

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16315

研究課題名（和文）扁平上皮癌の進展におけるセロトニンシグナルの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of serotonin signaling in the progression of squamous cell carcinoma

研究代表者

岡崎 章悟（Okazaki, Shogo）

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・助教

研究者番号：20784044

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：口腔、食道、肺などの扁平上皮癌において高発現が認められるセロトニン受容体 HTR7 に着目し、その悪性腫瘍の進展に及ぼす影響の解析を行った。口腔扁平上皮癌細胞株において HTR7 をノックダウンすると、*In vivo*において、造腫瘍性の顕著な低下、未分化腫瘍細胞の減少が認められた。また、*In vitro*においては HTR7 のノックダウンによる細胞分化の促進が認められた。さらには HTR7 シグナル下流 Gタンパク質である G12 のノックダウンにおいても同様に細胞分化の促進が認められた。以上のことから、HTR7 は G12 シグナルを介して細胞分化を抑制することにより、扁平上皮癌の進展に寄与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床における有効な扁平上皮癌の治療法は限られており、さらなる新規治療法の開発が望まれる。本研究においては、セロトニン受容体 HTR7 が扁平上皮癌の分化を抑制することで、悪性腫瘍の進展に関わっていることが明らかとなった。HTR7 はすでに多くのアンタゴニストが開発されている受容体であり、本研究の成果により、これら HTR7 に対するアンタゴニストが扁平上皮癌に対する新規治療薬として応用できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the effect of the serotonin receptor HTR7, which is highly expressed in squamous cell carcinomas of the oral cavity, esophagus, and lung, on malignant tumor progression. Knockdown of HTR7 in oral squamous cell carcinoma cell lines resulted in a marked decrease in tumorigenicity and undifferentiated tumor cells *in vivo*. *In vitro*, knockdown of HTR7 promoted cell differentiation. Furthermore, knockdown of G12, a G protein downstream of HTR7 signaling, also promoted cell differentiation. These results indicate that HTR7 contributes to the progression of squamous cell carcinoma by suppressing cell differentiation through G12 signaling.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：扁平上皮癌 細胞分化 セロトニン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

扁平上皮癌は口腔、食道、肺、子宮頸などに生じる、重層扁平上皮に類似した組織像を特徴とする悪性腫瘍である。扁平上皮癌の治療としては、近年、食道癌や頭頸部癌などの扁平上皮癌においては抗EGFR抗体セツキシマブや抗PD-1抗体であるニボルマブの適応によって治療成績は向上しているものの未だ十分ではなく、新たな治療法の開発が求められている。本研究で着目したセロトニン受容体HTR7は主に神経科学領域においては機能解析が進められているが、悪性腫瘍における機能については不明であった。これまでの研究から、セロトニン受容体HTR7は、扁平上皮癌において高発現していること、また、その高発現が予後不良と相関することが明らかとなっていたため、本研究においては扁平上皮癌の進展におけるその機能について解析を行い、扁平上皮癌におけるHTR7の新規治療標的としての可能性の探索を行った。

### 2. 研究の目的

HTR7はGタンパク質共役型受容体(GPCR)に属するセロトニン受容体である。GPCRは重要な薬剤の標的分子であり、HTR7に対するアゴニスト、アンタゴニストについてもすでに多くの化合物が開発されている。また、HTR7はこれまでの解析から、口腔扁平上皮癌などの悪性腫瘍において高発現すること及びその発現が予後不良と相関することが明らかとなっていることから、HTR7は扁平上皮癌における新規治療標的として期待される。しかしながら、扁平上皮癌の進展におけるHTR7の機能は不明である。本研究では、癌新規治療標的としてのHTR7の可能性を評価するため、HTR7が腫瘍の進展に及ぼす影響の検討を行い、また、その腫瘍促進メカニズムの解明を目的として研究をおこなった。

### 3. 研究の方法

#### (1) HTR7が腫瘍成長に及ぼす影響の検討

HTR7が扁平上皮癌の腫瘍成長に及ぼす影響を検討するため、口腔扁平上皮癌細胞株HSC-2において、HTR7に対するshort-hairpin RNAを安定的に発現する細胞株(HSC-2-shHTR7)を樹立し、免疫不全マウス皮下への細胞移植を行った。その後、経時的に腫瘍体積の測定を行った。

#### (2) 腫瘍細胞分化制御に対するHTR7の影響の検討

未分化性は腫瘍における悪性度の指標の一つであることから、実験(1)の腫瘍組織を、未分化マーカーであるCD44vと分化マーカーであるInvolucrinの蛍光免疫染色による評価にて検討した。また、HTR7の分化への直接的な影響を検討するため、HSC-2-shHTR7細胞を用いて、接着制限培養によるin vitro分化誘導を行い、分化マーカーInvolucrin、Keratin 10のmRNA発現を定量した。

