

機関番号：32651
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790329
 研究課題名（和文） 癌の浸潤・転移におけるEMMPRIN-モノカルボン酸トランスポーター複合体の機能
 研究課題名（英文） Role of EMMPRIN-monocarboxylate transporter complex in tumor cell invasiveness and metastasis.
 研究代表者
 青木 勝彦 (AOKI KATSUHIKO)
 東京慈恵会医科大学・医学部・助教
 研究者番号：80328278

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は EMMPRIN-MCT 複合体の機能ががん細胞の転移・浸潤過程に与える影響を明らかにすることである。得られた成果は以下の通り。(1) 乳酸類似体である 3-ブロモピルビン酸は EMMPRIN-MCT1 複合体により前立腺がん細胞株 PC-3 内に取り込まれることを明らかにした。(2) 免疫沈降法の条件を改善することにより、すでに EMMPRIN と相互作用することが知られている MCT1、MCT4、MMP1、PDLIM7 の他に、CA9 等の新規な内在性の EMMPRIN 相互作用因子の存在を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： The purpose of this study is to evaluate the relationship between the function of EMMPRIN-MCT complex and the invasiveness and metastasis of tumor cells. Main findings were as follows: (1) 3-Bromopyruvate, a lactate analog, was transported into PC-3 cells actively through the EMMPRIN-MCT1 complex. (2) Improvements in the sensitivity of co-immunoprecipitation method revealed that the existence of novel endogenous interactors for EMMPRIN such as CA9, in addition to already identified MCT1, MCT4, MMP1 and PDLIM7.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：癌

1. 研究開始当初の背景

悪性度の高い癌に高発現している膜タンパク質である EMMPRIN/CD147 は、細胞表面でモノカルボン酸トランスポーター (MCT) と複合体を形成している。EMMPRIN と複合体を形成する MCT には MCT1 と MCT4 の 2 種類が知られていたが、これらの複合体の機能的な違いについては理解が進んでおらず、共にがん細胞において

は細胞内で作られた乳酸を細胞外へ排出していると考えられていた。このような状況の下、研究代表者は乳酸類似体である 3-ブロモピルビン酸を用いた予備的な実験から、EMMPRIN-MCT1 複合体が乳酸の取り込みに、EMMPRIN-MCT4 複合体が乳酸の排出に関与しているとの仮説を立てるに至った。がん細胞の浸潤・転移能は、その周囲の環境の pH を低下させるだけで亢進するという報

告も存在するため、これらの複合体の機能的な差違を明らかにすることが重要であった。

2. 研究の目的

EMMPRIN-MCT1 複合体と EMMPRIN-MCT4 複合体の機能的な差違を明らかにし、その違いががん細胞の転移・浸潤過程に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 3-プロモピルビン酸を用いた解析

3-プロモピルビン酸は乳酸類似体であり、解糖系を阻害することでがん細胞特異的に毒性を發揮することが知られている。この殺細胞効果を指標として細胞内への 3-プロモピルビン酸の取り込み（すなわち乳酸の取り込み）を評価した。

① 3-プロモピルビン酸の殺細胞効果を Cell Counting Kit-8 (DOJIN)を用いて解析した。

② siRNA を用いることで MCT の発現を抑制し、その状態における 3-プロモピルビン酸の殺細胞効果を解析した。

③ 3-プロモピルビン酸の殺細胞効果に対する MCT1 阻害剤の影響を解析した。

(2) EMMPRIN ノックダウン細胞を用いた解析

① EMMPRIN に対する shRNA を恒常的に発現する前立腺癌細胞株 PC-3 (PC-3KD) を用いて、その細胞株に対する 3-プロモピルビン酸の殺細胞効果を解析した。

② PC-3KD 細胞での EMMPRIN、MCT1、MCT4 等の発現をウェスタンブロッティング法で解析した。

(3) 免疫沈降法を用いた EMMPRIN-MCT 複合体の解析

細胞を可溶化する条件を最適化し、内在性の EMMPRIN と MCT の相互作用を検出した。

(4) EMMPRIN-MCT 複合体発現系の構築

EMMPRIN-MCT 複合体の機能を解析するために、市販のベクター (Tet-On System, Clontech 社、Flp-In System, Invitrogen 社) をもとにして 2 種類の発現系を構築した。

