

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07706

研究課題名(和文) 扁平上皮がんにおけるバイオマーカーと分子標的治療法の探索

研究課題名(英文) Novel Biomarker for Therapeutic Target in Lung squamous cell carcinoma

研究代表者

六代 範 (Rokudai, Susumu)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20392334

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)：肺扁平上皮がんは、分子標的治療薬も有効ではなく難治療性である。扁平上皮がんの診断マーカーである Np63遺伝子の発現制御の破綻は、がんの発生や進行の原因の一つである。我々は、次世代シーケンサーを用いた網羅的なスクリーニングにより、予後不良に関わるp63の発現制御の破綻を惹き起こす分子機構を明らかにし、がんの悪性化に関与する仕組みを明らかにした。また頭頸部扁平上皮がんにおいては、癌関連繊維芽細胞(CAF)におけるAKT3がCAF微小環境の免疫抑制に関連することを明らかにし、CAF活性と免疫抑制微小環境の潜在的なバイオマーカーであり、CAFの腫瘍促進機能を阻害する治療標的である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺扁平上皮がんの診断マーカーでもある Np63の発現の増加は高頻度で認められ、90%以上の扁平上皮がんが陽性であり、p53のがん抑制機能を阻害することで、がんの発生や進行、治療への抵抗性を高めるものと考えられており、治療標的としての可能性を秘めていると考えられる。本研究では、p63遺伝子の制御に関与するがんの発生や進行の詳細な仕組みを解明し、分子標的治療の開発に繋がる可能性を検討した。p63の発現制御機構を利用した化合物スクリーニングを進めており、アカデミア創薬としての開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Lung squamous cell carcinoma is difficult to treat because molecular targeted therapies are not effective. The disruption of control of the Np63 gene expression, which is a diagnostic marker for squamous cell carcinoma, is one of the causes of cancer development and progression. Through comprehensive screening using a next-generation sequencer, we clarified the molecular mechanism that causes the disruption of p63 expression control related to poor prognosis, and clarified the mechanism involved in malignant transformation of cancer. In addition, in squamous cell carcinoma of the head and neck, AKT3 in cancer-related fibroblastic cells (CAF) was revealed to be associated with immunosuppression of the microenvironment of CAF, and is a potential biomarker of CAF activity and immunosuppressive microenvironment. Possibly a therapeutic target that inhibits the tumor-promoting function of CAF.

研究分野：腫瘍学

キーワード：p53 p63 肺がん 扁平上皮がん

1. 研究開始当初の背景

肺がんをはじめとする扁平上皮癌は難治療性であり効果的な分子標的治療がなく、新たなバイオマーカーや分子標的治療の探索が必要である。これまでに肺扁平上皮癌の臨床マーカーである Np63 のユビキチン化分解を STXBP4 が抑制することから、STXBP4 の結合阻害により Np63 の発現を低下させることで、扁平上皮がんの発生や進行を抑制する分子標的治療法の開発が望まれる。

頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) において、癌周縁部においては癌関連線維芽細胞 (CAF) は上皮間葉転換、血管新生、および免疫抑制を促進し、腫瘍の進行を促進することが知られている。CAF は様々な調節因子により制御を受け、癌微小環境の免疫抑制に関連することが知られている。

急性骨髄性白血病 (AML) は、エピジェネティックな制御不全により、発癌性の分化停止状態から離脱させることが知られている。これまでに AML 細胞の分化に関与する種々のエピジェネティック調節因子が関与することが報告されている。

2. 研究の目的

肺癌をはじめとする扁平上皮癌の臨床マーカーである Np63 を標的として、新たな扁平上皮癌の治療標的の探索を目的とする。肺扁平上皮がんにおいては、これまでに Np63 のユビキチン化分解を STXBP4 が抑制することから、STXBP4 の結合阻害により Np63 の発現を低下させることで、扁平上皮がんの発生や進行を遅らせる分子標的治療の探索を目的とする。

頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) において、癌関連線維芽細胞 (CAF) は上皮間葉転換、血管新生、および免疫抑制を促進し、腫瘍の進行を促すことが知られている。本課題では、頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) における CAF の主要な調節因子を正常線維芽細胞との NGS 解析から同定し、CAF 微小環境の免疫抑制への影響を明らかにすることを目的とする。また HNSCC の CAF 活性と免疫抑制微小環境を評価するためのバイオマーカーや、CAF の腫瘍促進機能に関与する治療標的となり得ることを明らかにする事を目的とする。

急性骨髄性白血病 (AML) においては、エピジェネティックプログラムの調節不全により、発癌性の分化停止状態を離脱させる。AML 細胞で分化に焦点を当てた CRISPR スクリーニング法などを行い、AML 細胞の主要なエピジェネティックな調節因子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

具体的には、STXBP4 と Np63 の結合を検討するためのスクリーニング法の開発に向けて、バキュロウイルス系により作製した精製タンパク質の結合検出スクリーニング法の構築を進めた。また細胞内分子間結合検出スクリーニング法の構築に関しても、標的タンパク質と発光タグの位置を変えた 8 種類の組み合わせを構築し、それぞれの発現を確認したのち発光強度を比較した。構築した細胞内分子間結合検出スクリーニング法を用いて、両者のタンパク質の結合領域 (Coiled-Coil 領域) を含む STXBP4 断片を作製し、発光システム (細胞内分子間結合検出ス

リーニング系)に共導入して、発光抑制を比較検討した。さらには上記断片に細胞透過性修飾(TAT修飾)を施したペプチドを作製して、合成ポリペプチドにより発光強度の抑制を比較検討した。

HNSCC 標本から得られた CAF と正常線維芽細胞の NGS 解析により、免疫機能に関連する発現変動遺伝子(DEGs)を比較検討し、CAF の潜在的な調節因子を検証した。免疫抑制性サイトカイン遺伝子の発現制御により、CAF の腫瘍への浸潤は T 細胞抑制と腫瘍形成促進性マクロファージ誘導への影響を考慮し、HNSCC 患者の予後不良との相関について検証を行った。これらの結果により、HNSCC における CAF 活性と免疫抑制微小環境を評価するためのバイオマーカーや治療標的となり得ることを検証した。

エピジェネティックプログラムは、急性骨髄性白血病(AML)で調節不全になり、発癌性の分化停止状態を離脱させる。AML 細胞で分化に焦点を当てた CRISPR スクリーニングを行い、AML 細胞の主要なエピジェネティックな調節因子を探索した。このスクリーニングでは、ヒストン修飾を伴うエピジェネティック制御が、白血病誘発性遺伝子発現プログラムを動かす骨髄分化の関与を検証した。KAT6A はプロモーター H3K9ac がアセチルリジンリーダー ENL によって結合され、クロマチン因子と協力し転写伸長を誘導する、新たに記述された転写制御複合体の治療標的であることを検証した。

4. 研究成果

具体的には、STXBP4 と Np63 の結合を検討するためのスクリーニング方法として、バキュロウイルス系により作製した精製タンパク質の結合検出スクリーニング系の構築を進めた。また細胞内分子間結合検出スクリーニング系の構築に関して、標的タンパク質と発光タグの位置を変えた 8 種類の組み合わせを構築し、それぞれの発現を確認したのち発光強度の強い組み合わせを確定した。細胞内分子間結合検出スクリーニング法も用いて、両者のタンパク質の結合領域(Coiled-Coil 領域)を含む STXBP4 断片を作製し、発光システムに共導入することにより、発光抑制が強い部位を特定した。さらには上記断片に細胞透過性修飾(TAT修飾)を施したペプチドを作製して、発光強度が抑制される合成ポリペプチドを確定した(詳細については、下記 2-i) ~2-iii) 参照のこと)。

