

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07473

研究課題名(和文) 扁平上皮がんの新規がん遺伝子THG-1の機能解析と分子標的治療への応用

研究課題名(英文) Role of THG-1 in squamous cell carcinoma development and its application to cancer therapy

研究代表者

鈴木 裕之 (SUZUKI, Hiroyuki)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70375509

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)：我々はTHG-1が正常な扁平上皮基底層で発現し、扁平上皮がんで過剰発現していることを明らかにしている。THG-1は受容体型チロシンキナーゼ経路によってリン酸化され、THG-1の腫瘍形成能獲得に重要である。本研究では、がんの転移と化学療法および放射線療法への耐性に関するCD44の発現制御に、THG-1が関与することを見出した。特にTHG-1は、EGFによって生成されるCD44バリエーションアイソフォーム(CD44v)の制御に重要な役割を果たすことが明らかになり、THG-1が受容体型チロシンキナーゼ経路の下でCD44vスプライシングを増強し、がん進行に関与することを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

扁平上皮がんは、肺、食道、子宮頸部などに発生する予後不良のがんで、未だ有効な分子標的治療薬は少ない。本研究では扁平上皮がんを高発現するTHG-1/TCS22D4が、がん幹細胞マーカーであるCD44のスプライシングを制御する新たな分子メカニズムを明らかにした。本研究成果は、機能が未知であったTHG-1/TCS22D4の新規分子機構を明らかにするとともに、本経路を標的にした新たな治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Our groups have been shown that THG-1 (TSC22D4), a TSC22 family member, is expressed normal squamous epithelium, and overexpressed in SCCs. THG-1 is phosphorylated by receptor tyrosine kinase pathways, which is important for the tumorigenic potential of THG-1. CD44 is involved in cancer metastasis and resistance to chemotherapy and radiation. CD44 has a standard isoform (CD44s) and variant isoforms (CD44v), produced by mRNA splicing. In this study, we found that the CD44v expression was decreased in THG-1 knockdown SCC cells and the xenograft tumors. Furthermore, the splicing of CD44v were elevated by EGF treatment in THG-1 expressed SCC cells. Moreover, overexpression of THG-1 with oncogenic RAS in non-tumorigenic human keratinocyte promotes the CD44v expression and tumor formation. These results indicated that THG-1 potentiates the CD44v splicing under the receptor tyrosine kinase pathways and involved in the malignant progression of SCC.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：THG-1 扁平上皮がん CD44 リン酸化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

扁平上皮がんは重層扁平上皮細胞を主な起源とし、食道、皮膚、肺などに発生する予後不良のがんである。正常扁平上皮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、また発がん機構については不明である。申請者は THG-1 が正常皮膚、食道等の扁平上皮基底細胞特異的に発現することを見出した。さらに THG-1 は扁平上皮がんを高発現し、EGF-Ras-ERK 経路でリン酸化されて腫瘍形成を促進することを見出した。本研究では扁平上皮の増殖、分化、及びがん化における THG-1 の役割を明らかにし、そのリン酸化、変異、結合タンパクを標的にした分子腫瘍マーカーの開発を目指す。

<扁平上皮がんの概要>

発生患者数：米国の統計(CA CANCER J CLIN 2017;67:7-30)による、2017年推定新規罹患数は、肺(222,500)、食道(16,940)、頭頸部(49,670)、子宮頸部(12,820)。中国では喫煙率の高さ、大気汚染の状況から2025年の肺がん発症数は100万人を超えると試算(WHO)されている。日本の肺がん罹患患者は133,800(2016年)。(注：上記肺がんの2～3割が扁平上皮がん)

病因：肺扁平上皮がんは特にタバコ、食道・頭頸部がんはタバコ、アルコール、食習慣。

病態・症状の特徴：肺扁平上皮がんは、太い気管支が細かく分かれ、肺に入っていく肺門部に発生するが多い。タバコとの因果関係が深い。食道・頭頸部がんの9割以上は扁平上皮がん、組織学的背景から、浸潤、転移を起こしやすく、発見時には周辺組織に広がっていることが多い。

