

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18738

研究課題名（和文）TPD52ファミリータンパクを介するスプラバシンのオートクライン機構の検索

研究課題名（英文）The autocrine mechanism of suprabasin via TPD52 family proteins

研究代表者

宮本 隼也（Miyamoto, Saya）

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：60867737

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）：申請者は口腔扁平上皮癌細胞（OSCC）に特異タンパクであるTPD52に結合し、細胞外に輸送される分泌タンパクとして、スプラバシン（SBSN）を見出した。SBSNは食道や皮膚などの上皮細胞同定された分泌タンパク質であるが、口腔扁平上皮癌細胞の増殖と転移に重要な役割を果たすことが知られている。そこで本研究では低酸素下の口腔扁平上皮癌細胞におけるSBSNの発現および機能について検索した。その結果、SBSNは低酸素状態化のOSCCの細胞死においてにおけるオートファジーを誘導するよりもむしろ細胞浸潤、血管新生を誘導することによって細胞死抵抗性に関与することが明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低酸素下の口腔扁平上皮癌細胞においては、SBSNは細胞浸潤、血管新生に重要な役割を果たすことが明らかとなった。この知見は口腔扁平上皮癌に対する化学療法において、新たな分子標的薬のターゲットを見出したことを意味する。ゆえに、本研究は口腔がん治療における一つのマイルストーンになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We discovered Suprabasin (SBSN) as a secreted protein that binds to TPD52, a protein specific to oral squamous cell carcinoma cells (OSCC), and is transported outside the cells. SBSN is a secreted protein identified in epithelial cells such as the esophagus and skin, and is known to play an important role in the proliferation and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells. Therefore, in this study, we investigated the expression and function of SBSN in oral squamous cell carcinoma cells under hypoxia. The results revealed that SBSN is involved in cell death resistance in hypoxic OSCC by inducing cell invasion and angiogenesis rather than inducing autophagy.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平上皮癌 低酸素 スプラバシン 血管新生 細胞浸潤 アポトーシス オートファジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### TPD ファミリータンパクについて

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、既知あるいは未知のタンパクの細胞外分泌に関与していること、さらには、この細胞外分泌機構は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、他の既知あるいは未知の細胞質内タンパクとホモ/ヘテロ二量体を形成し、細胞内輸送、細胞膜融合、および、オートクラインに関与することで、結果的に、癌細胞の増殖・浸潤・転移を促進す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)。申請者が所属する研究室 (以下、「当講座」と記す) 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、この研究を発展させ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* 実験によって、口腔扁平上皮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、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)。しかしながら、TPD52 ファミリータンパクが結合し、その分泌を調整される他のターゲットタンパクの同定は、現在のところ明らかとなっていない。

#### スプラバシン (SBSN) について

スプラバシン (SBSN) は2002年に Park らによって分化ケラチノサイトで発現する新規遺伝子として単離され、その一次分子構造はN末端にシグナルペプチドを持つ61 kDa の糖タンパクである (Park et al. *J Biol Chem.* 2002)。また、SBSN が高侵襲性膠芽腫細胞 (Formolo et al. *J Proteome Res.* 2011)、唾液腺悪性腫瘍である腺様嚢胞癌細胞 (Shao et al. *PLoS One.* 2012) および、食道扁平上皮癌細胞 (Wu et al. *Sci Rep.* 2016) において高度に発現している。これらの悪性腫瘍細胞に SBSN を強制発現させると、細胞の増殖能および、浸潤能が著しく増加することが報告されている (Wu et al. *Sci Rep.* 2016)。これらの報告は扁平上皮癌を含む癌細胞の悪性化 (増殖、浸潤、転移など) に SBSN が重要な役割を果たしていることが示唆されているが、その詳細はほとんど明らかになっていない。さらには、SBSN は分泌タンパクであるにも関わらず、その細胞内輸送機構、分泌機構や、受容体なども、申請者が知りうる限り、まったく不明である。

### 2. 研究の目的

SBSN は OSCC を含む様々な癌の有望なバイオマーカーとなる可能性がある。しかし、腫瘍細胞が適応の過程で異なる反応を示すことが知られている低酸素状態における SBSN と癌の関係を示す研究はほとんどなかった。そこで、本研究では、SBSN が低酸素状態の腫瘍細胞に影響を与える可能性があるという仮説を立て、そのような状態における OSCC におけるその役割を検索した。