HNSCC 標本から得られた CAF と正常線維芽細胞の NGS 解析により、免疫機能に関連する発現変動遺伝子(DEG)を 13 個特定し、CAF の潜在的な調節因子として AKT3 を同定した。AKT3 陽性 CAF の腫瘍への浸潤は、免疫抑制性サイトカイン遺伝子の発現を抑制し、T 細胞抑制と腫瘍形成促進性マクロファージ誘導を阻害することを明らかにした。HNSCC 患者の予後不良と正の相関が認められることを明らかにした。これらの結果は、AKT3 が HNSCC の CAF 活性と免疫抑制微小環境を評価するための潜在的なバイオマーカーであり、CAF の腫瘍促進機能を阻害する治療標的であることを明らかにした。

エピジェネティックプログラムは、急性骨髄性白血病(AML)で調節不全になり、発癌性の分化停止状態を離脱させる。AML 細胞で分化に焦点を当てた CRISPR スクリーニングを行い、AML 細胞の主要なエピジェネティックな調節因子を特定した。このスクリーニングでは、ヒストン

アセチルトランスフェラーゼ KAT6A が、白血病誘発性遺伝子発現プログラムを動かす骨髄分化の新規レギュレーターとして特定された。KAT6A はプロモーターH3K9ac がアセチルリジンリダーENL によって結合され、クロマチン因子と協力し転写伸長を誘導する、新たに記述された転写制御モジュールのイニシエーターであることを示す。KAT6A の阻害は、強力な抗 AML 表現型を示し、KAT6A 小分子阻害剤が AML の単剤療法または併用療法に基づく治療に高い可能性を示唆していた。

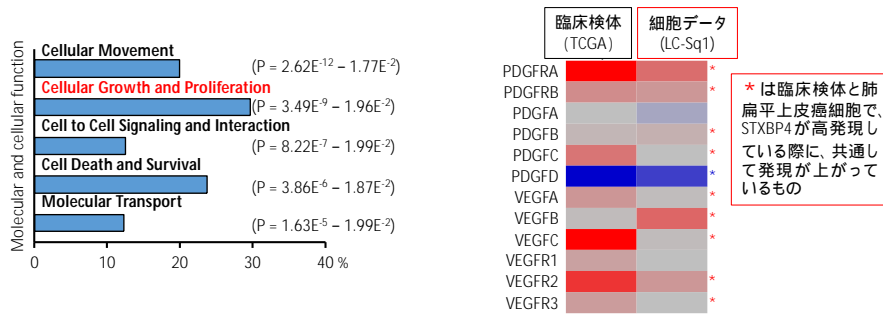
(2) 分子標的治療コンセプトの妥当性 n の検証：

2-i) Tet 誘導性システムを用いた STXBP4 や Np63 阻害による抗腫瘍効果 (治療効果) の検証： これまでに、内因性 STXBP4 高発現の肺扁平上皮がん細胞 RERF-LC-Sq1 に、Tet 誘導性ノックダウン系 Tet-shRNA レンチウイルス (sh Np63 および shSTXBP4) を感染導入した安定細胞株を樹立し、テトラサイクリン系薬剤 (DOX) によりノックダウン効果を誘導し、*in vitro* および *in vivo* で抗腫瘍効果 (治療効果) が発揮されることを確認した。これらの安定発現細胞株を用いて *in vitro* 実験および *in vivo* 実験を行い、DOX により KD 効果を誘導し、抗腫瘍効果 (治療効果) を有することを確認した。