ステージ分類：TNM分類によりステージ、治療法が決定する。低ステージの場合は外科的切除により根治が期待できる。遠隔転移を伴う切除不能、再発の場合は化学療法、免疫療法、放射線療法が選択される。扁平上皮がんと診断するためのマーカーは存在するが(p40など)、その病態を詳細に知るための分子マーカーは存在しない。

標準治療の満足度：切除不能な場合は、化学療法が選択されるが、現在でも細胞殺傷性の化学療法が選択される場合が多く、認可された分子標的治療薬は少ない。これは肺腺がんのように分子標的治療薬の標的になるドライバー変異を持つがんが少ないためである。近年はPD-1を標的にした免疫療法(抗体医薬)も認可されてきているが、適用範囲は未だ限定的である。

5年生存率：肺、食道：20%。頭頸部：60%前後。子宮頸部：70%(日本、米国の場合)。

2. 研究の目的

新規がん遺伝子 THG-1 の分子、生理機能、及び臨床病理学的意義を明らかにし、新規分子腫瘍マーカー、及びタンパク質間相互作用阻害剤による分子標的治療の開発を目指す。

3. 研究の方法

細胞培養

ヒト食道がん細胞株TE13細胞、ヒトケラチノサイトHaCaTは 10% 胎児ウシ血清(FBS、Invitrogen 社)、1% Penicillin-Streptomycin solutionを添加したDulbecco's modified Eagle's medium を用いて、37℃、5% CO₂条件下で培養した。

プラスミドDNAの構築

THG-1及びHRasは当研究室においてPCRによってクローン化し、pCAG-IPベクターに挿入して発現ベクターを作成した。HRasの点変異体HRas(G12V)はPCRにより作製した。THG-1ノックダウン細胞作製用に、ヒト・マウスに対するshRNAをpSUPER-puroベクター(OligoEngine 社)に挿入した。

マウスでの腫瘍形成アッセイ

1×10⁷ 個のコントロール TE13 細胞、THG-1 ノックダウンした TE13 細胞(shTHG-1#2、shTHG-1#3) をマトリゲル (BD Biosciences 社)と共に免疫不全マウス(NOD-Scid)の皮下に移植し、60 日後に移植片を摘出した。HaCaT-Ras 腫瘍は免疫不全マウス(Balb/c nude) の皮下に移植し、45 日後に移植片を摘出した。

RT-PCR

TE13細胞を6 well plateに 5×10⁵ cells/wellの密度で撒き、翌日細胞を回収した。培地を除去しPBSで洗浄後、はISOGEN (NIPPON GENE 社)を用いて細胞からRNAの抽出を行った。PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa 社)を用いてRT反応を行い、RNA 1 μgをcDNAに逆転写した。合成したcDNAを鋳型として、RT-PCRを行った。Primerはhuman CD44のvariant exonを挟むように設計し、CD44s、CD44vの双方が検出できる様にした。

免疫組織化学

10% 中性緩衝ホルマリンで固定した組織をパラフィンブロックに包埋、薄切し、42℃、一晩乾燥させ、スライドグラスに張り付けた。キシレンを用いてパラフィンを除去し、エタノールで親水化を行った。PBS で5分間、3回洗浄後、0.01 M クエン酸緩衝液(pH 7.0) に浸し、121℃、20分間オートクレーブし、抗原の賦活化を行った。PBSで10分間、3回洗浄後、ブロッキング試薬をスライドに滴下し、室温で1時間静置した。その後ブロッキング試薬で希釈した一次抗体を滴下し、4℃で一晩反応させた。翌日 PBS-T で10分間、3回洗浄し、HRP-polymer labeled anti-mouse、またはrat-IgG antibody (ENVISION system, Dako 社)を滴下し、室温で1時間反応させた。PBSで10分間、3回洗浄後、ヘマトキシリン溶液にて核の対比染色を行い、流水水洗によって色だしを行った。その後、エタノール、キシレンを用いて、脱水・透徹を行い、封入した。

