

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861292

研究課題名(和文) 泌尿器がんでのEBAG9による微小環境変化、腫瘍増殖メカニズムの解明と臨床応用

研究課題名(英文) The relationship between microenvironment and tumor growth mechanism regulated by EBAG9 in urological cancer and the application to clinical

研究代表者

宮崎 利明 (Miyazaki, Toshiaki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・がん分化制御解析分野・研究員

研究者番号：50589075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：EBAG9は複数のがんで過剰発現しており患者の予後不良と相関しているが、その作用機序は不明な点が多い。本研究において、Ebag9ノックアウト(Ebag9K0)マウスを宿主とした際に、膀胱がん細胞の増殖と肺転移が抑制され、腫瘍内への細胞傷害性T細胞の浸潤が増加することが明らかになった。さらに、このT細胞は細胞傷害活性が増大しており、別個体に移植しても腫瘍形成を阻害した。また、EBAG9発現量は前立腺がん細胞の移動能と関連していた。本研究により、EBAG9は宿主側の免疫系細胞ならびにがん細胞の両面において機能を発揮しており、腫瘍免疫において重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：EBAG9 overexpression is found in several cancers and correlated with poor prognosis of patients with the cancers; however, the mechanism is not fully understood. In this study, tumor growth of mouse bladder cancer cells subcutaneously inoculated into Ebag9 knockout (Ebag9K0) mice was found to be suppressed compared with that of control mice. Tumor metastasis in lung was also suppressed in Ebag9K0 mice. Furthermore, the number of T cell infiltration was increased in implanted tumors of Ebag9K0 mice. We also found that the CD8+ T cells exhibited upregulation of cytotoxic activity, and the adoptive transfer of CD8+ T cells isolated from tumors in Ebag9K0 host could repress tumor growth by mouse bladder cancer cells implanted in wild-type host. Gain and loss-of-function analysis of EBAG9 demonstrated that EBAG9 modulates migration in prostate cancer cells. These results suggest that EBAG9 modulates tumor growth by negatively regulating the adaptive immune response in host defense.

研究分野：医歯薬学

キーワード：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、胃がんに次いで2番目(がん情報サービス、2011年罹患数参照)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(がん情報サービス、<http://ganjoho.jp/public/index.html>)。将来の罹患数予測においては、2015年には男性がんで1番多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、腎細胞がんなど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、腫瘍周辺の微小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。しかしながら、がんにおけるEBAG9の作用については十分解明されていない。

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(Ebag9KO)マウスを用いて明らかにし、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。特に、Ebag9KOマウスに同系統マウス由来のがん細胞を移植し、がん細胞の腫瘍増殖や転移能を解析する。前立腺がん細胞または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、細胞増殖、移動能などを解析する。以上の解析を前立腺がんまたは膀胱がんで行い、泌尿器がんにおけるEBAG9の発現がもたらす微小環境変化と腫瘍増殖メカニズムの統合的な解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) Ebag9KOマウスの作製

マウスEbag9遺伝子領域のゲノムDNAをクローニングし、翻訳開始コドンを有するエクソン2を挟んでloxP配列を挿入し、ターゲティングベクターを作製した。このターゲティングベクターを制限酵素で消化して直列状にした後、マウスES細胞にインジェクションして、組換え細胞を選択し、さらに仮親マウスの子宮に移植してEbag9^{flx/flx}マウスを作製した。このEbag9^{flx/flx}マウスにCre組換え酵素を全身で発現するAyu1-Creマウスを交配することにより、Ebag9KOマウスを作製した。

(2) Ebag9KOマウスを用いた腫瘍細胞の皮下移植

マウス膀胱がんMB-49細胞をマトリゲルと混合し、Ebag9KOならびにコントロールマウスの皮下に移植した。皮下移植後1週間経過した後、腫瘍径を3日に一度、1ヶ月間測定した。1ヶ月後、マウスを解剖して皮下腫瘍

ならびに各臓器を採取し、転移の有無を確認した。

(3) 免疫組織化学

上記の Ebag9KO ならびにコントロールマウスにおいて形成されたマウス膀胱がん細胞の腫瘍を用いてパラフィン切片を作製し、CD3、CD4 ならびに CD8 に対する特異抗体による免疫組織化学を行い、腫瘍内への T 細胞の浸潤を解析した。