① テトラサイクリン応答性かつパイシストロン性の発現系を構築した。

② 上記の発現系を改変し、細胞内のゲノム上の特定の位置に遺伝子断片を導入できる発現系を構築した。

4. 研究成果

(1) 乳酸類似体である 3-プロモピルビン酸の殺細胞効果を指標とした EMMPRIN-MCT 複合体の機能解析

① 10 種類のがん細胞株に対して 3-プロモピルビン酸の殺細胞効果を検討した。その結果、125 μ M の濃度において 3-プロモピルビ

ン酸に対して高感受性を示す細胞群と耐性を示す細胞群に二分することが出来た (図 1)。

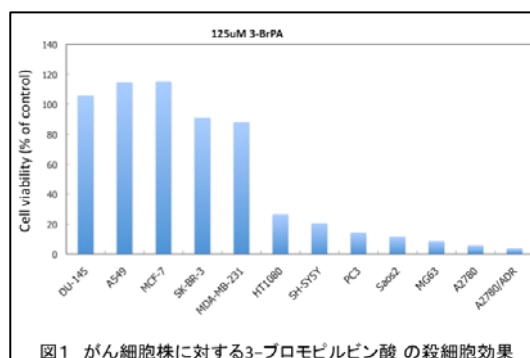


図1 がん細胞株に対する3-プロモピルビン酸の殺細胞効果

このうちの高感受性の前立腺癌細胞株 PC-3 は、既に予備実験として EMMPRIN のノックダウン細胞を作成していたため、その後の研究に使用した。

② 3-プロモピルビン酸感受性の PC-3 細胞において発現していた 6 種類の MCT に対して、siRNA を用いてそれらの発現を抑制し、3-プロモピルビン酸に対する感受性を比較した。その結果、PC-3 細胞では MCT1 のノックダウンにおいてのみ 3-プロモピルビン酸に対して耐性を示すことが明らかになった (図 2)。

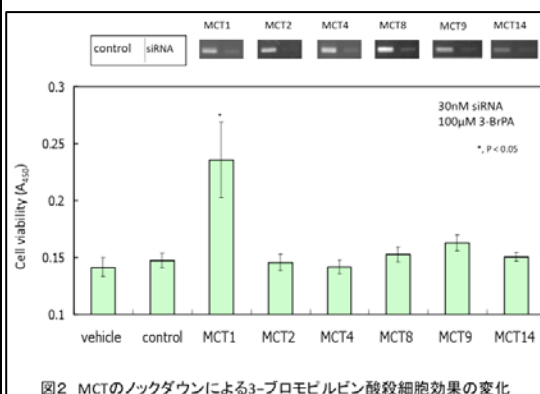


図2 MCTのノックダウンによる3-プロモピルビン酸殺細胞効果の変化

これは 3-プロモピルビン酸の細胞内への取り込みに MCT1 が関与していることを示している。この 3-プロモピルビン酸に対する耐性は PC-3 の EMMPRIN ノックダウン細胞においても同様に観察された。さらに 2 種類の MCT1 阻害剤を用いて MCT1 の機能を阻害した場合の 3-プロモピルビン酸感受性の変化を解析したところ、MCT1 阻害剤存在下で 3-プロモピルビン酸に対する耐性が高まることが示された (図 3)。

以上の結果は 3-プロモピルビン酸の細胞内への取り込みに EMMPRIN-MCT1 複合体が関与していることを示唆している。

一方、3-プロモピルビン酸耐性株のうち、MDA-MB-231 では MCT1 の発現が消失していることが既に報告されているが、本研究でもその事実が確認された。また、MCF7 細胞と SK-BR-3 細胞においても正常な MCT1 タンパク質の発現が消失しており、さらに

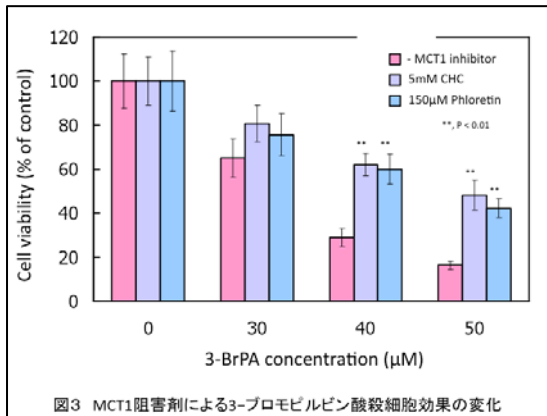


図3 MCT1阻害剤による3-ブロモピルビン酸殺細胞効果の変化

EMMPRIN タンパク質の発現レベルが低いことを確認した。これらはいずれも乳がん組織由来の細胞株であるが、これらの細胞では EMMPRIN-MCT1 複合体の機能が欠失しており、3-ブロモピルビン酸の細胞内への取り込みが行われないうえに 3-ブロモピルビン酸耐性を獲得していることが予想される。

