

学位論文

Interaction between membranous EBP50 and myosin 9 as a favorable  
prognostic factor in ovarian clear cell carcinoma

(卵巣明細胞癌の予後因子としての膜型 EBP50/MYH9 発現に関する研究)

DM20020 中川 茉祐

北里大学大学院医療系研究科 医学専攻博士課程  
生体構造医科学群 分子病理学  
指導教授 三枝 信

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

## 要旨

### 1. 序論

卵巢上皮性腫瘍は全ての婦人科系悪性腫瘍(子宮頸癌、子宮体癌、卵巢癌など)のうち最も高い死亡率を示し、4つの組織型に分類される。このうち、卵巢明細胞癌(OCCC: ovarian clear cell carcinoma)は緩徐な発育傾向を示し、早期発見は外科的切除の対象ともなり予後良好であるが、進行期は抗癌剤感受性に乏しく予後不良となる。また、線維腺腫と子宮内膜症が前癌病変として知られているが、子宮内膜症有病者は健常人に比して OCCC 発症リスクが約3倍になる。OCCC の腫瘍自体北米や欧米諸国と比して本邦の有病率が高いことが知られてきており、早期診断のための臨床応用可能なバイオマーカーの同定と、OCCC での腫瘍進展を制御する分子機構の解明が必要である。

細胞骨格の維持に参与する足場タンパクのひとつに Ezrin-radixin-moesin binding protein-50 (EBP50)がある。これは、細胞質内 PDZ アダプターをもつタンパク質ファミリーの1つとして認知されている。EBP50 の膜性発現は上皮の極性を保持するために必要とされている。ところが、EBP50 の発現局在が変化することでその機能が異なることが知られており、他臓器腫瘍では発現局在が細胞膜から細胞質へ変化することで上皮形態の破壊による腫瘍進展に寄与することが報告されている。

前述のとおり、細胞質性 EBP50 の発現局在が腫瘍の進展に寄与する予後不良因子として密接に関連していることに基づいて、OCCC において上皮極性の確立と維持における膜性 EBP50 の発現による作用が、OCCC 患者の予後を左右するのではないかと仮説を立て、膜性 EBP50 発現の検索とその機能的役割の解析を目的とした。

### 2. 方法

北里大学病院で2005年-2019年の期間に施行された卵巢摘出を含む手術症例で、病理診断が卵巢原発の明細胞癌であり、且つ、術前化学療法の施行や減量術後の残存症例ではないことを確認した120症例の臨床検体を対象として選定した。臨床検体で EBP50 の染色を行い、発現局在を細胞膜または細胞質内・核内・陰性に分けて評価した。それぞれ陽性細胞の範囲と染色強度をスコア化し、臨床病理学的因子(年齢、臨床病期、腫瘍進展の程度をみる T 因子、リンパ節転移の有無をみる N 因子、遠隔転移の有無をみる M 因子、播種巣の有無)との検討や Kaplan-Meier 生存曲線による予後解析を施行した。

臨床検体で得た結果をもとに、卵巢明細胞癌細胞における EBP50 の機能的役割を検討するため、OCCC 培養細胞株から膜性 EBP50 発現がある OVISE を選定した。ついで、OVISE から EBP50 ノックアウト細胞(OVISE-EBP50 KO 細胞)の樹立を行った。上記の細胞株を利用していくつかの検討を施行した。まず、OVISE を用いて、低密度で散布したのち EBP50 KO を行い細胞増殖へ及ぼす影響の解析をした。次に、OVISE-EBP50 KO 細胞を用いて、モック細胞と比較しながら、Flowcytometry による細胞周期解析や Migration assay、Wound healing assay による細胞運動能(移動能)の解析、Western blot 法による上皮間

葉系(epithelial mesenchymal transition : EMT)関連・癌幹細胞化(cancer stem cells : CSC)関連・細胞周期関連/細胞死関連のタンパクの発現解析、Aldefluor assay による CSC 化誘導能解析を行った。タンパク発現の結果をうけ、EMT/CSC マーカーである E-カドヘリン、Snail、ALDH1、ビメンチン、Sox2 を用いて、臨床検体で免疫染色を行い、その発現の有無と強度をスコア化して確認した。

EBP50 の発現局在に関して、ショットガンプロテオミクス法による膜性 EBP50 発現時の結合パートナー分子の同定と、GST Pull down assay による EBP50 における結合ドメインの同定を行った。ここで同定された MYH9 について、臨床検体で免疫染色を行って発現を評価し、EBP50 と同様にスコア化するとともに、細胞膜上での EBP50/MYH9 共発現の有無に関して蛍光二重染色・Proximity Ligation Assay(PLA)による検討を追加した。

最後に、細胞上で EBP50/MYH9 の相互作用に関して検討するため、MYH9 の機能阻害作用をもつ Blebbistatin 処理を用いて、OVISE に Blebbistatin 処理した細胞と、OVISE-EBP50 KO 細胞に Blebbistatin 処理を行った細胞で、それぞれ上記と同様の方法を用いて EMT/CSC について検討と解析を重ねた。

### 3. 結果

[臨床検体における EBP50 発現の検索と予後解析]

臨床検体を用いた EBP50 免疫染色では、OCCC 細胞の細胞膜上または細胞質・核内で観察され、一部症例では完全に陰性を示した。Kaplan-Meier 生存曲線による解析で、膜性 EBP50 発現群は、細胞質性 EBP50 発現群・陰性群と比較して、全生存期間(OS : overall survival)、および無増悪期間(PFS : progression free survival)ともに予後良好であった。

[OVISE-EBP50 KO 細胞を用いた増殖能・運動能・癌幹細胞化の検討]

OVISE-EBP50 KO 細胞では、モック細胞に比して線維芽細胞様の形態を示す上皮間葉転換 (EMT) 様の変化を呈する細胞が増加した。

細胞増殖能の評価では、細胞数が日を追うごとに有意に低くなる傾向があった。細胞周期でみると、G1 期にある細胞が多く G2/M 期にある細胞は少なかった。これらのことから、細胞増殖能の低下が窺われた。

細胞運動能の評価では、Migration assay、Wound healing assay のいずれにおいても OVISE-EBP50 KO 細胞は遊走速度の有意な増加を示した。一方、Aldefluor assay では、ALDH 活性がモック細胞に比して上昇を示し、OVISE-EBP50 KO 細胞では高い割合で CSC 様細胞が含まれていることが観察される。

最後に、複数の上皮間葉転換マーカー・癌幹細胞化マーカー・細胞周期/細胞死関連マーカーを用いてタンパク発現の有無をみたところ、上皮間葉転換マーカーの N-カドヘリン・ビメンチン・Snail、癌幹細胞化マーカーの ALDH1・Sox2、細胞周期/細胞死関連マーカーのうち細胞増殖抑制時に発現する p27、p21 の発現の増加を認めた。

これらの所見は、OCCC 細胞における膜性 EBP50 発現の欠如が、細胞増殖能の減少、細胞運動能亢進、EMT 様表現型の誘導を通して CSC 様細胞の特性を生み出すことを示唆し



ている。

#### [EBP50 結合パートナー分子を同定]

EBP50 は他の分子との相互作用を通して機能を発揮することから、EBP50 が細胞膜に発現する際の結合パートナー分子を同定するため、タンパクの網羅的解析を行い、Myosin9(MYH9)が検出された。GST Pull down assay で MYH9 は EBP50 の持つ PDZ1 ドメインに特異的に結合することが確認された。臨床検体においても、蛍光二重染色で EBP50 と MYH9 の共免疫局在は OCCC 細胞膜頂部で観察され、Proximity Ligation Assay(PLA)の結果とも一致した。このことから、OCCC 細胞の細胞膜頂部局在で EBP50 と MYH9 の 2 分子間の相互作用が示された。

#### [EBP50/MYH9 の相互作用の検討]

MYH9 も EBP50 と同様に細胞骨格や上皮極性の制御を担うタンパクのひとつとして知られている。そこで、OCCC 細胞における MYH9 の役割を評価するため、MYH9 機能を特異的に阻害する作用のある Blebbistatin 処理を行った OVISE 細胞を用いて、OVISE-EBP50 KO 細胞と同様に解析した。その結果、用量依存的に線維芽細胞様形態への著明な変化、増殖能低下、EMT/CSC 関連タンパクの発現の増加、移動能亢進を示した。さらに、OVISE-EBP50 KO 細胞を Blebbistatin 処理すると、その効果は増強された。このことから、MYH9 の抑制は OCCC 細胞における EMT 機能、増殖および運動能にも影響を及ぼすことが示唆され、OVISE-EBP50 KO 細胞で得られた結果と一致する。以上から、おそらく、EBP50 は PDZ1 ドメインを介した MYH9 との強い相互作用を介して、MYH9 の機能を安定化させる役割を担っていることが示唆された。

#### [膜性 EBP50/MYH9 の共発現と予後との関連]

臨床検体で MYH9 の免疫染色を行いスコア化したところ、膜性 EBP50 高発現群で MYH9 が有意に高発現を示し、正の相関が得られた。また、E-カドヘリン、Snail、ALDH1、Vimentin、Sox2 に関しても免疫染色を行いスコア化したところ、Snail と ALDH1 スコアは膜性 EBP50 高発現群で有意に低く、Snail スコアとは負の相関が得られた。

臨床病理学的因子との検討では、膜性 EBP50 高発現は臨床病期早期および遠隔転移の欠如において有意に関連し、予後指標としても有効なことが得られた。Kaplan-Meier 解析によると、膜性 EBP50 高発現-MYH9 高発現群は、他群と比較して Overall Survival(OS)と Progression-Free Survival(PFS)が最も良好であった。これらの所見は、EBP50 の細胞内分布と腫瘍進展との間に密接な関連があることを示唆している。

## 4. 考案

膜性 EBP50 は、PDZ1 ドメインを介した MYH9 との共局在に伴う強い相互作用を介して上皮極性の確立およびその維持をすることで腫瘍抑制機能を発揮する。一方、膜性 EBP50 発現喪失は、細胞移動亢進や幹細胞化様の性質の増強などの結果が得られ、おそらく、MYH9 機能不全による EMT 様表現型の誘導、細胞運動能亢進、CSC 様特性の増強をもたらすことで、OCCC の進展が促進されると考える。

OS と PFS の予後良好群は膜性 EBP50 高発現と MYH9 高発現の組み合わせを持つ OCCC 患者で見出されたことから、EBP50 と MYH9 の免疫染色による分析の組み合わせが、OCCC 患者の予後予測に大きな有用性を持っている可能性が挙げられる。

