

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17026

研究課題名（和文）新規治療法開発を目指したSTEAP1による食道癌病態修飾機序の解析

研究課題名（英文）Analysis of pathological modification mechanism of esophageal cancer by STEAP1 for development of new treatment

研究代表者

早坂 尚貴（Hayasaka, Naotaka）

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00792665

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：食道癌におけるSTEAP1の機能を明らかにするため、食道癌細胞株を用いてsiRNAを用いたSTEAP1 Knock down(K.D.)によるviabilityへの影響をWST-1 assayを用いて検討したところ、STEAP1をK.D.すると細胞増殖が抑制されることを見出した。また、Cell cycle assayではK.D.によりG1 arrestが惹起されることを見出した。さらにK.D.前後のRNAを用いてRNA sequence解析を行い、JAK-STAT経路に変化があることを見出した。以上より、STEAP1は食道癌における細胞増殖および細胞周期との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

STEAP1は前立腺がんなど他癌腫で発現亢進していることが既に指摘されており、一部では治療標的にされるなど注目されている細胞膜蛋白である。食道癌におけるSTEAP1の役割はこれまで明らかにされていないが、我々はSTEAP1が食道癌においても発現亢進していることを見出し、今回その機能について解析を行った。細胞株を用いた検討では、STEAP1が食道癌細胞の増殖に関連していること、さらには細胞周期に関与していることを見出した。そしてRNAを用いた解析ではJAK-STAT経路に関与していることを示唆する結果も得た。これらは今後更なる食道癌の病態解析や治療戦略開発に寄与し得る知見である。

研究成果の概要（英文）：To clarify the function of STEAP1 in esophageal cancer, we investigated the effect of siRNA-based STEAP1 Knock down (K.D.) on viability using the WST-1 assay, and found that K.D. of STEAP1 suppressed cell growth. We found that K.D. of STEAP1 suppressed cell proliferation. In the cell cycle assay, we also found that K.D. induced G1 arrest. Furthermore, RNA sequence analysis using RNA before and after K.D. revealed that the JAK-STAT pathway is altered. These results suggest that STEAP1 is associated with cell proliferation and cell cycle in esophageal cancer.

研究分野：腫瘍内科

キーワード：食道癌 STEAP1 化学療法 細胞周期 JAK-STAT

1. 研究開始当初の背景

2018年のがん統計予測では、食道癌の罹患数は年間約22,400例にものぼる。さらに死亡数は年間約11,300例(がん死亡原因第10位)に達する予後不良な癌である。進行食道癌に対する治療は、局所進展度や遠隔転移の有無によって化学療法単独、化学療法に放射線または手術を組み合わせる集学的治療が行われている。切除不能進行食道癌に対する化学療法は、標準治療として5-(フルオロウラシル)FUとシスプラチン(CDDP)の併用(FP)療法の多くが行われているが、奏効率は30%前後かつ生存期間中央値は6.6~9.5ヵ月とその治療成績は不良である。したがって、進行食道癌に対する有効な治療法開発が急務である。申請者らは、食道癌治療成績の向上を目指して、切除可能進行食道癌に対する術前DNF療法の第1相試験を行い、同療法が高い奏効率を有していることを報告した(Ohnuma, Hayasaka, *Cancer Sci* 2018)。現在、同療法を切除不能進行食道癌に応用する臨床試験を準備中である。本治療は3剤併用の強力な化学療法であるため適格な患者選択基準が必須である。しかしながら、DNF療法(FP療法も含めて)の治療効果予測因子および抗癌剤耐性機序も不明である。最近、申請者らは大腸癌においてSix Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 1 (STEAP1)が転写因子であるNR-E2 related factor2 (NRF2)を介して酸化ストレス抑制を惹起し、癌細胞のアポトーシスを回避していることを明らかにした(Nakamura, Hayasaka, *Cancer Gene Therapy* 2018)。しかしながら、食道癌におけるSTEAP1に関する研究報告は皆無である。