4. 研究成果

(1) がん遺伝子THG-1の機能解析

扁平上皮がん培養細胞を用い、THG-1の過剰発現及びノックダウンを行い、細胞の増殖、分化、がん化におけるTHG-1の役割を検討した。その結果ヒト食道がん細胞株の多くでノックダウンにより増殖抑制が認められた。さらに一部の食道がん細胞株でTHG-1のノックアウトを行ったところ、さらに顕著な増殖抑制が認められ、一部の細胞には細胞老化の特徴が見出された。本成果は論文掲載された(Biochem Biophys Res Commun.

2020 Feb 19;522(4):897-902)。さらにTHG-1ノックダウン細胞について検討したところ、EGF依存性の細胞遊走、浸潤能、及びスフェア形成能の低下が認められた。さらにこれら扁平上皮がん細胞をNOD-SCIDマウスの皮下に移植したところ、THG-1ノックダウン細胞で腫瘍形成が抑制された。

(2) THG-1ノックダウンによるCD44スプライシングの低下

CD44には、多くの細胞で発現するスタンダードフォーム (CD44s) とmRNAスプライシングによって生成されるCD44パリアントアイソフォーム (CD44v) が知られている。CD44vは扁平上皮がん (SCC) を含むさまざまながんを高発現しており、がん転移や化学療法、放射線療法への耐性に関与し、がん幹細胞マーカーとして報告されている。THG-1ノックダウン細胞においてCD44s、CD44v発現についてフローサイトメトリー、RT-PCRで検討したところ、THG-1ノックダウン細胞においてCD44vの発現が低下することを見出した。また親株では、EGF処理依存的にCD44vの発現が上昇するが、THG-1ノックダウン細胞においてはその上昇が認められなかった。以上のことからTHG-1はEGFの下流でCD44vのvariant exonの取り込みを促進し、腫瘍系性能の促進に寄与することが示された。

(3) がん遺伝子RasとTHG-1発現によるCD44スプライシングの亢進

THG-1は受容体型チロシンキナーゼ経路の下流でリン酸化修飾を受けることが明らかになっている。そこで様々なTHG-1変異体を作製し、リン酸化されるアミノ酸の同定の同定に成功した。そこで非腫瘍形成性ヒトケラチノサイトにがん遺伝子RasG12VとTHG-1 (WT) を発現させたところ、CD44vの発現と腫瘍形成を促進することを見出した。一方、RasG12Vとリン酸化を受けないTHG-1変異体THG-1 (SA) を発現させると、CD44vの発現上昇は認められず、腫瘍系性能の亢進も認められなかった。

(4) 腫瘍におけるCD44v発現パターンの解析

(2) (3) で用いた腫瘍をパラフィン包埋し、CD44vの発現パターンについて検討した。(2) の扁平上皮がん細胞の移植腫瘍 (親株) では、CD44v9を含むアイソフォームは基底層を含む幅広い領域で発現が認められた一方で、CD44v3を含むアイソフォームはより分化した領域で認められた。しかしながらTHG-1をノックダウンした腫瘍ではCD44vの発現ほとんど認められなかった。また(3) におけるRasG12VとTHG-1 (WT) の発現腫瘍ではCD44v9を発現する領域が、RasG12V、またはRasG12VとTHG-1 (SA) 発現する腫瘍に比べて顕著に増大することが明らかになった。