(2) EMMPRIN ノックダウン細胞における MCT1 および MCT4 の発現変化

2 種類の EMMPRIN ノックダウン細胞 (PC3KD1 と PC3KD2 では shRNA の塩基配列が異なっている) はそれぞれ EMMPRIN に対する shRNA を恒常的に発現しており、3-ブロモピルビン酸に対する抵抗性を示した。そこで、これらの細胞における MCT1 および MCT4 の発現をウエスタンブロッティング法で解析した。その結果、EMMPRIN ノックダウン細胞では MCT1 と MCT4 のタンパク質発現が著しく減少していることが明らかになった。このときそれらの mRNA 発現量は変化していなかった。また、同様の実験を低酸素環境下 (酸素濃度 1%) で行ったところ通常酸素状態と同様の傾向が観察された (図 4)。

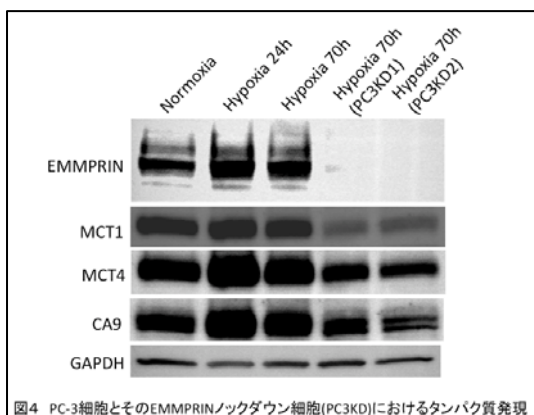


図4 PC-3細胞とそのEMMPRINノックダウン細胞(PC3KD)におけるタンパク質発現

低酸素状態では解糖系が亢進するために通常酸素状態よりも多くの乳酸が産生され、細胞はそれを細胞外へ排出しなければならない。したがって乳酸を排出するためのトランスポーターの発現が誘導されるはずである。図 4 でも示されたように MCT4 は低酸素環境下で発現が誘導される。また、低酸素環

境下では EMMPRIN の発現も誘導されるため、乳酸の細胞外への排出には EMMPRIN-MCT4 複合体が関与していることが示唆される。一方、低酸素環境下では MCT1 の発現は亢進しない。この事実は EMMPRIN-MCT1 複合体の機能が乳酸の排出に重要でないことを示唆していると考えられる。

さらに興味深いことに、細胞外の pH を調節するタンパク質として知られるカルボニックアンヒドラーゼ 9 (CA9) の発現量が EMMPRIN ノックダウン細胞で減少することを見出した。MCT が乳酸を輸送するためにはプロトンが必要であるため、EMMPRIN-MCT 複合体と CA9 は機能的に関連している可能性がある。このような知見はこれまでに報告されておらず、本研究で初めて得られたものである。CA9 は EMMPRIN-MCT 複合体と同様にがん細胞で高発現していることが知られているため、これらの機能相関を明らかにすることは今後の課題として重要である。また、EMMPRIN タンパク質の減少が、それと複合体を形成する MCT タンパク質の減少を引き起こすメカニズムには興味を持たれる。通常の膜タンパク質の品質管理では、複合体を作れなかったサブユニットは不完全な糖鎖修飾を指標として小胞体外へ逆行輸送され、分解されるが、MCT1 と MCT4 は糖鎖修飾を受けないことが知られている。このような糖鎖修飾を受けない複数回膜貫通型の膜タンパク質の品質管理機構は未だ明らかになっていない。

(3) 免疫沈降法を用いた EMMPRIN-MCT 複合体の解析

EMMPRIN と MCT が実際に複合体を形成していることを示すには、免疫沈降法を用いて、その両者が結合していることを示す必要がある。しかし、EMMPRIN と MCT との結合があまり強くないため、内在性の複合体を免疫沈降することは難しく、場合によっては架橋剤などを用いる必要があった。そこで研究代表者は細胞の可溶化剤として 18 種類の界面活性剤を検討し、n-Dodecyl-β-D-maltoside を用いることで効率よく内在性の EMMPRIN-MCT 複合体を免疫沈降することに成功した (図 5)。

さらに、この可溶化法を用いることで、これまでに酵母のツーハイブリッド法でしか検出されていなかった PDLIM7 との相互作用を免疫沈降法で確認することができた。また、過去の EMMPRIN に関するいくつかの研究で用いられている MEM-M6/1 抗体が、高分子糖鎖修飾を受けた EMMPRIN を特異的に認識すること、そのタイプの EMMPRIN は MCT と複合体を作らないことを明らかにした。EMMPRIN は複数の種類の糖鎖修飾を受けており、それらの糖鎖修飾の違いによって EMMPRIN は複数の機能を発揮すると

