

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：32409
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791783
 研究課題名（和文） 泌尿器がんにおける EBAG9 発現がもたらす微小環境変化と腫瘍増殖メカニズムの関係
 研究課題名（英文） The relationship between microenvironment and growth of the cells regulated by EBAG9 in bladder cancer.
 研究代表者
 宮崎 利明（MIYAZAKI TOSHIAKI）
 埼玉医科大学・医学部・研究員
 研究者番号：50589075

研究成果の概要（和文）：マウス膀胱がん細胞を、Ebag9 ノックアウトマウスまたはコントロールマウスの皮下に移植し腫瘍増殖を比較したところ、Ebag9 ノックアウトマウスにおいて腫瘍増殖と肺への転移が制御されることが明らかになった。Ebag9 ノックアウトマウスに形成された腫瘍内において、T 細胞の浸潤が増大していることが示された。また、Ebag9 ノックアウトマウスの皮下に形成された腫瘍内に浸潤した T 細胞において免疫関連因子の発現を定量的 PCR 法によって解析した。本研究により、EBAG9 は宿主側の免疫反応を制御することによりがん細胞の増殖と転移に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Mouse bladder cancer cells were subcutaneously implanted into Ebag9 knockout mice and control mice. We found that tumor volumes generated in Ebag9 knockout mice were smaller than that of control mice. Furthermore, numbers of T cell infiltration increased in implanted tumors of Ebag9 knockout mice. We analyzed the expression of immune-related genes in the T cells derived from tumors using qPCR. Notably, tumor metastasis in lung was suppressed in Ebag9 knockout mice. We assume that EBAG9 may regulate tumor growth and migration by regulating immune response of host cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腫瘍学、EBAG9、がん、微小環境変化、腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

日本における前立腺がん罹患率は、胃がん、肺がん、結腸がん、肝臓がん、直腸がんに次いで 6 番目であり、年齢別にみると 65 歳以

上で増加する特徴を有している。将来の罹患数予測においては、2020 年には肺がんに次いで男性がんの 2 番目に高くなると予測されている。EBAG9 は乳がん細胞株 MCF-7 において

エストロゲン応答遺伝子として同定されたが、エストロゲン標的組織だけでなく、脳、肝臓、心臓、リンパ節、腎臓などで発現していることが判明している。EBAG9 の発現が、悪性の乳がん、卵巣がん、肝細胞がん、腎細胞がんにおいて上昇していることから、EBAG9 ががんにおける病態生理に影響を与えていることが知られている。EBAG9 のがん細胞増殖における機能解析の過程で、*in vitro* の細胞培養系において EBAG9 を過剰発現もしくは発現抑制しても細胞増殖に対する変化は起らないが、EBAG9 を過剰発現させたがん細胞をマウスに皮下移植した場合、腫瘍形成が促進され、遊走能力が増加することが判明した。さらに、形成された腫瘍内に EBAG9 の siRNA を投与すると、腫瘍増殖を抑えることが報告されている。これらのことより、EBAG9 は腫瘍増殖を直接制御しているのではなく、腫瘍周辺の環境を変えることによって、腫瘍増殖を促進していると考えられる。EBAG9 が微小環境に変化を及ぼすメカニズムとして、がん細胞から分泌された EBAG9 が周囲の間質細胞や末梢リンパ球にある未同定の受容体に結合することにより作用を及ぼすと仮定することができる。一方、EBAG9 ノックアウトマウスの解析により、EBAG9 は細胞傷害効果に関する因子のエンドソームやリソソームへの輸送を阻害し、細胞傷害性 T 細胞の活性を抑制することが示されているが、このような変化が、がん周囲において生じれば、がん細胞の免疫系からの回避に有利に働いていることが考えられる。しかしながら、がんにおける EBAG9 の免疫系作用については十分解明されていない。さらに、これらいくつかのメカニズムが提唱されているが、正常細胞とがん細胞において EBAG9 の機能における正確なメカニズムの関係ははっきりしていない。

2. 研究の目的

本研究は、前立腺がんと膀胱がんにおける EBAG9 の発現がもたらす微小環境変化と腫瘍増殖のメカニズムの関係を我々が独自に構築した EBAG9 ノックアウトマウス、臓器特異的 EBAG9 ノックアウトマウス、EBAG9 トランスジェニックマウスを用いて明らかにし、さらに臨床サンプルを解析することにより診断マーカーならびに治療の新規標的を見出すことを目的とする。前立腺がん細胞と膀胱がん細胞における EBAG9 の過剰発現系と、発現抑制系による細胞周期、細胞増殖、アポトーシス、移動能などを解析する。また、EBAG9 ノックアウトマウス、EBAG9 トランスジェニックマウスに同系マウス由来のがん細胞として、前立腺がんまたは膀胱がん細胞を利用して皮下移植モデル、または転移モデルを活用し、がん細胞の腫瘍増殖や転移メカニズムを解析する。さらに、形成された腫瘍塊に EBAG9 の siRNA を投与した際の腫瘍細胞、ならびに周囲間質細胞や浸潤している免疫細胞への影響を解析し、腫瘍細胞と周囲の細胞に分けて遺伝子発現解析を探索する。さらに臨床サンプルを解析する。以上の解析を前立腺がんと膀胱がんの両面から行い、前立腺がんと膀胱がんの両者における EBAG9 の発現がもたらす微小環境変化と腫瘍増殖メカニズムの統合的な解明を目指す。前立腺がんと膀胱がんにおいてエストロゲン応答遺伝子 EBAG9 の発現が、がん細胞と周囲環境との相互作用に変化を生じさせ、がん細胞増殖に有利に作用するメカニズムを EBAG9 ノックアウトマウス、臓器特異的 EBAG9 ノックアウトマウス、EBAG9 トランスジェニックマウスを用いて解明することが特徴である。また、前立腺がんと膀胱がんにおける EBAG9 の影響を比較することと、臓器特異的 EBAG9 ノックアウト

