

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16724

研究課題名(和文)膀胱癌浸潤転移に関わる新規ヒアルロニダーゼTMEM2の機能解明

研究課題名(英文)Functional analysis of TMEM2, a novel hyaluronidase involved in bladder cancer invasion and metastasis.

研究代表者

米山 美穂子 (Yoneyama, Mihoko)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：50791696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膜貫通タンパク質2(TMEM2)は、数種の固形癌悪性化の関与が報告されている。我々は、膀胱癌の浸潤および上皮間葉転換(EMT)に伴うTMEM2発現を検討した。病理組織検体を免疫組織化学的に解析した結果、TMEM2発現は病理学的病期および浸潤パターンによって変化することを明らかにした。細胞株では、EMT表現型を示した筋層浸潤性細胞でTMEM2発現は低く、非筋層浸潤性細胞では高かった。非筋層浸潤性細胞を薬剤にてEMTを誘導すると、細胞膜のTMEM2発現が有意に低下した。TMEM2発現は非浸潤癌で高く、一方で筋層浸潤細胞や"partial EMT"の際にTMEM2発現が低いことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌微小環境におけるヒアルロン酸の分子サイズは癌の増殖、浸潤に影響を与える。本研究の成果によって、高分子ヒアルロン酸を分解するTMEM2が膀胱上皮に発現していること、また悪性度の低い癌やクラスターを形成する癌で高発現である一方、浸潤性の高い癌では低下していることが明らかとなった。本研究成果によって、これまでのヒアルロン酸分解における定説であったHYAL依存的な古典的分解経路とCEMIP/KIA1199による分解経路だけでは説明しきれなかった代謝機構を考えるための手がかりとなりうる。

研究成果の概要(英文)：transmembrane protein 2 (TMEM2), which serves as a reportedly functions in malignancy of several solid tumors. We investigate potential changes in expression of TMEM2 during bladder cancer (BCa) invasion and over the course of the epithelial mesenchymal transition (EMT). Immunohistochemical analysis revealed that TMEM2 expression changed with pathological stage (pT) and infiltration pattern (INF) and was highest in pTa-pT1 of INFa tumors and significantly lower at stages from pTa-pT1 to pT2 or 3 in INFb or INFc. BCa cell lines showed that muscle-invasive cells with low TMEM2 expression exhibited EMT phenotypes in vitro, in contrast to high TMEM2-expressing non-muscle invasive cells. EMT-induced non-muscle invasive cells also showed significantly decreased plasma membrane expression of TMEM2. Our data suggested TMEM2 expression is higher in non-invasive cancers, whereas invasive cancer cells are less likely to express TMEM2 during muscle-invasion and "partial EMT".

研究分野：分子生物学

キーワード：TMEM2 ヒアルロン酸代謝 EMT 膀胱癌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックスの主要成分であるヒアルロン酸は、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸が交互に結合した巨大な高分子化合物である。正常組織では生合成と分解のバランスにより一定量に保持されるが、癌ではヒアルロン酸は異常に蓄積、または分子サイズの低下が起こり、癌細胞の接着、遊走、増殖、浸潤および癌周囲の微小血管新生を促進する。近年、高分子ヒアルロン酸は癌抑制性シグナル経路を活性化する一方で、低分子ヒアルロン酸は癌抑制性シグナルの不活性化を介して癌の発症・進展を促すことが明らかにされた (Ooki T et al. *Dev Cell*, 2019)。癌と癌細胞周囲のヒアルロン酸の相互作用はヒアルロン酸分子サイズの違いで、癌抑制的にも促進的にも作用しうることから、その分子サイズが鍵と考えられる。

2. 研究の目的

これまで、ヒアルロン酸分解には、HYAL 依存的な古典的分解経路と CEMIP/KIA1199 による細胞内のクラスリン被覆小胞によるヒアルロン酸分解経路が知られていたが、高分子ヒアルロン酸を細胞内に取り込み可能なサイズに分解するヒアルロン酸分解酵素は発見されていなかった。最近、弘前大学泌尿器科では、細胞膜表面で高-中分子ヒアルロン酸を低分子ヒアルロン酸まで分解する活性を有する新規ヒアルロン酸分解酵素として、Transmembrane protein 2 (TMEM2) を世界に先駆けて同定した (Yamamoto H. et al. *J Bio Chem*, 2017)。癌における TMEM2 の関与は、乳癌で TMEM2 の発現亢進が浸潤転移を促進するという報告 (Lee H et al. *Cancer Res*, 2016) があるが、癌細胞の TMEM2 発現亢進とヒアルロン酸代謝関連について、未だ証明されていない。本研究の目的は、TMEM2 が癌進展過程のどのタイミングで、どのような分子生物学的機能を発揮するのかを解明することである。