## 5. 結論

膜性 EBP50 と MYH9 の発現様式の組み合わせが、OCCC の予後因子関連バイオマーカーになりうることが示唆された。

## 目次

	頁
1. 序論 -----	1
2. 材料と方法 -----	2
3. 結果 -----	6
4. 考察 -----	8
5. 結語 -----	10
6. 謝辞 -----	10
7. 引用文献 -----	11
8. 図表 -----	16

## 1. 序論

卵巣上皮性腫瘍 (Epithelial ovarian carcinoma: EOC) は全婦人科腫瘍の中で最も高い死亡率を示し、世界で7番目に多く診断される腫瘍とされる[1-3]。近年、EOCは、細胞特性・分子特性に基づいて臨床的に2つのタイプに分類される[4]。臨床的に低悪性度で遺伝子学的にも安定した1型には、低異型度漿液性癌、低異型度類内膜癌、明細胞癌、粘液性癌が含まれる[5,6]。2型はより高悪性度で遺伝学的に不安定とされ、高異型度漿液性癌、高異型度類内膜癌、一部の明細胞癌、癌肉腫が含まれる[7,8]。

卵巣明細胞癌 (Ovarian clear cell carcinoma: OCCC) は以下の理由でEOCとは別の存在として認識されている。第一に、OCCCはEOC全体のうち、北米では5-10%、欧米諸国では12%を占めるが、東アジアでは有病率はより高く、日本では25-30%、韓国では10-12%である[9-11]。第二に、子宮内膜症は線維腺腫と並んでOCCCの前癌病変と言われており、子宮内膜症のない女性に比して発癌のリスクは3倍に増加する[12]。

第3に、OCCC患者はより若年で早期診断され(66.4%の患者で病期1期[13])、腫瘍は片側性が多く、血栓塞栓や高カルシウム血症の合併が多い[14]。一方で、一部の進行期OCCC患者は、高異型度漿液性癌の患者よりも優位に予後不良で、これは化学療法に感受性の高い非OCCCとは対照的である[15]。

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換制御因子1としても知られているEBP50は55-kDaのリンタンパク質で、細胞質内PSD-95/Drosophila discs large/ZO-1 (PDZ)アダプタータンパク質ファミリーの1つである[16]。

EBP50は、いくつかの上皮組織において、上皮細胞で頂膜微絨毛の形成を制御する細胞膜頂部に高発現している[17,18]。EBP50の局在の変化は、いくつかの悪性腫瘍で上皮細胞の形態の破壊による腫瘍進展に寄与する[19-21]。さらに、エストロゲン受容体 $\alpha$ 依存性のEBP50の発現は、phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) や $\beta$ カテニンと相互作用することで、子宮内膜癌細胞で形態的表現型の分化を負に制御する[22]。

ここで、上皮細胞の極性の確立と維持における膜性EBP50の役割が、OCCC患者の予後を左右するのではないかと仮説を立てた。この仮説は、細胞質性EBP50の発現が予後不良であることと密接な関連があることにも基づいている[23]。

この仮説を検証するために、OCCC細胞の増殖能と移動能におけるEBP50の機能的役割を調べ、膜性EBP50の結合パートナーとしてMHY9を同定し、膜性EBP50/MHY9複合体がOCCCの腫瘍進展を決めるうえで重要な役割を果たしていることを明らかにした。



## 2. 材料と方法

### 2-1. 細胞

PDZ1、PDZ2、EB ドメインを含む Glutathione S-transferase (GST) 融合タンパク質は、全長を構築され、前述の通りに使用された[23]。

OVISe (RRID:CVCL\_3116) と TOV-21G (RRID:CVCL\_3613) の 2 つの OCCC 細胞株は、医薬基盤研究所(Osaka, Japan)および American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)から入手した。これらは解凍後 6 か月以内に使用し、すべての実験はマイコプラズマを含まない細胞で実行し、細胞形態と増殖曲線の解析により、定期的に細胞状態を確認した。膜性 EBP50 高発現を認める OVISe 細胞から CRISPRdirect を用いてガイド RNA 配列(gRNA : 5'-GAGAAGGGTCCGAACGGCTACGG-3') を設計した。gRNA の相補的オリゴヌクレオチドはアニーリングし、pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 にクローニングした。

pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0/gRNA 構築物を OVISe 細胞に人為的に核酸導入し、膜性 EBP50-KO 細胞株を樹立した。線維芽細胞様形態は細長い表現型を示すものと定義し、細胞間接着の減弱または欠如を示す。

### 2-2. 臨床検体

北里大学病院で 2005 年から 2019 年にかけて手術が施行された OCCC120 症例を、2014 年 WHO TNM 分類に従って抽出した[24,25]。全症例で、子宮全摘出の有無に関わらず卵巣摘出がされており、パクリタキセル/カルボプラチンを基準とした術前化学療法を受けた症例や減量術後の腫瘍残存症例は除外した。

すべての検体を 10%ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋してブロックを作製した。本研究は、北里大学医学部倫理委員会の承認を得た (B20-181)。実験方法はヘルシンキ宣言の定める基準に準拠し、各被験者の理解と書面による同意のもとに実施された。

### 2-3. ショットガンプロテオミクス解析

EBP50 と共沈降するタンパク質を用いたショットガンプロテオミクスは、既報のものを行った[23,26]。共沈降のために、抗 EBP50 抗体を製造元の支持に従って Protein G Dynabeads(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)に結合させ、架橋した。

細胞を IP バッファー[10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1% Nonidet P-40]で分解し、得られた産物をライセート溶液中で EBP50 抗体標識 Protein G Dynabeads にインキュベートした。このビーズを洗浄し、共免疫沈降物を回収した。ショットガンプロテオミクスデータの定量解析は、スペクトルカウントにより行った[23]。

### 2-4. 抗体と試薬

抗 Ezrin/radixin/moesin(ERM)抗体、抗 phospho(p)Ezrin(at Thr567)/radixin(at Thr564)/moesin at

Thr558)(pERM)抗体、抗 poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1)抗体と抗 vimentin 抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)製。抗 EBP50 抗体、抗  $\beta$ -actin 抗体、抗 MYH9 (mouse)抗体、抗 vinculin 抗体、抗 Sox2 抗体は Abcam (Cambridge, MA, USA)製。抗 E-cadherin 抗体、抗 p21waf1 抗体、抗 cyclin D1 抗体は Dako (Copenhagen, Denmark)製。抗 cyclin A2 抗体、抗 cyclin E 抗体は Novocastra (Newcastle, UK)製。抗 p27kip1 抗体、抗 aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)抗体、抗 N-cadherin 抗体は BD Biosciences (San Jose, CA, USA)製。抗 MYH9 (Rabbit)抗体、抗 cyclin B1 抗体は Proteintech (Rosemont, IL, USA)製と Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA, USA)製を用いた。Blebbistatin and MG132 は Toronto Research Chemicals (North York, ON, Canada)と Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA)を用いた。

## 2-5. GST pull-down assay

GST-EBP50-全長、GST-EBP50-PDZ1、GST-EBP50-PDZ2、および GST-EBP50-EB を 1 mM の isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside で誘導し、glutathione-Sepharose beads で精製した。

OVISe 細胞溶解液と精製した GST-EBP50-full length、GST-EBP50-PDZ1、GST-EBP50-PDZ2、ビーズに固定化した GST-EBP50-EB と混合し、4℃で一晩反応させた。その後、ビーズを洗浄バッファー [10mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Nonidet P-40]で十分に洗浄した。

結合タンパク質を SDS-PAGE ローディングバッファーで煮沸して溶出し、SDS-PAGE で分離し、免疫ブロッティングおよび Coomassie Brilliant Blue 染色で検出した[23]。

## 2-6. Western blot assays

全量の細胞タンパクを RIPA バッファー[20 mM Tris-HCl (pH7.2)、1% Nonidet P-40、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% ドデシルナトリウム 硫酸塩]で分離した。細胞質分画、細胞膜分画、核分画は ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction kit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)で調整した。SDS-PAGE で解明されたタンパク質は膜に転写され、結合した一次抗体を元に ECL 検出システム(GE Healthcare)で目的のタンパク質の検出を行った [22,23,26,27]。

## 2-7. Flow cytometry and Aldefluor assay

細胞周期解析のため、細胞を 70%アルコールで固定しヨウ化プロピジウム (Sigma) で染色し、BD FACS Calibur (BD Biosciences) を用いて細胞周期を解析した。ALDH1 酵素活性に関して、蛍光色素法に基づいて Aldefluor assay (Stem Cell Technologies, Grenoble, France) を用いて製造元の指示通りに測定した[22,23,26,27]。

## 2-9. Spheroid assay

細胞 ( $\times 10^3$ ) を、Cancer Stem Cell Premium (ProMab Biotech, Richmond, CA)内の低細胞結合プレート (Thermo Fisher Scientific, 横浜、日本) に培養した。少なくとも直径 50  $\mu$

m の均一なスフェロイドを培養から約 2 週間後、カウントした[22, 27]。

## 2-10. Immunohistochemistry (IHC)

IHC は、マイクロ波加熱法とポリマー免疫複合体 (Envision, Dako) 法を組み合わせで行った[23,26]。

IHC 所見は、EBP50、E-カドヘリン、Snail、ALDH1、ビメンチン、Sox2 に対する免疫反応について、陽性細胞数と範囲からなる 2 つのパラメーターを乗算した免疫強度を膜性、細胞質性または核性で算出して評価とした[23,26]。

予後的意義の検討のため、膜性 EBP50、細胞質性 EBP50、および MYH9 のスコアは平均値をカットオフ値として、高値と低値の 2 つのカテゴリーに分けた。

## 2-10. 蛍光免疫染色

臨床検体のスライドを 10 mM クエン酸緩衝液(pH 6.0)につけたのちに、マイクロ波で 5 分の加熱を 3 回行い、抗 EBP50(rabbit)抗体と抗 MYH9(mouse)抗体をのせて一晩おいた。Alexa488 と 570(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を二次抗体として BZ-X700 microscope(KEYENCE Co. Osaka, Japan)で分析した。focal adhesions (FAs)をみるために、スライド上の EBP50KO の OVISE と mock 細胞は一次抗体と二次抗体が染色される。Vinculin が選ばれたのは、様々な FA 抗体による染色にて形態学的有意差がなかったためである[27]。単位面積当たりの陽性細胞数を ImageJ software version 1.41 (NIH, Bethesda, MD)を用いて算出した[22,23]。

## 2-11. PLA

スライドを 10 mM の Tris-EDTA 緩衝液(pH 9.0)につけてマイクロ波で 5 分の加熱を 3 回行い、一次抗体をのせて一晩おいた。EBP50 (rabbit)/MYH9 (mouse)の抗体の組み合わせまたは 1 種を陰性コントロールとして使用した。洗浄後、洗浄後、スライドはマウスおよびウサギ用の PLA PLUS および MINUS プローブを備えた Duolink 検出キット(Olink Bioscience, Uppsala, Sweden)を使用して、製造元の指示通りに従って処理した[26]。