2. 研究の目的

本研究では、STEAP1のESCCにおける病態進展、特に転移・浸潤能獲得機序を明らかにし、抗転移薬開発につなげることを第一の目的とする。さらに、STEAP1による抗癌剤耐性機序を検討し、STEAP1発現の多寡が化学療法の効果予測因子となり得るかを検証することも目的とする。

3. 研究の方法

(1) ESCCにおけるSTEAP1の発現解析；ESCCにおけるSTEAP1 mRNA発現をin silicoにて解析する。

(2) STEAP1の細胞増殖への影響の解析；STEAP1 KD細胞を用いてWST-1 assayを行い、細胞増殖への影響を解析する。(3) STEAP1 KD細胞の5-FUおよびCDDPに対する感受性の解析；STEAP1をKDしたESCC細胞株が5-FUおよびCDDPに対する感受性に变化があるか否かをWST-1 assayで検討する。

(4) STEAP1 KD細胞を用いた細胞周期解析；STEAP1をKDしたESCC細胞株を用いてcell cycle assayを行い、細胞周期に与える影響を解析する。

(5) STEAP1の食道癌apoptosisへの関与の解析；STEAP1をKDしたESCC細胞株を用いてAnnexin/7AAD assayを行い、STEAP1が食道癌の細胞死に与える影響を解析する。

(6) STEAP1 KD細胞株を用いたRNA-sequence解析を行い、KD前後で起きる変化を網羅的に解析し、STEAP1の食道癌に対する病態修飾機序の解析を行う。

4. 研究成果

(1) ESCCにおけるSTEAP1の発現解析；ESCCにおけるSTEAP1 mRNA発現をGSE23400を用いて解析した。図1に示すとおり正常食道上皮と比較してESCCではSTEAP1 mRNAが高発現していることをin silicoで明らかにした。

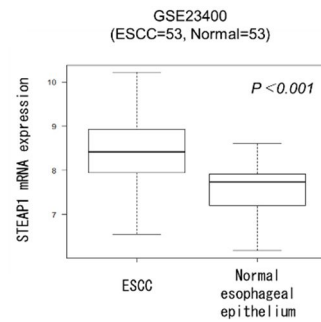
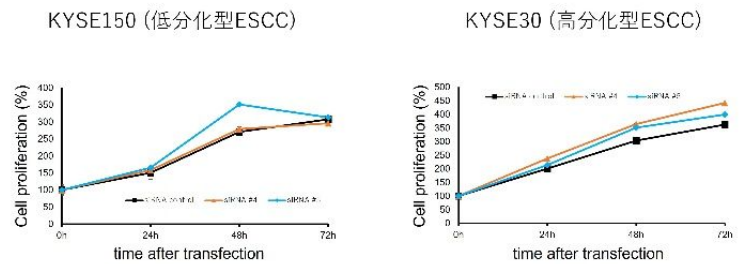


図1 STEAP1 transcript level in ESCC is higher than in normal esophageal epithelium.

(2) STEAP1 の細胞増殖への影響の解析；STEAP1 KD 細胞を用いて WST-1 assay を行い、細胞増殖への影響を解析した。STEAP1 KD 前後で細胞の増殖に大きな変化はみられなかった(図 2)。

図2



(3) STEAP1 KO 細胞の 5-FU および CDDP に対する感受性の解析；STEAP1 を KD した ESCC 細胞株が 5-FU および CDDP に対する感受性に变化があるか否かを WST-1 assay で検討した。いずれの薬剤も STEAP1 KD 前後で薬剤感受性に大きな差はみられず、STEAP1 は薬剤感受性に関与していないことが示唆された(図 3-1、3-2)。