3. 研究の方法

TURBT42 例と根治的膀胱摘除術 85 例を含む 127 例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 膀胱癌組織標本を用いて、TMEM2 及び E-cadherin の免疫組織科学的解析を行った。また、epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) 誘導培地を用いて、筋層非浸潤性膀胱癌細胞株 RT4 の EMT を誘導し、添加時の TMEM2 発現の変化及び、局在について検証した。

4. 研究成果

■ TMEM2 発現は病理学的 T 期および INF と関連する

膀胱癌患者の TMEM2 発現と臨床的関連性 (病理学的 T ; pT と腫瘍浸潤パターン; INF) を評価するために、膀胱癌検体を用いて 127 例の免疫組織化学的解析を行った。非筋層浸潤膀胱癌に分類される pTa-pT1 では TMEM2 スコアは高かったが、筋層浸潤膀胱癌に分類される pT2 および pT3 に進行するにつれてスコアは有意に低下した (図 1A)。これら 127 検体で観察された TMEM2 の発現変化が、他の膀胱癌臨床検体で観察されるパターンと同等であるかどうかを評価するために、Human Bladder Disease Spectrum Tissue Microarray

(BL804, US Biomax, Inc, Derwood, MD, USA) の検体を用いて同様の解析を行ったところ、TMEM2 の発現は正常上皮細胞で観察されるものと比較して、癌組織で増加し、我々の患者検体で観察されたものと同様の傾向をたどることを明らかにした。さらに、INF との関連では、TMEM2 スコアは、INFa で最も高かったが、INFb と INFc では有意に低下した (図 1B)。TMEM2 スコアの変化が EMT の指標である E-cadherin のダウンレギュレーションと相関するかどうかを調べるため、TMEM2 スコアを解析したのと同領域の E-cadherin 発現と INF について連続切片で評価した。その結果、E-cadherin のスコアは INFa で最も高く、INFc で最も低いことがわかった (図 1C)。組織標本における TMEM2 と E-cadherin の細胞内局在を図 1D-F に示した。pTa における TMEM2 の発現は、膜および細胞質で強発現であった (図 1D ; pTa の INFa、スコア 3)。筋層浸潤した癌細胞のクラスター (INFb) は、細胞質で TMEM2 高発現を示したが (図 1E; pT2 の INFb、TMEM2 スコア 3)、散発的に筋層浸潤したがん細胞 (INFc) は、膜と細胞質の両方で低い TMEM2 発現を示し (図 1F; pT3 の INFc、スコア 1)、核近傍の凝集体で発現していた (図 1F、矢印)。E-cadherin 発現では、INFa (図 1G; pTa の INFa、スコア 3) と INFb (図 1G ; pT2 の INFb、スコア 3) では主に細胞膜に強く見られたが、INFc (図 1I; pT3 の INFc、スコア 0) では細胞膜に観察されなかった。これらの結果は、膀胱癌細胞における TMEM2

