

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08397

研究課題名(和文) STEAP1を介した酸化ストレス制御による新規肝細胞癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development a novel therapy for hepatocellular carcinoma by targeting STEAP1

研究代表者

高田 弘一 (Takada, Kohichi)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：90398321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：独立した複数のGEOデータセットの解析から、STEAP1の発現が正常肝組織と比較して肝細胞癌(HCC)で亢進していること、STEAP1の発現亢進が予後不良因子であることを明らかにした。さらに、STEAP1のknock-downによりHCC細胞株において細胞増殖の抑制とG1 arrestが惹起されることを見出した。これらの結果よりSTEAP1がHCCの病態生理に寄与している可能性が示された。c-Mycは細胞周期制御に重要な転写因子であり、HCCにおいて過剰発現が認められている。これらのことから、STEAP1-c-Myc経路はHCCの有望な新規治療ターゲットとなり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌で同定され、多くの癌細胞で過剰発現している細胞表面蛋白質であるSix-transmembrane epithelial antigen of prostate 1 (STEAP1)は、肝細胞癌(HCC)の病態形成にどのように関与しているかは不明であり、先駆性や独創性があると考えられた。

HCCの治療薬として様々な薬剤が臨床導入されているが、切除不能HCC患者の予後は不良である。より効果的なHCC治療薬を開発するために新規標的分子の探索が必要不可欠であり、社会的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：STEAP1 has emerged as an ideal target in cancer therapeutics. However, the functions of STEAP1 in hepatocellular carcinoma (HCC) remain unexplored. In the current study, we sought to characterize the biological roles of STEAP1 in HCC. STEAP1 transcripts are over-expressed and associated with poor clinical outcomes in patients with HCC in several publicly available datasets. STEAP1 silencing using small interfering RNA inhibited cell growth and was accompanied by G1 arrest induced by the suppression of cyclin D1 and the promotion of p27. STEAP1 silencing suppressed the expression of c-Myc, which we identified as a component in STEAP1 signal transduction by mining publicly available datasets, and confirmed this by PCR array. In conclusion, the knockdown of STEAP1 in HCC cells led to cell-growth inhibition involving G1 arrest by targeting the suppression of c-Myc. This study suggests a preclinical concept for STEAP1 as a druggable target in HCC.

研究分野：腫瘍学

キーワード：STEAP1 HCC c-Myc

1. 研究開始当初の背景

2018年のがん統計予測では、HCCの罹患数は約39,000人にものぼる。さらにHCCの年間死亡者数は約27,000人に達する(がん死亡原因第5位)。切除不能肝細胞癌(UR-HCC)に対する薬物療法として最近レンバチニブ(Len)が臨床導入されたが、治癒を目指した治療法ではなく、その生存期間中央値は13.6ヵ月と短く、UR-HCCの予後は不良である。よって、より効果的な治療法の開発が急務である。申請者は、C型肝炎およびNASH患者では、鉄代謝関連分子の発現異常により消化管からの鉄吸収が亢進し、肝細胞に鉄が過剰に蓄積する原因であることを明らかにしてきた(前述, Takada K, Can J Gastroenterol Hepatol 2018)。しかしながら、鉄代謝関連分子群のHCC細胞における機能は不明である。そこで申請者は、鉄代謝関連分子発現多寡がHCC患者の生存期間に与える影響を網羅的に解析した。その結果 *Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 1 (STEAP1)* の mRNA 高発現群が有意にその予後が不良で、かつ *STEAP1* の発現が非HCC部に比較してHCC部で有意に高いことも見出した。したがって、*STEAP1* がHCCの発症・進展に寄与している可能性がある。しかしながら、これまでHCCにおける*STEAP1*に関する研究報告は皆無であった。

2. 研究の目的

近年、分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害薬が進歩してきたが、未だ進行HCC患者の予後は不良である。より効果の高い治療薬を開発するために、HCCの分子生物学的特性を探ることが重要である。

腫瘍関連タンパク質であるc-Mycは、HCCを含む様々な癌の病態に関与しており、c-Mycの転座や過剰発現はHCC患者の予後不良とも関連している。しかし、腫瘍細胞内におけるc-Mycの特性により、c-Mycを直接の標的とする薬剤の開発は難しいのが現状である。

Six-transmembrane epithelial antigen of prostate 1 (STEAP1) は前立腺癌で最初に同定され、正常細胞では発現が低く、多くの癌細胞で過剰発現している細胞表面蛋白質である。最近、我々は、大腸癌細胞でSTEAP1が過剰発現しており、NF-E2関連因子(NRF2)経路を介し活性酸素種(Reactive oxygen species;ROS)を抑制することで大腸癌細胞のapoptosis回避に寄与していることを発見した。しかしながら、HCCの病因におけるSTEAP1の役割は未だ不明である。