(4) 腫瘍内浸潤 T 細胞における遺伝子発現ならびに機能解析

上記の形成された腫瘍塊より、CD8 陽性細胞を特異抗体を結合したビーズを用いて分離した。これらの CD8 陽性細胞から RNA を抽出し、免疫関連遺伝子などの発現量を定量的 PCR により解析した。また、これらの CD8 陽性細胞を CD107a 抗体で標識し、FACS を用いて解析することにより脱顆粒反応を解析した。これらの CD8 陽性細胞の細胞傷害活性に関しては、MB-49 細胞を標的細胞として共培養し、細胞溶解に伴って培地中に放出される乳酸脱水素酵素を定量することにより解析した。さらに、Ebag9KO ならびにコントロールマウスにおいて形成されたマウス膀胱がん細胞の腫瘍より分離した CD8 陽性細胞を野生型の別個体マウスに移植した後、BM-49 細胞の皮下移植を行い、腫瘍形成能を比較した。

(5) 前立腺がん細胞株における EBAG9 の機能解析

前立腺がん細胞株に EBAG9 に対する siRNA を導入し、EBAG9 の発現抑制系を構築した。また、EBAG9 を過剰発現する前立腺がん細胞を構築した。これらの培養細胞を用いて、細胞増殖と移動能に対する影響を解析した。

4. 研究成果

(1) Ebag9KO マウスの作製

Ebag9^{flx/flx} マウスに Cre 組換え酵素を全身で発現する *Ayul-Cre* マウスを交配することにより、Ebag9KO マウスを作製した。Ebag9KO マウス由来の胎児線維芽細胞や脳、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺などの組織において、EBAG9 の発現が消失していることが確かめられた。Ebag9KO マウスは外形的な表現型は認められず、妊孕性も有していた。

(2) Ebag9KO マウスを宿主とすると腫瘍増殖と肺転移が抑制された

Ebag9KO マウスに同系統由来マウス膀胱がん細胞を皮下移植し、腫瘍増殖、転移への影響を解析した。その結果、コントロールマウスに比べて Ebag9KO マウスの皮下腫瘍の増殖が抑制されることが明らかになった。また、各臓器における腫瘍の転移を解析したところ、コントロールマウスに比べて Ebag9KO マウスにおいて肺への転移の減少が観察された。これらの結果より、宿主側の EBAG9 欠損によりがん細胞周辺の微小環境変化が起きていることが示唆された。

(3) Ebag9KO マウスにおいて形成された腫瘍における T 細胞の浸潤増加

Ebag9KO マウスに形成させた腫瘍内において T 細胞の浸潤が増えているかを検証するため、CD3、CD4 ならびに CD8 に対する特異抗体による免疫組織化学を行ったところ、Ebag9KO マウスの皮下に形成された腫瘍において、これらの免疫染色性が増大しており、T 細胞の浸潤が亢進していることが明らかになった。特に、CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞に着目してさらに解析を行った。

(4) Ebag9KO マウス由来の細胞傷害性 T 細胞における遺伝子発現変化と脱顆粒反応、細胞傷害活性の亢進

活性化した細胞傷害性 T 細胞は細胞傷害因子のグランザイムなどの分泌顆粒によりがん細胞などを破壊することが知られている。そこで、腫瘍内に浸潤している CD8 陽性 T 細胞を分離し、グランザイムをはじめとする免疫関連遺伝子の発現量を定量的 PCR により解析したところ、Ebag9KO マウス由来の CD8 陽性 T 細胞において発現上昇が認められた。また、細胞内分泌顆粒の急速な放出に関与する脱顆粒反応について、CD107a 抗体を用いて評価したところ、Ebag9KO マウス由来の CD8 陽性 T 細胞において亢進していることが明らかになった。さらに、Ebag9KO マウス由来の CD8 陽性 T 細胞は細胞傷害活性が上昇していることが認められた。興味深いことに、Ebag9KO マウス由来の CD8 陽性 T 細胞は、別個体に移植しても腫瘍形成を抑制することが可能であることを明らかにした。これらの結果より、EBAG9 は宿主側の免疫系を負に制御し、腫瘍免疫に関与していることが示唆された。

