

## 学内グラント 報告書

## 平成25年度 学内グラント終了時報告書

泌尿器がんにおける EBAG9 発現がもたらす微小環境変化と  
腫瘍増殖メカニズムの関係

研究代表者 宮崎 利明 (ゲノム医学研究センター)

本研究では、泌尿器がんにおけるEBAG9発現がもたらす微小環境変化と腫瘍増殖メカニズムの関係を明らかにする目的で、EBAG9特異的抗体を作製してウェスタンブロット法による抗体の特異性を検証し、がん臨床検体における免疫組織化学的解析に応用し、その有用性を実証した。

研究代表者が所属する研究室では、乳がん細胞より、エストロゲン受容体がゲノムに結合する部位をクローニングする手法を用いて、数種類のエストロゲン応答遺伝子の同定に成功し、その1つとして estrogen receptor-binding fragment associated antigen 9 (EBAG9) を同定した<sup>1)</sup>。EBAG9はエストロゲン標的組織だけでなく、脳、肝臓、心臓、リンパ節、腎臓など多彩な臓器で発現している。EBAG9は、様々ながんにおいても高発現が認められており、前立腺がん<sup>2)</sup>、腎細胞がん<sup>3)</sup>、膀胱がん<sup>4)</sup>、精巣がん<sup>5)</sup>などの泌尿器がんをはじめ、肝細胞がん<sup>6)</sup>、卵巣がん<sup>7)</sup>、乳がん<sup>8)</sup>において発現上昇していることが報告されてきた。がん細胞の培養系において、EBAG9を過剰発現しても細胞増殖に変化はみられないが、細胞の移動能は亢進する。また、EBAG9を過剰発現させたがん細胞をマウスに皮下移植すると、腫瘍形成が促進する。さらに、形成された腫瘍内にEBAG9のsiRNAを投与すると、腫瘍増殖が抑えられることを所属研究室では報告してきた<sup>3,4)</sup>。以上から、EBAG9は腫瘍本体において、増殖を直接制御している可能性と、腫瘍周辺の微小環境を変化させ腫瘍増殖を促進している可能性の両方向からのがん病態生理への関与が考えられている。EBAG9が微小環境に作用するメカニズムとして、がん細胞から分泌されたEBAG9が周囲の間質細胞や末梢リンパ球の受容体等に結合することにより作用を発揮する可能性も考えられる。ドイツの研究グループによるEBAG9ノックアウトマウスの解析では、EBAG9は細胞傷害効果に関する因子の細胞外分泌を阻害することによって、細胞傷害性T細胞の活性を

抑制するという報告もされている<sup>9)</sup>。このような変化が、がん周囲の微小環境において生じれば、がん細胞の免疫系からの回避に有利に働くことも想定される。しかしながら、EBAG9のがん細胞への直接的作用およびがん免疫を介する作用については、未だ十分には解明されていない。

泌尿器がんにおけるEBAG9発現がもたらす微小環境変化と腫瘍増殖メカニズムの関係を明らかにする目的で、特異性の高いEBAG9モノクローナル抗体を独自に作製した。ヒトEBAG9遺伝子発現ベクターを導入した胎児腎上皮由来の培養細胞から細胞抽出液を調整し、ウェスタンブロット法によりEBAG9モノクローナル抗体の特異性を検証した。次に、がん臨床検体における抗体のEBAG9蛋白質検出能力を検討するため、既にいくつかの蛋白質発現性と予後相関解析に成功している乳がん病理組織を用いて、免疫組織化学を施行した。乳がんは、泌尿器がんの一つである前立腺がんと同様、ホルモン依存性がんであり、両者ともにホルモン受容体に対する内分泌療法が初期には有効であるが、病態の進展により、ホルモン治療抵抗性を示すことが問題になるなどの共通点を多く有している。乳がん病理組織を用いての研究は、埼玉医科大学倫理委員会の承認が得られている。乳がん手術検体を、本研究で作製したEBAG9モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った。EBAG9免疫染色性は、がん細胞の細胞質を中心に検出された。本研究において検討を行った乳がんでは、全例、術後のホルモン治療(タモキシフェン)を行っており、術後5年以内に再発群と無再発群の2つのグループに分けて、予後相関解析を行った。その結果、無再発群よりも再発群において細胞質内でのEBAG9の免疫染色性が上昇していた。また、予後相関解析においても、EBAG9陰性のがんよりもEBAG9陽性のがんを有する患者群において、無再発生存期間が短いことが示された。EBAG9の免疫染色性とリンパ節転移は、無再