上記に基づき、本研究ではHCCにおけるSTEAP1の発現や予後との関連を解析し、STEAP1がHCC細胞の増殖に与える影響やその機序を検討することで、将来的な新規治療戦略の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞癌におけるSTEAP1の発現および予後との関連の検討

複数の独立したGene Expression Omnibus(GEO)のデータセット(GSE14520, GSE36376)を用いて、患者の非癌組織およびHCC組織におけるSTEAP1の発現多寡をin silicoで解析した。さらに、STEAP1の発現とHCC患者の予後との関係について、データセットのGSE14520とThe Cancer Genome Atlas Program (TCGA)において、Receiver Operating Characteristic (ROC)曲線を作成し設定したカットオフ値により、STEAP1の発現多寡で患者を2群に割り付け、STEAP1の発現と全生存期間(Overall survival: OS)との関連についてKaplan-Meier法により解析した。

(2) STEAP1が細胞増殖に与える影響およびその機序の検討

HCC 細胞株(HepG2, Hep3B)において、それぞれ配列の異なる 2 種類の siRNA を用いて STEAP1 を knock-down し、細胞増殖に与える影響について transfection から 0h, 24h, 48h, 96h の各時点において WST-1 法を行い、吸光度に基づいた増殖曲線を作成し検討した。 knock-down 効率に関しては、transfection から 72h の時点で RT-qPCR 法および Western blot 法を行い確認した。さらにその機序を検討するため、それぞれの HCC 細胞株で STEAP1 を siRNA を用いて knock-down し、transfection から 72h 後に細胞周期の各期の割合および apoptosis 細胞の割合を flow cytometry 法で解析した。さらに、細胞周期関連タンパク質について Western Blot 法で評価した。

(3) STEAP1 の下流に存在するシグナル伝達経路の検討

STEAP1 の下流に存在するシグナル伝達経路を明らかにするため、まず GEO2R の HCC 患者のデータセット (GSE14520-GPL3921) を用いて、STEAP1 の高発現群と低発現群に分け、それぞれ発現変動遺伝子 (Differentially Expressed Genes; DEGs) を抽出した。さらに Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を用い、STEAP1 によって制御される遺伝子について検討し、STEAP1 の発現と関連のある分子について GEO のデータセット (GSE14520, GSE36376) と TCGA において in silico で解析を行った。さらに、HCC 細胞株 (HepG2, Hep3B) において STEAP1 の knock-down 後に認められる上記分子の発現を RT-qPCR 法と Western blot 法で評価し、PCR array でシグナル伝達経路を構成する各種分子についてその発現を評価した。

(4) 統計学的検討

統計学的有意差検定は Student t test, Mann-Whitney U-test, log-rank test, one-way ANOVA とそれに続く Bonferroni's post-hoc test を用いて行い、相関分析は Pearson の相関分析で行った。P < 0.05 をカットオフ値とした。

4. 研究成果

(1) STEAP1 は HCC において過剰発現しており、独立した予後不良因子である

2 種類のデータセット (GSE14520 および GSE36376) の解析から、STEAP1 は正常患者肝組織と比較して HCC 組織で発現が有意に亢進していることを見出した。さらに、GSE14520 および TCGA のデータセットを用いた解析では、STEAP1 の発現亢進群における有意な全生存期間 (overall survival: OS) の短縮が明らかとなり、STEAP1 の発現亢進が HCC において予後不良因子であることを示した (Figure 1)。

