

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10155

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌におけるR2TPのターゲット解析と治療標的としての可能性の検討

研究課題名(英文) Analysis of the Target of R2TP in Oral Squamous Cell Carcinoma and its Potential as a Therapeutic Target

研究代表者

柿原 嘉人 (Kakihara, Yoshito)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40379938

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)：R2TPは、細胞の分裂増殖や代謝に関わるシャペロンタンパク質で、細胞の重要な生物学的プロセスに関わる複合体の形成に関与することが知られている。本研究では、このR2TPが口腔癌の悪性化に関わるかについて解明を行った。口腔扁平上皮癌組織における発現様式や癌由来細胞を用いたR2TP相互作用因子の網羅的単離や遺伝学的な表現型解析を行ったところ、R2TPが口腔癌の悪性腫瘍において高発現しており、癌抑制遺伝子産物である変異型p53などと相互作用することで、悪性化に関与していることが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の口腔癌の罹患数は、近年の超高齢化に伴って上昇傾向にあり、その約9割を占める口腔扁平上皮癌についても同様である。効果的な治療薬の開発によって、予後の改善は進んでいるが、一方で癌悪性化のメカニズムは未解明の部分も多く、治療薬については副作用や獲得耐性の問題点もあり、口腔癌細胞の性状における分子レベルでのメカニズムの理解が必要である。そこで、本研究は、口腔癌の悪性化がどのようにして起こるのかについて、分子レベルでの解明を行った。本研究結果によって、悪性化のメカニズムの理解が進んだことで、副作用や獲得耐性が少ない新しい治療法薬の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：R2TP is a chaperone protein involved in cell division and proliferation and metabolism, and is known to be involved in the formation of complexes involved in important cellular biological processes. In this study, we sought to elucidate whether the R2TP is involved in the malignant transformation of oral cancer. Comprehensive isolation and genetic phenotypic analysis of R2TP and its interacting factors in oral squamous cell carcinoma tissues and cancer-derived cells revealed that R2TP is highly expressed in malignant tumors of oral cancer and is involved in malignant transformation by interacting with mutant p53, an oncosuppressor gene product. Also, R2TP is highly expressed in malignant tumors of oral carcinoma.

研究分野：薬理学

キーワード：R2TP 口腔扁平上皮癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国の口腔癌の罹患数は、近年の超高齢化に伴って上昇傾向にあり、その約9割を占める口腔扁平上皮癌についても同様である。口腔扁平上皮癌の化学療法としては、いわゆる殺細胞性抗癌薬と分子標的治療薬が併用されている。殺細胞性抗癌薬は副作用が大きく、分子標的治療薬は獲得耐性を生じるといった問題点があることから、口腔癌に適用可能な副作用の少ない新規分子標的治療薬の創出が期待されているが、そのためには、口腔癌進展について分子レベルでのメカニズムの理解が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究では、近年、肝臓癌、乳癌、大腸癌などの様々な癌において高発現が見出されている分子シャペロン R2TP が、口腔扁平上皮癌の悪性化進展にどのように関わるのかについて明らかにする。本研究で対象とする分子シャペロン R2TP は、Pontin, Reptin, PIH1D1, RPAP3 の4つのタンパク質から構成される。このシャペロンは、巨大なタンパク質複合体もしくはタンパク質-RNA複合体形成を手助けする活性がある事が見出されている。既知の標的として、mTORC1, RNAポリメラーゼ II, snoRNP (核小体低分子リボ核酸タンパク質) などが報告されており、それらは細胞の生存維持に必須の複合体である。本研究では、R2TP が口腔扁平上皮癌の悪性進展に関与しているのか否か、また関与しているとすればどのような作用機序によるのかについて解明し、口腔扁平上皮癌に対する新規分子標的治療薬開発への橋渡しをめざす。

