

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16434

研究課題名(和文)食道扁平上皮癌における新規分子標的治療の開発

研究課題名(英文)Development of novel targeted therapy for esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

鄭 齡 (ZHENG, LING)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：70833565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌は初期段階の診断が困難で、手術後の再発や、リンパ節転移、隣接器官への浸潤が起こりやすいため、進行に関わる特異的な標的分子のメカニズムの更なる理解は、治療および予後の改善のために重要である。本課題では食道扁平上皮癌において高発現するがん遺伝子THG-1の分子機能についてTHG-1のリン酸化反応に注目し、リン酸化THG-1機能解析中心に明らかにし、新たな食道扁平上皮癌の分子標的治療法の開発を目的として行われた。その結果リン酸化THG-1発現細胞株でグルタミン代謝の変化が認められ、またその変化を抑制する化合物を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌は主に扁平上皮癌と腺癌を含む二つの組織型に分類することができるが、アジアで特に多いのが扁平上皮癌である。食道扁平上皮癌に高発現し、さらに癌の進行に関わる分子であるTHG-1についてリン酸化機能解析を中心に解明した分子機構の理解及び特異的な標的分子の探索は、治療および予後の改善のために重要である。

研究成果の概要(英文)：Esophageal squamous cell carcinoma is a cancer that is difficult to diagnose at an early stage and is prone to recurrence after surgery, lymph node metastasis, and invasion into adjacent organs. Therefore, further understanding of the mechanisms by which specific target molecules are involved in the progression is important to improve treatment and prognosis. In this project, we investigated the molecular function of THG-1, an oncogene highly expressed in esophageal squamous cell carcinoma, focusing on the phosphorylation of THG-1, with the aim of developing new molecularly targeted therapies for esophageal squamous cell carcinoma. We found that phosphorylated THG-1 induces changes in glutamine metabolism in squamous cell carcinomas, and we also found compounds that inhibit the changes in glutamine metabolism.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：食道扁平上皮癌 THG-1 リン酸化 グルタミン代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者の研究室では THG-1 が食道、皮膚などの重層扁平上皮の基底細胞に発現し、約 9 割の食道扁平上皮癌で高発現することを見出した。そこで、食道扁平上皮癌細胞において、腫瘍における THG-1 の役割を検討したところ、THG-1 のノックダウンにより、がん細胞の増殖、浸潤、腫瘍形成能が低下することを見出した。さらに、皮膚角化細胞株 (HaCaT) に THG-1 を発現させたところ、リン酸化 THG-1 発現細胞の腫瘍形成能が高く、同定した 1 つのセリンのリン酸化が腫瘍形成の促進に必須であることを見出した。

このような結果は癌細胞において過剰に発現した THG-1 が腫瘍形成や悪性化に関与している可能性を示す。さらに、THG-1 による腫瘍形成能誘導には、リン酸化が重要であることではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では THG-1 が腫瘍形成や悪性化における役割を、リン酸化 THG-1 により制御されるシグナル経路やタンパク、および結合タンパクに注目して機能解析を中心に解明し、リン酸化 THG-1 を標的とした診断マーカー及び分子標的治療法の開発を目的として研究を行うことにした。

## 3. 研究の方法

### 細胞培養-単層培養

食道扁平上皮癌細胞株 (TE13、KYSE770、T.Tn)、HaCaT-THG-1 (WT 野生型、SA および SD 変異体) 恒常発現細胞は 10%FBS、1% Penicillin-Streptomycin 添加 DMEM 培地で維持し、THG-1 ノックダウン細胞は puromycin 添加し、THG-1 恒常発現細胞は puromycin と blasticidin を添加した培地を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> の環境下で培養した。

### 細胞培養-足場非依存的培養

癌細胞株および恒常発現細胞の足場非依存的培養 (3次元培養) は超低接着表面プレート (10cm dish、12well plate) 用いて、DMEM/F12 培地に B27、EGF、bFGF を添加し 37°C、5% CO<sub>2</sub> の環境下で培養した。

### 癌細胞スフェアからの RNA 抽出及び qPCR 解析

足場非依存的培養条件で培養したスフェアを遠心して回収した後 Trizol で溶解抽出した。一部のサンプルは RNA-seq 解析を依頼し、一部のサンプルは PrimeScript RT Master Mix を用いて cDNA を合成した。プライマーを設計の上 qPCR 解析を用いてターゲット遺伝子の mRNA の発現を解析した。

### 阻害剤評価

新規同定したリン酸化 THG-1 により制御される分子の阻害剤の効果を THG-1 恒常発現細胞を用いて検証した。検証には単層培養および足場非依存的培養条件下で行った。単層培養は阻害剤投与後 48 時間および 72 時間培養し、足場非依存的培養は阻害剤投与後 7 日間培養し、MTT assay 法を用いて評価した。

#### 4 . 研究成果

##### (1)THG-1 ノックダウン細胞の樹立および足場非依存的増殖能の評価

THG-1 発現食道扁平上皮癌細胞株 KYSE770 および T.Tn を用いて THG-1 ノックダウン細胞を樹立し、その細胞を用いて足場非依存的増殖能の評価を行った。その結果 THG-1 ノックダウン細胞はコントロール細胞に比べてスフェア形性能が低下した。リン酸化できない変異体の発現食道扁平上皮癌細胞も作成を進め、マウスを用いて腫瘍形性能の評価を検討している。

##### (2)リン酸化 THG-1 による癌シグナル変化の解析

THG-1 ノックダウン細胞および HaCaT-THG-1 (WT 野生型、SA および SD 変異体) 恒常発現細胞を用いてスフェアを形成させ、そのスフェアから RNA を抽出し RNA-seq を行った。RNA-seq の結果に基づいてリン酸化 THG-1 の発現により変化する癌シグナル経路の解析を行った。その結果いくつかの重要シグナルの変化が認められ、グルタミン代謝や p53 シグナルなどでの変化を見出した。シグナル経路でリン酸化 THG-1 で制御される分子に注目して解析を進めている。

##### (3)リン酸化 THG-1 により制御される分子の解析

RNA-seq の結果からリン酸化 THG-1 により制御されている分子を同定し、制御メカニズムの解析を行った。すでに阻害剤の開発が進んでいる分子については、その阻害剤投与に適した診断法やバイオマーカーとしての THG-1 応用可能性について検討した。またリン酸化 THG-1 特異的に結合する分子の解析を進めており、THG-1 結合ペプチドがリン酸化および分子との結合に対する影響についての解析を検討している。

##### (4)リン酸化 THG-1 により制御される分子の阻害剤評価

単層培養と足場非依存的培養条件下でリン酸化 THG-1 により制御される分子の阻害剤を投与し、MTT assay で細胞生存率について検討した。その結果、単層培養では癌細胞の増殖には影響がないが、足場非依存的培養条件下ではリン酸化できない THG-1 発現グループに比べて、リン酸化 THG-1 発現グループで有意な癌細胞増殖抑制効果があることを見出した。この結果はリン酸化 THG-1 が阻害剤投与バイオマーカーとしての応用可能性を示しており、検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yukari Okita, Ling Zheng, Kunio Kawanishi, Hirotohi Miyoshi, Kazuyoshi Yanagihara, Mitsuyasu Kato	4. 巻 -
2. 論文標題 Polyvinyl alcohol scaffolds and supplementation support 3D and sphere culturing of human cancer cell lines by reducing apoptosis and promoting cellular proliferation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to cells	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） 10.1111/gtc.12843	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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------