

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07971

研究課題名（和文）癌促進型分岐点の制御に着目した新規食道癌治療の分子基盤

研究課題名（英文）Development of a novel esophageal cancer treatment focusing on controlling cancer-promoting branch points

研究代表者

増田 清士（Masuda, Kiyoshi）

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00457318

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）：食道扁平上皮癌（ESCC）でTIA1遺伝子のスプライシング制御機構とTIA1aのリン酸化制御因子に着目した。複数のリン酸化キナーゼを予測し、TIA1aの細胞内局在を制御するキナーゼ（kinase2）を同定した。また、TIA1a型スプライシングを誘導する因子（SF-X）を同定した。同定した因子に対する特異的 siRNAや阻害剤はESCC細胞の増殖を抑制した。RNA-seqデータ解析から、ESCC組織でTIA1a、kinase2、SF-X量が増加していること、TIA1a量とkinase2量、SF-X量に正の相関があることが確認された。以上から、これらはESCCの新たな治療標的となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RBPは正常細胞でも様々な生理機能を担っており、発現量制御に着目した従来の治療戦略では重大な副作用が予測される。本研究の成果をモデルに、RBPが癌細胞の悪性形質獲得のために必要な機能モジュール群のみを調節する分子機構の全貌を解明し、これを可逆的にON/OFFすることでこの機能モジュール全体を特異的に調節できれば、有効な分子標的治療薬の少ないESCCにおいて、腫瘍や特定の悪性形質に選択性が高い治療法開発が可能になる。

研究成果の概要（英文）：We focused on the alternative splicing control mechanism of the TIA1 gene and the phosphorylation regulators of TIA1a during the pathogenesis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). We predicted multiple phosphorylation kinases based on the amino acid sequence of TIA1a and identified a kinase (kinase2: lab name) that controls the intracellular localization of TIA1a. In addition, a splicing factor (SF-X: lab name) that could induce TIA1a-type splicing was identified by knockdown experiments. Specific siRNAs and inhibitors against these identified factors significantly suppressed the cell growth of ESCC cells. RNA-seq data analysis confirmed that TIA1a, kinase2, and SF-X expression levels increased dramatically in ESCC tissues compared to normal tissues. Moreover, there was a positive correlation between TIA1a levels, kinase2 levels, and SF-X levels. These results suggest that the identified factors could be novel therapeutic targets for ESCC.

研究分野：RNA生物学

キーワード：RNA結合蛋白質 食道扁平上皮癌 転写後調節機構

1. 研究開始当初の背景

RNA 結合蛋白 (RBP) ファミリー遺伝子は、機能的に関連のある因子 (mRNA、miRNA) と複合体 (RNP) を形成し、mRNA の転写から翻訳に至るまでの様々な品質管理や発現制御 (転写後調節機構) の中心的役割を担っている。近年、その機能異常が癌を含む様々な疾患の病態形成に関与することが明らかとなった (Wurth Lら、Biochim Biophys Acta 2015) が、多くの RBP は正常細胞でも多彩な生理機能を担うことから分子標的となり得なかった。申請者らは、これまで non-coding RNA や RBP による転写後調節機構に着目し、「癌特異的な遺伝子発現制御機構」に関する研究を行ってきた (PLoS Med. 2008、EMBO J. 2011、Oncogene 2013、Oncotarget 2017 など)。この研究過程で、T-cell intracellular antigen-1 (TIA1) の exon 5 でコードされる 11 アミノ酸 (ヒンジ領域) を含む TIA1a isoform が、食道扁平上皮癌 (ESCC) の発生と進行に伴い発現・局在に変化を生じ、癌促進的に働くことを見いだした。TIA1 はこれまで細胞障害時にアポトーシスを誘導する癌抑制遺伝子として考えられており、実際 exon 5 を欠く TIA1b isoform の強制発現が細胞死を誘導する細胞株もある。また TIA1a 特異的なヒンジ領域には既知の核外・核内輸送シグナルなどの特定のモチーフはないが、蛋白質構造や機能を調節する disordered sequence (Calabretta ら、Trends Biochem Sci. 2015) が内在することから、TIA1a が未知の分岐点として機能することが予測される。このことから申請者は、TIA1a は ESCC 細胞の悪性化に伴って、選択的スプライシング異常によって発現が亢進し、癌特異的なヒンジ領域のリン酸化修飾を介した局在調節の変化によって細胞質に分布することで、癌特異的パートナー分子と集合体を形成し病態特異的な機能モジュール内の癌関連分子群に対する転写後調節機能を発揮する癌促進型分岐点であり、癌細胞に特異的な機能を制御できれば有望な癌治療標的となり得るといふ仮説を想起した。