発生存期間の独立した予測因子であった。以上から、EBAG9の免疫染色性は乳がんにおける予後不良の予測マーカーとして、診断と治療選択に役立つ可能性が示唆された。

本研究に加え、EBAG9は前立腺がん、膀胱がん、腎がん、精巣腫瘍をはじめとする各種泌尿器がんにおいても高発現していることから、泌尿器がんならびにその他のがんにおいても、予後予測因子ならびに治療法の選択のためのバイオマーカーとして臨床に活用できる可能性が考えられる<sup>2-5)</sup>。EBAG9のがん増殖における作用機序については、EBAG9を過剰発現させたマウス腎がん細胞を用いた移植モデルにおいて、CD8<sup>+</sup>T細胞の腫瘍内への浸潤が減少する細胞傷害性T細胞を介するメカニズム<sup>3)</sup>や、細胞傷害効果に関する因子の細胞外分泌を阻害し、細胞傷害性T細胞の活性を抑制するメカニズム<sup>9)</sup>などが考えられる。EBAG9の抗腫瘍免疫における制御機能に加え、他のメカニズムが腫瘍増殖に関与する可能性も考えられている。すなわち、EBAG9依存的な細胞表面の糖鎖修飾の変化による細胞の増殖や移動能の上昇<sup>12)</sup>、腫瘍増殖や転移に好ましいがん微小環境の構築<sup>9)</sup>、増殖因子またはサイトカインの分泌を増加させることによる血管新生の促進などの可能性が想定される<sup>13)</sup>。EBAG9による抗腫瘍免疫の抑制、腫瘍細胞の転移能の亢進、血管新生の促進、ゴルジ体<sup>14)</sup>における役割などの作用メカニズムが、乳がんにおいてはホルモン治療耐性の獲得に関与し、がん病態悪化に作用する可能性が考えられる。実際に、本研究グラントにて泌尿器がんにおける臨床材料ならびに動物モデルを用いた検討を進めているが、詳細は未発表データのため先に原著論文で発表することとする。

本研究により、EBAG9のがん病態を探索する新しいツールとしての特異性が高い抗体が確立し、臨床検体を用いての免疫組織化学的解析により、がん病態の進行との予後相関を示すことが可能になった。泌尿器がん細胞を用いての動物モデルならびに泌尿器がん臨床検体での解析に、EBAG9抗体を活用し、未だ画期的治療の方法が少ない難治性泌尿器がんの病態解明と治療開発へ結びつけていきたい<sup>15)</sup>。

