

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名

中川 茉祐



論 文 題 目

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)

指 導 教 授 承 認 印

三 坂 信



# 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性 EBP50/MYH9 発現に関する研究)

氏名 中川 茉祐

## 1. 序論

卵巣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、卵巣癌など)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、卵巣明細胞癌(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 EBP50(Ezrin-radixin-moesin binding protein-50)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巣摘出を含む手術症例で、病理診断が卵巣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、卵巣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 OVICE を選定した。ついで、OVICE から EBP50 ノックアウト細胞(OVICE-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(EMT: epithelial mesenchymal transition)関連・癌幹細胞化(CSC: cancer stem cells)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。細胞周期で見ると、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、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 OVICE 細胞を用いて、OVICE-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、OVICE-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、OVICE-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 につい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 OS と 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

膜型 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。