#### (3) HTR7による扁平上皮癌分化制御における下流シグナルの探索

HTR7が扁平上皮癌の未分化性を維持する下流シグナル探索のため、HTR7と共役するGタンパク質であるGsとG12の遺伝子発現量をThe Cancer Genome Atlas(TCGA)における口腔扁平上皮癌のデータセットを用いて解析した。また、G12が扁平上皮癌分化に及ぼす影響を検討するため、G12に対するshRNAを安定発現するHSC-2細胞株(HSC-2-shGNA12)を樹立し、接着制限培養によるin vitro分化誘導系を用い、分化マーカーInvolucrinとKeratin 10のmRNA発現を定量することにより解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) HTR7が腫瘍成長に及ぼす影響の検討

HTR7ノックダウン細胞HSC-2-shHTR7を免疫不全マウス皮下へ移植し、経時的に腫瘍体積の測定し、また、腫瘍細胞移植後32日後に腫瘍を取り出し、腫瘍重量を測定した。その結果、コントロールであるHSC-2-shControl細胞と比較し、HTR7ノックダウンによる顕著な腫瘍成長の抑制及び腫瘍重量の低下が認められた。また、一部の腫瘍においてはHTR7ノックダウンによる完全な退縮が認められた(図1A, B)。以上の結果より、HTR7は口腔扁平上皮癌の腫瘍成長を促進することが示された。

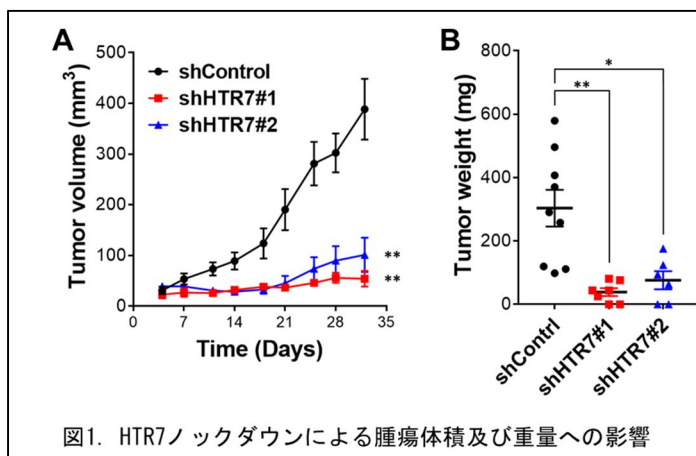


図1. HTR7ノックダウンによる腫瘍体積及び重量への影響

### (2) 腫瘍細胞分化制御に対する HTR7 の影響の検討

HTR7 による腫瘍成長の促進メカニズムを明らかとするため、(1)の腫瘍組織を用いて、腫瘍の進展及び悪性度における重要な指標の一つである、未分化性への影響を検討した。未分化マーカーである CD44v と分化マーカーである Involucrin の発現を蛍光免疫染色にて解析したところ、HTR7 のノックダウンにおいて、CD44v を発現する未分化腫瘍細胞の有意な減少が認められた (図 2A, B)。より詳細に HTR7 が扁平上皮癌細胞の分化に及ぼす影響を検討するため、接着制限培養による In vitro 分化誘導系による解析を行ったところ、コントロールと比較し、HTR7 のノックダウンにより、分化マーカー Keratin10 及び Involucrin の mRNA 発現の顕著な発現亢進が認められた (図 2C)。以上の結果より、HTR7 は扁平上皮癌の未分化性を維持することにより腫瘍の進展に寄与することが示唆された。