(5) 前立腺がん細胞における EBAG9 の機能

前立腺がん細胞株を用いて、EBAG9 の発現抑制系と過剰発現系を構築し、*in vitro* の細胞培養系における細胞増殖と移動能に対する影響を解析した。その結果、EBAG9 発現量は細胞移動能と関連することが明らかになった。

以上のことより、EBAG9 は宿主側の免疫系細胞ならびにがん細胞の両面においてそれぞれの機能を発揮しており、腫瘍免疫において重要な役割を担っていることが示唆され

た。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Miyazaki T, Ikeda K, Sato W, Horie-Inoue K, Okamoto K, Inoue S, MicroRNA Library-Based Functional Screening Identified Androgen-Sensitive miR-216a as a Player in Bicalutamide Resistance in Prostate Cancer, J Clin Med. 2015 Oct 21;4(10):1853-1865. 査読有
doi:10.3390/jcm4101853.

Miyazaki T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Kondo T, Takahashi S, Inoue S, EBAG9 modulates host immune defense against tumor formation and metastasis by regulating cytotoxic activity of T lymphocytes, Oncogenesis, 2014 Nov 3;3:e126. 査読有
doi: 10.1038/oncsis.2014.40.

Maruyama Y, Miyazaki T, Ikeda K, Okumura T, Sato W, Horie-Inoue K, Okamoto K, Takeda S, Inoue S, Short hairpin RNA library-based functional screening identified ribosomal protein L31 that modulates prostate cancer cell growth via p53 pathway, PLoS One, 2014 Oct 6;9(10):e108743. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0108743.

Miyazaki T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S, Amyloid precursor protein regulates migration and metalloproteinase gene expression in prostate cancer cells, Biochem Biophys Res Commun. 2014 Sep 26;452(3):828-833. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.010.

〔学会発表〕(計 6 件)

宮崎 利明、石黒 竜也、大畑 広和、吉田 正行、恩田 貴志、加藤 友康、榎本 隆之、田中 憲一、中釜 斉、岡本 康司、Rho キナーゼの抑制は ALDH 依存的な SOX2 の誘導を介して卵巣がん幹細胞の増殖を促進する、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日～10 日、名古屋国際会議場（愛知県）

宮崎 利明、池田 和博、堀江 公仁子、井上 聡、エクソソームを介して前立腺がんのがん免疫エスケープと悪性化を引き起こす EBAG9 の二つの新しい作用メカニズム、日本アンドロロジー学会第 34 回学術大会共同開催 第 22 回精子形成・精子毒性研究会、2015 年 6 月 26 日～27 日、福岡大学病院メディカルホール（福岡県）

奥村 俊之、丸山 洋二郎、宮崎 利明、池田 和博、佐藤 航、堀江 公仁子、岡本 康司、竹田 省、井上 聡、RPL31 は p53 タンパク質の分解を制御することによってピカルタミド耐性前立腺がん細胞の増殖を促す、第 15 回 関東ホルモンと癌研究会、2015 年 1 月 28 日、ベルサール八重洲（東京都）

宮崎 利明、池田 和博、堀江 公仁子、井上 聡、泌尿器がんでの EBAG9 による微小環境変化、腫瘍増殖メカニズムの解明と臨床応用、第 23 回日本がん転移学会、2014 年 7 月 10 日～11 日、金沢市文化ホール・金沢ニューグランドホテル金沢（石川県）

池田 和博、丸山 洋二郎、宮崎 利明、堀江 公仁子、井上 聡、前立腺がん細胞の抗アンドロゲン薬耐性に関わる遺伝子 RPL31、第 15 回ホルモンと癌研究会、2014

年 7 月 4 日～5 日、東北大学医学部 良陵会館（宮城県）

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、前立腺がん細胞における抗アンドロゲン薬耐性に関わる遺伝子 RPL31 の機能スクリーニングによる同定、第 87 回日本内分泌学会学術総会、2014 年 4 月 24 日～26 日、福岡国際会議場・福岡サンパレス（福岡県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 利明（MIYAZAKI TOSHIAKI）
国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所 がん分化制御解析分野・研究員
研究者番号：50589075