2. 研究の目的

本研究では、ESCC の病態形成過程において TIA1a が受ける分子修飾とその修飾因子、その結果として起こる細胞内局在変化の機序、細胞質内で集合体を作るパートナー分子群とその調節標的となる mRNA や機能モジュール群、さらに各機能モジュールと表現型との関連を検討することで、TIA1a の癌文脈における生物学的意義を包括的に解明するとともに、各制御レベルを分子標的とした場合の ESCC 細胞や非癌細胞への影響を比較検討し、TIA1a が鍵となる癌促進型分岐点の制御による ESCC 治療法開発を目指す。RBP は正常細胞でも様々な生理機能を担っており、発現量制御に着目した従来の治療戦略では重大な副作用が予測される。本研究の成果をモデルに、RBP が癌細胞の悪性形質獲得のために必要な機能モジュール群のみを調節する分子機構の全貌を解明し、これを可逆的に ON/OFF することでこの機能モジュール全体を特異的に調節できれば、有効な分子標的治療薬の少ない ESCC において、腫瘍や特定の悪性形質に選択性が高い治療法開発が可能になる。

3. 研究の方法

(1) TIA1a の癌特異的発現・機能を制御する分子マップの完成

① TIA1 遺伝子の選択的スプライシング制御機構を明らかにする。TIA1 遺伝子の exon 5 領域を含む cDNA をテンプレートとして、BrUTP で標識した RNA を in vitro 合成し、抗 BrdU 抗体を用いて BrU-RNA-RBP 複合体を回収する。回収した RNP 複合体を SDS-PAGE で分離・展開後、質量分析を行い、TIA1 遺伝子の選択的スプライシングを制御する RBP 候補リストを作成する。さらに候補 RBP 群のノックダウンや強制発現系で、スプライシングパターンの解析をミニジーンで行い、TIA1 遺伝子の選択的スプライシングを制御する複合体の特定とその結合 DNA 領域を明らかにする。

② TIA1 のヒンジ領域の有無により ESCC で細胞内局在が変化する機序を解明する。ヒンジ領域にのみ蛋白質構造や機能を調節する disordered sequence が内在すること、ヒンジ領域の Ser/Thr を全てアラニンに改変した変異型 TIA1a は核のみに局在し細胞増殖を抑制することから、申請者は Ser/Thr のリン酸化状態が局在調節複合体により認識されることで局在に変化が生じ、細胞増殖能が誘導されると予測している。ヒンジ領域のアミノ酸配列から予測されるキナーゼリストを作成し、特異的阻害剤や CRISPR-Cas9 sgRNA ライブラリーを用いた検証で、局在調節キナーゼの同定を行う。また、クロスリンクと Halo Tag システムを組み合わせた高感度プルダウン法を行い、質量分析で細胞内局在調節複合体蛋白質を同定する。これまでの検討から複数のリン酸化キナーゼ候補ならびに、TIA1a と相互作用する RBP 群を同定しており、これらが TIA1a の細胞内局在と ESCC 細胞の悪性形質化に与える影響について解析をすすめている。

③ ①、②の結果とこれまでの検討で作成した TIA1a が関わる RNP 内分子プロファイルを統合し、TIA1a の機能制御に関わる分子マップを完成する。

(2) TIA1a の機能制御点の同定と特異的な介入法の決定

(1)の結果から TIA1a の癌促進機能を制御する候補点を絞り込み、有効な介入法を検討する。介入法の検索は、TIA1a 安定強発現細胞株を用いた TIA1a の細胞内局在解析または細胞増殖能解

析を用いる。エクソンスキップ、特異的 siRNA、キナーゼ阻害、相互作用する mRNA の作用部位修飾、機能モジュールのハブとなる因子の阻害に加え、ヒンジ領域配列を含む合成ペプチドによる細胞内局在調節性相互作用因子の阻害やスポンジ因子による TIA1a トラップを介入法の候補とした。

