

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790374

研究課題名（和文） 重層扁平上皮の増殖、分化、がん化における THG-1 の役割

研究課題名（英文） Roles of THG-1 on cellular proliferation, differentiation and tumorigenesis

研究代表者

鈴木 裕之（SUZUKI HIROYUKI）

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：70375509

研究成果の概要（和文）：

我々は Tsc-22 ファミリータンパク質の一つである THG-1 (Tsc22D4) の機能を解析する過程で、THG-1 が皮膚、食道などの重層扁平上皮の基底細胞に特異的に発現することを見出した。基底細胞には幹細胞が存在しがん化と密接に関わっていることから、食道、肺がんの組織アレイを用いて、THG-1 の発現について検討したところ、食道、肺の扁平上皮がん THG-1 が高発現することを見出した。そこで皮膚角化細胞株に THG-1 を発現させたところ、EGF による細胞形態の変化、及び増殖、運動性が亢進することが認められた。さらにコラーゲンゲル上で表皮構造を構築させたところ、THG-1 発現細胞では有棘層や顆粒層への分化が抑制されることを見出した。また食道がん細胞株において THG-1 遺伝子の塩基配列を検討したところ、一部の食道がん細胞株においてアミノ酸置換を伴う変異が存在することが明らかになった。さらにその変異体は、EGF による増殖促進能が正常型に比べて亢進することを見出した。以上より THG-1 は、扁平上皮がんの新規がん遺伝子として機能することが示唆された。今後も THG-1 の重層扁平上皮の増殖、分化、がん化における役割を明らかにし、さらに新規がんの診断法の開発、及び THG-1 が制御する経路を標的にした新規治療法の開発に結びつけていきたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：

THG-1 / Tsc22D4 belongs to Tsc-22 family members. However, biological and physiological roles of THG-1 remain unclear. We found that THG-1 is localized in basal layer of normal squamous epithelium, and overexpressed in squamous cell carcinomas. Knockdown of THG-1 in tumor cells suppresses cell proliferation, invasiveness and tumorigenicity. Moreover, overexpression of THG-1 suppresses the differentiation in squamous epithelium formation. We also found that THG-1 is phosphorylated by Ras-ERK pathway, which is required for the promotion of cellular proliferation by EGF and Ras-mediated tumorigenesis. Furthermore, we found an oncogenic mutation of THG-1 in tumors. These findings highlight the importance of THG-1 as a novel oncogene of squamous cell carcinomas.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：扁平上皮がん、THG-1、EGF

1. 研究開始当初の背景

皮膚や食道は重層化した上皮細胞によって微生物感染、物理的刺激や水分の喪失から組織を防御する重要な役割を果たしている。そしてその構成細胞は常に更新され、絶妙なバランスで一定の細胞数を維持することで組織の恒常性が保たれている。構成細胞は基底部に存在する幹細胞が非対称分裂を行うことで供給され、それらが有棘層、顆粒層に移動するに伴い増殖を止めて分化する。そして角質層で最終分化を行い、細胞は死んで垢として剥がれおちる。しかしながらこのような重層扁平上皮の構築が、どのような機構で行われているのかは不明な点が多い。また重層扁平上皮を主な起源とする扁平上皮がんは、食道、皮膚、肺、頭頸部などに認められ、腺がんに近いで多いがんである。近年がんの発生には、その組織幹細胞に変異が蓄積することで、がん幹細胞が発生することが重要であると考えられており、組織構築機構の解明とともに注目されている。

2. 研究の目的

重層扁平上皮は皮膚や食道にみられる組織構造である。その構成細胞は基底部に存在する幹細胞から供給され、それらが増殖、重層化、分化という複雑な過程を経て形成されるが、その詳しい形成機構については不明な点が多い。また重層扁平上皮を主な起源とする扁平上皮がんは、食道、皮膚、肺などに発生する予後不良のがんである。我々は THG-1 という分子が正常皮膚、食道の基底細胞特異的に発現することを見出した。さらに THG-1 は食道、肺の扁平上皮がんを高発現し、さらに食道がん細胞株で THG-1 の変異を見出している。本研究では重層扁平上皮の増殖、分化、及びがん化における THG-1 の役割を明らかにし、がんの診断・治療への応用を目指す。