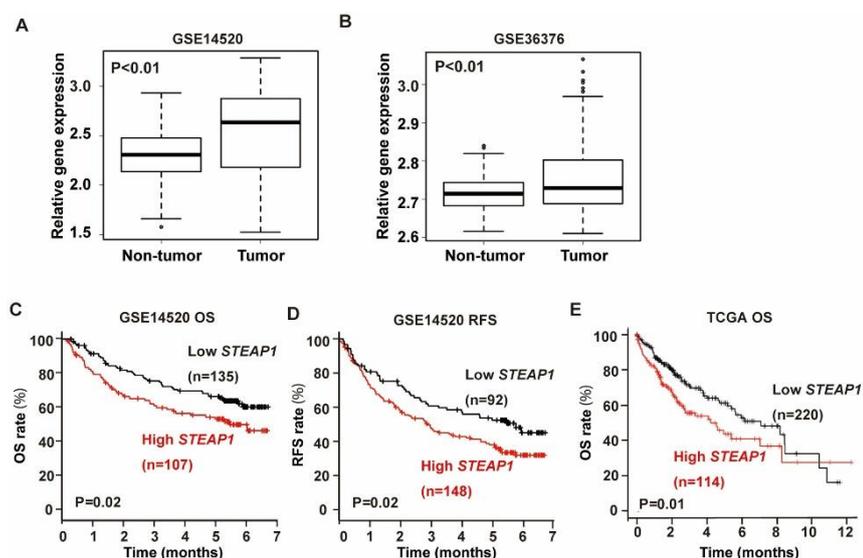


Figure 1. STEAP1 expression is upregulated and associated with poor survival in patients with hepatocellular carcinoma

ことを示した (Figure 1)。

(2) STEAP1 の発現抑制は HCC 細胞株の増殖能を低下させる

2 種類の異なる HCC 細胞株 (HepG2, Hep3B) において, negative control の siRNA および STEAP1 を標的とした 2 種類の配列の異なる siRNA を transfection し, 72h 後に細胞を回収し, RT-qPCR 法と Western blot 法により knock-down 効率を評価した. その結果, STEAP1 を標的とした siRNA では control と比較して, 両方の細胞株で STEAP1 の有意な発現低下を認めた. そこで, 細胞増殖に与える影響を WST-1 法にて検討したところ, 両方の細胞株において, STEAP1 の knock-down 後に有意な細胞増殖能の低下が認められた (Figure 2).

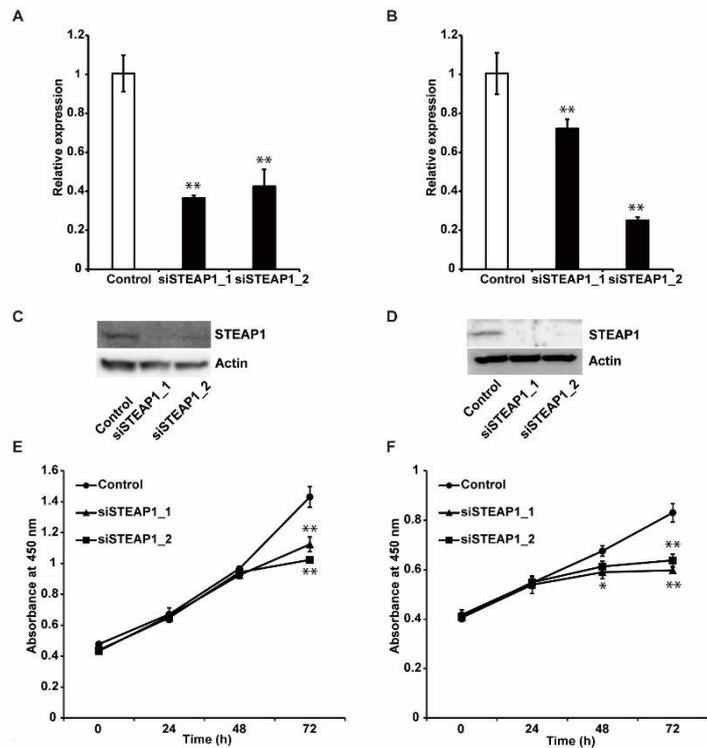


Figure 2. Knockdown of STEAP1 leads to inhibition of cell proliferation in HCC cell lines

(3) STEAP1 の発現抑制は HCC 細胞株において G1 arrest を誘導する

Propidium iodide (PI) を用いた flow cytometry 法により STEAP1 knock-down 後の細胞周期について解析した. 2 種類の異なる HCC 細胞株 (HepG2 および Hep3B) において, control と比較して, STEAP1 knock-down 後には G0/G1 期の細胞の割合が有意に増加し G1 arrest が誘導されていた. また, apoptosis 細胞の割合を評価するために, Annexin V を用いた flow cytometry 法で解析を行ったが, STEAP1 の knock-down によって HCC 細胞株では apoptosis 細胞の割合の増加は認めなかった. STEAP1 の knock-down によって誘導された HCC 細胞株における G1 arrest のメカニズムを検討するため, western blot 法を使用し, HCC 細胞株において細胞周期関連タンパク質の

