

令和元年6月20日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08706

研究課題名(和文) 扁平上皮がんの発生、進展におけるTHG-1の役割

研究課題名(英文) Roles of THG-1 in squamous cell carcinoma development

研究代表者

鈴木 裕之 (Suzuki, Hiroyuki)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70375509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞は、環境ストレス、代謝ストレスおよび治療に対して高い頑健性を示す。本研究で我々はTsc 22ファミリータンパク質による扁平上皮がん進展の新しいメカニズムを明らかにした。TSC-22ファミリーのメンバーであるTHG-1は、正常な扁平上皮の基底層に発現し、扁平上皮がんにおいて過剰発現し、Ras-ERK経路によってリン酸化されることで腫瘍増殖を促進する。さらにプロテオーム解析を用いて新規THG-1相互作用タンパク質を同定した。THG-1は、細胞増殖、細胞保護、代謝および微小環境を調節するタンパク質と相互作用することで、腫瘍形成に中心的役割を果たすことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

扁平上皮がんの治療は、外科手術、放射線、化学療法であるが、転移を伴う進行がんの予後を劇的に改善できる分子標的治療薬は未だ開発されていない。本研究により申請者はTHG-1と呼ばれる分子が、扁平上皮がんにおいて高発現し、腫瘍形成、浸潤に重要な役割を果たすことも見いだすと同時に、その結合タンパク質のがん進展における役割について明らかにすることができた。さらにこの結合を阻害する戦略を開発することにより、新たながん治療法へ応用することができると考えている。

研究成果の概要(英文)：Carcinoma cells exhibit a high level of robustness against environmental stresses, metabolic disorders and therapeutic efforts. Here, we provide a novel mechanism of the squamous cell carcinoma development by THG-1, a Tsc-22 family protein. THG-1(TSC22D4), a member of TSC-22 family, is expressed in the basal layer of normal squamous epithelium and overexpressed in squamous cell carcinomas. THG-1 is phosphorylated by Ras-ERK pathway, which promotes cell proliferation, invasion and tumorigenesis. However, molecular functions and physiological roles of THG-1 have not been clear. Therefore, we identified the THG-1-interacting proteins using proteomic approach. THG-1 interacts with several factors that regulate the cell proliferation, cytoprotection, metabolism and microenvironment. Our results highlight the pivotal roles of THG-1 as a novel regulator of tumorigenesis under the oncogenic signaling pathway.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：扁平上皮がん THG-1 分子標的治療 タンパク質相互作用 ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

扁平上皮がんは重層扁平上皮細胞を主な起源とし、食道、皮膚、肺などに発生する予後不良のがんである。正常扁平上皮の構成細胞は基底部に存在する幹細胞から供給され、それらが増殖、重層化、分化という複雑な過程を経て形成されるが、その詳しい形成機構、また発がん機構については不明である。以下に扁平上皮がんの概要を示す。

**発生患者数：** 米国の統計(CA CANCER J CLIN 2017;67:7-30)による、2017年推定新規罹患数は、肺(222,500)、食道(16,940)、頭頸部(49,670)、子宮頸部(12,820)。中国では喫煙率の高さ、大気汚染の状況から2025年の肺がん発症数は100万人を超えると試算(WHO)されている。日本の肺がん罹患患者は133,800(2016年)。  
(注：上記肺がんの2～3割が扁平上皮がん)

**病因：** 肺扁平上皮がんは特にタバコ、食道・頭頸部がんはタバコ、アルコール、食習慣

**病態・症状の特徴：** 肺扁平上皮がんは、太い気管支が細かく分かれ、肺に入っていく肺門部に発生するが多い。タバコとの因果関係が深い。  
食道・頭頸部がんの9割以上は扁平上皮がん、食道の場合組織学的背景から、浸潤、転移を起こしやすく、発見時には食道外組織に広がっていることが多い。