(5) まとめ

以上のことからTHG-1はCD44vのスプライシングを制御することで、THG-1による腫瘍形成の亢進に寄与している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Wang Chen, Okita Yukari, Zheng Ling, Shinkai Yasuhiro, Manevich Lev, Chin Jas M., Kimura Tomokazu, Suzuki Hiroyuki, Kumagai Yoshito, Kato Mitsuyasu | 4. 巻 112 |
| 2. 論文標題 Glycoprotein non-metastatic melanoma protein B functions with growth factor signaling to induce tumorigenesis through its serine phosphorylation | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 4187 ~ 4197 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15090 | 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 Suzuki Hiroyuki, Kaneko Mika K., Kato Yukinari | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Roles of Podoplanin in Malignant Progression of Tumor | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cells | 6. 最初と最後の頁 575 ~ 575 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11030575 | 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 Takei Junko, Asano Teizo, Suzuki Hiroyuki, Kaneko Mika K., Kato Yukinari | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 Epitope Mapping of the Anti-CD44 Monoclonal Antibody (C44Mab-46) Using Alanine-Scanning Mutagenesis and Surface Plasmon Resonance | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy | 6. 最初と最後の頁 219 ~ 226 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2021.0028 | 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 Asano Teizo, Suzuki Hiroyuki, Kaneko Mika K., Kato Yukinari | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 Epitope Mapping of a Cancer-Specific Anti-Podocalyxin Monoclonal Antibody (PcMab-60) Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Surface Plasmon Resonance | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy | 6. 最初と最後の頁 227 ~ 232 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2021.0030 | 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 Takei Junko, Suzuki Hiroyuki, Asano Teizo, Li Guanjie, Saito Masaki, Kaneko Mika K., Kato Yukinari | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 Epitope Mapping of an Anti-CD20 Monoclonal Antibody (C20Mab-60) Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy | 6. 最初と最後の頁 250 ~ 254 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mab.2021.0042 | 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 Zhang X, Koga N, Suzuki H, Kato M. | 4. 巻 522 |
| 2. 論文標題 Promotion of cellular senescence by THG-1/TSC22D4 knockout through activation of JUNB. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun. | 6. 最初と最後の頁 897-902 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.145. | 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 Hwang J, Haque MA, Suzuki H, Dijke PT, Kato M. | 4. 巻 523 |
| 2. 論文標題 THG-1 suppresses SALL4 degradation to induce stemness genes and tumorsphere formation through antagonizing NRBP1 in squamous cell carcinoma cells. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun. | 6. 最初と最後の頁 307-314 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.149 | 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 Tran STP, Hipolito CJ, Suzuki H, Xie R, Kim Tuyen HD, Dijke PT, Terasaka N, Goto Y, Suga H, Kato M. | 4. 巻 516 |
| 2. 論文標題 Generation of non-standard macrocyclic peptides specifically binding TSC-22 homologous gene-1 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun. | 6. 最初と最後の頁 445-450 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.06.035. | 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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Suzuki Hiroyuki and Kato Mitsuyasu |
| 2. 発表標題 Roles of THG-1/Tsc22D4 in squamous cell carcinoma development |
| 3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Suzuki Hiroyuki |
| 2. 発表標題 Screening of protein-protein interaction inhibitors between TSC-22 homologous gene-1 and its interacting proteins |
| 3. 学会等名 TGF-beta meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Suzuki Hiroyuki and Kato Mitsuyasu |
| 2. 発表標題 Regulation of cellular senescence by THG-1/TSC22D4 |
| 3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会(国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hwang Jongchan, Suzuki Hiroyuki and Kato Mitsuyasu |
| 2. 発表標題 THG-1 overexpression stabilizes β -catenin via antagonizing NRBP1 in esophageal squamous cell carcinoma |
| 3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会(国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Goto Nohara, HIPOLITO CHRISTOPHER, Suzuki Hiroyuk and Kato Mitsuyasu |
| 2. 発表標題 Screening of macrocyclic peptide against CD44 |
| 3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Suzuki Hiroyuki and Kato Mitsuyasu |
| 2. 発表標題 Regulation of c-MYC transcriptional activity by transforming growth factor-beta 1 stimulated clone 22 |
| 3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| 筑波大学 実験病理学 http://www.md.tsukuba.ac.jp/epatho/ |
|---|

| | | |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|