

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870093

研究課題名(和文) TMEPAIの腫瘍の発生・悪性化における役割と臨床への応用

研究課題名(英文) The Roles of TMEPAI on tumorigenesis

## 研究代表者

渡邊 幸秀 (Watanabe, Yukihide)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：40618534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：TMEPAIはがん組織において高発現する膜貫通型タンパク質である。我々は既にTMEPAIがTGF- $\beta$ シグナルを抑制することを示しているが、本研究ではTMEPAIの腫瘍における役割を検討した。結果、肺がん細胞からTMEPAIをノックダウンすると、ヌードマウス移植腫瘍形成能およびスフェア形成能が著しく低下した。また、TMEPAIの発現制御にはオートクラインによるTGF- $\beta$ シグナルが重要であることを示し、TGF- $\beta$ と共にEGFシグナルが協調的に働くことで、TMEPAIの転写を活性化することを見出した。さらにTMEPAIの構造類似分子であるC18orf1もTGF- $\beta$ シグナルを抑制することを示した。

研究成果の概要(英文)：TMEPAI is a type I transmembrane protein which is highly expressed in diverse cancer cells. We previously reported that TMEPAI inhibits TGF- $\beta$  signaling pathway. However, TMEPAI's role in cancer cell was poorly understood. First, we established TMEPAI knock-down model using lung carcinoma cells, then performed xenograft assay and in vitro sphere formation assay. As a result, Knock-down of TMEPAI significantly reduces lung tumorigenesis emphasizing that autocrine TGF- $\beta$  is essential for the high expression of TMEPAI in lung carcinoma. Furthermore, EGF signaling collaboratively regulates TGF- $\beta$ -induced TMEPAI expression. Additionally, C18orf1, a family molecule of TMEPAI, also suppresses TGF- $\beta$  signaling.

研究分野：腫瘍学・分子細胞生物学

キーワード：腫瘍形成 TMEPAI 発現制御 TGF- $\beta$  EGF

### 1. 研究開始当初の背景

TMEPAI (transmembrane prostate androgen induced RNA)は前立腺においてアンドロゲンにより発現が誘導されるタンパク質として同定された膜貫通型タンパク質で、様々ながん組織において発現が亢進していることが報告されていた。しかし、その機能においてはあまり報告がなく、私達の研究により、TMEPAI が TGF- $\beta$ シグナルの負の制御因子として働くことを見出した。TGF- $\beta$ シグナルは細胞増殖、アポトーシス、細胞接着、運動性などの制御に関わるシグナルであり、その異常が多くの疾患に関与することが知られている。特にがんにおいてTGF- $\beta$ は細胞増殖を抑制し抗腫瘍作用を示し、悪性化過程においてTGF- $\beta$ はEMT誘導や運動性の亢進などを介して浸潤、転移能を亢進することが報告されている。よってTMEPAI が TGF- $\beta$ シグナルの抑制に関わることから、腫瘍形成にも関与している可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

TMEPAI が腫瘍形成においてどのような役割をしているのか解明し、その作用機序を解析する。また、TMEPAI の機能を抑制することで、抗腫瘍作用など臨床応用が可能であるか検討する。また TMEPAI が腫瘍組織において高発現することから、腫瘍診断マーカー等の診断法の開発にも応用できる可能性を考え、その有用性を検討する。さらに、TMEPAI ノックアウトマウスの解析を行い、生体内での TMEPAI の役割を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 生体における TMEPAI の役割の解析

既に作製していた TMEPAI ノックアウトマウスに加え、TMEPAI ファミリー分子である C18orf1 ノックアウトマウスを作製し、TMEPAI ファミリーのマウス個体での役割を病理学的、生化学的に解析する。