2-ii) Coiled-Coil 領域ペプチドによる STXBP4 と Np63 結合阻害の検討:本研究では、STXBP4 の Coiled-Coil 領域内の詳細な結合領域を欠損した発現細胞を構築し、STXBP4 と Np63 の結合阻害および増殖抑制効果 (*in vitro*) の検討を行なった。新規に開発した細胞内分子間結合検出スクリーニング系を用いて、両者のタンパク質の結合領域 (Coiled-Coil 領域) を含む STXBP4 断片 (20 アミノ酸断片を 12 種類) を発現する遺伝子をクローニングにより作製して、発光システムに添加し、発光強度による結合阻害効果の検討を行った。その結果、フラグメント 4 (Frag.4) で発光抑制が最も強く、この部位で結合が示唆された。また、Coiled-Coil 領域のフラグメント 4 に相当するポリペプチドに、細胞透過性修飾 (TAT 修飾) を施した合成ペプチドを作製し、発現タンパク量 (細胞数) を調整し発光強度の抑制効果を検証したところ、ペプチド濃度 1 μ M でも 1/2 程度まで発光が抑制され、結合が阻害されることを示唆する結果が得られた。また、Np63 との結合領域 (Coiled-Coil 領域) を含む STXBP4 断片 (20 アミノ酸断片を 12 種類) を発現する遺伝子をクローニングにより作製して、発光システムで共発現させ発光強度抑制効果を検証した。Np63 との結合領域 (Coiled-Coil 領域) を含む STXBP4 断片 (フラグメント 4) に細胞透過性修飾 (TAT 修飾) を施したペプチドを、細胞内分子間結合検出スクリーニング系に添加し、ペプチド処理後 24 時間にて発光強度抑制効果を検証した。ペプチド濃度 1 μ M でも 1/2 程度まで発光強度の抑制効果が認められた。

2-iii) 創薬標的により転写活性化が変動する因子探索

・内因性 STXBP4 の発現が低い肺扁平上皮癌細胞株 RERF-LC-Sq1 細胞を用い、STXBP4 や Np63 をノックダウンした際の遺伝子発現への影響について検討するために、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析にて遺伝子発現プロファイルを検討した。



(図) 扁平上皮癌細胞 (LC-Sq1 等) を用い、標的遺伝子 (STXBP4) をノックダウンした際の遺伝子発現への影響について、NGS を用いた網羅的遺伝子解析の検討。RERF-LC-Sq1 細胞において、STXBP4 をノックダウンした際に発現が変動する遺伝子の分類。細胞増殖に関わる遺伝子の変動が認められた。これまでに p53 非依存的な発現遺伝子として、PDGFR や VEGFR の経路の関与の可能性を報告しており、今回は臨床検体 (パブリックデータ: TCGA) や細胞データを用いて検証実験および解析を行った。今後、他の扁平上皮がん細胞を用いて標的遺伝子をノックダウンした際の遺伝子発現変動や、ヒット化合物による遺伝子変動プロファイル等の比較検討により、作用メカニズムの解明と高次評価に活用する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Bilguun E0, Kaira K, Kawabata-Iwakawa R, Rokudai S, Shimizu K, Yokobori T, Oyama T, Shirabe K, Nishiyama M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Syntaxin binding protein 4 as a novel therapeutic target and an effective biomarker for better treatment selection in lung squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Research Square, Review	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） 10.21203/rs.3.rs-39783/v1	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 該当する
1. 著者名 Bilguun E0, Kaira K, Kawabata-Iwakawa R, Rokudai S, Shimizu K, Yokobori T, Oyama T, Shirabe K, Nishiyama M.	4. 巻 20(1)
2. 論文標題 Distinctive roles of syntaxin binding protein 4 and its action target, TP63, in lung squamous cell carcinoma: A theranostic study for the precision medicine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21203/rs.3.re-39783/V2	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 該当する
1. 著者名 Takahashi H, Rokudai S, Kawabata-Iwakawa R, Sakakura K, Oyama T, Nishiyama M, Chikamatsu K.	4. 巻 13(6)
2. 論文標題 AKT3 is a novel regulator of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13061233	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 Takahashi H, Rokudai S, Kawabata-Iwakawa R, Sakakura K, Oyama T, Nishiyama M, Chikamatsu K.	4. 巻 -
2. 論文標題 AKT3 is a key regulator of head and neck squamous cell carcinoma. Takahashi H, Rokudai S, Kawabata-Iwakawa R, Sakakura K, Oyama T, Nishiyama M, Chikamatsu K.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	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） 10.1111/cas.14911	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 Ohtaki Y, Shimizu K, Kawabata-Iwakawa R, Gombodorj N, Altan B, Rokudai S, Yamane A, Kaira K, Yokobori T, Nagashima T, Obayashi K, Nakazawa S, Iijima M, Kosaka T, Yajima T, Mogi A, Kuwano H, Shirabe K, Nishiyama M.	4. 巻 10(13)
2. 論文標題 Carbonic anhydrase 9 expression is associated with poor prognosis, tumor proliferation, and radiosensitivity of thymic carcinomas.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 1306-1319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26657	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 該当する

