

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19100

研究課題名(和文)腫瘍形成におけるTMEPAIの分子機構の解明

研究課題名(英文)The molecular function of TMEPAI in 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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：TMEPAIはがんで高発現し、腫瘍形成に関連する膜タンパク質である。TMEPAIは細胞外領域の異なる複数のアイソフォームが存在することから、がん細胞におけるアイソフォームの同定を行った結果、乳がん細胞ではアイソフォームDの発現が強い傾向が認められた。また、乳がん細胞においてTMEPAIは足場非依存的な増殖に関与することが明らかとなった。さらにTMEPAIの新規の機能として、TMEPAIがWntシグナルを抑制することを見出した。

研究成果の概要(英文)：TMEPAI is a transmembrane protein that is highly expressed in cancer cells and is known to be involved in tumorigenesis. Several TMEPAI isoforms that possess distinct extra-cellular domain are reported. In this study, we found that the TMEPAI isoform D is strongly expressed in breast cancer cell lines. Therefore, TMEPAI is involved in anchorage-independent growth in breast cancer cells. Moreover, we demonstrated that TMEPAI's novel molecular function that TMEPAI inhibits Wnt signaling pathway.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：腫瘍形成 足場非依存的増殖 TMEPAI Wnt

1. 研究開始当初の背景

TMEPAI (transmembrane androgen induced-protein) 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膜貫通型タンパク質として同定された。その後、TMEPAI は様々ながん組織において発現が亢進している報告があり、アンドロゲン以外にも TGF-beta や EGF 等により発現が制御される遺伝子として知られている。TMEPAI をがん細胞でノックダウンするとヌードマウス移植腫瘍形成能やスフェア形成能が低下することから、近年 TMEPAI は腫瘍関連分子と考えられている。TMEPAI の分子機能として、TMEPAI が TGF-beta シグナルの負の制御分子として働くこと、TMEPAI がアンドロゲン受容体や PTEN の分解を促進することで、結果としてアンドロゲンシグナルを負に制御または PI3K/AKT シグナルを増強するという報告がある。しかし、TMEPAI の生体での役割については不明な点が多い。

2. 研究の目的

TMEPAI は腫瘍形成に関与することが示唆されているが、その分子メカニズムの詳細はいまだ不明である。また、TMEPAI は細胞外ドメインの異なる4つのアイソフォームが存在するが、正常細胞やがん細胞において発現アイソフォームの違いがあるか、またはアイソフォーム間での機能の違いについては報告がないことから、本課題では乳がん細胞を用いて、TMEPAI のアイソフォーム解析を行い、さらに TMEPAI の腫瘍における分子機能の解析を行った。

3. 研究の方法

TMEPAI のアイソフォームの同定

6 種類のヒト乳がん細胞株 (BT-549, HCC1395, Hs578T, MDA-MB-157, BT-474, SKBr3) およびヒト正常乳腺上皮細胞 (MCF10A1) ヒト正常角化細胞 HaCaT に TGF-beta (1 ng/ml) を 2 時間添加した後、Isogen II を用いて、添付の操作手順に従い total RNA を回収した。さらに、SMARTer RACE cDNA Amplification Kit の操作手順に従い、5' RACE 法により、TMEPAI mRNA の 5'末の配列を増幅し、シーケンス解析によりアイソフォームを同定した。

また、上記の細胞より細胞溶解液を調整し、同時に各アイソフォームを発現するプラスミド DNA を導入した HEK293 細胞の細胞溶解液を調整した。細胞溶解液は、SDS-PAGE およびウエスタンブロット法を行い、抗 TMEPAI 抗体による免疫ブロットで得られたバンドの分子量によりアイソフォームの同定を試みた。

TMEPAI ノックアウト細胞の樹立および足場非依存的増殖能の評価
Crispr/Cas9 システムを用いて TMEPAI を高発現する乳がん細胞 (Hs578T, BT-549) か

らノックアウト細胞を樹立した。TMEPAI の Exon2 を標的とする 2 つの guideRNA と Cas9 を発現するプラスミド DNA をそれぞれ細胞にトランスフェクションし、クローン化した後、シーケンス解析により TMEPAI 遺伝子上への変異を確認し、ウエスタンブロット法により TMEPAI タンパク質の消失を確認した。それらの細胞を用いて、poly-HEMA コートした低接着性の細胞培養ペトリ皿にスフェア形成メディウム (25 ng/ml EGF, 25 ng/ml bFGF, 1 x B27, 1% Methylcellulose in DMEM/F-12) を用いて培養し、7~14 日後のスフェアの大きさ及び数を測定した。さらに、TMEPAI ノックアウト細胞に TMEPAI をレンチウイルスシステムにより再発現させ、同様の実験を行った。