(3) 介入法の臨床意義、有効性の検証と副作用予測

(1)、(2)で得られた結果について ESCC 臨床検体を用いた免疫組織染色、リアルタイム PCR、次世代シーケンス解析で、TIA1a と標的分子候補の発現量や分布、変異の有無の相関を調べ、機能モジュールのアウトプット指標である臨床病理学的因子との関連を検討する。また、介入前後の遺伝子パターンを RNA-seq で網羅的に解析し、各機能モジュールの活性化状態を比較することで、TIA1a を標的とした場合の標的モジュールへの影響が予測できることから、治療効果や副作用を予測できると考えられる。また、検討した ESCC 臨床検体での各機能モジュールの活性化状態を模倣する細胞株をモデルとして用い、TIA1a 作用の転換や抑制、あるいはそれらと他の分子標的薬剤との併用効果を検討する。

4. 研究成果

(1) TIA1a と相互作用する因子の同定

クロスリンクと FLAG-Tag システムを組み合わせた高感度プルダウン法を行い、質量分析で細胞内局在調節複合体蛋白質の同定を試みた。結果、TIA1a は選択的スプライシング制御因子、RNA の品質管理や発現調節因子と複合体を形成することが明らかとなった。一方、先行研究で明らかにしたリン酸化キナーゼ候補群は検出することができなかった。

(2) TIA1 のヒンジ領域の有無により ESCC で細胞内局在が変化する機序の解明

まず TIA1a 蛋白質の細胞内局在が重要であるとの仮説の元、検討を行った。TIA1a または TIA1b 蛋白質に核移行シグナルを付加したコンストラクトを作成し、食道癌細胞株に遺伝子導入した。結果、核移行型 TIA1a 蛋白質を発現した細胞はコントロール細胞に比べて細胞増殖が抑制された。また、TIA1 の標的 mRNA として報告している SKP2 および CCNA2 蛋白質の発現量が有意に抑制された。一方、野生型 TIA1b は主に核内に発現しており、核移行型 TIA1b を遺伝子導入しても細胞の形質に変化は見られなかった。以上から、TIA1 アイソフォームの細胞内機能の違いは、細胞内局在の違いに由来すると考えられた。

① ヒンジ領域に内在するリン酸化部位の特定

これまでの研究成果から、ヒンジ領域内の Ser/Thr を全てアラニンに改変した変異型 TIA1a は核のみに局在し細胞増殖を抑制することを見出している。複数のリン酸化予測プログラムによってアミノ酸領域の絞り込み (4 候補) を行い、各々のアミノ酸をアラニンに改変した変異型 TIA1a 発現プラスミドを作成した。結果、これらの変異型 TIA1a のうち、特定のアミノ酸を改変した変異体でのみ、核への局在や細胞増殖抑制効果が確認された (Figure 1a)。また、同アミノ酸をアスパラギン酸に改変した変異体 TIA1a はより細胞質へ移行した。

② ヒンジ領域をリン酸化するキナーゼの同定

①で同定したリン酸化部位を含む領域のアミノ酸配列をもとに、4 種類のリン酸化キナーゼ (kinase1、kinase2、kinase3、kinase4: 研究室名) を予測した。まず特異的 siRNA を用いてノックダウン実験を行い、TIA1a の細胞内局在について検討した。結果、kinase2 および kinase3 でのみ、TIA1a の核移行が確認できた (Figure 1b)。また、特異的阻害剤を用いて同様の検討を行った結果、

kinase2 を阻害したときのみ、TIA1a の核移行を確認した。以上のことから、kinase2 が介入点

Figure 1.

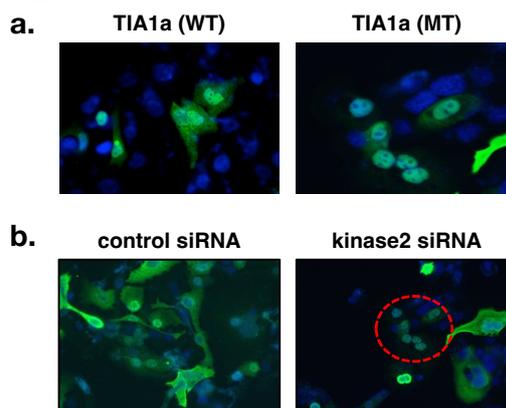
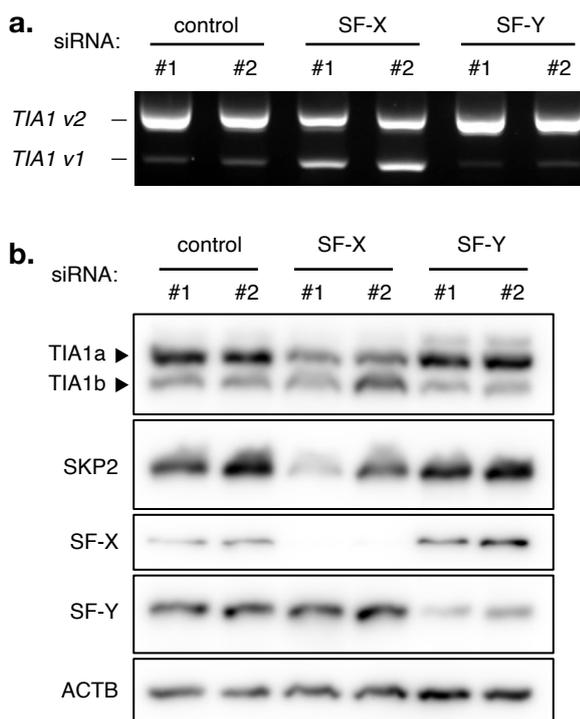