3. 研究の方法

【細胞培養】

ヒト胎児腎細胞株 293T、ヒト角化細胞株 HaCaT は 10%FBS、penicillin streptomycin solution を添加した DMEM を用いて 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

【遺伝子導入】

HaCaT-THG-1 安定発現株は、HaCaT 細胞に pCAGIP-FLAG-THG-1 を導入し、導入細胞を 1 µg/ml の puromycin で選択した。増殖したコロニーをクローニングし、抗 FLAG 抗体を用いて発現細胞を選択した。TE13 THG-1 ノックダウン細胞は pSUPER-shTHG-1 を導入し、導

入細胞を 1 µg/ml の puromycin で選択した。増殖したコロニーをクローニングし、抗 THG-1 抗体を用いて発現細胞を選択した。

【細胞増殖曲線】

THG-1 安定発現株、を 12 well plate に 1x10⁴ cells/well の密度で撒き、その後血球計算盤を用いて 6 日目まで 1 日おきに細胞数をカウントし、細胞増殖曲線を得た。

【Scratch assay】

HaCaT 細胞、TE13 THG-1 ノックダウン細胞をそれぞれ 6 cm dish に撒き、コンプレントになるまで培養し、0.1% FBS/DMEM 培地に交換した。翌日 1000 ml 用チップで直線的に細胞を削り取り、48 時間インキュベートした。3.7% formaldehyde/PBS で 10 分間固定した後に写真撮影を行った。TGF-β と EGF はスクラッチする前に 2.5 ng/ml、100 ng/ml の濃度で刺激した。

【蛍光免疫染色法】

カバーガラスを入れた 6well dish に、細胞を 2×10⁴ cells で撒き、24 時間培養した。Dish から細胞培養液を除去し、PBS で洗浄した後、3.7% formaldehyde/PBS で 10 分間固定した。PBS で 10 分、3 回洗浄後、1% BSA in 0.3% Triton X-100/PBS で 25 分間ブロッキングし、1 次抗体を室温で 1 時間反応させた。その後、PBS で 5 分、4 回洗浄後、2 次抗体を室温で 1 時間反応させた。反応後、PBS で 5 分、4 回洗浄後、蒸留水で 2 回洗浄し、封入剤を用いてスライドガラス上に封入した。

【免疫不全マウスでの腫瘍形成能の解析】

2×10⁷ の TE13 細胞を、マトリゲルに混ぜ込み NOD-Scid マウスに移植した、移植 2 ヶ月後に腫瘍を回収し、大きさ、重さを測定した。さらにパラフィン切片を作製して、抗 THG-1 抗体で免疫染色を行った。

4. 研究成果

【THG-1 の組織分布解析】

Tsc-22 ファミリータンパク質の一つである THG-1 の特異的抗体を用いて、THG-1 の組織分布について検討した。その結果、THG-1 は皮膚、食道などの重層扁平上皮の基底細胞特異的に発現することを見出した。基底細胞には幹細胞が存在しがん化と密接に関わっていることから、食道、肺がんの組織アレイを用いて、THG-1 の発現について検討したところ、食道、肺の扁平上皮がんは THG-1 が高発現することを見出した。さらに THG-1 の発現は細胞膜や細胞質に認められた。

【THG-1の細胞増殖・分化への影響】

次にヒト角化細胞株 HaCaT に THG-1 を発現させたところ、上皮増殖因子 EGF による細胞形態の変化、及び増殖、運動性が亢進することが認められた。さらにコラーゲンゲル上で表皮構造を 3 次元的に構築させたところ、THG-1 発現細胞では細胞の分化が抑制され、細胞増殖が亢進していることが明らかになった。以上のことから THG-1 は EGF による細胞増殖を亢進し、細胞分化は抑制する働きを持つことが明らかになった。