### 3. 研究の方法

#### (1)口腔扁平上皮癌細胞における R2TP の新規標的因子の同定

R2TP のターゲット因子を網羅的に同定し、その中から鍵因子を割り出し、それに対する R2TP の作用機序を明らかにする。方法としては、口腔扁平上皮癌由来細胞を用いて免疫沈降し、R2TP の相互作用因子を質量分析法によって同定し、ウエスタンブロット法により相互作用を特定する。

#### (2)R2TP と新規標的因子の機能解析

各遺伝子について siRNA ノックダウンを行い、口腔扁平上皮癌由来細胞の増殖や遊走に対する表現型解析を行う。口腔扁平上皮癌の組織切片において、免疫組織化学染色を行い、各遺伝子の発現領域や発現強度を評価する。口腔扁平上皮癌由来細胞における各タンパク質の細胞内局在を検討する。

#### (3)阻害剤による口腔扁平上皮癌細胞の増殖抑制効果の検討

R2TP や標的因子の阻害剤を用いて口腔扁平上皮癌の増殖に対する効果を検討する。

### 4. 研究成果

#### (1)口腔扁平上皮癌細胞における R2TP の新規標的因子の同定

口腔扁平上皮癌由来細胞の細胞抽出液に対して、R2TP 複合体の免疫沈降を行い、相互作用因子を質量分析法によって同定した。その結果、主要な相互作用因子として、p53 の機能獲得型変異である mutp53-R248Q や HEAT repeat-containing protein 1(HEATR1)が同定された。さらに、R2TP の相互作用因子として知られる TEL02 の相互作用因子として、Phosphoglycerate Dehydrogenase(PHGDH)が単離された。

#### (2)R2TP の機能解析

まず、R2TP の各因子である Pontin, Reptin, PIH1D1, RPAP3 について解析を進めた。口腔扁平上皮癌組織の低分化領域においてすべての因子が高発現していることが確認された。口腔扁平上皮癌由来細胞(HSC-4)の抽出液を用いた免疫沈降によって各因子の相互作用が認められ、HSC-4 細胞において各因子が R2TP として複合体を形成していることが明らかになった。siRNA を用いて HSC-4 細胞の R2TP 各因子をノックダウンしたところ、コントロール siRNA に比較して、RPAP3 以外のすべての R2TP 因子のノックダウンで増殖と遊走の抑制が見られた( )。

#### (3)R2TP と mutp53-R248Q の機能的な関連性の解析

R2TP の Pontin との結合が確認された p53 の機能獲得型変異である mutp53-R248Q についての解析を行った。Pontin のノックダウンによって mutp53-R248Q のリン酸化レベルが低下したことから、Pontin は、R2TP とは独立した機能として、mutp53-R248Q の活性化に関与していることが示唆された( )。

#### (4)R2TP と HEATR1 の機能的な関連性の解析

R2TP との相互作用が確認された HEATR1 の解析を行った。HEATR1 は HEAT リピートと呼ばれるタンパク質相互作用に関与するドメインを持っており、他にもいくつかの HEAT リピートを持つタンパク質が同定されたことから、R2TP と HEAT リピートドメインに結合親和性があることが予想された。siRNA による HEATR1 ノックダウンは、細胞増殖が顕著に低下したことから、R2TP と同様に口腔扁平上皮癌細胞の増殖に寄与する遺伝子であることが明らかになった( )。また、HEATR1 のノックダウンによって R2TP の構成因子である Pontin/Reptin のタンパク質レベルの低下が見られた。HEATR1 の mRNA レベルに変化は見られなかったため、HEATR1 が Pontin/Reptin の

タンパク質安定性に関与していることが示唆された。さらに口腔扁平上皮癌組織において HEATR1 の高発現が認められたことから、癌の悪性進展に関与することが推察された( )。

