

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09798

研究課題名(和文) 低酸素状態の口腔扁平上皮癌細胞におけるTPD52の細胞生存因子としての役割の検索

研究課題名(英文) Role of TPD52 as a survival factor on OSCC cells in a hypoxic condition

研究代表者

椋代 義樹 (Mukudai, Yoshiki)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：50325099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画によって、以下の知見を得た。

低酸素に曝露されたヒト口腔扁平上皮癌細胞では、TPD52のmRNAおよびタンパクの亢進がみられた。この亢進作用は遺伝子転写活性の上昇によるものではなく、かつ、低酸素誘導因子(HIF)にも依存していなかったが、mRNAの安定性の上昇という遺伝子転写後制御作用によるものであった。TPD52は低酸素曝露化の口腔扁平上皮細胞において、オートファジー制御に関与し、細胞生存能を上昇させていた。in vivo実験において、TPD52ノックダウンはHIF阻害剤の投与と相乗的効果を示し、移植扁平上皮癌細胞の増殖および浸潤を著しく抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌細胞でTPD52のmRNA、および、タンパクは低酸素刺激で誘導されるが、その作用は転写活性の上昇によるものではなく、もっぱらmRNA安定性の上昇に起因し、この作用はHIFシグナル経路に非依存であることが明らかとなった。また、TPD52の低酸素下での発現亢進は癌細胞の細胞死抵抗性獲得に関与することが示された。本研究結果によって、TPD52遺伝子は口腔扁平上皮癌における新たな分子標的となりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, the following findings were revealed;

(1) TPD52 gene and protein were increased in human oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells exposed to hypoxia. (2) This enhancing effect was not dependent on an increase in gene transcription activity or on hypoxia-inducible factor (HIF), but on a post-transcriptional regulation by increased mRNA stability. (3) TPD52 was involved in autophagy, and thereby, increased cell viability of OSCC cells in hypoxia. (4) In the in vivo experiment, TPD52 knockdown showed a synergistic effect with HIF inhibitor, and significantly suppressed the growth and invasion of transplanted OSCC cells.

研究分野：口腔外科学

キーワード：TPD52ファミリー 扁平上皮癌 mRNA安定性 転写後遺伝子発現調節 TIA-1 Hypoxia オートファジー 口腔癌

## 1. 研究開始当初の背景

Tumor Protein D (TPD)ファミリータンパクはこれまで4つのタンパク(TPD52、TPD53、TPD54、および、TPD55)が単離されているが、いずれも定常状態では細胞質に局在し、リン酸化されると細胞膜に移行し、種々のタンパクの細胞外分泌に関与していること、さらには、N末端領域にあるcoiled-coil domainを介して、ファミリー同志あるいは、他の細胞質内タンパクとホモ/ヘテロ二量体を形成して細胞内の局在が制御され、癌細胞の増殖・浸潤・転移をいくつかのシグナル伝達機構を介して制御していることが報告されている(Byrne *et al.* *Tumour Biol.* 2014、Boutros *et al.* *Biochem Biophys Res Commun.* 2004に総説)。申請者らは2013年にTOFMASSを用いてヒト口腔扁平上皮癌においてTPD54が特異的に発現していることを見出し、TPD54は扁平上皮癌細胞のnegative regulatorで、同ファミリーに属するTPD52の口腔扁平上皮癌における転移および悪性化亢進作用を拮抗的に抑制していることを報告した(Mukudai *et al.* *Cellular Oncol.* 2013)。さらに、この研究を進展させ2017年に、TPD52ファミリー遺伝子を恒常的に強制発現あるいは強制ノックダウンしているSAS細胞を用いた*in vitro*および*in vivo*実験を用いて、口腔扁平癌細胞の転移を協調的に制御していることを見出した(Kato *et al.* *Int J Oncol.* 2017)。また、申請者らはこのファミリー遺伝子のmRNAの3'非翻訳領域(3'-UTR)はタンパクコード領域と比べて異常に長いことに着目し、これらの遺伝子の発現は転写後制御を受けていること、また、その制御機構は3'-UTRに存在するシスエレメントとRNA結合タンパクであるTIA-1およびTIARの相互反応によって調節されていることも報告している(Motohashi *et al.* *Biochem J.* 2017)。一方、ShangらはTPD52を強制発現あるいはノックダウンした前立腺癌細胞を用いて、TPD52は放射線によるゲノムDNAの損傷が引き金となるアポトーシスならびにオートファジーに対して抵抗性を獲得する因子であること報告した(Shang *et al.* *Oncotarget.* 2016)。このことは、TPD52ファミリータンパクは、癌細胞の細胞死刺激に対する生存性の獲得に関しても、何らかの役割を果たしていることを示唆しているが、それ以上のことは明らかとなっていない。近年の癌治療として分子標的治療が脚光を浴びており、その標的候補の一つに低酸素誘導因子-1(Hypoxia-inducible Factor-1:HIF-1)がある。HIF-1は口腔扁平上皮癌細胞を含むほとんどの癌細胞で発現が亢進しており、癌細胞の高い増殖性・浸潤性、ならびに、抗細胞死に関しても重要な働きを担っている。事実、HIF-1を対象にした分子標的治療に関しては多くの報告がなされ、その阻害剤のいくつかは現在治験中でもある。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、TPD52が低酸素状態における口腔扁平上皮癌細胞の生存因子としての役割に着目し、その発現制御機構ならびに、HIF-1の発現、HIF-1阻害剤・活性化剤との関連を検索して、このファミリータンパクの新たな分子標的治療としての可能性を探索するものである。