1. 著者名 Yan Fangxue, Li Jinyang, Milosevic Jelena, Petroni Ricardo, Liu Suying, Shi Zhennan, Yuan Salina, Reynaga Janice M., Qi Yuwei, Rico Joshua, Yu Sixiang, Liu Yiman, Rokudai Susumu, Palmisiano Neil, Meyer Sara E., Sung Pamela J., Wan Liling, Lan Fei, Garcia Benjamin A., Stanger Ben Z., Sykes David B., Blanco M. Andr?s	4. 巻 12
2. 論文標題 KAT6A and ENL Form an Epigenetic Transcriptional Control Module to Drive Critical Leukemogenic Gene-Expression Programs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 792 ~ 811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2159-8290.CD-20-1459	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 該当する

1. 著者名 Wang Herui, Li Bin, Asha Kulsum, Pangilinan Ryan L., Thuraisamy Asha, Chopra Harman, Rokudai Susumu, Yu Yong, Prives Carol L., Zhu Yan	4. 巻 297
2. 論文標題 The ion channel TRPM7 regulates zinc-depletion-induced MDMX degradation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101292 ~ 101292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101292	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 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Susumu Rokudai, Kyoichi Kaira, Daiki Tanaka, Eisuke Horigome, Michiru Fujieda, Yukihiro Otaka, Misaki Iijima, Yuji Kumakura, Kimihiro Shimizu, Tetsunari Oyama, Jun'ichi Tamura, Ken Shirabe, Carol Prives, Masahiko Nishiyama
2. 発表標題 Novel Biomarker and Development of Squamous Cell Carcinoma for and Development of Therapeutic Target
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 六代範, 田中大暉, 杉本明生, 堀込瑛介, 藤枝みちる, 熊倉祐二, 清水公裕, 調憲, 西山正彦
2. 発表標題 扁平上皮がんにおける新規p63結合分子STXBP4による腫瘍悪性化とがん分子行的薬の探索
3. 学会等名 第78回 日本癌学会(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 六代 範, 堀込瑛介, 田中大暉, 調憲, 桑野博行, 西山正彦
2. 発表標題 扁平上皮がんにおける新規p63結合分子STXBP4によるがん分子行的薬の探索
3. 学会等名 第23回 日本がん分子標的治療学会(国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Rokudai S.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 297-303
3. 書名 High-Throughput RNA Interference Screen Targeting Synthetic-Lethal Gain-of-Function of Oncogenic Mutant TP53 in Triple-Negative Breast Cancer (Reviews).	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Method for manufacturing peripheral nerve cells.	発明者 西山正彦, 六代範, 吉山伸司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-545754	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 iPS抹消神経細胞の製造方法	発明者 西山正彦, 六代範, 吉山伸司, 高橋寛之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6980211	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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			
米国	コロンビア大学			
米国	セントジョンズ大学			
米国	ペンシルバニア大学			
ベルギー	リエージュ大学			
米国	Columbia University			
米国	St John's University			
米国	University of Pennsylvania			
フランス	Mon Pellie University			