

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640059

研究課題名(和文) 組織型特異的がん遺伝子THG1の腫瘍形成能に関する研究

研究課題名(英文) Tumorigenic activity of tissue-specific oncogene THG-1

研究代表者

加藤 光保 (Kato, Mitsuyasu)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20194855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：THG-1は食道、子宮頸部、肺などに発生する扁平上皮がんで発現が亢進している。この分子は、RAS-MAPK経路の下流でリン酸化されることで活性化された。またTOF/MS解析で同定した複数の標的分子との結合を介して、その機能を制御することで扁平上皮がんの腫瘍形成能と浸潤能の亢進に働いていることを示した。また、リン酸化される部位や標的分子との結合部位の変異体は、腫瘍形成能を失うことも示された。

研究成果の概要(英文)：TGF-1 is expressed only in the basal layer of stratified squamous epithelia and the elevated expression of THG-1 is commonly observed in squamous cell carcinoma (SCC); such as esophageal cancer, cervical cancer, and lung SCC. It is phosphorylated by ERK in the downstream of epidermal growth factor receptor/Ras/MAPK pathway and essential for the tumorigenic activity of SCC. We also identified downstream target molecules of THG-1 by TOF/MS screening and confirmed the functional significance of these binding proteins in tumorigenic activity by using multiple molecular cell biological experiments. Mutations of the phosphorylation site or binding motifs to the downstream effectors abrogated the tumorigenic function of THG-1. These findings indicated that THG-1 is a novel tissue-specific oncogene of SCC.

研究分野：実験病理学

キーワード：扁平上皮がん 食道がん 子宮頸がん 肺がん THG-1 RAS/MAPK経路

1. 研究開始当初の背景

(1) 私達は、細胞増殖制御や発がんに関わる Transforming Growth Factor- β (TGF- β)の標的遺伝子の研究を行い、*c-myc* (Yagi, J Biol Chem 2002; Sasaki, Cancer Res 2003), *ephrin-A1* (Shi, Oncogene 2008), *TMEPAI* (Watanabe, Mol Cell 2010; Nakano, J Biol Chem 2010)、*MafK* (Okita, J Biol Chem 2013)などの発現制御や分子機能について報告してきた。この過程で、TGF- β によって発現が誘導され、細胞増殖を抑制する TGF- β Stimulated Clone 22 (TSC-22, TSC22D1) の作用機序の研究も進めていたため、そのファミリー分子である THG-1 (TSC22D4; TSC22 Domain Family 4)の存在を知った。

(2) THG-1 は、小脳の顆粒細胞に発現しているという報告が2報あったが、分子レベルで機能を解析した報告はない (Canterini, Mol Cell Neurosci. 2009; Cerebellum 2012)。私達は、THG-1 が重層扁平上皮の基底層に発現し、EGF/RAS/ERK 経路によってリン酸化を受けて活性化し、細胞増殖と腫瘍形成を促進することを発見した。また、食道がんや子宮頸がんの8割以上で発現が亢進していることを見いだした (投稿中)。THG-1 は、現在も新規の組織型特異的ながん遺伝子で独自に開拓しつつある萌芽期にある研究である。

2. 研究の目的

(1) THG-1 と結合する分子を TOF/MS 解析で同定し、同定された分子の中から、細胞増殖促進ならびに腫瘍形成に関わる分子標的を探索して、THG-1 の作用機序を明らかにする。
(2) THG-1 に対する抗体、リン酸化 THG-1 に対する抗体を用いて臨床病理学研究を行うとともに、臨床診断への応用に向けた橋渡し研究を行う。

(3)がん細胞における THG-1 の活性化は過剰発現だけか、それとも RAS 遺伝子のような点突然変異による活性化もあるのかを多数の症例でゲノム DNA シークエンスを読んで検討する。点変異体が存在する場合には、変異体を認識する抗体も作製して、がんの発生や悪性化に関係して変異体が出現しているかを検討するとともに、変異体の機能についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 産業技術総合研究所の夏目徹博士との共同研究により、HEK293T 細胞に THG-1 を過剰発現させ、THG-1 と共沈する分子を TOF/MS 解析により網羅的に同定した。さらに THG-1 を安定に発現させた HaCaT 細胞を用い、EGF 刺激の有無で THG-1 と共沈する分子の違いについても TOF/MS による網羅的な解析を行なった。これらの中から注目される分子について、結合を確認するとともに扁平上皮がんの発生への関与について種々の解析を行なった。

