

がんの浸潤・転移を促進させる epithelial membrane protein 1 の分子作用機構

清水 昭男, 扇田 久和

1. はじめに

がんは世界的に生命を脅かす疾患の一つである。日本におけるがん罹患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。

過形成 (hyperplasia) から異形成 (dysplasia), 新形成 (neoplasia) へと変化し、自己増殖能を獲得したがんは、その後、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るとはいいがたい。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)}。著者らはがんの浸潤・転移の分子機構を研究するにあたり、その“ファーストステップ”、すなわち、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”に焦点を当てた。この接触を分子生物学的に解析するため、独自のがん細胞-間質細胞共培養系を開発した。この共培養系を用いて、がん細胞において発現が有意に上昇する分子を探索した結果、epithelial membrane protein 1 (EMP1) を同定した⁵⁾。本稿ではEMP1同定経緯と、EMP1ががん細胞の浸潤・転移を亢進する細胞内シグナル伝達機構を紹介し、EMP1をターゲットとした新たながん治療臨床応用への可能性を考察する。

2. EMP1の同定とEMP1を介したがんの浸潤・転移能亢進機序の解析

がん微小環境で生じるがん細胞と間質細胞との接触を解析するモデルとして、近年最も罹患患者数が増加している前立腺がんを選択した。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。その結果、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の一つとしてEMP1を同定した。

EMP1はperipheral myelin protein 22 kDa gene (PMP22)ファミリーに属する4回膜貫通型の膜タンパク質である。その構造は、N-グリコシド型糖鎖修飾部位が存在する第一細胞外ドメインと、比較的小さな第二細胞外ドメインおよびその間に存在する細胞内ドメインによって構成されている。気道、気管支、食道、胆嚢などの上皮組織や、脂肪組織、神経組織、血管、白血球など体内に広く発現しており、細胞内では細胞間接着部位に局在することがこれまでに報告されている⁶⁾。またがんにおいては、小児の急性リンパ芽球性白血病 (ALL) の予後不良因子⁷⁾、抗腫瘍薬ゲフィチニブに対する薬剤耐性の分子マーカーとしても報告されているが⁸⁾、EMP1の生理的およびがん生物学的機能解析はほとんど行われておらず、その分子機構はまったく不明であった。

著者らの研究ではまず最初に、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

滋賀医科大学分子生物学・生化学講座分子病態生化学部門 (滋賀県大津市瀬田月輪町)

Pro-invasive and -metastatic activities of epithelial membrane protein 1

Akio Shimizu and Hisakazu Ogita (Division of Molecular Medical Biochemistry, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shiga University of Medical Science, Seta Tsukinowa-cho, Otsu, Shiga 520-2192, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920216

© 2020 公益社団法人日本生化学会

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。

3. EMP1ががんの浸潤・転移を亢進させる分子機構—EMP1結合タンパク質 Copine-IIIの同定—

EMP1ががんの浸潤・転移と深く関連するがん細胞の運動能・浸潤能を亢進させることがわかったため、その細胞内シグナル伝達機構を検討することにした。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するため、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ところ、Copine-IIIを同定できた。Copine-IIIは537アミノ酸からなる約60kDa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。近年Copine-IIIは肺がんや乳がん細胞をはじめとするがん細胞で発現し、がんの遊走能を亢進させることが報告されている^{9,10)}。

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をノックダウンすると、細胞遊走は有意に低下した。この細胞に野生型Co-