トマウスを解析することは、効率的に組織特異的な EBAG9 の作用を明らかにできる。さらに、臨床サンプルの解析を行うことにより、診断マーカーまたは治療法の新しい分子標的としての可能性について検討することができる。本研究によって、前立腺がんと膀胱がんそれぞれ特異的な、あるいは共通の分子標的としてのエストロゲン応答遺伝子 EBAG9 のメカニズムを明らかにすることができれば、治療における診断の分子マーカーとしてだけでなく、治療における EBAG9 をターゲットとした新たな分子標的の開発に繋がると期待できる。

3. 研究の方法

(1) 個体レベルにおける EBAG9 の機能を解析するために、我々は Ebag9 ノックアウトマウスを作製した。この Ebag9 ノックアウトマウスからマウス繊維芽細胞を採取し、Ebag9 mRNA の発現量を qRT-PCR で定量した。

(2) Ebag9 ノックアウトマウスに膀胱がん細胞を皮下移植し、腫瘍径を測定することにより腫瘍増殖能を解析し、解剖後に臓器を確認することにより転移能への影響を解析した。腫瘍径は皮下移植 1 週間後から 2 日に一度測定し、おおよそ 1 ヶ月間測定を行った。1 ヶ月後、マウスを解剖し各臓器を回収した。

(3) Ebag9 ノックアウトマウスにおける腫瘍増殖の抑制メカニズムを解明するために、腫瘍のパラフィン切片を作製し T 細胞特異抗体により腫瘍内への T 細胞の浸潤を免疫染色法により解析した。

(4) 皮下に形成した腫瘍から T 細胞を単離し、

免疫関連因子の mRNA 発現量を qRT-PCR により解析した。

4. 研究成果

(1) 個体レベルにおける EBAG9 の機能を解析するために、我々は Ebag9 ノックアウトマウスを作製した。

(2) Ebag9 ノックアウトマウスに膀胱がん細胞を皮下移植した場合の腫瘍増殖、転移能への影響を解析したところ、EBAG9 を過剰発現させたがん細胞をマウスに皮下移植した場合、腫瘍形成が促進され、遊走能力が増加することが判明していたが、Ebag9 ノックアウトマウスに膀胱がん細胞を皮下移植した場合、コントロールマウスに比べ Ebag9 ノックアウトマウスにおいて皮下移植した腫瘍の増殖が抑制されることが明らかになった。さらに、転移能を確認するために、各臓器を確認したところ肺への転移が認められた。そして、肺への転移がコントロールマウスに比べ Ebag9 ノックアウトマウスにおいて少ないことが観察された。これらの結果より、宿主側の EBAG9 の発現抑制によりがん細胞周辺の環境変化が起きていることが考えられた。そして、EBAG9 が細胞傷害活性の負の制御因子ということから、Ebag9 ノックアウトマウスにおいて細胞傷害性 T 細胞の活性が上昇しがん細胞の増殖が抑制されることが示唆された。

(3) 細胞傷害性 T 細胞が活性化しているかを検証するため、まず皮下に形成させた腫瘍内への T 細胞の浸潤を免疫染色法にて解析したところ、Ebag9 ノックアウトマウスの皮下に形成した腫瘍内に浸潤している T 細胞の数が上昇していた。

(4) 腫瘍内に浸潤している T 細胞の免疫関連因子の mRNA 発現量を qRT-PCR により解析したところ、Ebag9 ノックアウトマウスの皮下に形成させた腫瘍から単離した T 細胞において免疫関連因子の遺伝子発現量が変化していた。。

本研究により、EBAG9 は宿主側の免疫反応を制御することによりがん細胞の増殖と転移に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

①丸山 洋二郎、宮崎 利明、池田 和博、堀江 公仁子、岡本 康司、竹田 省、井上 聡、前立腺がんにおいて抗アンドロゲン薬反応性に関わる新規遺伝子群の機能的スクリーニング、第 86 回 日本内分泌学会学術総会、2013/4/25、仙台国際センター (仙台市)

②宮崎 利明、池田 和博、堀江 公仁子、井上 聡、宿主側の EBAG9 欠損は腫瘍免疫の増強を介して in vivo での泌尿器がん腫瘍増殖を抑制する、第 13 回 関東ホルモンと癌研究会、2013/2/2、高崎ビューホテル (高崎市)

③宮崎 利明、池田 和博、堀江 公仁子、井上 聡、膀胱がん増殖制御における EBAG9 の役割、第 10 回 RCGM フロンティア国際シンポジウム、2012/11/2~11/3、埼玉医科大学日高キャンパス 創立 30 周年記念講堂(日高市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 利明 (MIYAZAKI TOSHIAKI)

埼玉医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50589075