【THG-1のEGFシグナルによるリン酸化】

THG-1 の EGF シグナルに与える影響について検討するため、THG-1 発現細胞での EGF 下流シグナル伝達 (ERK、Akt のリン酸化、c-Myc、JunB の発現) について検討した。しかしながら、THG-1 発現細胞ではこれらシグナル伝達にはコントロールに比べて顕著な差は認められなかった。しかしながらウェスタンブロットにより、THG-1 は EGF 処理により高分子両側にそのバンドがシフトすることが明らかになった。このバンドシフトは phosphatase 処理によって消失したことから、THG-1 は EGF 処理によりリン酸化されることが明らかになった。さらに THG-1 のリン酸化を誘導する EGF シグナル伝達について検討したところ、THG-1 は Ras-Raf-MEK-ERK 経路でリン酸化されることが明らかになった。

【THG-1のEGFによる細胞内局在】

HaCaT-THG-1 細胞で、EGF の存在下における THG-1 の細胞内局在について検討した。THG-1 は EGF 非存在下では細胞質に局在するが、EGF 処理 5 分後に、その局在はラフリングを起こした細胞膜への局在変化が認められた。このことから THG-1 は細胞質またはラフリング膜で機能することが示唆された。

【THG-1の腫瘍形成への影響】

食道がん細胞株 TE13 細胞において THG-1 ノックダウン株を樹立した。そしてその細胞増殖、遊走、浸潤能について検討したところ、THG-1 ノックダウン細胞では、いずれも低下していることが明らかになった。さらにこの細胞を NOD-Scid マウスに移植してその腫瘍形成能について検討したところ、THG-1 ノックダウン細胞では腫瘍形成能が低下することが明らかになった。

以上より THG-1 は、扁平上皮がんの新規がん遺伝子として機能することが示唆された。今後、THG-1 の重層扁平上皮の増殖、分化、がん化における役割を明らかにし、さらに新規がんの診断法の開発、及び THG-1 が制御する経路を標的にした新規治療法の開発に結びつけていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Kaneko MK, Tian W, Takano S, Suzuki H, Sawa Y, Hozumi Y, Goto K, Yamazaki K, Kitanaka C, Kato Y.

Establishment of a novel monoclonal antibody SMab-1 specific for IDH1-R132S mutation. *Biochem Biophys Res Commun.* 406: 608-13, 2011 (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1) Suzuki H and Kato M

Roles of Tsc-22 family members in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis

70th Annual meeting of the Japanese Cancer Association Oct 4, Nagoya, 2011

2) Okita Y, Suzuki H and Kato M

MafK induces EMT and promotes tumorigenic activities FASEB Summer Research Conferences Aug 24, Pisa, Italy, 2011

3) Okita Y, Suzuki H and Kato M

A novel EMT inducer MafK promotes tumorigenicity

TGF- β meeting Aug 18, Uppsala, Sweden 2011

4) Ito Y Suzuki H and Kato M

THG-1 の腫瘍形成促進作用

30th Molecular pathology meeting. July 22, Okayama 2011

5) Inada H Aoyama C Suzuki H and Kato M

3 次元再構築による大腸腺腫発生機序の解析

30th Molecular pathology meeting. July 22, Okayama 2011

6) Suzuki H Nakano A Harada T and Kato M

Regulation of cellular proliferation by transforming growth factor- β stimulated clone 22

99th Annual meeting of the Japanese Society of Pathology Apr 29, Tokyo 2011

7) Inada H Aoyama C Suzuki H and Kato M

3 次元再構築による大腸腺腫発生機序の解析

99th Annual meeting of the Japanese Society of Pathology Apr 30, Tokyo 2011

8) Suzuki H Nakayama. Y and Kato M
Roles of THG-1/Tsc22D4 on cell
proliferation, differentiation and
tumorigenesis
平成 22 年度「個体レベルでのがん研究支
援活動」ワークショップ 2011 年 2 月 3 日、
大津

9) Suzuki H Nakano A and Kato M
Tsc-22 inhibits cellular proliferation
through regulation of c-Myc and Oct4
69th Annual meeting of the Japanese
Cancer Association Sep 24, Osaka, 2010

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/younginit/suzuki/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 裕之 (SUZUKI HIROYUKI)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：70375509

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：