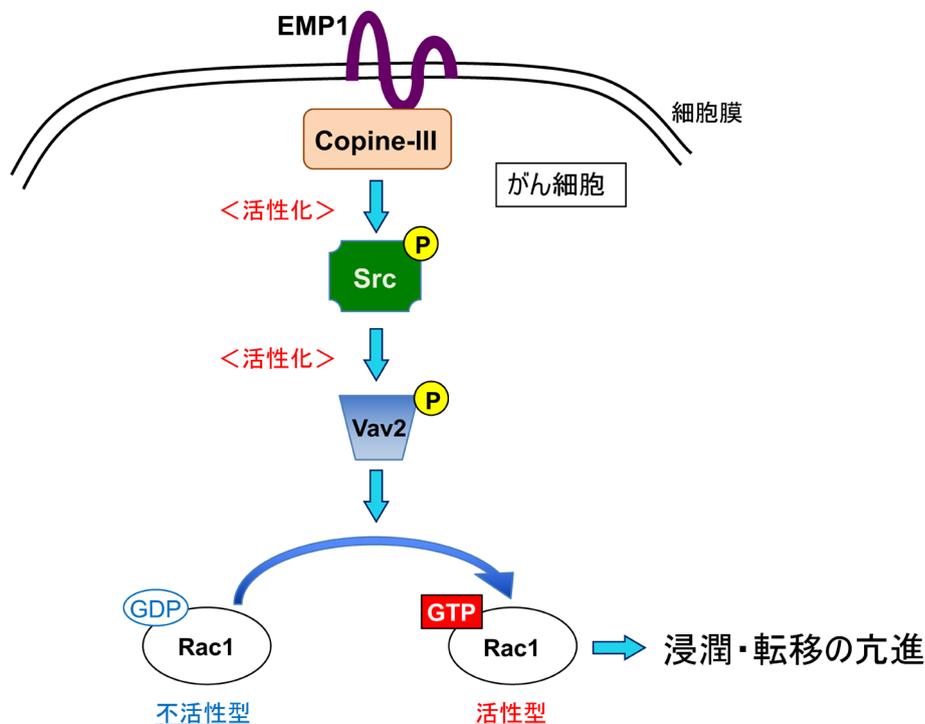


図1 EMP1ががんの浸潤・転移を亢進するがん細胞内シグナル伝達機構

EMP1の細胞内ドメインとCopine-IIIが結合すると、Srcの活性化(Tyr⁴¹⁷のリン酸化)が誘導される。Srcのチロシンキナーゼにより、Rac1のグアニンヌクレオチド交換因子Vav2がリン酸化(活性型)される。活性化したVav2はRac1を活性化する結果、がん細胞の運動能が増強し、がんの浸潤・転移能が亢進する。Oncogene, 2018; 37: 5416-5434より改変。

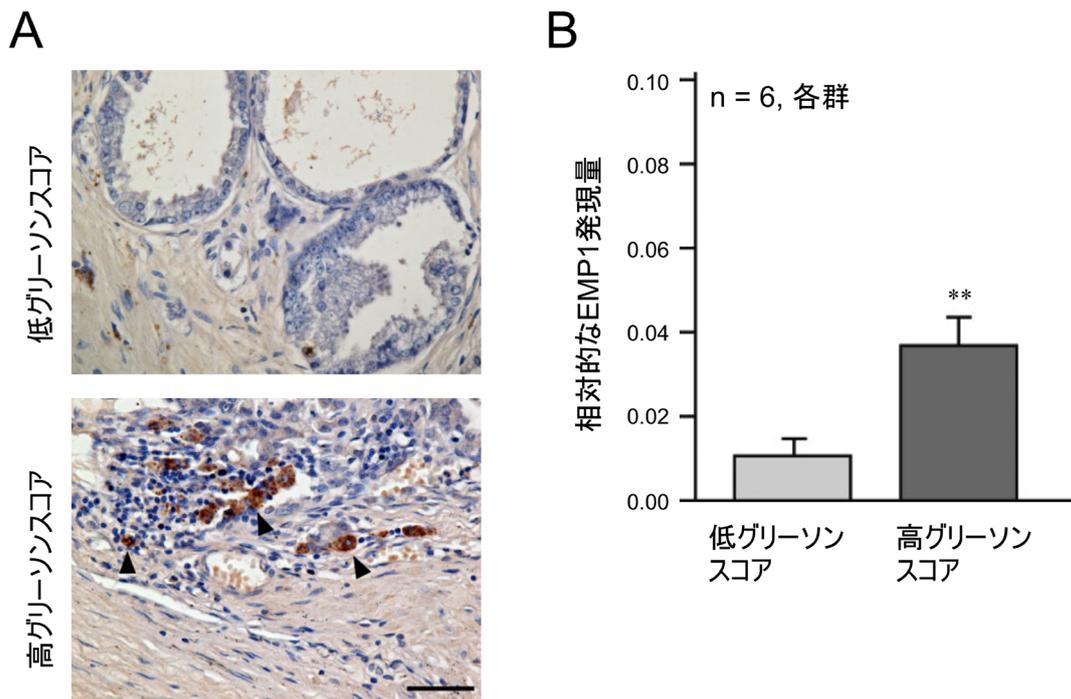


図2 ヒト前立腺がんにおけるEMP1の発現とがんの悪性度

(A)抗EMP1抗体による前立腺がんサンプルの免疫組織染色。高グリーソンスコアの前立腺がんサンプルでは、がんの浸潤端でEMP1が強く発現していた。EMP1高発現部位を矢頭(▲)で示す。(B)パラフィン包埋された前立腺がんサンプルよりRNAを抽出し、定量PCRによってEMP1発現量を解析した。高グリーソンスコア群では、低グリーソンスコア群と比較して、EMP1の発現は有意に上昇していた。** $p < 0.01$ 。Oncogene, 2018; 37: 5416–5434より改変。

pine-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。Rac1の活性化により、LNCaP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。これらの細胞内シグナル伝達機構を図1に示す。

