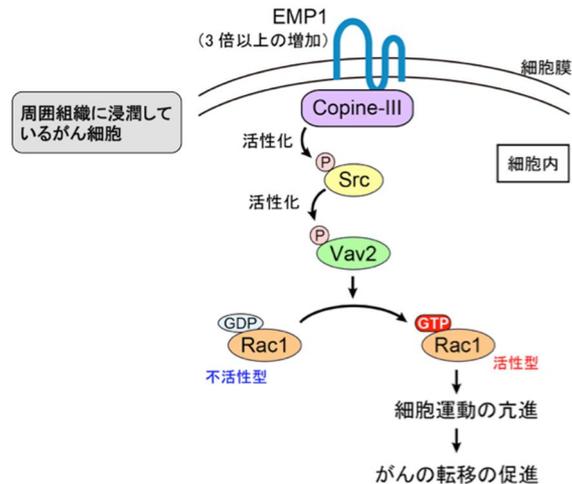


図2、EMP1によるがん転移を促進する分子機構

細胞で細胞運動の亢進に必要な細胞先端端の形成が増加することも見いだしている。以上の EMP1 による細胞内シグナル伝達機構の活性化、細胞形態の変化、細胞運動能・浸潤能の亢進は、前立腺がん細胞だけでなく、乳がん細胞や大腸がん細胞でも同様に認められることから、EMP1 は多くのがんにおいて、その浸潤・転移を促進していることが強く示唆された。

(3) 滋賀医科大学泌尿器科との共同研究により、ヒト前立腺がん患者のがん切除標本を用いて EMP1 の発現量を解析した。その結果、高グリーソンスコアの転移能の高い前立腺がん組織で EMP1 発現が有意に上昇していた。また、免疫組織染色での解析では、EMP1 はがん細胞が浸潤していく間質組織との接触面に強く発現していた(図 3)。このことは、“間質細胞とがん細胞の接触”によるがん微小環境が EMP1 の発現を上昇させ、がんの浸潤・転移を亢進させるのに寄与していると考えられた。

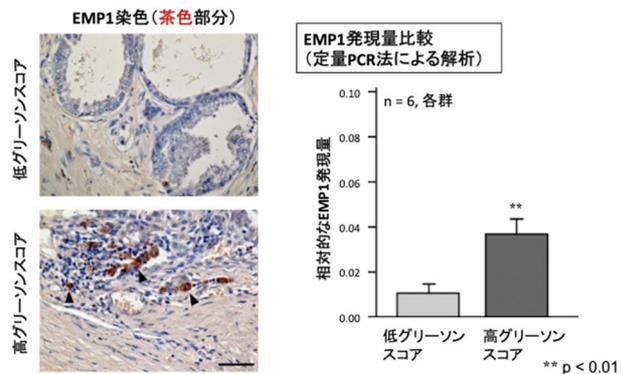


図3、ヒト前立腺におけるEMP1の発現
高グリーソンスコアで悪性度の高い前立腺がん症例において、EMP1の発現量が増加していた(矢頭)