#### 参考文献

- 1) Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Kawashima H, Muramatsu M. Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Mol Cell Biol* 1998;18:442-9.
- 2) Takahashi S, Urano T, Tsuchiya F, Fujimura T, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S. EBAG9/RCAS1 expression and its prognostic significance in prostatic cancer. *Int J Cancer* 2003;106:310-5.
- 3) Ogushi T, Takahashi S, Takeuchi T, Urano T, Horie-Inoue K, Kumagai J, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S. Estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 is a tumor-promoting and prognostic factor for renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:3700-6.
- 4) Kumagai J, Urano T, Ogushi T, Takahashi S, Horie-Inoue K, Fujimura T, Azuma K, Muramatsu M, Ouchi Y, Kitamura T, Inoue S. EBAG9 is a tumor-promoting and prognostic factor for bladder cancer. *Int J Cancer* 2009;124:799-805.
- 5) Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Xiaoqiang L, Ogushi T, Muramatsu M, Ouchi Y, Kitamura T, Homma Y, Inoue S. Estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9 expression and its clinical significance in human testicular cancer. *Int J Urol* 2009;16:329-32.
- 6) Aoki T, Inoue S, Imamura H, Fukushima J, Takahashi S, Urano T, Hasegawa K, Ogushi T, Ouchi Y, Makuuchi M. EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma: correlation with tumour dedifferentiation and proliferation. *Eur J Cancer*, 2003;39:1552-61.
- 7) Akahira JI, Aoki M, Suzuki T, Moriya T, Niikura H, Ito K, Inoue S, Okamura K, Sasano H, Yaegashi N. Expression of EBAG9/RCAS1 is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2004;90:2197-202.
- 8) Suzuki T, Inoue S, Kawabata W, Akahira J, Moriya T, Tsuchiya F, Ogawa S, Muramatsu M, Sasano H. EBAG9/RCAS1 in human breast carcinoma: a possible factor in endocrine-immune interactions. *Br J Cancer* 2001;85:1731-7.
- 9) Rüder C, Höpken UE, Wolf J, Mittrücker HW, Engels B, Erdmann B, Wollenzin S, Uckert W, Dörken B, Rehm A. The tumor-associated antigen EBAG9 negatively regulates the cytolytic capacity of mouse CD8<sup>+</sup> T cells. *J Clin Invest* 2009;119:2184-203.
- 10) Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;51:55-67.
- 11) O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 2004;18:1859-75.
- 12) Julien S, Adriaenssens E, Ottenberg K, Furlan A, Courtand G, Vercoutter-Edouart AS, Hanisch FG, Delannoy P, Le Bourhis X. ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies

their O-glycosylation pattern and enhances their tumorigenicity. *Glycobiology* 2006;16:54-64.

- 13) Sonoda K, Miyamoto S, Yamazaki A, Kobayashi H, Nakashima M, Mekada E, Wake N. Biologic significance of receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1) as a pivotal regulator of tumor growth through angiogenesis in human uterine cancer. *Cancer* 2007;110:1979-90.
- 14) Migita T, Inoue S. Implications of the Golgi apparatus in prostate cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:1872-6. Review.
- 15) Kumagai J, Takahashi S, Homma Y, Inoue S. EBAG9 as a tumor-promoting factor for bladder cancer. *Bladder cancer: Etymology, Diagnosis, and Treatments* 2010;187-93.

## 研究成果リスト

### 論文

- 1) Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Miyazaki T, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S. Association of positive EBAG9 immunoreactivity with unfavorable prognosis in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Clin Breast Cancer* 2013;13:465-70.

- 2) Takagi K, Ito S, Miyazaki T, Miki Y, Shibahara Y, Ishida T, Watanabe M, Inoue S, Sasano H, Suzuki T. Amyloid precursor protein in human breast cancer: An androgen-induced gene associated with cell proliferation. *Cancer Sci* 2013;104:1532-8. 表紙, ハイライト.

### 学会発表

- 1) 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, 2014/4/24-26, 福岡国際会議場・福岡サンパレス(福岡市)
- 2) 宮崎利明, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡. 担癌宿主側免疫系細胞における EBAG9 は in vivo での腫瘍増殖・転移制御する, 第 36 回日本分子生物学会, 2013/12/3-6, 神戸ポートアイランド(神戸市)
- 3) 宮崎利明, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡. 宿主側 EBAG9 欠失による腫瘍増殖・転移の抑制メカニズム, 第 11 回 RCGM フロンティアシンポジウム, 2013/11/22-23, 埼玉医科大学日高キャンパス・創立 30 周年記念講堂(日高市)