Figure 2.



kinase2 を阻害したときのみ、TIA1a の核移行を確認した。以上のことから、kinase2 が介入点

候補として有用である可能性が示唆された。

(3) TIA1 遺伝子の選択的スプライシング制御機構の解明

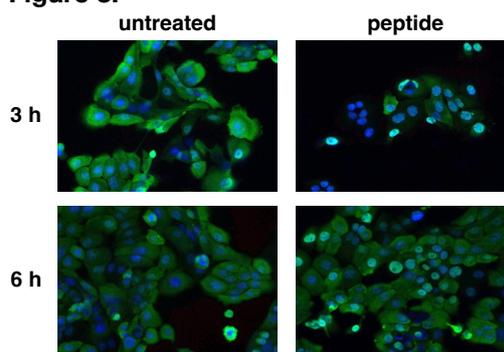
TIA1 遺伝子の exon 5 領域を含む cDNA をテンプレートとして、BrUTP で標識した RNA を *in vitro* 合成し、抗 BrdU 抗体を用いて BrU-RNA-RBP 複合体を回収し、TIA1a の発現量を制御する因子の同定を試みた。しかし、銀染色で質量分析に資する候補バンドの同定には至らなかった。

次に、これまで癌の発生や進展に関与すると報告のあるスプライシング制御因子をリスト化し、このうち 6 因子に着目した。siRNA を用いて各々をノックダウンした細胞で TIA1a と TIA1b の発現量を qPCR およびウェスタンブロット法を用いて検討した。この結果、SF-X (研究室名) をノックダウンした細胞は TIA1a mRNA 量が減少し、TIA1b mRNA 量が増加した (Figure 2a 中央)。一方、SF-Y (研究室名) をノックダウンした細胞は、TIA1a mRNA 量が増加し、TIA1b mRNA 量が減少した (Figure 2a 右)。TIA1 遺伝子の exon 5 領域を含むミニジーンで検討した結果、SF-X ノックダウン細胞で TIA1a 型スプライシングが、SF-Y ノックダウン細胞で TIA1b 型スプライシングが確認されたことから、SF-X および SF-Y は TIA1 遺伝子の選択的スプライシングを制御する因子であると示唆された。

SF-X ノックダウン細胞は TIA1a の標的である SKP2 蛋白質量が減少した。一方 SF-Y ノックダウン細胞は予想に反して SKP2 蛋白質量の増加を確認できなかった (Figure 2b)。

SF-X 特異的抗体を用いた免疫沈降ならびにビオチンで標識した TIA1 pre-mRNA プローブを用いたビオチンプルダウンから、核内で SF-X 蛋白質と TIA1 pre-mRNA との結合が確認された。以上の結果から、SF-X は TIA1a を中心とした癌促進機能のハブ因子 (スプライシング制御因子) であると考えられた。

Figure 3.