引用文献

- 1) 国立がん研究センターがん情報サービス最新がん統計 https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html
- 2) Guan, X. (2015) *Acta Pharm. Sin. B.* 5, 402-418.
- 3) Sleeboom, J.J.F., Eslami Amirabadi, H., Nair, P., Sahlgren, C.M., & den Toonder, J.M.J. (2018) *Dis. Model. Mech.* 11, dmm033100.
- 4) Wang, K. (2018) in *Cancer Metastasis* (Basbinar, Y. Ed.) Chapter 3. pp.27-37, IntechOpen, London.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Shimizu Akio, Zankov Dimitar P., Sato Akira, Komeno Masahiro, Toyoda Futoshi, Yamazaki Satoru, Makita Toshinori, Noda Taichi, Ikawa Masahito, Asano Yoshihiro, Miyashita Yohei, Takashima Seiji, Morita Hiroshi, Ishikawa Taisuke, Makita Naomasa, Hitosugi Masahito, Matsuura Hiroshi, Ohno Seiko, Horie Minoru, Ogita Hisakazu	4. 巻 34
2. 論文標題 Identification of transmembrane protein 168 mutation in familial Brugada syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 6399 ~ 6417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201902991R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsushima Shoko, Shimizu Akio, Kondo Manami, Asano Hirotsugu, Ueno Nobuhiro, Nakayama Hironao, Sato Naoko, Komeno Masahiro, Ogita Hisakazu, Kurokawa-Seo Misuzu	4. 巻 10
2. 論文標題 Anosmin-1 activates vascular endothelial growth factor receptor and its related signaling pathway for olfactory bulb angiogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-57040-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ahmat Amin, Shimizu, Ogita	4. 巻 11
2. 論文標題 The Pivotal Roles of the Epithelial Membrane Protein Family in Cancer Invasiveness and Metastasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1620 ~ 1620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11111620	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Noriaki, Asano Yoshihiro, Fujita Masashi, Matsuura Norio, Kobayashi Hatasu, Shimizu Akio, Ogita Hisakazu, Miura Katsuyuki, Ueshima Hirotsugu, Yamagishi Masakazu, Kitakaze Masafumi, Takashima Seiji	4. 巻 139
2. 論文標題 Mutant KCNJ3 and KCNJ5 Potassium Channels as Novel Molecular Targets in Bradyarrhythmias and Atrial Fibrillation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 2157 ~ 2169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Akio, Zankov Dimitar, Kurokawa-Seo Misuzu, Ogita Hisakazu	4. 巻 19
2. 論文標題 Vascular Endothelial Growth Factor-A Exerts Diverse Cellular Effects via Small G Proteins, Rho and Rap	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1203 ~ 1203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19041203	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ahmat Amin MKB, Shimizu A, Zankov DP, Sato A, Kurita S, Ito M, Maeda T, Yoshida T, Sakaue T, Higashiyama S, Kawauchi A, Ogita H	4. 巻 37
2. 論文標題 Epithelial membrane protein 1 promotes tumor metastasis by enhancing cell migration via copine-III and Rac1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5416-5434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-018-0286-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zankov DP, Sato A, Shimizu A, Ogita H	4. 巻 81
2. 論文標題 Differential Effects of Myocardial Afadin on Pressure Overload-Induced Compensated Cardiac Hypertrophy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1862-1870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-17-0394	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zankov Dimitar P., Shimizu Akio, Tanaka-Okamoto Miki, Miyoshi Jun, Ogita Hisakazu	4. 巻 7
2. 論文標題 Protective effects of intercalated disk protein afadin on chronic pressure overload-induced myocardial damage	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 39335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep39335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu A, Ogita H	4. 巻 89
2. 論文標題 A therapeutical potential of Dipeptidyl Peptidase III as a Novel Anti-hypertensive drug with the Angiotensin II Hydrolysis Activity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Seikagaku Mini review (Japanese)	6. 最初と最後の頁 449-452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 清水昭男、扇田久和
2. 発表標題 ジペプチジルペプチダーゼ-3が 糖尿病での心腎機能悪化を抑制
3. 学会等名 CVMW2019 心血管代謝週間
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水昭男、Mohammad Khusni Bin Ahmat Amin、佐藤朗、扇田久和
2. 発表標題 Epithelial membrane protein 1はRac1を活性化してがん細胞の遊走を促進させがんの浸潤・転移を促進する
3. 学会等名 第92回 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大東親生、清水昭男、Xiaoling Pang、扇田久和
2. 発表標題 ジペプチジルペプチダーゼ-3が糖尿病での腎機能悪化を抑制
3. 学会等名 第65回 日本生化学会 近畿支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口有汰、清水昭男、Xiaoling Pang、Dimitar P. Zankov、石田哲生、扇田久和
2. 発表標題 糖尿病性腎症に対するジペプチジルペプチターゼIIIの保護作用
3. 学会等名 第65回日本生化学会近畿支部例会（兵庫医科大学）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Xiaoling Pang、Akio Shimizu、Dimitar P. Zankov、Akira Sato、Tetsuo Ishida、Hisakazu Ogita
2. 発表標題 Novel Therapeutic Role for Dipeptidyl Peptidase III in the Treatment of Diabetic Nephropathy
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（京都国際会議場）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mohammad Khusni Ahamad bin amin、Akio Shimizu、Dimitar P. Zankov、Akira Sato、Hisakazu Ogita
2. 発表標題 Deciphering Signaling Pathway of a Novel Cancer Pro-invasive and -metastatic Molecule, Epithelial Membrane Protein 1
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田 亜佑美、清水昭男、門之園哲哉、近藤科江、瀬尾美鈴
2. 発表標題 VEGF-A/Neuropilin-1シグナルを阻害する膜透過性ペプチドは、腫瘍の成長と転移を抑制する
3. 学会等名 第21回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Dimitar P. Zankov, Akio Shimizu, Akira Sato, Hisakazu Ogita
2. 発表標題 Critical Role of Myocardial Afadin in Cardiac Protection during Chronic Mechanical Overload
3. 学会等名 第64回 日本生化学会 近畿支部例会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考