## 2-12. Wound healing assay

細胞を 24 ウェル組織培養プレートに均等に散布して、ほぼ完全に密集するまで増殖させ、細胞の単層が形成されたことを確認して、200  $\mu$ l 滅菌チップで直線状の傷を形成し、その創傷領域を ImageJ software version 1.41 を用いて計測した。細胞移動のパラメーターは創傷閉鎖という形でピクセル単位で計算した[22,27]。

## 2-13. Migration assay

細胞遊走能は孔径 8  $\mu$ m の 24-well Transwell chamber (Corning, NY, USA)を使用し、下部の chamber は 10%の血清を含む培地で満たした。細胞を blebbistatin の有無に分けて無血清の

上部 chamber に散布した。24 時間後、ポリカーボネート膜の底層で hematoxylin-eosin (HE) で染色した細胞数を光学顕微鏡を用いて計測した[22,27]。

#### 2-14. Statistics (統計解析)

比較データは Mann-Whitney U 検定と Spearman の相関係数を使用した。全生存期間(OS)は、発症から死亡まで、もしくは、最終的な追跡可能日で計算した。無増悪期間(PFS)も、手術日から再発までの期間とした。OS と PFS は Kaplan-Meier 法を用いて推定し、統計的比較にはログランク検定を用いて行った。単変量解析・多変量解析も Cox 比例ハザード回帰モデルを用いて実施した。統計的有意性のカットオフは、 $P < 0.05$  として設定された。



### 3. 結果

#### 3-1. OCCC における膜性および細胞質性 EBP50 の予後的意義

OCCC における膜性および細胞質性 EBP50 の代表的な IHC 所見を図 1A に示す。EBP50 陽性像は、OCCC 細胞の細胞膜上または細胞質内で観察され、OCCC120 症例のうち、膜性 EBP50 高発現 64 例(53.3%)、細胞質性 EBP50 高発現 42 例(35%)、EBP50 陰性 4 例(11.7%)であった。Kaplan-Meier 解析によると、膜性 EBP50 高発現群は、細胞質性 EBP50 および EBP50 陰性群と比較して、OS および PFS で予後良好を示した (図 1B)。これらの所見は、OCCC における EBP50 の細胞内分布と腫瘍進展との間に密接な関連があることが示唆された。

#### 3-2. 膜性 EBP50-KO は OCCC 細胞の増殖能低下と移動能亢進に関連

OCCC 細胞株にて、静止状態にあった細胞を後血清で刺激したとき、OVISE 細胞と TOV-21G 細胞の間で MYH9、E-カドヘリンおよび Snail の発現に差はなかった。対照的に、TOV-21G 細胞と比較して OVISE では、Sox2 と N-カドヘリンの発現が増加し、EBP50 と ALDH、Vimentin の発現が減少し (補足図 S1A) し、さらに、遊走能は有意に高かった (補足図 S1B)。

EBP50 の発現は、OVISE 細胞で膜性、TOV-21G 細胞で細胞質性に、それぞれ優位であった (図 2A)。膜性 EBP50 の機能的役割を調べるために、まず 3 つの独立した EBP50-KO OVISE 細胞株クローン (OV-EBP-KO#3、#4、#31) を樹立した。

OV-EBP-KO 細胞は、モック細胞と比較して、上皮間葉転換 (EMT) 様形態として知られる紡錘形細胞様の形態変化が著明であった (図 2B)。

膜性 EBP50-KO が細胞増殖に影響を及ぼすかどうかを調べるため、3 つの独立した OV-EBP-KO 細胞株を低密度で散布した。OV-EBP-KO 細胞は、モック細胞に比べて増殖が遅い傾向があり、特に細胞周期で G1 期にある細胞が増加し、G2/M 期にある細胞が減少した (図 2C)。細胞増殖中における細胞周期関連分子の発現の変化を調べるために、OV-EBP-KO 細胞を一度静止状態にした。その後に刺激して細胞周期に移行してから 9 時間後と 24 時間後に解析してみたところ、サイクリン A2 とサイクリン D1 はモック細胞に比べて発現が減少し、サイクリン B1、サイクリン E、p21 waf1、p27 kip1 の発現は大きく変化はしなかった (図 2D)。

細胞移動能は細胞接着因子 (FA) の動的機能と分解に密接に関連している [28,29]。FA の状態と細胞移動能の関連を調べるために、OV-EBP-KO とモック細胞を抗ピンチクリン抗体 (成熟 FA のマーカー) で染色した [27,28]。OV-EBP-KO では、モック細胞に比べて単位面積当たり FA 数が有意に多かった (図 3A)。また、OV-EBP-KO 細胞は、モック細胞と比較して細胞遊走速度の優位な増加 (図 3B)、創傷した間隙の迅速な再充填 (図 3C) を示した。このことは、EMT 関連分子 (N-カドヘリン、ビメンチン、Snail 等)、CSC 関連分子 (ALDH1、Sox2 等) の発現が増加し、細胞骨格に関連する ERM タンパク質の発現とリン酸化が減少し

た(図 3D) [30]。

OV-EBP-KO 細胞では、CSC 様細胞で高発現する ALDH に関してもモック細胞と比較して増加していた(図 4A)。これは、直径 50  $\mu\text{m}$  以上の境界明瞭な円形スフェロイドの数が優位に増加したことと一致していた (図 4B)。

これらの所見は、膜性 EBP50 KO が OCCC 細胞において、細胞増殖能の減少、細胞運動能亢進、EMT 様表現型の誘導を通して CSC 様特性を生み出すことを示唆している。

### 3-3. 膜性 EBP50 は OCCC 細胞において MYH9 と強く相互作用する

EBP50 は、標的タンパク質の C 末端に特異的に結合する少なくとも 2 つの PDZ 分子によって特徴づけられる。膜性 EBP50 に関連するタンパク質を同定するために、EBP50 と共沈降するタンパク質の検索のためにショットガンプロテオミクスを行ったところ、OVISE 細胞と TOV-21G 細胞でそれぞれ 271 と 791 のプロテオフォームが見つかった。図 5A に示すように、階層的クラスタリングにより、これらのタンパク質は 9 つのグループに分けられた。このうちグループ I には、OVISE 細胞で高いペプチドスペクトル一致率 (PSM) を示した MYH9 プロテオフォームが含まれ、これは TOV-21G 細胞では対照的に低値であった。OVISE 細胞では、テクニカルレプリケート間の再現性が高かった (ピアソン相関  $R^2$  0.9)。各プロテオフォームを  $\text{Log}_2$  (fold-change) と  $-\text{Log}_{10}$  (P-value) として計算した相対的な PSM として各プロテオフォームを表すボルケーノプロットでも、MYH9 が異常値であることが明らかになった (図 5B)。これらのことから、OVISE 細胞では MYH9 が膜性 EBP50 の共沈降物であることが示された。EBP50 内の MYH9 結合領域をさらにマッピングするために、全長型および切断型 EBP50 を用いて GST プルダウンアッセイを行った(図 5C)。その結果、MYH9 は GST-EBP50-PDZ1 (PDZ2 と EB ドメインには結合しない) に特異的に結合することが明らかになった(図 5D)。さらに、MG132 (非特異的プロテアソーム阻害剤) で処理すると、OV-EBP-KO 細胞では MYH9 タンパク質の半減期がモック細胞と比較して減少した (図 5E)。これらの所見から、膜性 EBP50 は、おそらく、PDZ1 ドメインを介して MYH9 との強い相互作用により、翻訳後に MYH9 を安定化させることが示唆された。

### 3-4. MYH9 の阻害は、EMT 機能の誘導、増殖能低下、および OCCC 細胞の移動能亢進につながる

EBP50 は他の分子との相互作用を通して生物学的機能を発揮することから[31]、MYH9 の ATPase 活性を効果的かつ可逆的に阻害する合成化合物である blebbistatin を用いて、その結合パートナーである MYH9 の役割を評価した[32]。OVISE 細胞を blebbistatin 処理すると、用量依存的に線維芽細胞様形態に著明な変化 (図 6A)、増殖能低下 (図 6B)、Snail、ALDH1、および Sox2 の発現の増加(図 6C)、移動能亢進(10 mM ではみられたが、20 mM の blebbistatin ではみられない)(図 6D, E)を示した。この効果は、blebbistatin 処理した OV-EBP-KO 細胞では、その効果はモック細胞と比較して増強された (補足図 S2)。これらの所見から、MYH9 の抑制は OCCC 細胞における EMT 機能、増殖および移動性にも影響を及ぼすことが示唆



され、OV-EBP-KO 細胞で得られた結果と一致している。

### 3-5. 膜性 EBP50 と MYH9 の高い共発現は OCCC の予後良好群と関連

膜性 EBP50 と MYH9、E-カドヘリン、Snail、ALDH1、Vimentin、Sox2 の代表的な IHC 画像を図 7A と補足図 S3A に示す。

MYH9 スコアは膜性 EBP50 低発現群と比べて膜性 EBP50 高発現群で優位に高く(図 7B)、Snail と ALDH1 スコアは優位に低かった(補足図 S3B)。膜性 EBP50 スコアは MYH9 スコアと正の相関があり、Snail スコアと負の相関があった(補足表 S1)。EBP50 と MYH9 の共免疫局在は OCCC 細胞の膜成分で観察され、細胞や組織切片のタンパク質間相互作用の定量に使用できる PLA の結果と一致し[33]、細胞膜頂部局在での 2 分子間の相互作用を示した(図 7C)。

膜性 EBP50 高発現は、臨床病期早期および遠隔転移の欠如と有意に関連していた(表 1)。Kaplan-Meier 解析によると、膜性 EBP50 高発現と MYH9 高発現の組み合わせは、他の組み合わせと比較して OS と PFS が最も予後良好だった(図 7D)。

単変量解析では、膜性 EBP50 といくつかの臨床病理学的因子は OS と PFS における有意な予後指標であり、多変量解析でも、膜性 EBP50、FIGO 病期、および腹膜播種が、OS ではなく PFS の独立した予後因子であることが明らかとなった(表 2)。