**ステージ分類：** TNM分類によりステージ、及び治療法が決定する。低ステージの場合は外科的な切除により根治が期待できる。遠隔転移を伴う切除不能、再発の場合は化学療法、免疫療法、放射線療法が選択される。

**標準治療の満足度：** 切除不能な場合は、化学療法が選択されるが、現在でも細胞殺傷性の化学療法が選択される場合が多く、認可された分子標的治療薬は少ない。これは肺腺がんのように分子標的治療薬の標的になるドライバー変異を持つがんが少ないためであると考えられる。このため患者は、骨髄抑制、脱毛、下痢、口内炎、末梢神経障害等の一般的な細胞殺傷性化学療法の副作用に悩まされる。近年はPD1を標的にした免疫療法(抗体医薬)も認可されてきているが、適用範囲は限定的である。

**5年生存率：** 米国の場合、患者数が比較的多い、肺、食道の場合、20%。  
頭頸部は発生部位により幅があるが、60%前後。子宮頸部は70%。

申請者はTHG-1が正常皮膚、食道等の扁平上皮基底細胞特異的に発現することを見出した。さらにTHG-1は扁平上皮がんを高発現し、EGF-Ras-ERK経路でリン酸化されて腫瘍形成を促進し、さらに扁平上皮がんではTHG-1の機能獲得型変異を見出した。

## 2. 研究の目的

本研究では扁平上皮の増殖、分化、及びがん化におけるTHG-1の役割を明らかにし、そのリン酸化、変異、結合タンパクを標的にした分子腫瘍マーカーの開発、及びがん治療への応用を目指す。

## 3. 研究の方法

### 【細胞培養】

ヒト胎児腎細胞株293T、ヒト角化細胞株、食道がん、肺扁平上皮がん細胞は10%FBS、penicillin streptomycin solutionを添加したDMEMを用いて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。

### 【免疫染色】

カバーガラスを入れた6well dishに、細胞を2×10<sup>4</sup> cellsで撒き、24時間培養した。Dishから細胞培養液を除去し、PBSで洗浄した後、3.7% formaldehyde/PBSで10分間固定した。PBSで10分、3回洗浄後、1% BSA in 0.3% Triton X-100/PBSで25分間ブロッキングし、1次抗体を室温で1時間反応させた。その後、PBSで5分、4回洗浄後、2次抗体を室温で1時間反応させた。反応後、PBSで5分、4回洗浄後、蒸留水で2回洗浄し、封入剤を用いてスライドガラス上に封入した。

### 【マウスの皮膚からのRNA回収、及び定量的PCR解析】

マウスの耳を切断し、皮膚組織を細かく裁断した後、アイソジェン2溶液に懸濁した後-80℃で凍結した。融解後RNAを回収し、cDNAを作製後、各種プライマーを用いてmRNA発現を解析した。

#### 【タンパク質間相互作用の検出・定量化】

Fluoppi、及び Nano-luc を用いたタンパク質相互作用検出系を導入し、それぞれタンパク質間相互作用を蛍光輝点、及びルシフェラーゼ活性で検出することに成功した。これを用いて THG-1 に結合する環状ペプチドがタンパク質間相互作用を抑制するかどうか検討した。

#### 4 . 研究成果

THG-1 / TSC22D4 の扁平上皮がんの進展における役割を分子、細胞、個体レベルで明らかにするため、以下の研究を行った。

新規同定した THG-1 の結合タンパク質（4種類）の解析を進め、THG-1 がどのようにがんを進展させるのか分子メカニズムを検討した。特に THG-1 は、その結合タンパク質との結合を介して、がんの微小環境、幹細胞性、さらにはストレス抵抗性を制御する可能性が考えられた。

THG-1 の生理的役割の解析：THG-1 ノックアウトマウスの解析を進めて、重層扁平上皮構築への役割について検討し、で同定した THG-1 の結合タンパク質との関連性について検討を進めた。その結果、結合タンパク質の一つによって制御される標的遺伝子が THG-1 ノックアウトマウスにおいても変化することが明らかになり、生体マウスにおいても機能していることが示された。現在一部の結合タンパク質について組織染色ができないため、抗体の作成を検討している。

THG-1 の発現・リン酸化・変異・結合タンパクを標的にした分子腫瘍マーカーの開発：THG-1 のリン酸化を認識する抗体を用いて、THG-1 のリン酸化を指標に複数の扁平上皮がん組織の免疫染色を進めた。今後 THG-1 のリン酸化と 1 で同定した標的遺伝子発現との関連性を進め、新規診断法開発の可能性についての検討を進めている。

THG-1 結合ペプチドの同定と分子診断・分子標的薬への応用：THG-1 に結合するペプチド候補物質の絞り込みを行い、THG-1 とその結合タンパク質との結合を定量的に評価する検出系を用いて、同ペプチドが上記タンパク質間相互作用の一部を容量依存的に抑制することが明らかになった。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Wada M, Suzuki H, Kato M, Oikawa H, Tsubouchi A, Oguri H.