図3-1

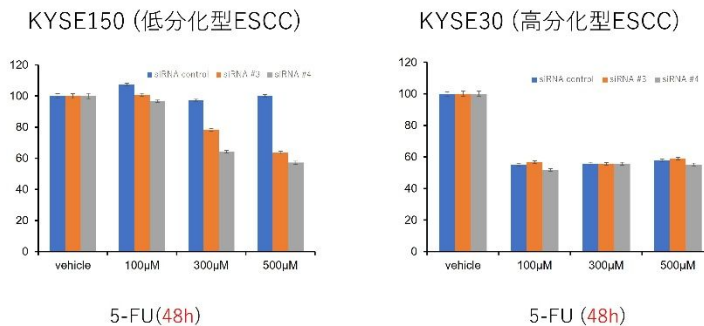
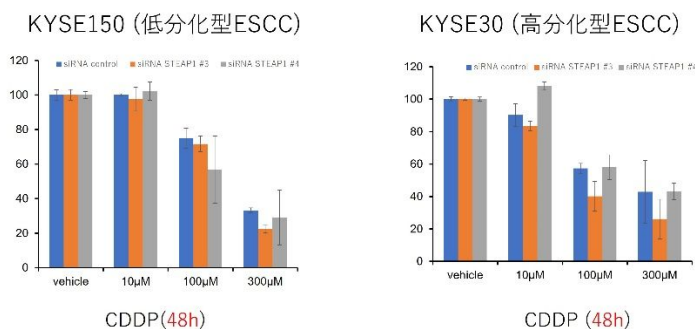
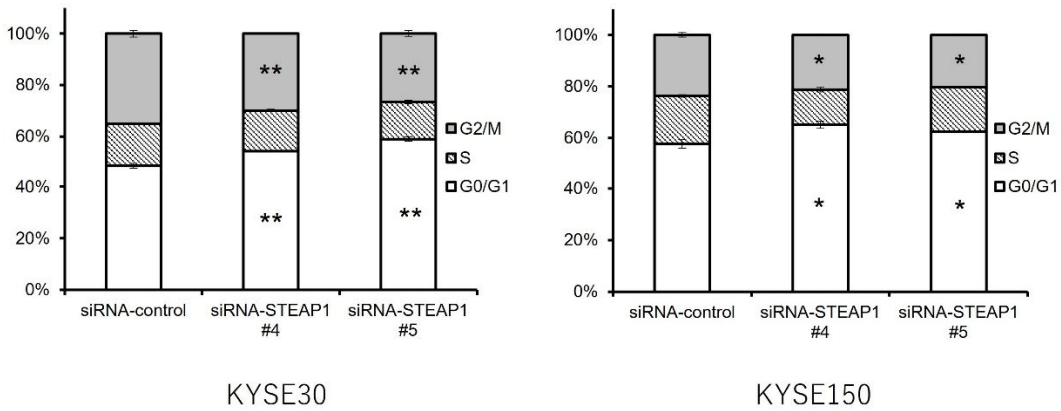


図3-2



(4) STEAP1 をKDしたESCC細胞株を用いてcell cycle assayを行い、細胞周期に与える影響を解析した。図4に示す通り、STEAP1 KDによってG1 arrestが誘導された。