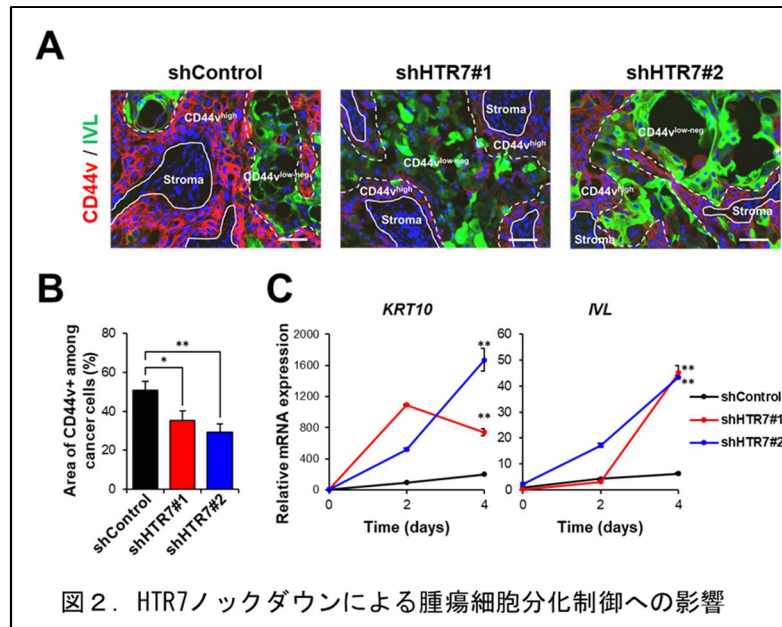


図 2. HTR7ノックダウンによる腫瘍細胞分化制御への影響

### (3) HTR7 による扁平上皮癌分化制御における下流シグナルの探索

HTR7 が扁平上皮癌の分化を制御するより詳細なメカニズムを解析するため、HTR7 の共役 G タンパク質である G<sub>s</sub>、G<sub>12</sub> と、HTR7 の発現の相関を TCGA の口腔扁平上皮癌データセットを用いて解析したところ、HTR7 と G<sub>12</sub> の mRNA 発現量に高い相関が認められ (図 3A) また、G<sub>12</sub> の高発現は予後不良と相関することも示された (図 3B)。そのため、HTR7 は G<sub>12</sub> シグナルを介して腫瘍細胞の分化を抑制していると考え、G<sub>12</sub> ノックダウン HSC-2 細胞を樹立し、(2) 同様に In vitro における分化誘導系

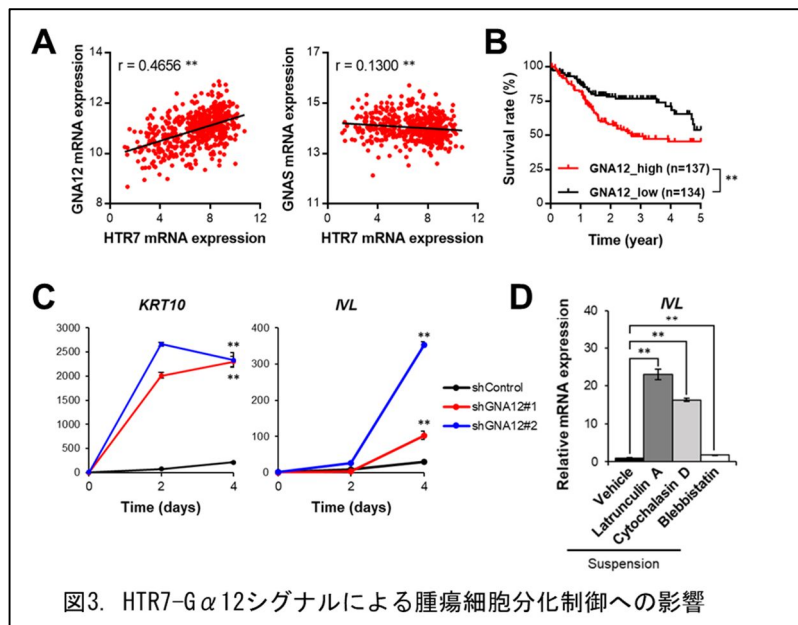


図 3. HTR7-G $\alpha$ 12シグナルによる腫瘍細胞分化制御への影響

を用いた腫瘍細胞分化への影響を検討した。その結果、shHTR7 と同様、shGNA12 においても分化マーカー Involucrin と Keratin10 の顕著な発現上昇が認められ、HTR7 が G<sub>12</sub> を介して扁平上皮癌の分化を抑制していることが示された (図 3C)。また、G<sub>12</sub> はアクチン動態制御に重要な Rho family タンパク質を活性化することから、HTR7-G<sub>12</sub> シグナルによるアクチン重合が分化抑制に寄与しているか検討を行うため、アクチン重合阻害剤である Latruncrin A, Cytochalasin D、また、Cortical actin の形成を阻害する Blebbistatin を用いて、扁平上皮癌細胞の分化に及ぼす影響を検討した。その結果、これらの薬剤はいずれも接着制限培養による分化マーカー Keratin10 の発現を亢進させた (図 3D)。これらの結果から、HTR7-G<sub>12</sub> シグナルはアクチン重合の促進を介して扁平上皮癌の分化を抑制していることが示唆された。