## 4. 考察

本研究は、上皮細胞の細胞膜頂部に局在する膜性 EBP50 発現群の患者が、細胞質性 EBP50 発現群の患者と比較して、OCCC における OS と PFS の両方において有意に予後良好であることに関連した確かなエビデンスを提示した。また、膜性 EBP50 高発現は臨床病期早期および遠隔転移の欠如と関連し、上皮性悪性腫瘍の発症初期で形態学的特徴と言える上皮極性の消失を回避するために、頂端に局在する EBP50 が必要であるという考えと一致する[34,35]。さらに、膜性 EBP50-KO は ERM タンパク質の発現とリン酸化を減少させた。これは、EBP50 が頂膜微絨毛における活性 ERM タンパク質の維持に重要な役割を果たしているという報告と一致する[36]。対照的に、細胞質性 EBP50 はいくつかの細胞内因子に応答して核へ移動し、PARP1 と相互作用する。これが PARP1 活性の上昇とアポトーシスの阻害につながり、腫瘍再発の可能性を高める[23]。OCCC における EBP50 の発現局在による正反対の作用は、EBP50 が細胞膜に局在する場合は腫瘍抑制性であるが、細胞質または核に局在、あるいは欠失する場合は腫瘍進展(または癌化)するというエビデンスと一致している[17,31,37,38]。

また、膜性 EBP50-KO は、OCCC 細胞の紡錘形細胞様形態を誘導し、いくつかの EMT 関連マーカーの発現増加、細胞増殖能低下、移動能亢進とともに CSC 様特性を誘導することを見出した。Snail、ALDH1 を含む EMT/CSC 関連マーカーの発現は、OCCC において膜性 EBP50 高発現群と比較して膜性 EBP50 低発現群で有意に高かった。一方、細胞移動能亢進に伴って細胞末梢に分布する FA の数を増加させたが、EBP50-null 血管平滑筋細胞は野

生型細胞よりも FA の数が少なかった。この不一致の結果は、EBP50 の細胞型のタイプや細胞内局在の違いに起因する可能性が考慮される。これらの発見は、遊走細胞が病変のコアとなる腫瘍細胞よりも増殖率が低く、EMT が CSC の特性を誘発することで CSC 様の特徴を持つ細胞を生成するという報告を裏付ける[39-42]。EBP50 を消失した細胞における細胞構造は、ラメリポディアのような構造の出現を特徴とする遊走表現型への転換が示唆される[43-45]。対照的に、膜性 EBP50 は OCCC 細胞の EMT プログラムの調節を通じて移動能を阻害することと、さらに、EBP50 過剰発現はマトリックスメタロプロテイナーゼ-2(MMP-2)活性を阻害するが、EBP50-KO は乳癌および子宮頸癌細胞の MMP-2 活性を促進することが報告されており、EBP50 は MMP-2 活性の抑制を介して転移を抑制することが示唆される[46]。

研究で得た結果から、膜性 EBP50 が OCCC 細胞で MYH9 と機能的に相互作用することを示す。第一に、共免疫沈降とショットガンプロテオミクスにより、OCCC 細胞で膜性 EBP50 が MYH9 に強く結合することが明らかになり、臨床検体で細胞膜共局在と両者の IHC スコアの正の相関と一致する。第二に、Blebbistatin 処理による MYH9 阻害は、膜性 EBP50-KO 細胞で得られた結果を模倣し、EMT 様表現型の誘導と移動能亢進につながった。この効果は、Blebbistatin 処理された膜性 EBP50-KO 細胞でさらに増強された。膜性 EBP50 が遊走能調節に必要な MYH9 の機能を促進する可能性があることを示唆する[26]。第三に、MYH9 タンパク質の半減期は、モック細胞と比較して膜性 EBP50-KO 細胞で有意に減少し、膜性 EBP50 が MYH9 の翻訳の安定化をはかる可能性が挙げられた。最後に、EBP50 が PDZ1 ドメインを介して MYH9 と直接相互作用することを実証した。アクトミオシンと細胞の運動性を制御する微小管ネットワークの間の均衡の維持に MYH9 が必要であることを考えると[47-49]、細胞骨格の調節には膜性 EBP50 と MYH9 との相互作用が必要である可能性を示唆する[43]。EBP50 消失後の微小管-MYH9 ネットワークの混乱は、微小管の重合、Rac1 活性化、ラメリポディアの形成、および血管平滑筋細胞の遊走を引き起こすことが、この結論を支持する。膜性 EBP50 発現の消失は、細胞移動能に関連した EBP50 関連シグナル経路の変化にも起因する可能性がある[17,19,31,50,51]。

意外なことに、OV-EBP-KO 細胞が E-カドヘリンを含め複数の EMT 関連分子を発現していることを発見した。この結果は、OCCC 検体において頻繁におこる E-カドヘリンと Vimentin の共発現を考えると、ハイブリッドな上皮間葉系段階にある可能性をみる[52]。ハイブリッド段階は、OCCC 細胞の長期的な初期培養でも説明される[53]。

興味深いことに、癌幹細胞性は本格的な EMT ではなく部分的な EMT 表現型と関連しているようで[54-56]、OV-EBP-KO 細胞が CSC 様特性を誘導できるという我々の結果と一致する。

最後に、OCCC 症例で、MYH9 では関連は指摘されなかったが、膜性 EBP50 の発現は PFS の独立した予後因子であった。しかし、OS と PFS における最も予後良好群は膜性 EBP50 高発現群と MYH9 高発現群の組み合わせを持つ OCCC 患者で見出されたことから、EBP50 と MYH9 の IHC 分析の組み合わせが OCCC の予後予測に大きな有用性を持っている可能



性があることが示唆された。実際に EBP50 は、結合パートナーとの相互作用およびその後の下流シグナル伝達経路の調節を通じて、腫瘍の動向に直接的または間接的に影響を与える[57,58]。

## 5. 結語

研究結果は、OCCC における膜性 EBP50 の新たな役割を示唆する(図 8)。

細胞膜頂部 膜性 EBP50 は、MYH9 依存性の細胞骨格ネットワークの調節を介して上皮極性を確立および維持することにより、腫瘍抑制機能を発揮する。対照的に、膜性 EBP50 発現の消失とそれに伴う MYH9 機能障害は、EMT 様表現型を誘発し、その結果、細胞移動能亢進と CSC 様特性の増強をもたらし、OCCC の進行を促進すると考えられる。

以上から、EBP50 の発現とその局在が OCCC 患者の臨床関連バイオマーカーとなりうることを示す。

## 謝辞

北里大学大学院医療系研究科分子病理学研究室の 三枝 信 教授には、研究の遂行のために熱心なご指導を賜りました。また、実験の際には同研究室の皆様にも温かいご指導ご鞭撻と多大なるご協力をいただきました。この場を借りて深くお礼申し上げます。

## 引用文献

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*. 2007;57:43-63.
2. Wang Y, Helland A, Holm R, Skomedal H, Abeler VM, Danielsen HE, Trope CG, Borresen-Dale A-L, Kristensen GB. TP53 mutations in early-stage ovarian carcinoma, relation to long-term survival. *Br J Cancer*. 2004;90:678-685.
3. Salani R, Backes FJ, Fung MF, Holschneider CH, Parker LP, Bristow RE, Goff BA. Posttreatment surveillance and diagnosis of recurrence in women with gynecologic malignancies: Society of Gynecologic Oncologists recommendations. *Am J Obstet Gynecol*. 2001; 204: 466-478.
4. Nik NN, Vang R, Shih leM, Kurman RJ. Origin and pathogenesis of pelvic (ovarian, tubal, and primary peritoneal) serous carcinoma. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:27-45.
5. Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *Lancet Oncol*. 2008;9:1191-1197.
6. Kurman RJ, Shih leM. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer-shifting the paradigm. *Hum Pathol*. 2011;42:918-931.
7. Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, Hirsch MS, Feltmate C, Medeiros F, Callahan MJ, Garner EO, Gordon RW, Birch C, Berkowitz RS, Muto MG, Crum CP. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol*. 2007;31:161-169.
8. Landen CN Jr, Birrer MJ, Sood AK. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:995-1005.
9. Oliver KE, Brady WE, Birrer M, Gershenson DM, Fleming G, Copeland LJ, Tewari K, Argenta PA, Mannel RS, Secord AA, Stephan J-M, Mutch DG, Stehman FB, Muggia FM, Rose PG, Armstrong DK, Bookman MA, Burger RA, Farley JH. An evaluation of progression free survival and overall survival of ovarian cancer patients with clear cell carcinoma versus serous carcinoma treated with platinum therapy: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group experience. *Gynecol Oncol*. 2017;147:243-249.
10. Kim SI, Lim MC, Lim J, Won YJ, Seo SS, Kang S, Park SY. Incidence of epithelial ovarian cancer according to histologic subtypes in Korea, 1999 to 2012. *J Gynecol Oncol*. 2016;27:e5.
11. Okamoto A, Glasspool RM, Mabuchi S, Matsumura N, Nomura H, Itamochi H, Takano M, Takano T, Susumu N, Aoki D, Konishi I, Covens A, Ledermann J, Mezzanzanica D, Steer C, Millan D, McNeish IA, Pfisterer J, kang S, Gladieff L, Bryce J, Oza A. Gynecologic Cancer intergroup (GCIG) consensus review for clear cell carcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Cancer*. 2014;24:S20-5.
12. Pearce CL, Templeman C, Rossing MA, Lee A, Near AM, Webb PM, et al. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Lancet Oncol*. 2012;13:385-394.

13. Fujiwara K, Shintani D, Nishikawa T. Clear-cell carcinoma of the ovary. *Ann Oncol.* 2016;27:i50-i52.
14. Machida H, Matsuo K, Yamagami W, Ebina Y, Kaobayashi Y, Tabata T, Kanauchi M, Nagase S, Enomoto T, Mikami M. Trends and characteristics of epithelial ovarian cancer in Japan between 2002 and 2015: A JSGO-JSOG joint study. *Gynecol Oncol.* 2019;153:589-596.
15. Sugiyama T, Kamura T, Kigawa J, Terakawa N, Kikuchi Y, Kita T, Suzuki M, Sato I, Taguchi K. Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer.* 2000;88:2584-2589.
16. Georgescu MM, Morales FC, Molina JR, Hayashi Y. Roles of NHERF1/EBP50 in cancer. *Curr Mol Med.* 2008;8:459-468.
17. Hayashi Y, Molina JR, Mamilton SR, Georgescu MM. NHERF1/EBP50 is a new marker in colorectal cancer. *Neoplasia.* 2010;12:1013-1022.
18. Oh Y-S, Heo K, Kim E-K, Jang J-H, Bae SS, Park JB, Kim YH, Song M, Kim SR, Ryu SH, Kim I-H, Suh P-G. Dynamic relocalization of NHERF1 mediates chemotactic migration of ovarian cancer cells toward lysophosphatidic acid stimulation. *Exp Mol Med.* 2017;49:e351.
19. Claperon A, Guedj N, Mergey M, Vignjevic D, Desbois-Mouthon C, Boissan M, Saubamea B, Paradis V, Housset C, Fouassier L. Loss of EBP50 stimulates EGFR activity to induce EMT phenotypic features in biliary cancer cells. *Oncogene.* 2012;31:1376-1388.
20. Shibaya T, Chuma M, Kokubu A, Sakamoto M, Hirohashi S. EBP50, a  $\beta$ -catenin-associated protein, enhances Wnt signaling and is over-expressed in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2003;38:178-186.
21. Du G, Gu Y, Hao C, Yuan Z, He Z, Jiang WG, Cheng S. The cellular distribution of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 1 is determined by the PDZ-I domain and regulates the malignant progression of breast cancer. *Oncotarget.* 2016;7:29440-29453.
22. Yokoi A, Minami M, Hashimura M, Oguri Y, Matsumoto T, Hasegawa Y, Nakagawa M, Ishibashi Y, Ito T, Ohhigata K, Harada Y, Fikagawa N, Saegusa M. PTEN overexpression and nuclear  $\beta$ -catenin stabilization promote morule differentiation through induction of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like properties in endometrial carcinoma. *Cell Commun Signal.* 2022;20:181.
23. Matsumoto T, Yokoi A, Konno R, Oguri Y, Hashimura M, Tochimoto M, Nakagawa M, Jiang Z, Ishibashi Y, Ito T, Kodera Y, Saegusa M. Cytoplasmic EBP50 and elevated PARP1 are unfavorable prognostic factors in ovarian clear cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2021;42:1162-1170.
24. Longacre TA, Wells M, Bell DA, Malpica A, Prat J, Ronnet BM. Tumours of the tumours of the ovary. In: Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH, (ed). *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs.* Lyon: France; 2014. P11-86.
25. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C (Eds): *TNM classification of Malignant tumours.* Wiley-Blackwell: Oxford, 2016