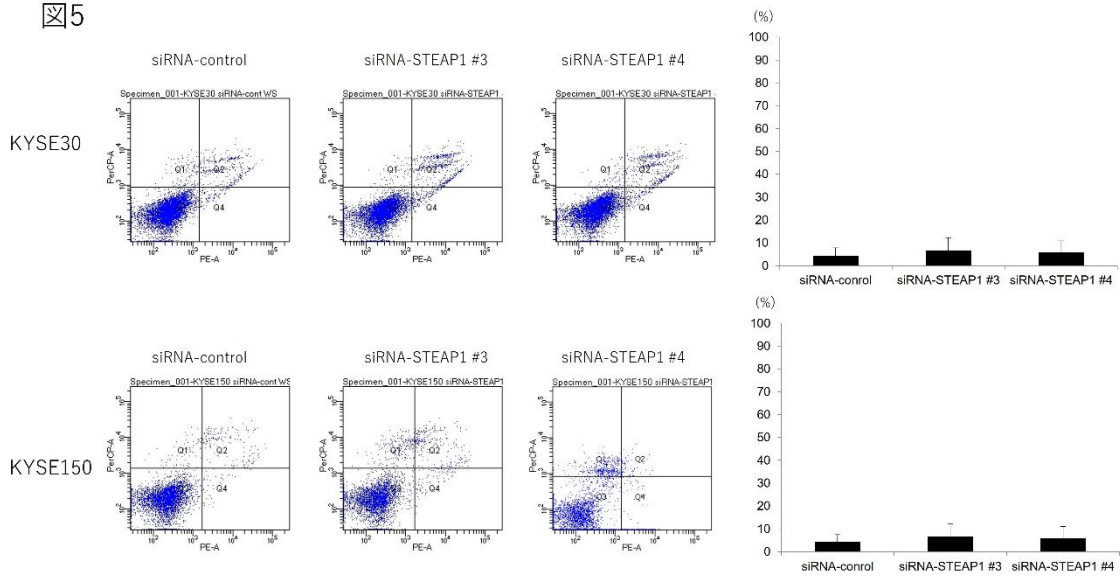
図4



T test
 ** : p<0.01
 * : p<0.05

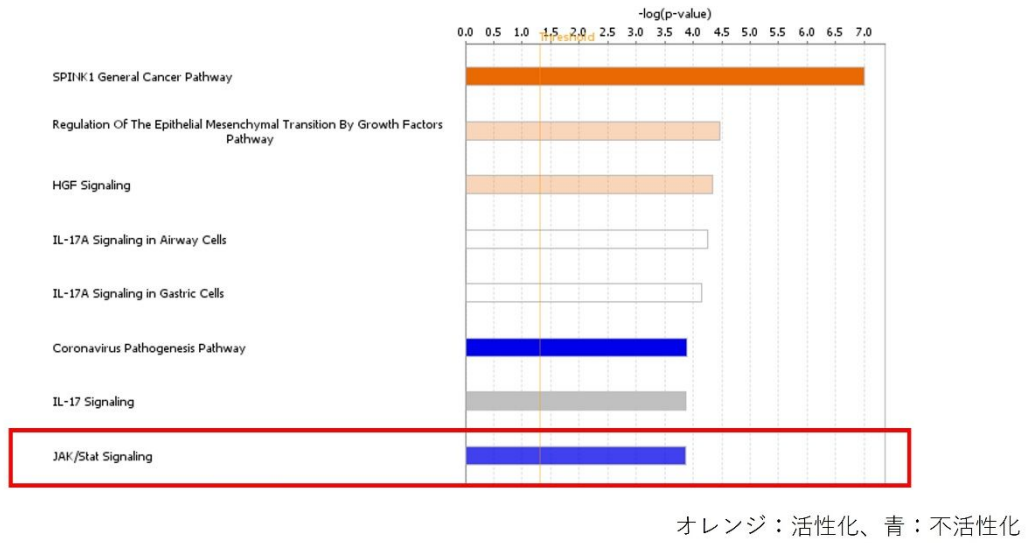
(5) *STEAP1* をKDしたESCC細胞株を用いてAnnexin/7AAD assayを行い、*STEAP1* が食道癌の細胞死に与える影響を解析した。KDによってapoptosisは誘導されず、細胞死には関与していないことが示唆された(図5)。

図5



(6) *STEAP1* KD細胞株を用いたRNA-sequence解析を行い、KD前後で起きる変化を網羅的に解析し、*STEAP1*の食道癌に対する病態修飾機序の解析を行ったところ、JAK-STAT pathwayが不活性化されていることを見出した。

図6



以上より、STEAP1 は食道癌において細胞周期、特に G1 arrest に関与しており、JAK-STAT 経路の活性化に関与している可能性があり、これらは食道癌の新たな治療標的となり得る知見である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------