#### (5) TEL02 の新規相互作用因子 PHGDH の同定と機能解析

口腔扁平上皮癌における TEL02 の機能については未解明であったため、TEL02 に結合するタンパク質の網羅的な同定を質量分析法によって行った。その結果、最も主要な結合因子として PHGDH (ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ) が同定された。実際の結合を確認するため、抗 TEL02 抗体で免疫沈降を行い、抗 PHGDH 抗体でウエスタンブロット解析を行ったところ、両者の結合が確認された。さらに、抗 PHGDH 抗体の免疫沈降物に対して、抗 Pontin 抗体でウエスタンブロット解析を行ったところ、両者の相互的な結合が確認されたことから、PHGDH は TEL02 を介して R2TP と結合していることが推察された。よって PHGDH についても、これまで我々が解析を行ってきた R2TP と同様に口腔扁平上皮癌細胞の増殖に関わることが推察されたことから、siRNA を用いたノックダウンによる表現型解析を行った。HSC-4 細胞に対して PHGDH をノックダウンし、細胞増殖アッセイを行ったところ、コントロールに比べて細胞増殖の促進が見られた。また、PHGDH の阻害剤によっても同様の表現型が観察された。このことから、PHGDH は細胞増殖を促進する R2TP とは逆に癌細胞増殖を抑制する活性を有していることが推察された。今後、そのメカニズムについてさらに詳細な解析を進めていく。

#### <引用文献>

Kiguchi T, Kakihara Y, Yamazaki M, Katsura K, Izumi K, Tanuma JI, Saku T, Takagi R, Saeki M. Identification and characterization of R2TP in the development of oral squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 548, 161-166, 2021.

Nakamura Akihiko, Kakihara Yoshito, Funayama Akinori, Haga Kenta, Mikami Toshihiko, Kobayashi Daiki, Yoshida Yutaka, Izumi Kenji, Kobayashi Tadaharu, Saeki Makio. HEATR1, a novel interactor of Pontin/Reptin, stabilizes Pontin/Reptin and promotes cell proliferation of oral squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 557, 294-301, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakamura Akihiko, Kakahara Yoshito, Funayama Akinori, Haga Kenta, Mikami Toshihiko, Kobayashi Daiki, Yoshida Yutaka, Izumi Kenji, Kobayashi Tadaharu, Saeki Makio	4. 巻 557
2. 論文標題 HEATR1, a novel interactor of Pontin/Reptin, stabilizes Pontin/Reptin and promotes cell proliferation of oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 294 ~ 301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.04.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kiguchi T, Kakahara Y, Yamazaki M, Katsura K, Izumi K, Tanuma JI, Saku T, Takagi R, Saeki M.	4. 巻 548
2. 論文標題 Identification and characterization of R2TP in the development of oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 161-166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.074.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柿原嘉人、佐伯万騎男
2. 発表標題 分子シャペロンR2TPの口腔扁平上皮癌進展における機能解析
3. 学会等名 第40回日本歯科薬物療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 彬彦, 柿原 嘉人, 船山 昭典, 小林 正治, 佐伯 万騎男
2. 発表標題 HEATR1はPontin/Reptinを安定化させmTORシグナル経路を介してOSCC細胞の増殖を正に制御する
3. 学会等名 第53回新潟歯学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 彬彦, 木口 哲郎, 高木 律男, 船山 昭典, 小林 正治, 柿原 嘉人, 佐伯 万騎男
2. 発表標題 リボソーム合成関連因子HEATR1は、Pontin/Reptin complexと共に口腔扁平上皮癌進展に寄与する
3. 学会等名 第74回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔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	佐伯 万騎男  (Saeki Makio)  (30273692)	新潟大学・医歯学系・教授   (13101)	
研究分担者	荒井 雅吉  (Arai Masayoshi)  (80311231)	大阪大学・薬学研究科・教授   (14401)	
研究分担者	船山 昭典  (Funayama Akinori)  (80529686)	新潟大学・医歯学総合病院・講師   (13101)	

#### 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
---------	---------