26. Hiruta A, Oguri Y, Yokoi A, Matsumoto T, Oda Y, Tomohiro M, Hashimura M, Jiang Z, Tochimoto M, Nakagawa M, Saegusa M. S100A4/nonmuscle myosin IIA/p53 axis contributes to aggressive features in ovarian high-grade serous carcinoma. *Am J Pathol.* 2020;190:2304-2316.
27. Tochimoto M, Oguri Y, Hashimura M, Konno R, Matsumoto T, Yokoi A, Kodera Y, Saegusa M. S100A4/non-muscle myosin II signaling regulates epithelial-mesenchymal transition and stemness in uterine carcinosarcoma. *Lab Invest.* 2020;100:682-695.
28. Kim D-H, Wirtz D. Focal adhesion size uniquely predicts cell migration. *FASEB J.* 2013;27:1351-1361.
29. Song GJ, Leslie KL, Barrick S, Bougoin S, Taboas JM, Bisello A. EBP50 promotes focal adhesion turnover and vascular smooth muscle cells migration. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53:809-819.
30. LaLonde DP, Garbett D, Bretscher A. A regulated complex of the scaffolding proteins PDZK1 and EBP50 with ezrin contribute to microvillar organization. *Mol Biol Cell.* 2010;21:1519-1529.
31. Vaquero J, Ho-Bouldoires TN, Claperon A, Fouassier L. Role of the PDZ-scaffold protein NHERF1/EBP50 in cancer biology: from signaling regulation to clinical relevance. *Oncogene.* 2017;36:3067-3079.
32. Straight AF, Cheung A, Limouze J, Chen I, Westwood NJ, Sellers JR, Mitchison TJ. Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science.* 2003;299:1743-1747.
33. Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J, Olsson C, Pietras K, Gustafsdottir SM, Ostman A, Landegren U. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat Biotechnol.* 2002;20:473-477.
34. Mullin JM. Epithelial barriers, compartmentation, and cancer. *Sci STKE.* 2004;216:pe2.
35. Georgescu MM, Yell P, Mobley BC, Shang P, Georgescu T, Wang SHJ, Canoll P, Hatanpaa KJ, White III CL, Raisanen JM. NHERF1/EBP50 is an organizer of polarity structures and a diagnostic marker in ependymoma. *Acta Neuropathol Commun.* 2015;3:11.
36. Morales FC, Takahashi Y, Kreimann EL, Georgescu M-M. Erzin-radixin-moesin (ERM) binding phosphoprotein50 organizes ERM proteins at the apical membrane of polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:17705-17710.
37. Malfettone A, Silverstris N, Paradiso A, Mattioli E, Simone G, Mangia A. Overexpression of nuclear NHERF1 in advanced colorectal cancer: association with hypoxic microenvironment and tumor invasive phenotype. *Experimental and Molecular Pathology.* Elsevier Inc. 2012;92:296-303.
38. Pan Y, Wang L, Dai J Le. Suppression of breast cancer cell growth by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 1 (NHERF1). *Breast Cancer Res.* 2006;8:R63.
39. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.*



2008;133:704-715.

40. Giese A, Loo MA, Tran N, Haskett D, Coons SW, Berens ME. Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation. *Int J Cancer*. 1996;67:275-282.
41. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant glioma and implications for treatment. *J Clin Oncol*. 2003;21:1624-1636.
42. Merzak A, McCreas S, Koocheckpour S, Pilkington GJ. Control of human glioma cell growth, migration and invasion in vitro by transforming growth factor beta 1. *Br J Cancer*. 1994;70:199-203.
43. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPase in cell biology. *Nature*. 2002;420:629-635.
44. Nemethova M, Auinger S, Small JV. Building the actin cytoskeleton: Filopodia contribute to the construction of contractile bundles in the lamella. *J Cell Biol*. 2008;180:1233-1244.
45. Saunders RM, Holt MR, Jennings L, Sutton DH, Barsukov IL, Bobkov A, Liddington RC, Adamson EA, Dunn GA, Critchley DR. Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover. *Eur J Cell Biol*. 2006;85:487-500.
46. Wang L, Qi Y, Xiong Y, Peng Z, Ma Q, Zhang Y, Song J, Zheng J. Ezrin-Radixin-Moesin Binding Phosphoprotein 50 (EBP50) Suppresses the Metastasis of Breast Cancer and HeLa Cells by Inhibiting Matrix Metalloproteinase-2 Activity. *Anticancer Research* 2017;37:4353-4360.
47. Baeyens N, Horman S, Vertommen D, Rider M, Morel N. Identification and functional implication of a Rho kinase-dependent moesin-EBP50 interaction in noradrenaline-stimulated artery. *Am J Cell Physiol*. 2010;299:C1530-C1540.
48. Choi CK, Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore LA, Mogilner A, Horwitz AR. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol*. 2008;10:1039-1050.
49. Baeyens N, de Meester C, Yerna X, Morel N. EBP50 is involved in the regulation of vascular smooth muscle cell migration and cytokinesis. *J Cell Biol*. 2011;2574-2584.
50. Georgescu MM, Cote G, Agarwal NK, White CL 3rd. NHERF1/EBP50 controls morphogenesis of 3D colonic glands by stabilizing PTEN and ezrin-radixin-moesin proteins at the apical membrane. *Neoplasia*. 2014;16:e361-e362.
51. Molina JR, Morales FC, Hayashi Y, Aldape KD, Georgescu MM. Loss of PTEN binding adapter protein NHERF1 from plasma membrane in glioblastoma contributes to PTEN inactivation. *Cancer Res*. 2010;70:6697-6703.
52. Strauss R, Li Z-Y, Liu Y, Beyer I, Persson J, Sova P, Moller T, Pesonen S, Hemminki A, Hamerlik P, Drescher C, Urban N, Bartek J, Lieber A. Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS One*. 2011;6:e16186.
53. Goyeneche AA, Koch M, Bell MC, Telleria CM. Long-term primary culture of a clear cell ovarian carcinoma reveals an epithelial-mesenchymal cooperative interaction. *Cancer Cell Int*. 2015;15:88.

54. Pradella D, Naro C, Sette C, Ghigna C. EMT and stemness flexible processes tuned by alternative splicing in development and cancer progression. *Mol Cancer*. 2017;16: 8.
55. Nieto MA, Huang RY, Lackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell*. 2016;166: 21-45.
56. Chaffer CL, San Juan BP, Lim E, Weinberg RA. EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35: 645-654.
57. Zheng JF, Sun LC, Liu H, Huang Y, Li Y, He J. EBP50 exerts tumor suppressor activity by promoting cell apoptosis and retarding extracellular signaling-regulated kinase activity. *Amino Acids*. 2010;38:1261-1268.
58. Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, Teruya-Feldstein J, Reinhardt F, Onder TT, Valastyan S, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J, Weinberg RA. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol*. 2010;12:247-256.