今回の結果より、HTR7-G<sub>12</sub> シグナルを標的とすることにより、扁平上皮癌に対する分化誘導療法の開発の可能性が示唆された。今後は HTR7-G<sub>12</sub> シグナルによる分化制御機構のより詳細な検討を行うとともに、HTR7 またはその関連シグナル分子を標的とした薬剤の解析を行うことで、扁平上皮癌分化誘導療法の開発を進める計画である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hayashi Natsumi, Yamasaki Akitaka, Ueda Shiho, Okazaki Shogo, Ohno Yoshiya, Tanaka Toshiyuki, Endo Yuichi, Tomioka Yoshihisa, Masuko Kazue, Masuko Takashi, Sugiura Reiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Oncogenic transformation of NIH/3T3 cells by the overexpression of L-type amino acid transporter 1, a promising anti-cancer target	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 1256 ~ 1270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.27981	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 Yamasaki Juntaro, Hirata Yuki, Otsuki Yuji, Suina Kentaro, Saito Yoshiyuki, Masuda Kenta, Okazaki Shogo, Ishimoto Takatsugu, Saya Hideyuki, Nagano Osamu	4. 巻 113
2. 論文標題 MEK inhibition suppresses metastatic progression of <i>KRAS</i> mutated gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 916 ~ 925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15244	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 Okita Kouki, Hara Yuta, Okura Hiroshi, Hayashi Hidemi, Sasaki Yoko, Masuko Sachiko, Kitadai Eri, Masuko Kazue, Yoshimoto Soshi, Hayashi Natsumi, Sugiura Reiko, Endo Yuichi, Okazaki Shogo, Arai Sayaka, Yoshioka Toshiaki, Matsumoto Toshiharu, Makino Yasutaka, Komiyama Hiromitsu, Sakamoto Kazuhiro, Masuko Takashi	4. 巻 112
2. 論文標題 Antitumor effects of novel mAbs against cationic amino acid transporter 1 (CAT1) on human CRC with amplified CAT1 gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 563 ~ 574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14741	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 Sugihara Eiji, Hashimoto Norisato, Osuka Satoru, Shimizu Takatsune, Ueno Sayaka, Okazaki Shogo, Yaguchi Tomonori, Kawakami Yutaka, Kosaki Kenjiro, Sato Taka-Aki, Okamoto Shinichiro, Saya Hideyuki	4. 巻 80
2. 論文標題 The Inhibitor of Apoptosis Protein Livin Confers Resistance to Fas-Mediated Immune Cytotoxicity in Refractory Lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4439 ~ 4450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-3993	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 Okita Kouki, Okazaki Shogo, Uejima Shinya, Yamada Erina, Kaminaka Hiroki, Kondo Misa, Ueda Shiho, Tokiwa Ryo, Iwata Nami, Yamasaki Akitaka, Hayashi Natsumi, Ogura Dai, Hirotsu Kenji, Yoshioka Toshiaki, Inoue Masahiro, Masuko Kazue, Masuko Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel functional anti-HER3 monoclonal antibodies with potent anti-cancer effects on various human epithelial cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 31 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.27414	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yuki Nakano, Ryo Goitsuka, Osamu Nagano, Hideyuki Saya, Shogo Okazaki
2. 発表標題 Serotonin receptor HTR7 regulates differentiation in oral squamous cell carcinoma.
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 Shogo Okazaki, Yuki Nakano, Momoko Yoshikawa, Tomoya Soma, Seiji Asoda, Ryo Goitsuka, Hideyuki Saya, Osamu Nagano
2. 発表標題 Transcription factor FOXA1 is a negative regulator for xCT-dependent tumor formation in oral cancer.
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 藤崎桂子、竹田深山、都留雅子、岡崎章悟、後飯塚僚
2. 発表標題 胎児期に発生・分化する RAG2発現履歴のある自然免疫細胞
3. 学会等名 第30回Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keiko Fujisaki, Miyama Takeda, Masako Tsuru, Shogo Okazaki, Shuhei Ogawa, Seiya Mizuno, Satoru Takahashi and Ryo Goitsuka
2. 発表標題 Postnatal behavior of fetal lymphoid cells identified with a novel Rag2 lineage tracing system.
3. 学会等名 第50 回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyama Takeda, Keiko Fujisaki, Masako Tsuru, Shogo Okazaki, Shuhei Ogawa, Seiya Mizuno, Satoru Takahashi and Ryo Goitsuka
2. 発表標題 The novel cell fate tracing system for fetal lymphoid cells with a history of Rag2 expression.
3. 学会等名 第50 回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野 友暉、後飯塚 僚、永野 修、佐谷 秀行、岡崎 章悟
2. 発表標題 Functional analysis of serotonin receptor HTR7 in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡崎 章悟、中野 友暉、後飯塚 僚、佐谷 秀行、永野 修
2. 発表標題 Role of FOXA1 in the progression of oral squamous cell carcinoma and xCT inhibitor sensitivity
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------