#### (2) 腫瘍における TMEPAI の役割の解析

TMEPAI が高発現する腫瘍細胞より TMEPAI ノックダウン細胞を樹立し、ヌードマウス移植腫瘍試験やスフェア形成試験を行い腫瘍形成に及ぼす影響を評価する。また、TMEPAI ノックアウトマウスと消化管腫瘍形成モデルマウス (*APC<sup>Min/+</sup>*マウス) を交配し、腫瘍形成能を評価する

#### (3) 臨床検体における TMEPAI の発現、進行度、予後との相関の解析

TMEPAI の抗体を作製し、種々のがん組織における TMEPAI の発現を免疫染色によって評価し、悪性度や予後との相関性を検討する。

#### (4) TMEPAI 発現制御機構の解析

TMEPAI は多くのがん細胞で発現の亢進が認められている。そこで、TMEPAI のプロモーター、エンハンサー解析を行い、その発現制御機構について検討する。

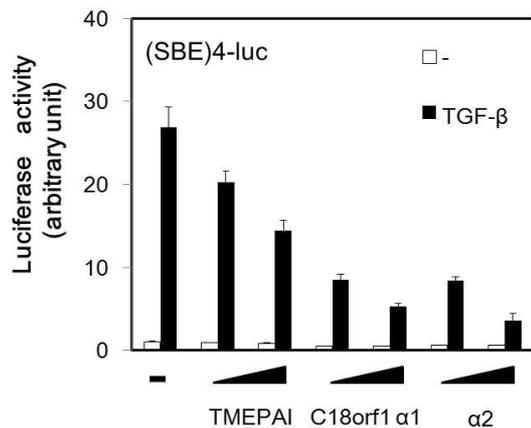
### 4. 研究成果

#### (1) 生体における TMEPAI の役割の解析

TMEPAI および C18orf1 ノックアウトマウスを作製し、病理学的・生化学的な解析を行ったが、通常飼育下における TMEPAI ファミリーノックアウトの顕著な表現型は認められていない。今後、マウスに様々な刺激を加えることで、その表現型を解析する。

TMEPAI のファミリー分子 C18orf1 については、ほとんど論文がなく機能については明らかではなかった。そこで機能を検討したところ、TMEPAI と同様に TGF- $\beta$ シグナルを抑制する事を見出し、発表した。(Nakano et al., JBC, 2014)

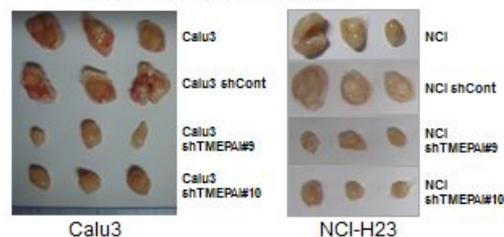
TMEPAI, C18orf1によるTGF- $\beta$ シグナルの抑制



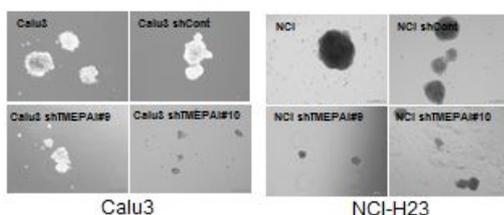
#### (2) 腫瘍における TMEPAI の役割の解析

肺がん細胞 (Calu-3, NCI-H23) において、TMEPAI の発現は亢進しており、その発現亢進にはオートクライン TGF- $\beta$ シグナルが重要であることを示した。また、これらの細胞から TMEPAI をノックダウンすると、ヌードマウス移植腫瘍形成能や in vitro スフェア形成能が著しく低下することから、TMEPAI は腫瘍形成を促進する働きがある事が示唆された。(Vo Nguyen et al., Cancer Sci., 2014)

ヌードマウス移植腫瘍形成試験



スフェア形成試験



TMEPAI ノックアウトマウスと APC<sup>Min/+</sup>マウスの交配による腫瘍形成実験においては、TMEPAI ノックアウトマウスの作製時に用いたマウス ES 細胞の系統のバックグラウンドが腫瘍形成頻度に影響してしまったため、戻し交配を行った後に検討する予定である。