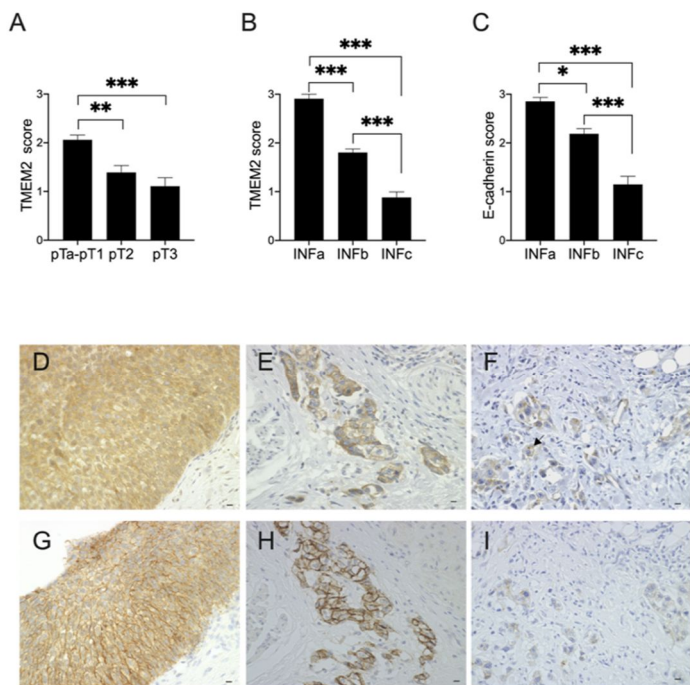


図1. 膀胱癌組織における臨床的関連性とTMEM2およびE-cadherin発現の比較

の発現と細胞内局在の変化が E-cadherin のダウンレギュレーションと関連し、部分的な EMT 表現型を示すことが示唆された。

■ 浸潤性の高い膀胱癌細胞株は TMEM2 発現が低下している

癌の進行と TMEM2 の発現との関連性についてさらに評価するために、筋層非浸潤性 2 株 (RT4, KK47)、筋層浸潤性 2 株 (T24, YTS-1) の 4 種の膀胱癌細胞株を用いて *in vitro* 解析を行った。まず、浸潤能を評価するために、トランスウェル浸潤アッセイを行い、YTS-1 と T24 は浸潤性が高く、KK47 と RT4 株はそれほどでもなかったことを確認した (図 2A)。次に、膀胱

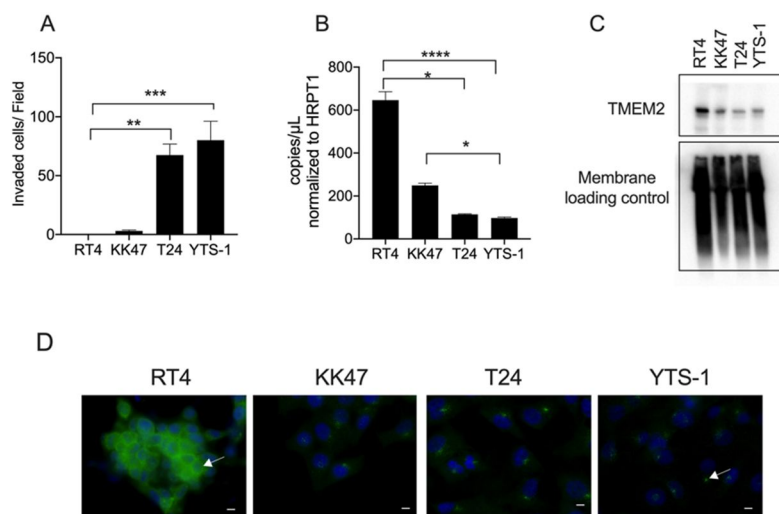


図2. 膀胱癌細胞株におけるTMEM2発現量とその局在について

癌細胞株における TMEM2 発現を mRNA レベル及びタンパク質レベルを解析し評価した。TMEM2 mRNA のコピー数は、RT4 (平均 \pm SEM 646.50 \pm 39.33) で最も多く、高い浸潤能を示す細胞 YTS-1 で有意に減少した (KK47 ; 249.50 \pm 10.06、T24 ; 114.50 \pm 2.89、YTS-1 ; 97.67 \pm 4.65) (図 2B)。TMEM2 は膜タンパク質であることから、細胞から膜画分を抽出し、WB 解析により TMEM2 の発現を評価した。mRNA レベルの解析と一致して、TMEM2 タンパク質発現レベルは、高浸潤性を有する細胞株で相対的に低下していた (図 2C)。免疫蛍光顕微鏡を用いて内在性 TMEM2 タンパク質の細胞内局在を調べた (図 2D) と、TMEM2 は主に RT4 の細胞膜に検出されたが (図 2D-RT4、矢印)、KK47 では細胞質に若干の発現が認められたものの、細胞膜にはほとんど発現していなかった (図 2D-KK47)。さらに、高浸潤性株 T24 と YTS-1 では TMEM2 の発現は低く、細胞膜には発現しておらず、むしろ核の近くに点として見られた (図 2D-T24、YTS-1、矢印)。これらの結果から、膀胱癌では、筋層非浸潤性癌細胞株は高浸潤性癌細胞株よりも高い TMEM2 発現を示すことが明らかとなった。