## 3. 研究の方法

本研究計画では、まず、低酸素下におけるTPD52遺伝子の発現の変化、その遺伝子発現調節機構(転写、転写後調節)および、低酸素下における扁平上皮癌細胞に対するアポトーシス、オートファジーへの影響を、HIF-1発現を調節する薬剤と関連付けて*in vitro*において検索した。次に、TPD52を強制発現あるいはノックダウンした扁平上皮癌細胞を移植したヌードマウスの系を用いて、HIF-1阻害剤との相乗効果による原発癌組織の増殖、アポトーシス・オート

ファジー誘導を検索し、新たな口腔扁平上皮癌の分子標的治療の可能性を検索した。具体的な研究方法を以下に示す。

#### 口腔癌患者の病理標本を用いた低酸素下状態における TPD52 遺伝子の発現の検索

昭和大学歯科病院口腔外科学診療科を受診し、摘出手術を受けた患者からからの試料を用いて、腫瘍組織中心部（低酸素部）における TPD52 関連タンパク、および、HIF-1 関連タンパクの発現を免疫組織化学法を用いて検索した。

#### *in vitro* における低酸素下条件における TPD52 遺伝子の発現の変化の検索

(a) ヒト扁平上皮癌細胞株、および、ヒト正常ケラチノサイトを用いて、低酸素下における TPD52 の発現に対する影響を検索した。また、同細胞において、mRNA 転写の検索、総 mRNA 量の検索、mRNA の安定性の検索、総タンパク質の発現、および、転写後発現調節の検索を行った。

(b) 低酸素状態で TPD52 の誘導がみられた条件において、その誘導効果が HIF-1  $\alpha$  に依存しているかどうかを検索した。すなわち、HIF-1  $\alpha$  を siRNA によりノックダウンし、低酸素条件にした場合、TPD52 の総タンパクの発現、転写、転写後発現調節、翻訳後発現調節の変化を検索した。同時に、HIF-1  $\alpha$  阻害剤、および、活性化剤を添加して、同様の検索を行った。

#### *in vivo* における TPD52 の分子標的治療対象への可能性の検索

EmGFP コントロール SAS 細胞株および EmGFP-TPD52shRNA SAS 細胞株の 2 種類の細胞をヌードマウスに移植し、HIF-1 阻害剤を投与し、TPD52 のノックダウンと HIF-1 の阻害剤の相乗効果が移植癌細胞の増殖・浸潤・転移に対する影響の評価を行った。すなわち、移植された原発腫瘍の大きさを経時的に計測し、また、マウスの生存率が変化するかどうかを検索した。同時に、原発腫瘍およびその周辺組織の組織切片を作成し、H-E 染色および免疫染色を行い、扁平上皮癌細胞の増殖・浸潤にどのような影響を及ぼしているかを検索した。

## 4 . 研究成果

本研究計画によって、以下の知見を得た。

低酸素に曝露されたヒト口腔扁平上皮癌細胞（SAS細胞、HSC-3細胞、および、HSC-4細胞）では、TPD52遺伝子およびタンパクの亢進がみられたが、ヒト正常角化上皮細胞ではみられなかった。また、高浸潤性の扁平上皮癌細胞（SAS細胞）でこの現象が顕著であった。