(2) 市販の抗 THG-1 抗体(Abnova)を用い、種々の臓器の扁平上皮癌組織の組織アレイの免疫染色を行なった。また、EGF 刺激によって、THG-1 がリン酸化されることを見だし、そのリン酸化を認識する抗体を作製して、これによる組織染色も行なった。

(3) 食道癌の病理組織を用いて、パラフィン切片から抽出した DNA のシークエンスにより、癌細胞における THG-1 の変異の有無を解析した。

4. 研究成果

(1) THG-1 が EGFR/RAS/MAPK 経路の下流でリン酸化されることを同定し、リン酸化依存的に特異的に結合する抗体を作製した。

さらにリン酸化部位に変異を入れると腫瘍形成促進能が消失することを見いだした。

THG-1 と結合する分子を TOF/MS 解析で同定し、同定された分子の中から、細胞増殖促進ならびに腫瘍形成に関わる分子標的を探索して免疫沈降ウェスタンブロット法で結合を確認した。さらに、同定した結合部位に変異を入れると結合が消失することを示した。この結合部位の変異体では、腫瘍形成促進能が消失しており、この分子間相互作用により、腫瘍形成を促進することが示された。このほかにも、THG-1 には、複数の腫瘍形成に関わる下流分子があることが示唆されたため、引き続き、他の下流分子の制御機構とその腫瘍形成における意義について解析を続けている。

(2) 抗 THG-1 抗体により、ヒト扁平上皮がん組織等の免疫染色を行い、食道扁平上皮がんの 9 割以上、子宮頸がんの 8 割、肺扁平上皮がんのおよそ 7 割で THG-1 が、がん細胞集団にびまん性に発現していることを見いだした。肺腺がんなどの他の組織型のがんでは発現が認められず、THG-1 は正常扁平上皮の基底層と扁平上皮に組織特異的に発現していることを示した。また、抗リン酸化 THG-1 抗体により、これらのがん組織において発現している THG-1 がリン酸化を受けていることを示した。この THG-1 の発現分布の変化の機序については、いまだに、その機序は不明である。現在、候補と考えられる機序について、解析を進めている。

(3) マイクロダイセクション法によって切り出した食道がん組織から抽出したゲノム DNA のシーケンスを解析し、見いだされた THG-1 の変異体（あるいはポリモルフィズム）が、より強い腫瘍形成促進能を有する

ことを見いだした。

(4) THG-1 結合分子の探索。THG-1 に時的に結合してその機能を制御する方法の開発を目指して、THG-1 結合分子の種々の探索を行っている。

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)

Okita Y, Kamoshida A, Suzuki H, Itoh K, Motohashi H, Igarashi K, Yamamoto M, Ogami T, Koinuma D, and Kato M. Transforming Growth Factor- β induces transcription factors MafK and Bach1 to suppress expression of the heme oxygenase-1 gene. **J. Biol. Chem.** 288, 2013, pp 20658-20667, 査読有

[学会発表](計4件)

鈴木裕之, 加藤光保, 細胞増殖, 分化, 癌化における Tsc-22 ファミリー分子の役割, 第 102 回日本病理学会総会, 平成 25 年 6 月 6-8 日, 札幌

鈴木裕之, 加藤光保, 細胞増殖, 分化, がん化における Tsc-22 ファミリー分子の役割, 第 103 回日本病理学会総会 平成 26 年 4 月 24 日-26 日, 広島

Hiroyuki Suzuki, Roles of Tsc-22 family proteins in epithelial homeostasis and tumorigenesis. TGF- β meeting 平成 26 年 5 月 8 日-10 日, Leiden

鈴木裕之, 加藤光保, Tsc-22 ファミリータンパク質の腫瘍化における役割, 第 73 回日本癌学会学術総会 9 月 25 日-27 日, 横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/epatho/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 光保 (KATO, MITSUYASU)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20194855

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

鈴木 裕之 (SUZUKI, HIROYUKI)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70375509