■ TMEM2 発現は epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) 誘導で抑制される

免疫組織学的検証および膀胱癌細胞株を用いた解析に基づき、我々は TMEM2 発現が悪性の表現型によって変化するという仮説を立てた。この仮説を証明するため、筋層非浸潤性細胞株 RT4 における EMT 表現型に注目した。E-cadherin の発現低下は膀胱癌の進行に關与することが報告されていることより、上皮マーカーである E-cadherin の発現によって示される EMT の初期段階を解析した。EMT を誘導するため、RT4 を EMT 誘導培地サプリメント (2X) で 4 日間培養し、免疫蛍光法で E-cadherin の発現を評価することにより EMT 誘導をモニターした。EMT 誘導細胞のコロニーは非誘導細胞よりもルーズで (図 3A-a, b)、非誘導細胞で観察された密接な細胞間接着とは異なり、紡錘形の形態を示した (図 3A-a, b)。非誘導細胞の密着したクラスターは細胞膜で E-cadherin 陽性であり、EMT 誘導培地サプリメントで処理すると減少した (図 3A-c, d)。

特に、誘導された RT4 では E-cadherin の発現が有意に減少し (図 3B、 $P < 0.0001$)、EMT 誘導と一致した。予測した通り、EMT 誘導細胞では TMEM2 の発現が有意に減少した (図 3C、 $P < 0.0001$)。さらに重要なことは、非誘導細胞では TMEM2 は主に膜に局在していたのに対し、EMT 誘導細胞では TMEM2 は核に近い場所に凝集していたことである (図 3D-b、矢印)。これらの結果は、EMT 誘導が TMEM2 の発現レベルと細胞内局在を変化させることを強く示唆された。現段階で、EMT の進行に伴い、細胞膜に局在する TMEM2 の発現減少する理由や局在の変化についてはまだ解明できていない。しかしながら、TMEM2 タンパク質は E-cadherin の細胞質尾部と相互作用することが報告されており、

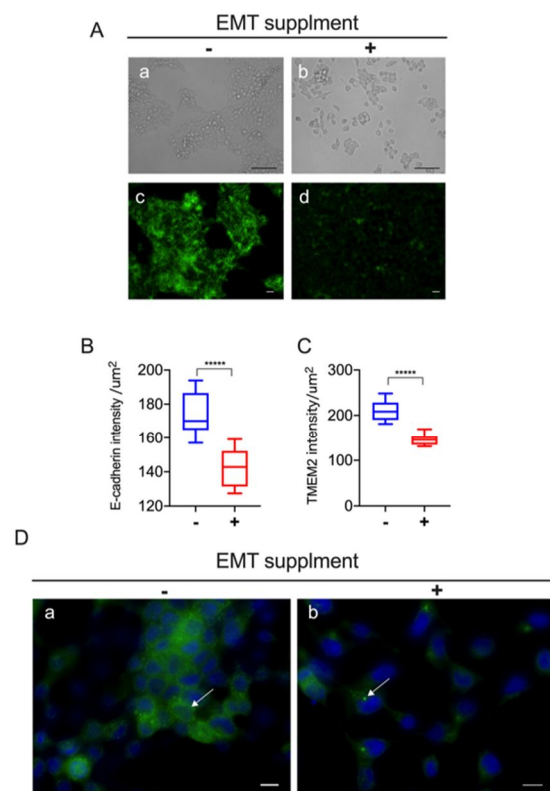


図3. EMT誘導によるTMEM2発現量及び局在の変化

EMT 誘導に伴う E-cadherin の消失が TMEM2 の細胞膜発現に関与している可能性があり、本研究期間終了後に引き続き、TMEM2 と E-cadherin の相互作用について検討を継続する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoneyama Mihoko Sutoh, Yoneyama Tohru, Tobisawa Yuki, Yamamoto Hayato, Hatakeyama Shingo, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Suzuki Tadashi, Ohyama Chikara	4. 巻 613
2. 論文標題 TMEM2 expression is downregulated as bladder cancer invades the muscle layer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.04.118	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------