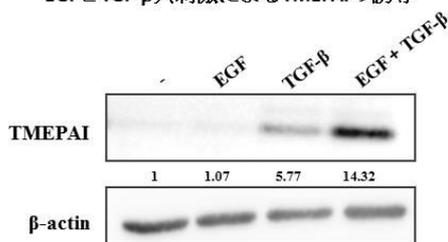
(3) 臨床検体における TMEPAI の発現、進行度、予後との相関の解析

大腸菌に TMEPAI タンパク質を発現させ精製した後、TMEPAI ノックアウトマウスに免疫することで TMEPAI モノクローナル抗体を作製した。(Vo Nguyen et al., Cancer Sci., 2014) 臨床検体の免疫染色を試みたが、パラフィン包埋切片を安定的に染色することが出来なかった。染色条件の検討や検体の作製方法の最適化が今後の課題である。

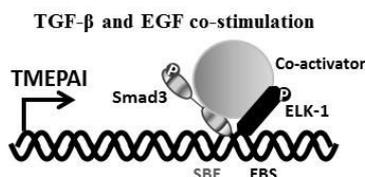
(4) TMEPAI 発現制御機構の解析

TMEPAI の発現制御には TGF-βシグナルが重要であることを示しているが、EGF シグナルを共刺激することで、さらに TMEPAI の発現が強く誘導されることが明らかになった。また、その制御は TGF-βシグナルの下流転写因子 Smad と EGF/MAPK/Erk シグナルの下流転写因子 Elk-1 が TMEPAI 遺伝子の第一イントロン上に結合することで調節されていることを示した。(Azami et al., BBRC, 2015)

EGFとTGF-β共刺激によるTMEPAIの誘導



EGFとTGF-βシグナルによるTMEPAI発現制御機構模式図



## 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) Azami S, Vo Nguyen TT, Watanabe Y\*, Kato M. Cooperative induction of transmembrane prostate androgen induced protein TMEPAI/PMEPAI by transforming growth factor-β and epidermal growth factor signaling. **BBRC**, 456: 580-585, 2015, \* corresponding author, 査読有

- (2) Nakano N, Maeyama K, Sakata N, Itoh F, Akutsu R, Nakata M, Katsu Y, Ikeno S, Togawa Y, Vo Nguyen TT, Watanabe Y, Kato M, Itoh S. C18ORF1: a novel negative regulator of TGF-β signaling. **J Biol Chem**. 289: 12680-12692, 2014, 査読有

- (3) Vo Nguyen TT, Watanabe Y, Shiba A, Noguchi M, Itoh S and Kato M. TMEPAI/PMEPAI enhances tumorigenic activities in lung cancer cells. **Cancer Sci**. 105: 334-341, 2014, 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) Yukihide Watanabe, TMEPAI cross regulation with multiple signaling pathways during tumorigenesis, Joint international symposium on TGF-β family and Cancer, 2015/1/12-13, International Congress Center Tsukuba, つくば、
- (2) 渡邊幸秀、腫瘍形成における TMEPAI の役割、第 37 回日本分子生物学会年会、2014/11/25-27、パシフィコ横浜、横浜
- (3) Vo Nguyen TT, 渡邊幸秀、TMEPAI enhances tumorigenic activities in lung cancer cells、第 73 回日本癌学会学術総会、2014/9/25-27、パシフィコ横浜、横浜
- (4) 渡邊幸秀、TMEPAI, a negative regulator of TGF-β signal, is involved in cancer development、第 72 回日本癌学会学術総会、2013/10/3-5、パシフィコ横浜、横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
筑波大学・実験病理学研究室ホームページ  
<http://www.md.tsukuba.ac.jp/epatho/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

渡邊 幸秀 (Watanabe, Yukihide)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：40618534