(4) TIA1a の機能制御点の同定と特異的な介入法の決定

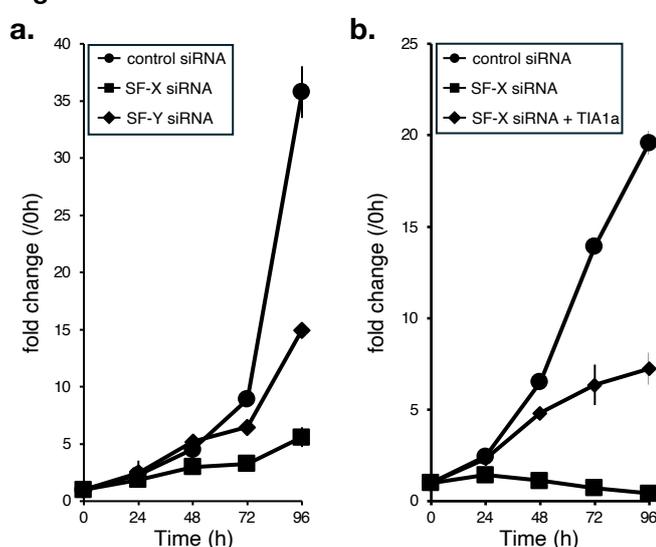
① キナーゼに着目した介入方法の検討

kinase2 特異的 siRNA でノックダウンした結果、ESCC 細胞の増殖が有意に抑制され、アポトーシスが誘導された。次に TIA1a に内在するリン酸化部位を含む低分子ペプチドを設計し、TIA1a の細胞内局在に与える影響について検討を行った。結果、低分子ペプチドで処理した細胞では、TIA1a は細胞質から核に移行した (Figure 3)。以上から、kinase2 は特異的介入候補として有用であると判断した。

② スプライシング調節因子に着目した介入方法

SF-X および SF-Y 特異的 siRNA を用いて検討を行った。SF-X をノックダウンした細胞は、細胞増殖が有意に抑制された (Figure 4a)。一方、SF-Y をノックダウンした細胞は、予想に反して細胞増殖の亢進が確認できなかった (Figure 4a)。また、SF-X ノックダウン細胞に TIA1a を遺伝子導入した結果、SF-X ノックダウンによる細胞増殖抑制が一部であるが解除された (Figure 4b)。また、スフェロイド培養法で SF-X ノックダウン細胞はスフェロイド形成がみられなかったが、SF-Y ノックダウン細胞はスフェロイド形成がみられるものの、コントロール細胞と比較して変化がなかった。以上から、SF-X は特異的介入点として有用であると考えた。

Figure 4.



(5) 介入法の臨床意義、有効性の検証と副作用予測

① TIA1a のリン酸化制御

kinase2 に対する特異的 siRNA および特異的阻害剤により、TIA1a の細胞内局在が変化するとともに、細胞増殖が抑制されることが明らかとなった (Figure 1b)。しかしながら、

kinase2 は DNA 修復経路ならびに正常細胞の増殖に必須の役割を果たしていることから重大な副作用が予想され、siRNA やゲノム編集を応用した発現量調節による介入法ならびに

kinase2 の機能を広範囲に阻害する介入法は適当でないと判断した。そこで TIA1a を中心とした癌促進機能を特異的に阻害する方法として、低分子ペプチドに着目した。上述のように、TIA1a に内在するリン酸化部位を含む低分子ペプチドを投与することによって、TIA1a の細胞内

局在を変化させることが可能となった (Figure 3)。しかしながら、現状では高濃度かつ短時間の効果しか確認できず (Figure 3)、適切なペプチド配列の検討が必要である。