TMEPAI による Wnt シグナル抑制の評価
Wnt シグナルの活性化の評価には TOP-Flash、Wnt シグナル標的遺伝子 (Axin-2, c-Myc 等) を用いた。レポータープラスミド DNA と共に TMEPAI 発現プラスミド DNA を共トランスフェクションにより細胞に導入した後、Wnt3 リガンドの添加、または GSK3beta 阻害剤 LiCl の処理を行うことで Wnt シグナルを活性化し、TOP-Flash プラスミド DNA により産生された Luciferase の活性化量をルミノメーターにて測定した。また、上記の細胞より total RNA を抽出し、cDNA に変換した後、Real-time PCR にて Wnt シグナル標的遺伝子の発現量を評価した。さらに、Wnt シグナルの細胞内情報伝達分子のひとつである beta-catenin の細胞内局在を細胞質 核分画法により解析した。

4. 研究成果

TMEPAI のアイソフォームの同定

乳がん細胞および正常な乳腺上皮細胞、皮膚角化細胞では、TGF-beta 刺激により TMEPAI の発現誘導が認められ (Fig.1A)、5' RACE 法により発現アイソフォームを解析したところ、正常細胞ではアイソフォーム B、乳がん細胞ではアイソフォーム D の発現が高い傾向が認められた (Fig.1B)。

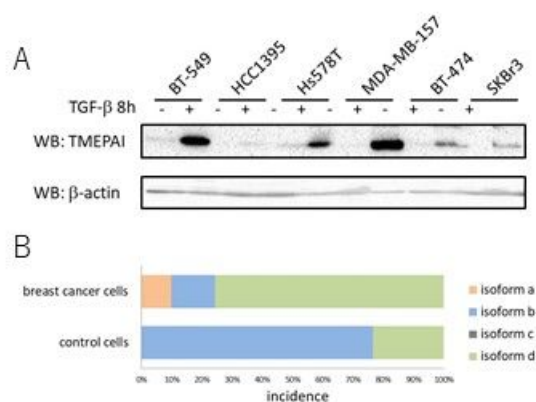


Fig.1. 乳がん細胞において TGF-beta 誘導性 TMEPAI の発現とアイソフォームの解析

TMEPAI の足場非依存的増殖能への影響

TMEPAI をノックアウトした乳がん細胞では、通常の平面培養条件下では細胞増殖速度に変化は認められなかった。しかしながら、低接着ペトリ皿を用いたスフェア培養条件下では、TMEPAI をノックアウトすることで、スフェア形成能が著しく低下した。さらに、ノックアウト細胞に TMEPAI のアイソフォーム A, B, D を再発現させると、スフェア形成能が回復した。(Fig.2) 従って、TMEPAI はスフェア形成能に重要な役割を果たしていることが示唆され、またアイソフォームの違いによるスフェア形成能は変わらないことから、TMEPAI の細胞外ドメインは、この機能に関与せず、細胞内ドメインが重要であると考えられる。