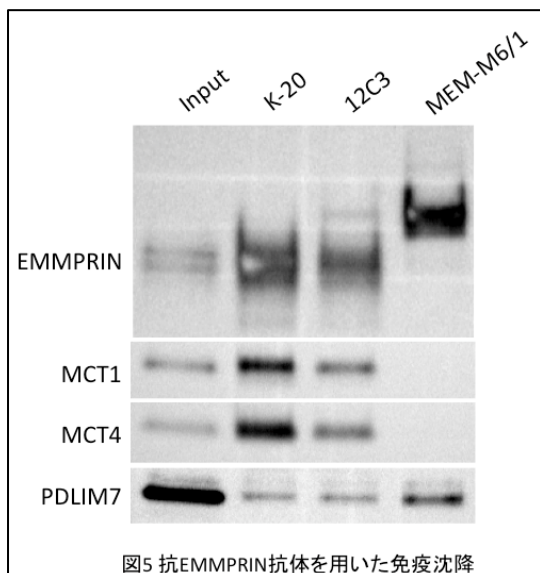


図5 抗EMMPRIN抗体を用いた免疫沈降

考えられているが、その詳細は明らかでない。この方法を用いることでその一端を解明することができるかもしれない。

研究代表者は既に EMMPRIN との相互作用が報告されている MMP1 や先に述べた CA9 など、いくつかの EMMPRIN と相互作用するタンパク質の検出に成功しており、本研究で開発した方法を用いることで、EMMPRIN と相互作用する未知のタンパク質を検索することが可能であると考えている。EMMPRIN は多機能タンパク質として説明されることが多いが、その多機能を発揮する本質は不明であった。本方法によってその本質に迫ることができると考えている。

(4) EMMPRIN-MCT 複合体発現系の構築

EMMPRIN と MCT はいずれも膜タンパク質であり、その過剰発現は細胞にストレスを生じさせるため、発現量の調節が可能でなければならない。また、複合体として発現させるために EMMPRIN と MCT の発現量を合わせる必要もあった。そこで市販のベクターを改変し、テトラサイクリンの濃度依存的に発現量が調節でき、2 種類のタンパク質を同時に発現できるバイシストロン性の発現ベクターを構築した。このベクターを用いて CHO 細胞で安定発現株を樹立したが、その解析過程で外来遺伝子が染色体に組み込まれる位置効果に由来すると思われる表現系の違いが生じた。そこでさらにベクターを改変し、染色体の特定の位置に外来遺伝子を挿入するための発現系を構築した。本研究期間終了の時点でこの発現系に用いる細胞株 (MDA-MB-231 細胞で作成) の樹立は完了しているが、その細胞での EMMPRIN-MCT 複合体の発現には成功していない。本研究で構築した発現系は汎用性があると考えており、今後も活用していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Matsudaira H., Asakura T., Aoki K.(他 5 名) Target chemotherapy of anti-CD147 antibody-labeled liposome encapsulated GSH-DXR conjugate on CD147 highly expressed carcinoma cells., *International Journal of Oncology.*, 査読有, vol. 36, 2010, pp.77-83
- ② 大川清、青木勝彦、解糖系阻害剤 3-ブロモピルビン酸の細胞内取り込みにおける乳酸トランスポーターの役割、*ビタミン*、査読無、vol. 84、2010、pp.84-85
- ③ Eda H., Aoki K.(他 6 名), The proteasome inhibitor bortezomib inhibits FGF-2-induced reduction of TAZ levels in osteoblast-like cells., *European Journal of Haematology.*, 査読有, vol. 85, 2010, pp.68-75

[学会発表] (計 4 件)

- ① 青木勝彦、解糖系阻害剤 3-ブロモピルビン酸の取り込みにおける MCT1-EMMPRIN 複合体の役割、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、2010 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド (兵庫)
- ② 朝倉正、Epoxomicin 耐性細胞における E-cadherin 発現消失はヒストンアセチル化による ZEB1 発現調節を介している可能性がある、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22 日、大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル (大阪)
- ③ 大川清、CD147 を分子標的としたマイクロバブル超音波造影剤の開発、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 3 日、パシフィコ横浜 (神奈川)
- ④ 青木勝彦、解糖系阻害剤 3-ブロモピルビン酸の抗癌作用に対する MCT1- CD147 複合体の役割、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1 日、パシフィコ横浜 (神奈川)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 勝彦 (AOKI KATSUHIKO)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：80328278