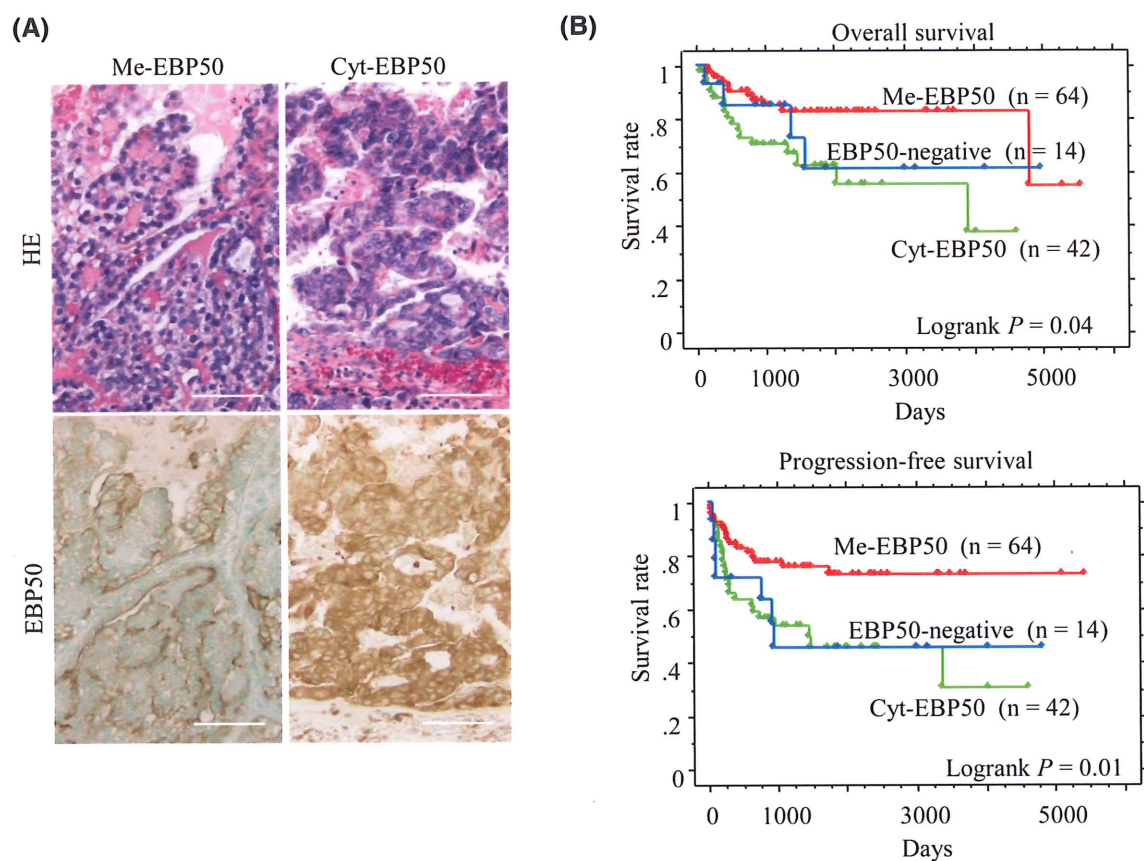


Figure1

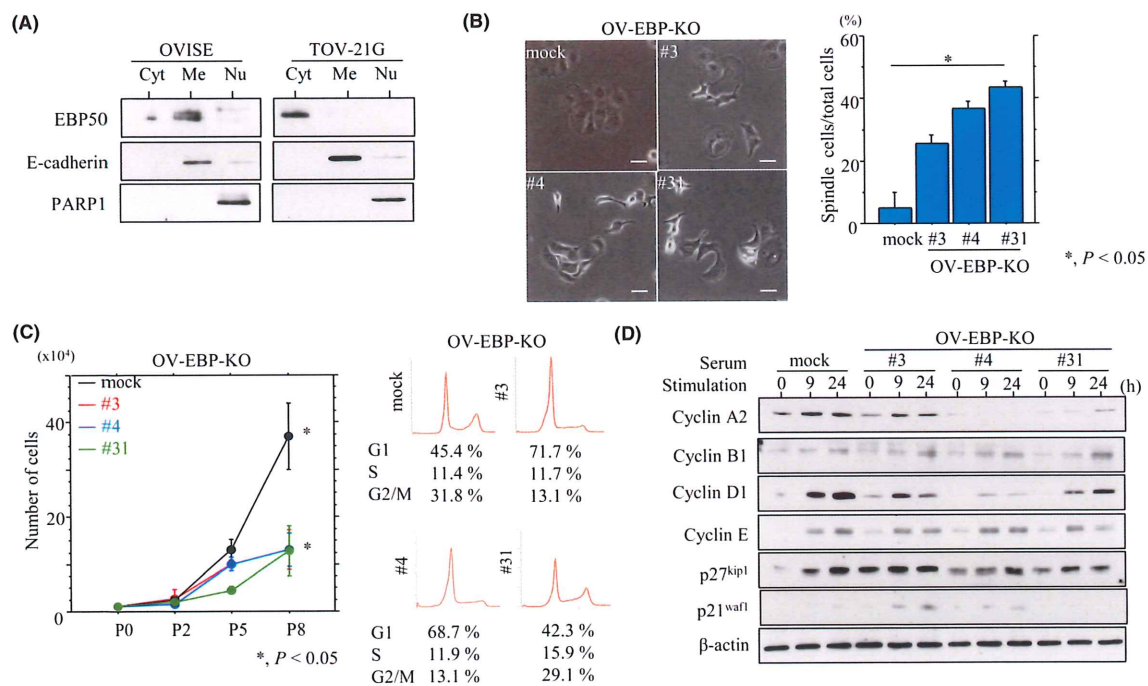


Figure2



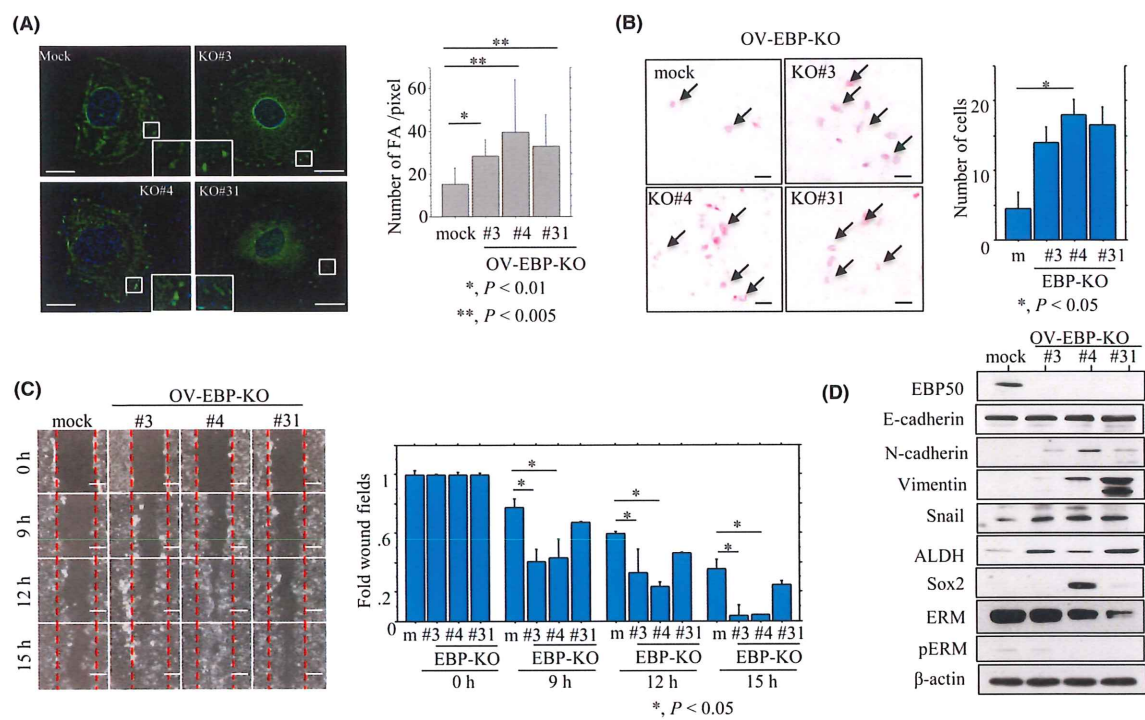


Figure3

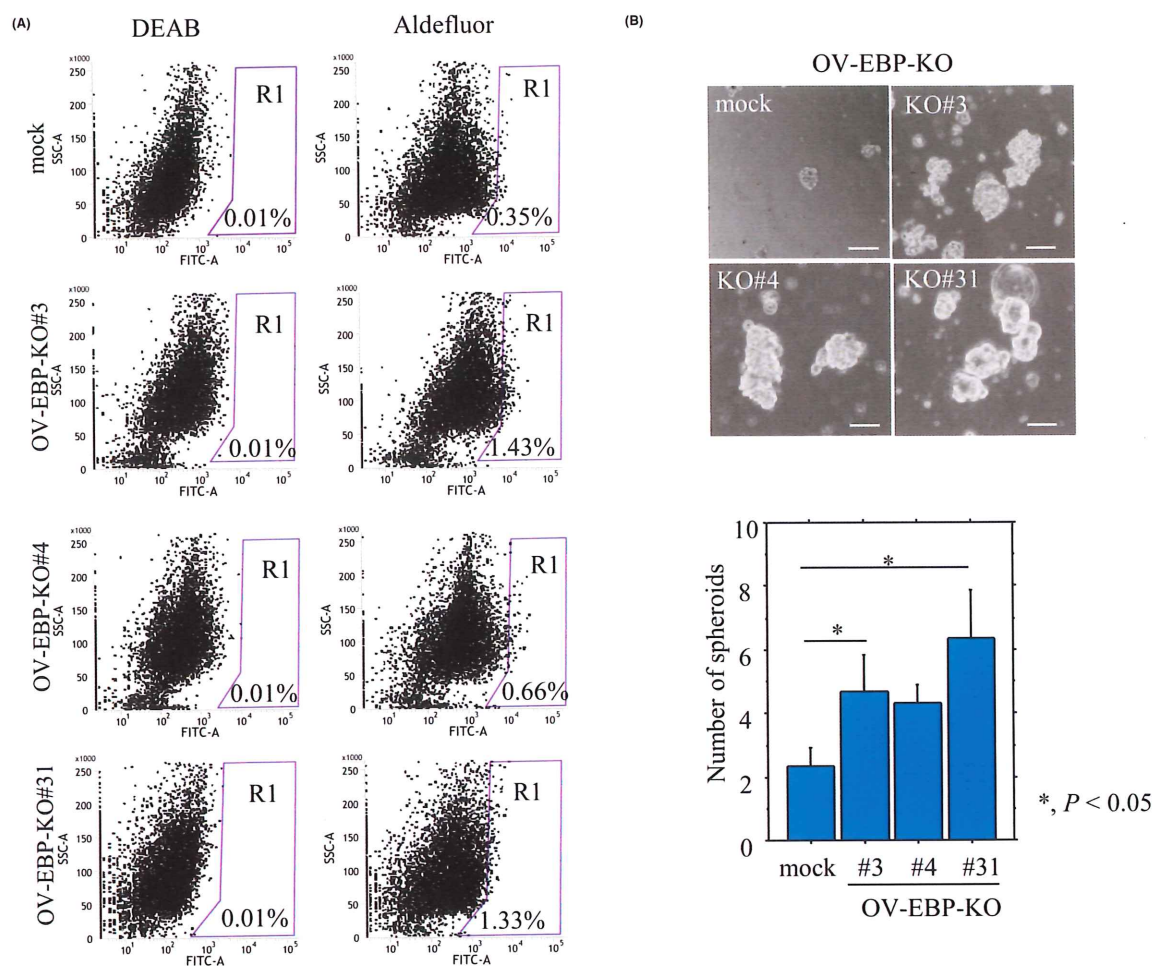


Figure4

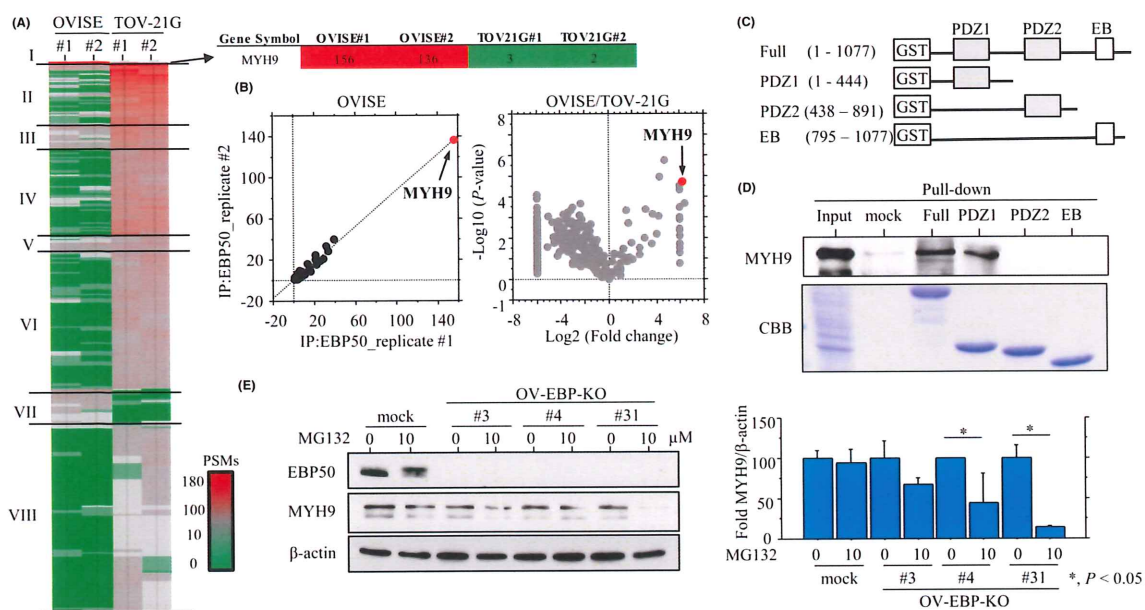