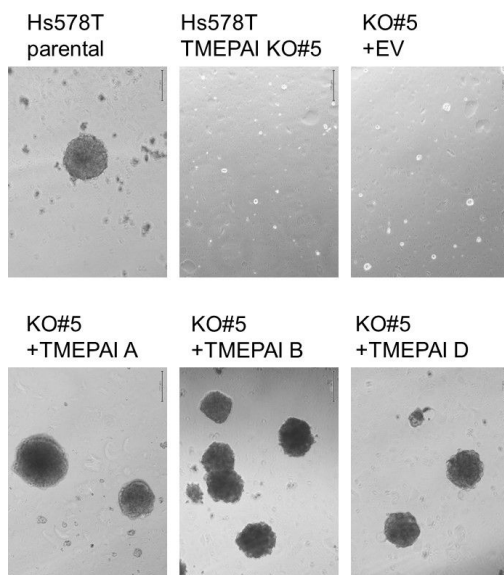


Fig.2. 乳がん細胞 Hs578T 細胞 (TMEPAI ノックアウトおよび TMEPAI 再発現細胞) の足場非依存的増殖能の解析

TMEPAI による Wnt シグナルの抑制

TMEPAI は様々なシグナル伝達に関与することが知られている。本課題では TMEPAI の Wnt シグナルに対する影響を検討した。TOP-Flash レポーターアッセイにおいて、TMEPAI を共発現させると Wnt3A や LiCl 刺激によって誘導された TOP-Flash 活性が抑制された。また、TOP-Flash レポーターと beta-catenin を共トランスフェクションした時の TOP-Flash 活性も TMEPAI により抑制された。(Fig.3A) さらに、TMEPAI の共発現により Wnt シグナル標的遺伝子 (Axin2) の発現が抑制され、TMEPAI のノックアウト (ノックダウン) により標的遺伝子の発現が増強された。従って、TMEPAI は Wnt シグナルを抑制する働きがあることが示唆された (Fig.3B)。

さらに、beta-catenin の局在を検討したとこ

ろ、TMEPAI の共発現により核内の beta-catenin 量が減少し、TMEPAI ノックアウト細胞では核内 beta-catenin 量が増加することから、TMEPAI は beta-catenin の発現量および核移行を調節することで、Wnt シグナルを抑制していると考えられる (Fig.3C)。

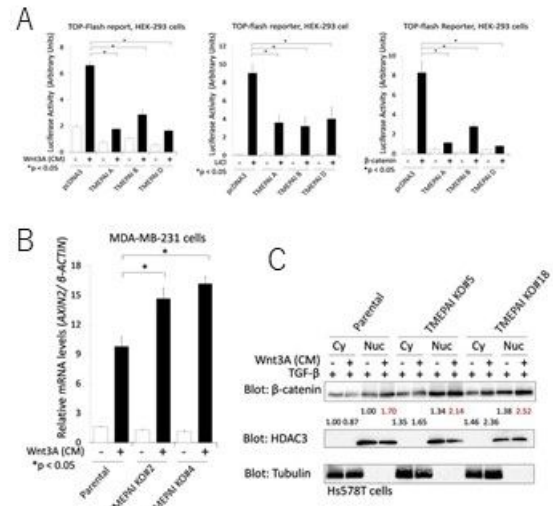


Fig.3. TMEPAI による Wnt シグナルの抑制

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 2 件)

1. Wardhani Bantari W. K., Puteri Meidi U., Watanabe Yukihide, Louisa Melva, Setiabudy Rianto, Kato Mitsuyasu Knock-out transmembrane prostate androgen-induced protein gene suppressed triple-negative breast cancer cell proliferation., MEDICAL JOURNAL OF INDONESIA, 査読有, 26, 3, 2017, 178-182
DOI: [10.13181/mji.v26i3.1823](https://doi.org/10.13181/mji.v26i3.1823)
2. Wardhani Bantari W. K., Puteri Meidi U., Watanabe Yukihide, Louisa Melva, Setiabudy Rianto, Kato Mitsuyasu TMEPAI genome editing in triple negative breast cancer cells., MEDICAL JOURNAL OF INDONESIA, 査読有, 26, 1, 2017, 14-18
DOI: [10.13181/mji.v26i1.1871](https://doi.org/10.13181/mji.v26i1.1871)

〔学会発表〕(計 5件)

1. Yukihide Watanabe
Roles of TMEPAI in breast cancer cells
The 17th TGF-beta meeting, Sweden,
2017
2. Riezki Amalia, Yukihide Watanabe,
Mitsuyasu Kato
Inhibitory roles of TMEPAI on
Wnt/beta-Catenin Signaling.
第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、
2016
3. Meidi Utami Puteri, Yukihide
Watanabe, Mitsuyasu Kato
Identification of TMEPAI isoform in
breast cancer cells
第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、
2016
4. 渡邊幸秀、加藤光保
TMEPAI のがん細胞における役割
第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、2016
5. Riezki Amalia, Yukihide Watanabe,
Mitsuyasu Kato
Inhibitory roles of TMEPAI on
Wnt/beta-Catenin Signaling.
The Wnt meeting. Czech Republic, 2016

〔その他〕

筑波大学実験病理学ホームページ

URL: <http://www.md.tsukuba.ac.jp/epatho/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 幸秀 (Yukihide Watanabe)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：40618534

(2) 研究協力者

- ・メイディ ウタミ プテリ (Meidi Utami Puteri)
- ・リズキ アマリア (Riezki Amalia)
- ・モハメド アブデルアジズ (Mohammed Abdelaziz)
- ・バンタリ ウィシュヌ クスマ ワルダニ (Bantari Wisynu Kusuma Wardhani)