Stereo-Divergent Synthesis of Bispyrrolidinoindoline Alkaloidal Scaffolds and Generation of a Lead Candidate with Stereospecific Anti-proliferative Activity.

Chembiochem. 査読有 2019 Jan 14. doi: 10.1002/cbic.201800815.

Chen C, Okita Y, Watanabe Y, Abe F, Fikry MA, Ichikawa Y, Suzuki H, Shibuya A and Kato M.

Glycoprotein nmb is exposed on the surface of dormant breast cancer cells and induces stem cell-like properties.

Cancer Res. 査読有 2018; 78: 6424-6435. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0599.

Fuse Y, Endo Y, Araoi S, Daitoku H, Suzuki H, Kato M and Kobayashi M.

The possible repositioning of an oral anti-arthritic drug, auranofin, for Nrf2-activating therapy: The demonstration of Nrf2-dependent anti-oxidative action using a zebrafish model.

Free Radic. Biol. Med. 査読有 2018; 115: 405-411. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.022.

Zheng L, Suzuki H, Nakajo Y, Nakano A, and Kato M.

Regulation of c-MYC transcriptional activity by transforming growth factor-beta 1-stimulated clone 22.

Cancer Sci. 査読有 2018;109:395-402. doi: 10.1111/cas.13466.

Okita Y, Kimura M, Rudy X, Chen C, Shen LTW, Kojima Y, Suzuki H, Muratani M, Saitoh M, Semba K, Heldin CH and Kato M.

The transcription factor MAFK induces EMT and malignant progression of triple-negative breast cancer cells through its target GPNMB.

Sci. Signal. 査読有 2017; 10(474). doi: 10.1126/scisignal.aak9397.

〔学会発表〕(計 12 件)

Hiroyuki Suzuki

Oncogenic functions of TGFβ-stimulated clone-22 families

STINT Special Symposium on the Sweden-Japan 150 Anniversary Grant, 2019 年

Ling Zheng, 鈴木裕之, 加藤光保

THG-1, a novel oncogene in tumor angiogenesis

第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年

鈴木裕之, 加藤光保

Oncogenic functions of THG-1/Tsc22D4 in squamous cell carcinoma development

第 77 回日本癌学会学術総会, 2018 年

三浦万侑花 鈴木裕之 加藤光保

THG-1/Tsc22D4 の腫瘍化における役割

第 106 回 日本病理学会総会, 2017 年

鈴木裕之 加藤光保

Roles of THG-1/Tsc22D4 and its binding proteins in tumor development

第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年

テイレイ 鈴木裕之 加藤光保

THG-1 は HIF-1α を安定化して腫瘍の血管新生を促進する

第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年

沖田結花里 鈴木裕之 加藤光保

乳がんの発生・進展における GPNMB の役割

第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年

鈴木裕之 小沼雅世 加藤光保

Roles of THG-1/TSC22D4 in squamous cell carcinoma progression

生命科学系学会合同年次大会, 2017 年

鈴木裕之 加藤光保

扁平上皮がんの病理発生

第 105 回日本病理学会総会, 2016 年

鈴木裕之 加藤光保

Roles of THG-1/Tsc22D4 in tumor development

第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年

鈴木裕之 小沼雅世 加藤光保

Tsc-22 ファミリータンパク質のがん進展における役割

第 39 回分子生物学会年会 2016 年

テイレイ 鈴木裕之 加藤光保

新規がん遺伝子 THG-1/Tsc22D4 は HIF-1 の安定化を介して腫瘍の血管新生を促進する

第 39 回分子生物学会年会, 2016 年

〔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：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 <http://www.md.tsukuba.ac.jp/younginit/suzuki/Top.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。