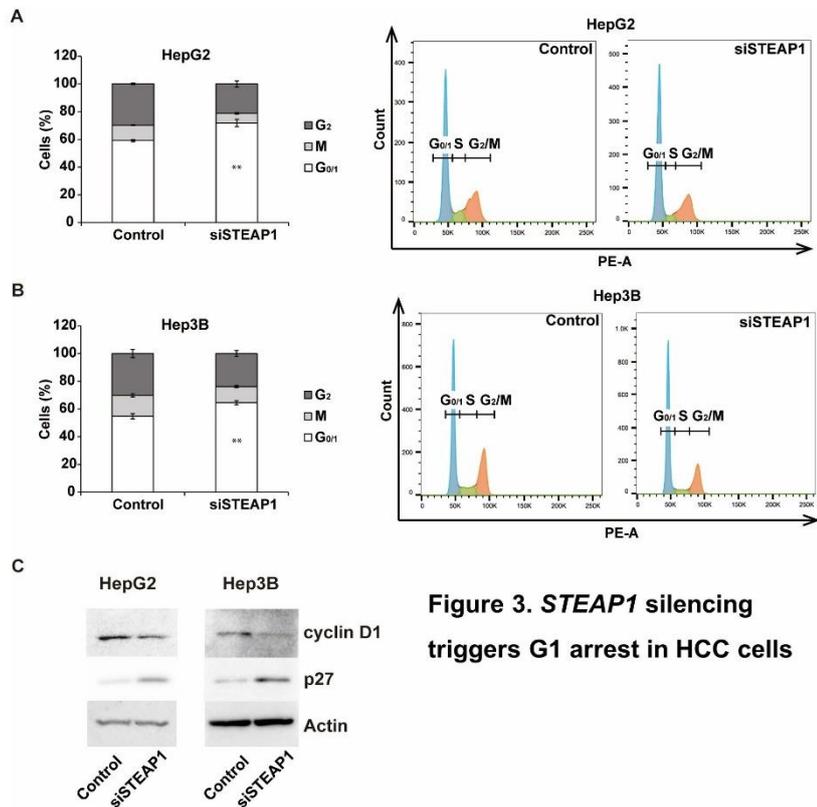


Figure 3. STEAP1 silencing triggers G1 arrest in HCC cells

を解析するため, western blot 法を使用し, HCC 細胞株において細胞周期関連タンパク質の

発現レベルを評価した。G1期の進行に関与する cyclin D1 の発現は低下し、G1 arrest を誘導する p27 の発現は有意に増加していた。これらに基づき、STEAP1 は細胞周期を制御し HCC の増殖に寄与しているものと考えられた。

(4) STEAP1 は転写因子 c-Myc とその標的遺伝子を制御している

上述のように STEAP1 の knock-down 後に認められる G1 arrest と細胞増殖低下について、その機序を更に検討する目的で、GEO2R の HCC 患者のデータセット (GSE14520-GPL3921) を用いて、STEAP1 の高発現群と低発現群に分け、それぞれ発現変動遺伝子 (Differentially Expressed Genes; DEGs) を抽出した。さらに、2 つのグループで Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を用い検討を行った結果、STEAP1 の発現と MYC_TARGET_V2 遺伝子の間に最も強い正の相関を認めた ($r=0.037$, $P=0.004$)。この結果より、我々は HCC において STEAP1 がシグナル伝達経路の上流にあり、下流の c-Myc を制御しているという仮説を立て、さらに検討を進めた。2 種類の異なる HCC 細胞株 (HepG2, Hep3B) において、STEAP1 の knock-down 後に RT-qPCR 法と Western blot 法で c-Myc の発現を評価したところ、いずれの細胞においても有意な発現低下を認めた。さらに、HCC 細胞株 (HepG2) において STEAP1 を knock down した後、PCR array により検討を行い、c-Myc の下流にある標的遺伝子の mRNA の発現が STEAP1 の knock-down により低下していることを明らかとした (Figure 4)。