② TIA1a の選択的スプライシング制御

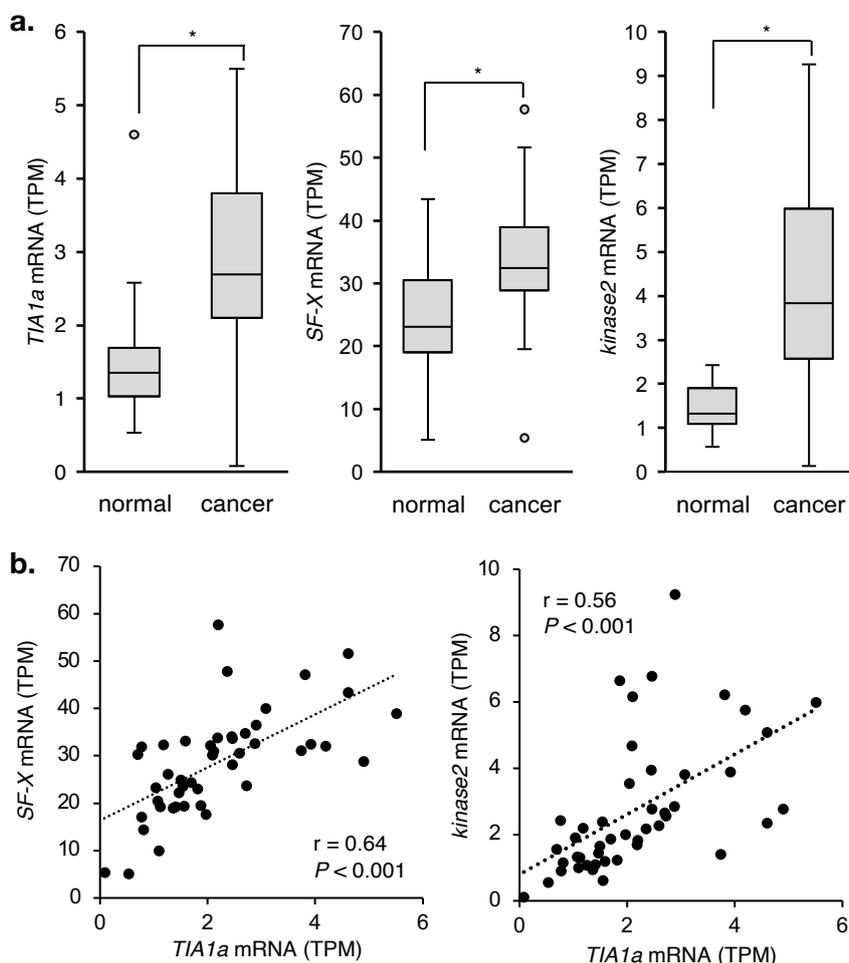
SF-X 特異的 siRNA により、細胞増殖が有意に抑制されることが明らかとなった (Figure 4a)。この細胞増殖抑制は強力であり、大半の細胞にアポトーシスを誘導することが可能であった。しかしながら、SF-X はがん細胞の増殖だけでなく、正常細胞の分化や増殖に必須の因子であるとの報告があり、siRNA やゲノム編集を応用した発現量調節による介入法はがん細胞に対する選択性が低いことが予想される。このことから、SF-X の結合領域を含む短鎖 RNA 分子を発現するプラスミドを作成し、短鎖 RNA 分子を TIA1a 蛋白質に対するスポンジ分子としてアプローチする方法を検討した。しかしながら、今回検討したプラスミドでは細胞内に充分量の RNA 分子を発現させることができず、TIA1 遺伝子のスプライシングパターンを変更することができなかつた。今後、短鎖 RNA 分子配列の最適化やオリゴヌクレオチドを用いたエクソスキップについて検討を進めて行く予定としている。

③ 介入法の臨床意義

公共データベースに収載されている RNA-seq データ (正常食道組織 13 例、食道扁平上皮癌組織 13 例) を再解析し、SF-X、kinase2 および TIA1a 発現量について検討した。結果、いずれも癌組織で有意に発現が上昇していた (Figure 5a)。また、kinase2 量と TIA1a 量 ($r=0.56$, $p<0.001$) ならびに SF-X 量と TIA1a 量 ($r=0.64$, $p<0.001$) には有意に正の相関があった

(Figure 5b)。このことから、本研究で明らかとなった癌促進機構ならびにこれに対する特異的介入法は臨床意義のあると示唆される。現在、症例を追加して検討を行っている。

Figure 5.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shoda Katsutoshi, Kuwano Yuki, Ichikawa Daisuke, Masuda Kiyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 circRNA: A New Biomarker and Therapeutic Target for Esophageal Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1643 ~ 1643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10071643	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 -

1. 著者名 Imoto Issei, Saito Masako, Suga Kenichi, Kohmoto Tomohiro, Otsu Masanobu, Horiuchi Keisuke, Nakayama Hironao, Higashiyama Shigeki, Sugimoto Mayumi, Sasaki Ayumi, Homma Yukako, Shono Miki, Nakagawa Ryuji, Hayabuchi Yasunobu, Tange Shoichiro, Kagami Shoji, Masuda Kiyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Functionally confirmed compound heterozygous ADAM17 missense loss-of-function variants cause neonatal inflammatory skin and bowel disease 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-89063-0	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 -

1. 著者名 Takaki Wataru, Konishi Hirotaka, Shoda Katsutoshi, Arita Tomohiro, Kataoka Satoshi, Shibamoto Jun, Furuke Hirotaka, Takabatake Kazuya, Shimizu Hiroki, Komatsu Shuhei, Shiozaki Atsushi, Fujiwara Hitoshi, Masuda Kiyoshi, Otsuji Eigo	4. 巻 28
2. 論文標題 Significance of Circular FAT1 as a Prognostic Factor and Tumor Suppressor for Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 8508 ~ 8518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-021-10089-9	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
---------	---------