この亢進作用は遺伝子転写活性の上昇によるものではなく、かつ、低酸素誘導因子（HIF）にも依存していなかったが、mRNAの安定性の上昇という転写後遺伝性制御作用によるものであることが明らかになった。また、この作用にはRNA結合タンパクであるT-cell intracytoplasmic antigen（TIA-1）およびTIA-related protein（TIAR）が重要な役割を果たしていた。

TPD52は低酸素曝露化の口腔扁平上皮細胞において、オートファジー制御に関与し、細胞生存能を上昇させていた。一方、この条件においては、アポトーシスおよびネクローシスへの関与はほとんどみられなかった。

ヌードマウスへのヒト口腔扁平上皮細胞株（SAS細胞）の移植実験において、TPD52ノックダウンはHIF阻害剤の投与と相乗的効果を示し、移植癌細胞の増殖および浸潤を著しく抑制した。

なお、本研究の詳細な結果は、2021年にCell & Bioscience誌に報告した（Abe Yuzo, \*Mukudai Yoshiki, Kurihara Mai, Houru Asami, Chikuda Junichiro, Yaso Atsutoshi, Kato Kosuke, Shimane

Toshikazu and Shirota Tatsuo. Tumor protein D52 is upregulated in oral squamous carcinoma cells under hypoxia in a hypoxia-inducible-factor-independent manner and is involved in cell death resistance. **Cell & Bioscience**. 11. Article no. 122. 2021).

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 1件）

1. 著者名 Abe Yuzo, Mukudai Yoshiki, Kurihara Mai, Houri Asami, Chikuda Junichiro, Yaso Atsutoshi, Kato Kosuke, Shimane Toshikazu, Shiota Tatsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Tumor protein D52 is upregulated in oral squamous carcinoma cells under hypoxia in a hypoxia-inducible-factor-independent manner and is involved in cell death resistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell & Bioscience	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） 10.1186/s13578-021-00634-0	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 Kurihara Mai, Mukudai Yoshiki, Watanabe Hitoshi, Asakura Mariko, Abe Yuzo, Houri Asami, Chikuda Junichiro, Shimane Toshikazu, Shiota Tatsuo	4. 巻 210
2. 論文標題 Autophagy Prevents Osteocyte Cell Death under Hypoxic Conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells Tissues Organs	6. 最初と最後の頁 326 ~ 338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000519086	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 -

1. 著者名 Yaso Atsutoshi, Kamatani Takaaki, Mukudai Yoshiki, Abe Yuzo, Shiota Tatsuo	4. 巻 34
2. 論文標題 Tumor protein D54: A promising marker of mucoepidermoid carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Showa Univ J Med Sci	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安部勇蔵、椋代義樹、栗原舞、祝部亜紗美、代田達夫
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞でTPD52はHIF非依存性に低酸素下で亢進し細胞死抵抗性に関与する
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗原舞、棕代義樹、安部勇蔵、祝部亜紗美、代田達夫
2. 発表標題 低酸素環境下における骨細胞はオートファジーによって細胞死が抑制される
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗原舞、棕代義樹、安部勇蔵、祝部亜紗美、代田達夫
2. 発表標題 低酸素環境下における骨細胞はオートファジーによって細胞死が抑制される
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安部勇蔵、棕代義樹、栗原舞、祝部亜紗美、代田達夫
2. 発表標題 TPD52は低酸素下の口腔扁平上皮癌細胞でHIF1非依存的に亢進し細胞死抵抗性に関与する
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 棕代義樹、安部勇蔵、栗原舞、祝部亜紗美、筑田洵一郎、八十篤聡、代田達夫
2. 発表標題 TPD52は低酸素下の口腔扁平上皮癌細胞でHIF非依存的に亢進され、細胞死抵抗性に関与する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	伊藤 千洋 (Ito Chihiro) (20783062)	昭和大学・歯学部・助教  (32622)	
研究分担者	山田 篤 (Yamada Atsushi) (50407558)	昭和大学・歯学部・講師  (32622)	
研究分担者	代田 達夫 (Shirota Tatsuo) (60235760)	昭和大学・歯学部・教授  (32622)	

	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
研究協力者	安部 勇蔵 (Abe Yuzo)		
研究協力者	栗原 舞 (Kurihara Mai)		
研究協力者	祝部 亜紗美 (Hour i Asami)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	筑田 洵一郎  (Chikuda Junichiro)		
研究協力者	八十 篤聡  (Yaso Atsutoshi)		
研究協力者	加藤 光佑  (Kato Kosuke)		

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