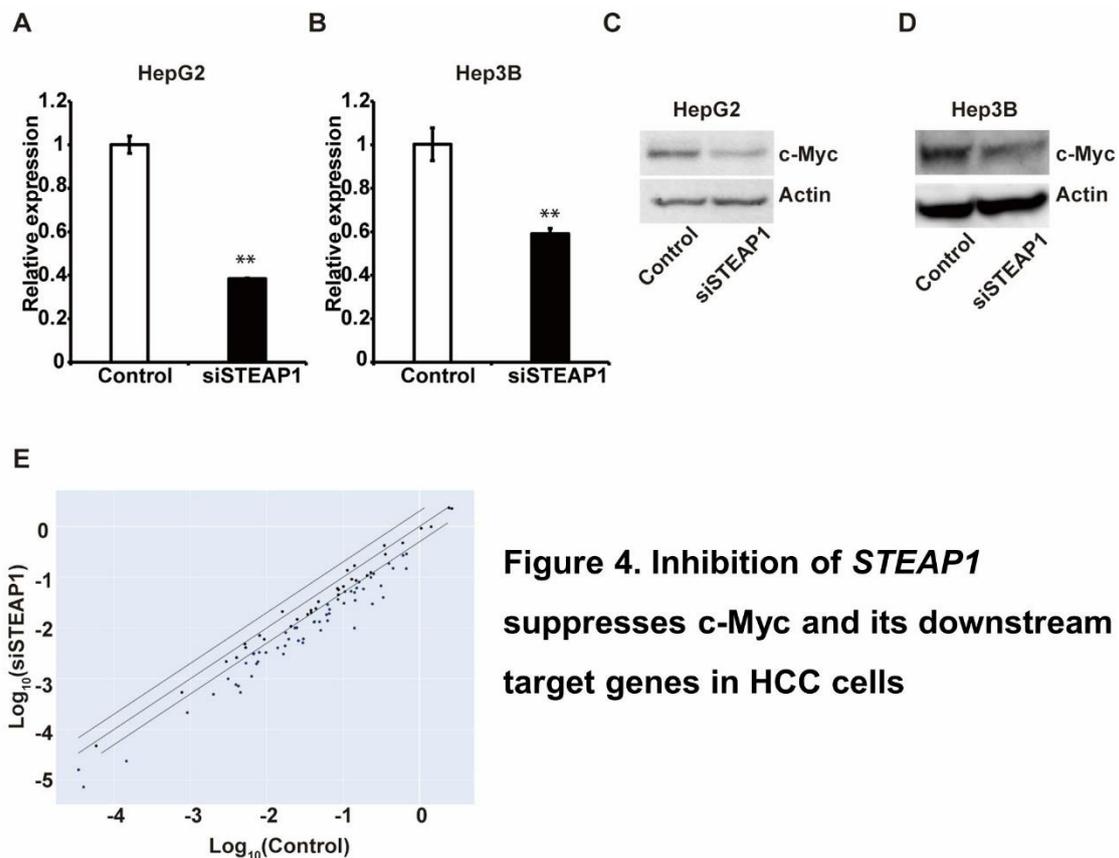


Figure 4. Inhibition of STEAP1 suppresses c-Myc and its downstream target genes in HCC cells

本研究により、STEAP1 は正常肝組織と比較し、HCC において有意に発現が亢進していることが明らかとなった。STEAP1 の発現抑制は c-Myc の発現低下を惹起し、HCC の増殖を抑制することを示した。これらのことから、STEAP1-c-Myc 経路は HCC の有望な新規治療ターゲットとなり得ると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sakamoto Hiroki, Miyanishi Koji, Tanaka Shingo, Ito Ryo, Hamaguchi Kota, Sakurada Akira, Sato Masanori, Kubo Tomohiro, Osuga Takahiro, Murase Kazuyuki, Takada Kohichi, Nakabeppu Yusaku, Kobune Masayoshi, Kato Junji	4. 巻 11
2. 論文標題 MUTYH is associated with hepatocarcinogenesis in a non-alcoholic steatohepatitis mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83138-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura Hajime, Kawano Yutaka, Miyanishi Koji, Ishikawa Kazuma, Kubo Tomohiro, Tanaka Shingo, Takada Kohichi, Kobune Masayoshi, Harada Kohei, Kawamura Norio, Shimamura Tsuyoshi, Kanno-Okada Hiromi, Kato Junji	4. 巻 12
2. 論文標題 Successful Treatment of Hepatocellular Carcinoma with Transcatheter Arterial Chemoembolization followed by Radical Liver Transplantation in a Patient with Severe Liver Damage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Reports in Oncology	6. 最初と最後の頁 289 ~ 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000499703	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Iijima Kazutaka, Nakamura Hajime, Takada Kohichi, Hayasaka Naotaka, Kubo Tomohiro, Umeyama Yui, Iyama Satoshi, Miyanishi Koji, Kobune Masayoshi, Kato Junji	4. 巻 22
2. 論文標題 Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 1 accelerates cell proliferation by targeting c-Myc in liver cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12807	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura Hajime, Takada Kohichi	4. 巻 112
2. 論文標題 Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3945 ~ 3952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 元 (Nakamura Hajime) (10792666)	札幌医科大学・医学部・その他 (20101)	
研究分担者	加藤 淳二 (Kato Junji) (20244345)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	宮西 浩嗣 (Miyanishi Koji) (60372819)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------