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る。

4. ヒト前立腺がんの悪性度とEMP1発現量の相関

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。グリーソンスコアは前立腺がんの悪性度を診断する際に用いる病理学上の分類方法で、2~10点でスコアをつけ8点以上の高スコアは悪性度が高い。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2)。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る。

5. EMP1をターゲットとした新たながん治療開発への期待

EMP1は細胞表面に局在し、細胞外領域を有していることから、すでに抗腫瘍薬として認可されているトラスツズマブやリツキシマブのような抗体薬療法が可能である。ヒトへの投与可能な抗EMP1抗体が開発され、それがが

ん細胞表面EMP1へ結合してがんの浸潤・転移を抑制し、がんの生存率向上に寄与できることを期待したい。また、EMP1の細胞内ドメインの9アミノ酸も標的候補として考えられる。著者らは以前の研究で、細胞膜透過性シグナルペプチドであるTATと標的配列を結合させて投与し、がん細胞内でのタンパク質-タンパク質間相互作用を阻害する方法によってがん細胞の増殖を阻害できることを見いだしている¹¹⁾。同様の手法によりEMP1の細胞内ドメイン9アミノ酸をがん細胞内に導入することで、EMP1とCopine-IIIの結合を阻害し、以降に続くシグナル伝達を遮断して、がんの浸潤・転移能を減少させることができるかどうかについては今後の検討課題である。最近腫瘍関連抗原として同定されたWT1のように¹²⁾、EMP1やCopine-IIIが腫瘍関連抗原となる可能性についても検討していきたい。現在までにEMP1やCopine-IIIが死滅したがん細胞から断片化されているという報告はないが、大腸がん患者において循環血中に細胞内タンパク質であるCopine-IIIが存在するという報告がある¹³⁾。

6. おわりに

前立腺がん細胞とその間質細胞との接触をモデル化した実験系により、がん細胞で発現が有意に増加する分子としてEMP1を同定した。上述のように、EMP1は、前立腺がんだけでなく、多くのがんで、その浸潤・転移を促進していると推定される。近年、EMP1の発現上昇が神経膠芽腫、肺がんなどでもみられ、これらの悪性腫瘍の浸潤・転移（または播種）に関連している可能性が示唆されている^{14, 15)}。ところで、間質細胞と接触することでEMP1の発現ががん細胞でどのように増加するのか、そのメカニズムは未解明のまま残されている。著者らの解析で、EMP1遺伝子のプロモーター領域-900bpまでの部位に少なくとも三つの転写因子結合クラスターが存在していることが判明している（未発表データ）。今後の詳細な解析により、EMP1遺伝子の発現に関する転写調節機構についても明らかにしていきたい。