Figure5

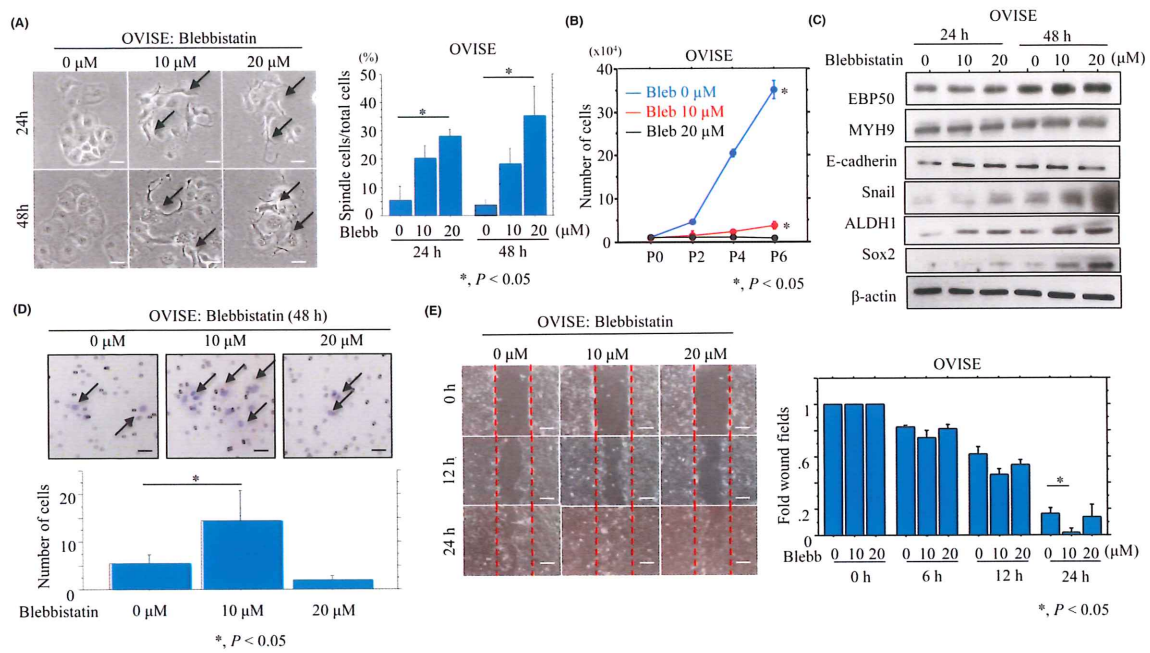


Figure6

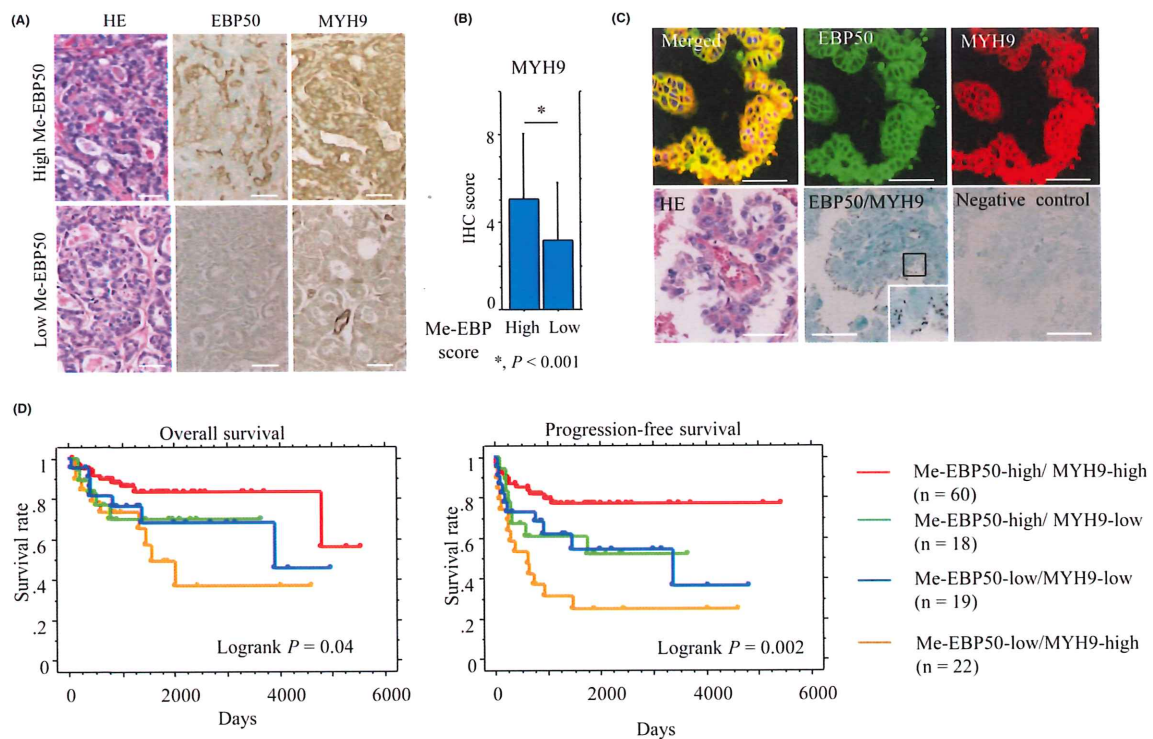


Figure7



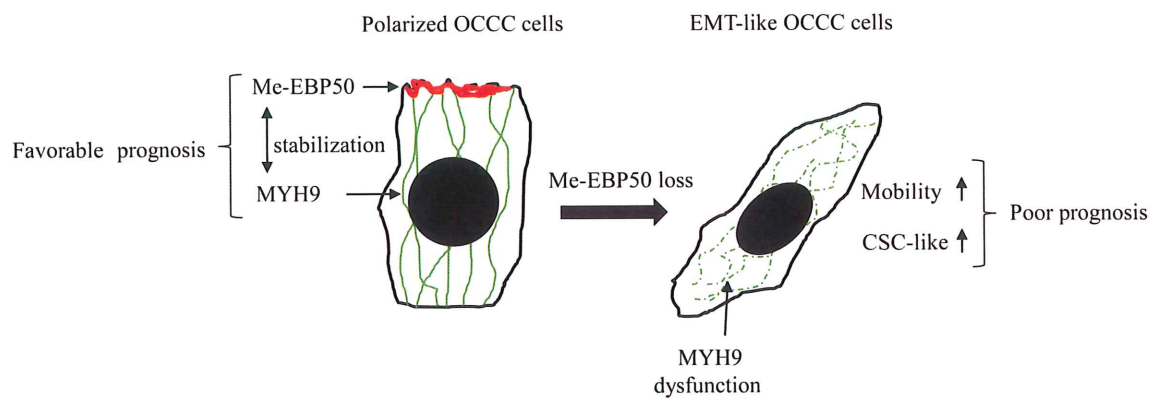
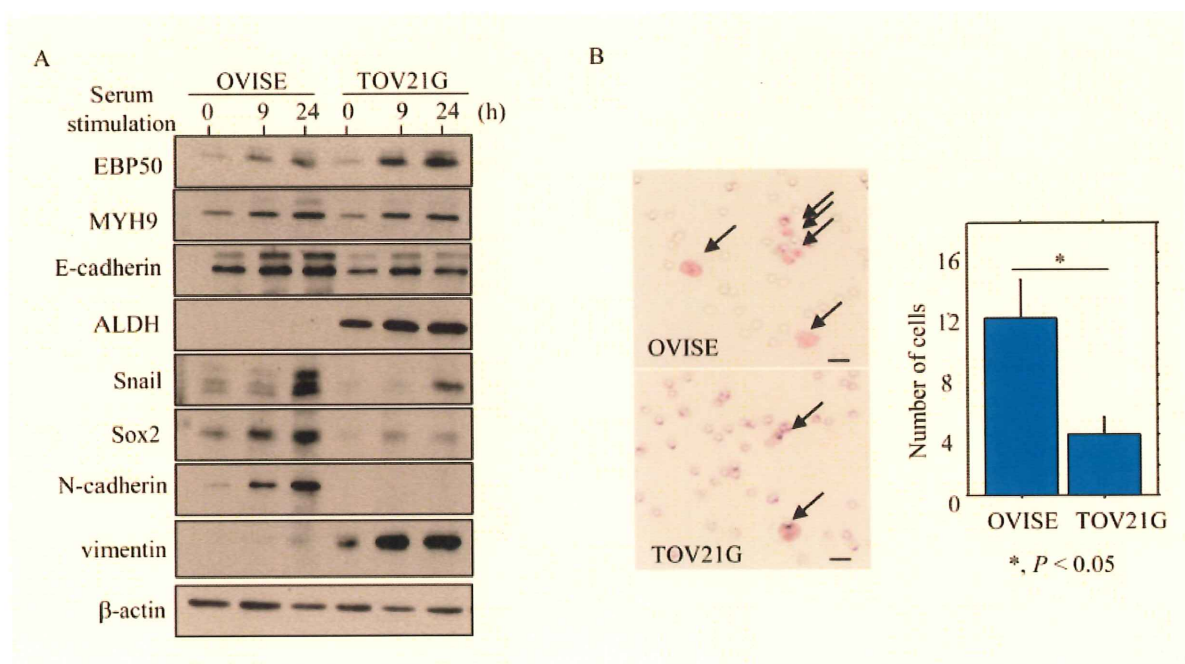
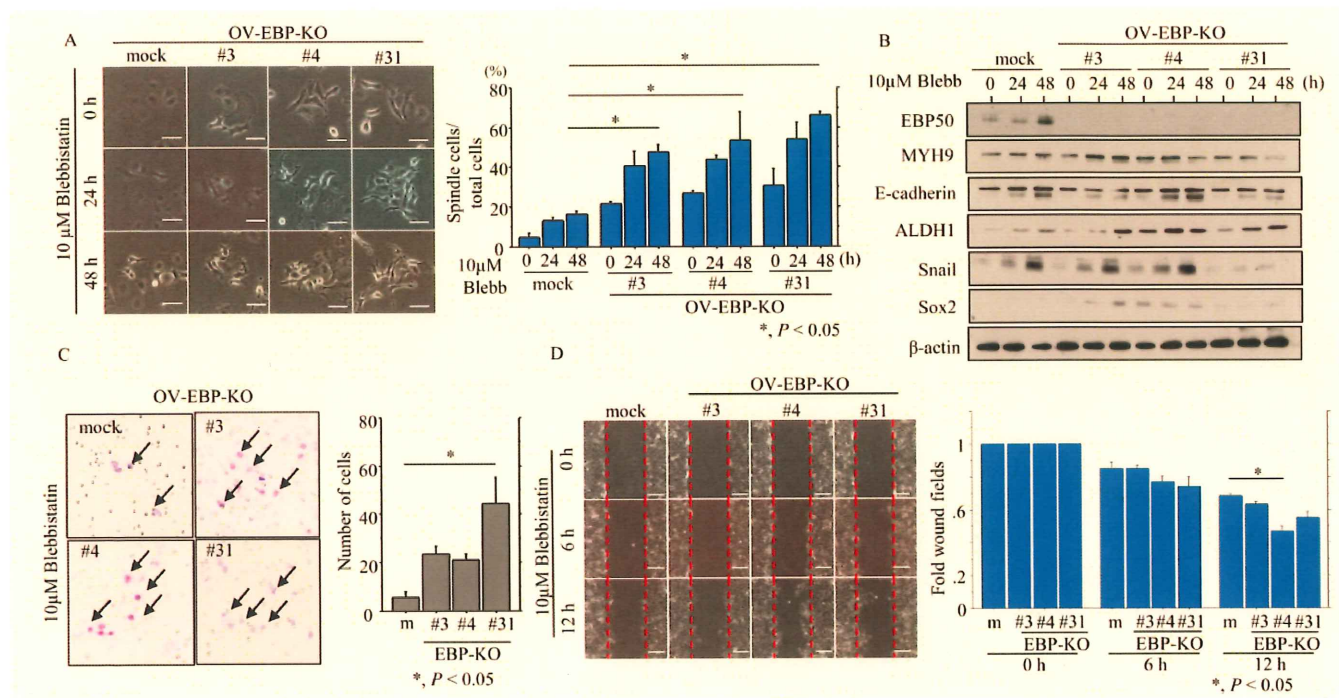