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) Cancer metastases: challenges and opportunities. *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) Metastasis in context: modeling the tumor microenvironment with cancer-on-a-chip approaches. *Dis. Model. Mech.*, **11**, dmm033100.
- 4) Wang, K. (2018) in *Cancer Metastasis* (Basbinar, Y. Ed.) Chapter 3, pp.27-37, IntechOpen, London.
 - 5) Ahmat Amin, M.K.B., Shimizu, A., Zankov, D.P., Sato, A., Kurita, S., Ito, M., Maeda, T., Yoshida, T., Sakaue, T., Higashiyama, S., et al. (2018) Epithelial membrane protein 1 promotes tumor metastasis by enhancing cell migration via copine-III and Rac1. *Oncogene*, **37**, 5416-5434.
 - 6) Ahmat Amin, M.K.B., Shimizu, A., & Ogita, H. (2019) The Pivotal Roles of the Epithelial Membrane Protein Family in Cancer Invasiveness and Metastasis. *Cancers (Basel)*, **11**, E1620.
 - 7) Ariës, I.M., Jerchel, I.S., van den Dungen, R.E., van den Berk, L.C., Boer, J.M., Horstmann, M.A., Escherich, G., Pieters, R., & den Boer, M.L. (2014) EMP1, a novel poor prognostic factor in pediatric leukemia regulates prednisolone resistance, cell proliferation, migration and adhesion. *Leukemia*, **28**, 1828-1837.
 - 8) Jain, A., Tindell, C.A., Laux, I., Hunter, J.B., Curran, J., Galkin, A., Afar, D.E., Aronson, N., Shak, S., Natale, R.B., et al. (2005) Epithelial membrane protein-1 is a biomarker of gefitinib resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 11858-11863.
 - 9) Lin, H., Zhang, X., Liao, L., Yu, T., Li, J., Pan, H., Liu, L., Kong, H., Sun, L., Yan, M., et al. (2018) CPNE3 promotes migration and invasion in non-small cell lung cancer by interacting with RACK1 via FAK signaling activation. *J. Cancer*, **9**, 4215-4222.
 - 10) Choi, H.Y., Park, N., Na, J.B., Ko, E.S., Park, J.Y., & Yoo, J.C. (2016) Direct binding of Copine3 with Jab1 activates downstream ErbB2 signaling and motility in SKBr3 breast cancer cells. *Oncol. Rep.*, **35**, 1147-1152.
 - 11) Yoshida, A., Shimizu, A., Asano, H., Kadonosono, T., Kondoh, S.K., Geretti, E., Mammoto, A., Klagsbrun, M., & Seo, M.K. (2015) VEGF-A/NRP1 stimulates GIPC1 and Syx complex formation to promote RhoA activation and proliferation in skin cancer cells. *Biol. Open*, **4**, 1063-1076.
 - 12) Cheever, M.A., Allison, J.P., Ferris, A.S., Finn, O.J., Hastings, B.M., Hecht, T.T., Mellman, I., Prindiville, S.A., Viner, J.L., Weiner, L.M., et al. (2019) The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin. Cancer Res.*, **15**, 5323-5337.
 - 13) Sun, B., Li, Y., Zhou, Y., Ng, T.K., Zhao, C., Gan, Q., Gu, X., & Xiang, J. (2019) Circulating exosomal CPNE3 as a diagnostic and prognostic biomarker for colorectal cancer. *J. Cell. Physiol.*, **234**, 1416-1425.
 - 14) Miao, L., Jiang, Z., Wang, J., Yang, N., Qi, Q., Zhou, W., Feng, Z., Li, W., Zhang, Q., Huang, B., et al. (2019) Epithelial membrane protein 1 promotes glioblastoma progression through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Oncol. Rep.*, **42**, 605-614.
 - 15) De Marco, C., Laudanna, C., Rinaldo, N., Oliveira, D.M., Ravo, M., Weisz, A., Ceccarelli, M., Caira, E., Rizzuto, A., Zoppoli, P., et al. (2017) Specific gene expression signatures induced by the multiple oncogenic alterations that occur within the PTEN/PI3K/AKT pathway in lung cancer. *PLoS One*, **12**, e0178865.

著者寸描

●清水 昭男 (しみず あきお)



滋賀医科大学医学部医学科生化学・分子生物学講座分子病態生化学部門助教。工学博士。

■略歴 1973年東京都に生る。97年京都産業大学工学部生物工学科卒業。同大学院工学科博士前期、後期課程終了、ポストン小児病院血管生物学部門ポスドクを経て2015年7月より現職。

■研究テーマ 血管新生、代謝疾患、循

環器疾患。

■抱負 “噛み付いたら放したらいかんのやで”を胸に今後もがんばっていきたい。

■ウェブサイト <http://www.shiga-med.ac.jp/~hqbioch2/>

■趣味 銭湯通い (豚足付き)。

●扇田 久和 (おぎた ひさかず)



滋賀医科大学医学部医学科生化学・分子生物学講座分子病態生化学部門教授。医学博士。

■略歴 1970年奈良県に生る。95年大阪大学医学部卒業。2003年同大学院医学系研究科修了。医学博士取得。循環器専門医取得。2003年から1年間ハーバード大学医学部へ海外留学の後、大阪大学助手(助教)、神戸大学准教授。11年より現職。

■研究テーマと抱負 がんと循環器疾患に関する基礎研究を行っている。がんでは浸潤・転移に関する分子機構の解明を、循環器疾患では生活習慣病と動脈硬化、心不全のメカニズム解明をそれぞれ目指し、新たな治療法開発を模索している。

■ウェブサイト <http://www.shiga-med.ac.jp/~hqbioch2/>

■趣味 スキー、読書、ドライブ。