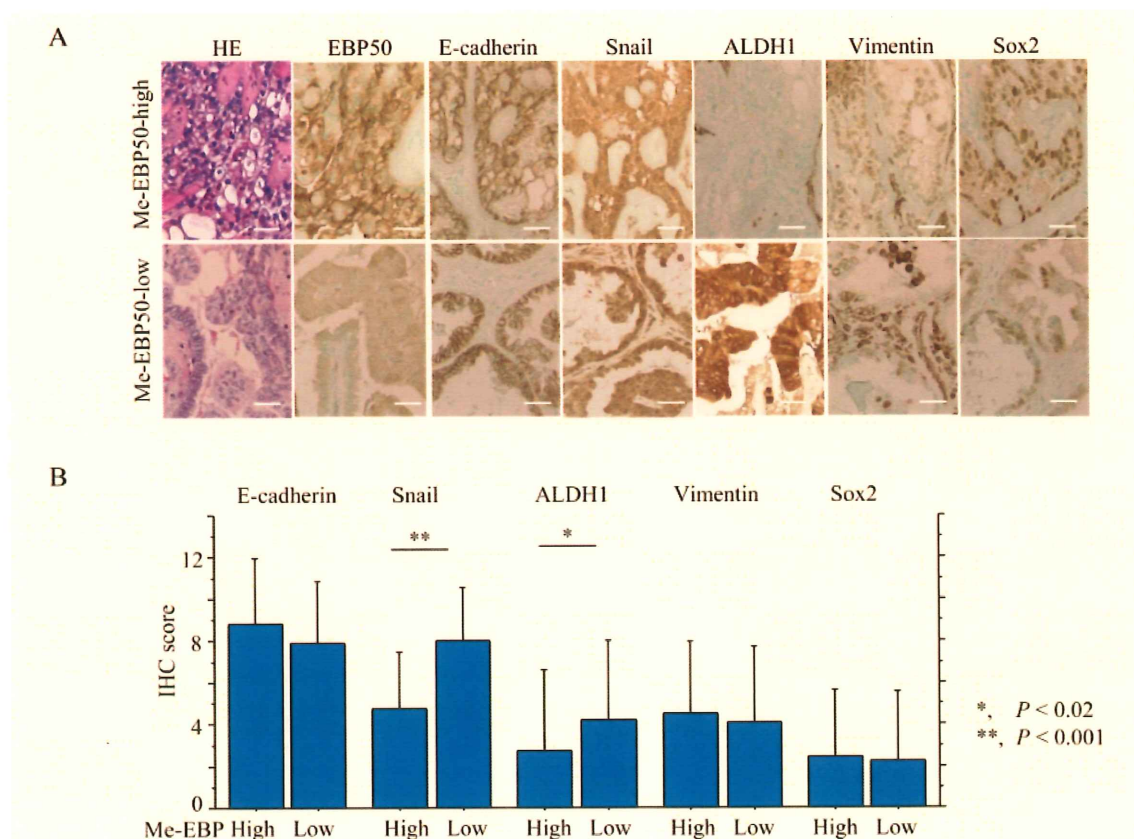
Figure8



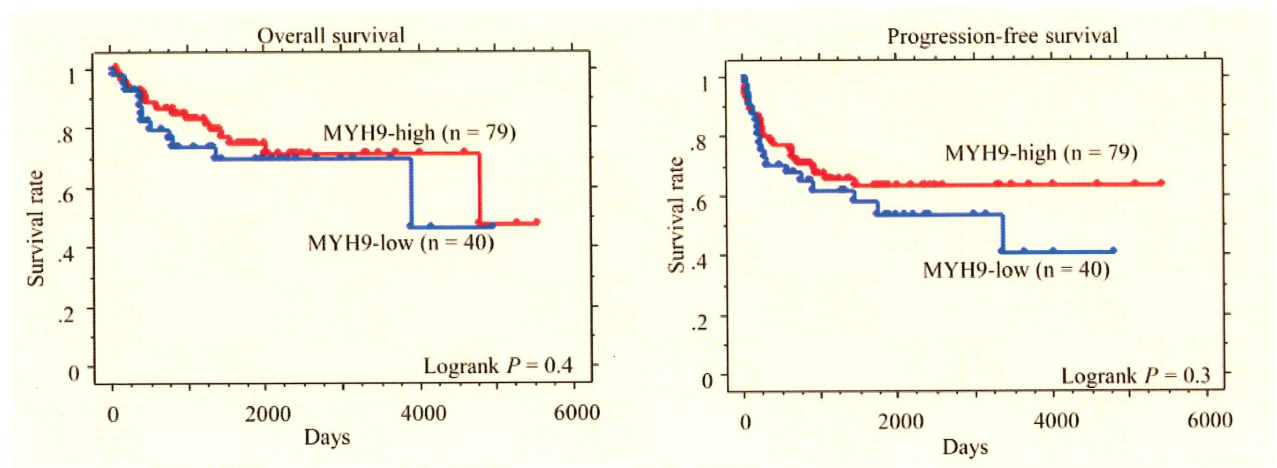
Supplementary Figure S1



Supplementary Figure S2



Supplementary Figure S3



Supplementary Figure S4



	<i>n</i>	Me-EBP50 immunoreactivity [ <i>n</i> (%)]		<i>P</i> -value
		Low (< 4)	High (≥ 4)	
Age (years)				
< 60	71	21 (29.6)	50 (70.4)	0.3
≥ 60	48	19 (39.6)	29 (60.4)	
FIGO stage				
I	70	19 (12.9)	51 (87.1)	0.004
II	14	7 (50.0)	7 (50.0)	
III	29	9 (31.0)	20 (69.0)	
IV	5	5 (100.0)	0 (0.0)	
pT factor				
1	75	21 (28.0)	54 (72.0)	0.1
2	16	8 (50.0)	8 (50.0)	
3	27	11 (40.7)	16 (59.3)	
LN metastasis				
Positive	14	7 (50.0)	7 (50.0)	0.2
Negative	86	25 (29.1)	61 (70.9)	
Distant metastasis				
Positive	5	5 (100.0)	0 (0.0)	0.003
Negative	115	34 (30.4)	78 (69.6)	
Dissemination				
Positive	21	10 (47.6)	11 (52.4)	0.2
Negative	98	30 (30.6)	68 (69.9)	

Table1

Variable	Univariate analysis				Multivariate analysis		
	Cutoff	Log-rank value	P-value	Favorable factor	Hazard ratio	95% CI	P-value
Overall survival							
Me-EBP50	3/4	4.7	0.02	High level	0.6	0.23–1.8	0.4
MYH9	5/6	0.7	0.3				
Age	59/60	0.6	0.4				
FIGO stage	I, II/III, IV	47.4	< 0.001	III, IV	0.1	0.03–0.81	0.02
pT factor	1/2,3	30	< 0.001	2, 3	0.9	0.26–4.21	0.9
LN metastasis	Positive/negative	4.7	0.02	Negative	2.02	0.44–9.22	0.3
Distant metastasis	Positive/negative	22.2	< 0.001	Negative	0.3	0.04–2.2	0.2
Dissemination	Positive/negative	43.9	< 0.001	Negative	0.1	0.03–0.88	0.03
Progression-free survival							
Me-EBP50	3/4	10.4	0.001	High level	0.3	0.14–0.66	0.02
MYH9	5/6	1.4	0.2				
Age	59/60	0.5	0.4				
FIGO stage	I,II/III,IV	74.3	< 0.001	III, IV	0.2	0.08–0.88	0.03
pT factor	1/2,3	32.9	< 0.001	2, 3	0.8	0.31–2.27	0.7
LN metastasis	Positive/negative	18.6	< 0.001	Negative	0.5	0.17–1.83	0.3
Distant metastasis	Positive/negative	34.5	< 0.001	Negative	0.2	0.04–1.23	0.08
Dissemination	Positive/negative	57.8	< 0.001	Negative	0.2	0.06–0.67	0.008

Table2