### 3. 研究の方法

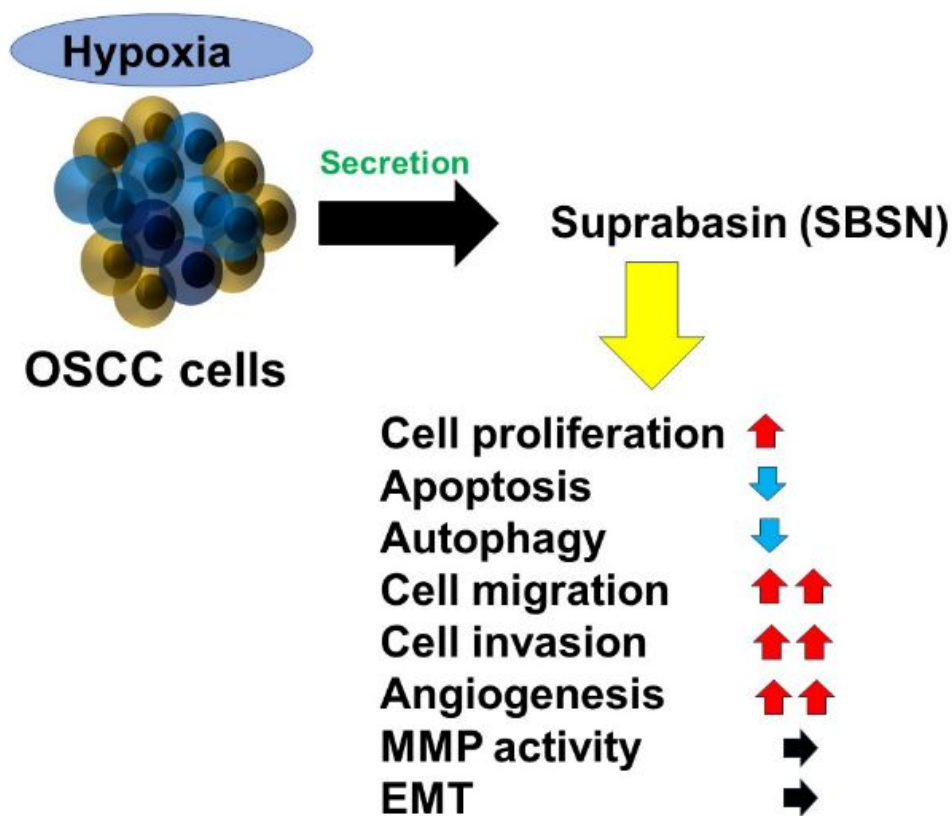
ヒト正常角化細胞 (NHEK) およびヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (SAS 細胞, HSC-3 細胞および HSC-4 細胞) を2%の酸素分圧に暴露し、低酸素下における SBSN 遺伝子およびタンパク質の発現を検索した。次いで、SAS 細胞において SBSN をノックダウンおよび強制発現することによって、低酸素下におけるオートファジー、アポトーシス、細胞浸潤、血管新生、遊走能に対する役割を検索した。

### 4. 研究成果

低酸素は、OSCC 細胞および正常ヒト表皮ケラチノサイト (NHEK) において SBSN mRNA およびタンパク質発現を誘導し、この観察結果は SAS 細胞で最も顕著であった。次に、SAS 細胞における SBSN の機能を、MTT、BrdU、クリスタルバイオレット細胞染色、細胞周期、カスパーゼ 3/7、浸潤、遊走、および管形成アッセイ、ならびにゼラチンゼイモグラフィーを使用して分析した。MTT アッセイでは、SBSN の過剰発現が MTT 活性を低下させることが示されたが、BrdU および細胞周期アッセイの結果は、細胞増殖の増加を示唆した。さらに、細胞周期アッセイも BrdU アッセイと同様の結果を示した。さらに、サイクリン関連タンパク質のウェスタンブロット法では、サイクリン経路の関与が示唆された。対照的に、カスパーゼ 3/7 アッセイおよび p62 と LC3 のウェスタンブロットティングは、SBSN がアポトーシスとオートファジーを抑制する可能性があることを示した。さらに、SBSN は正常酸素状態よりも低酸素状態の方が細胞浸潤を顕著に増加させ、

これらの効果はマトリックスメタロプロテアーゼ活性や上皮間葉転換ではなく、細胞移動の増加から生じた。さらに、SBSN は正常酸素状態よりも低酸素状態の方が血管新生をより強く誘導した。RT-qPCR は、血管内皮増殖因子 (VEGF) mRNA が SBSN VEGF のノックダウンまたは過剰発現によって変化しないことを示し、VEGF が SBSN の下流に位置していないことを示唆した。したがって、本研究では、低酸素状態における OSCC 細胞の生存、増殖、浸潤、血管新生における SBSN の重要性を実証した。

なお、本研究の結果は、Oncology Reports に掲載されている (DOI: 10.3892/or.2023.8520)。また、本研究の graphical abstract を以下に示す。



**SBSN plays an important role in inducing invasion and angiogenesis of OSCC cells under hypoxia**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Houri Asami, Mukudai Yoshiki, Abe Yuzo, Watanabe Masataka, Nara Maki, Miyamoto Saya, Kurihara Mai, Shimane Toshikazu, Shirota Tatsuo	4. 巻 49
2. 論文標題 Suprabasin enhances the invasion, migration, and angiogenic ability of oral squamous cell carcinoma cells under hypoxic conditions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2023.8520	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 棕代義樹、祝部亜紗美、安部勇蔵、栗原舞、渡邊匡崇、奈良真希、金田一和香、宮本装也、嶋根俊和、代田達夫
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞においてスプラバシンは低酸素下における細胞浸潤・血管誘引を増強する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Asami Noro, Yoshiki Mukudai, Yuzo Abe, Tatsuo Shirota
2. 発表標題 Suprabasin enhances the invasion, migration, and angiogenic ability of oral squamous cell carcinoma cells under hypoxic conditions
3. 学会等名 25th International Conference on Oral Maxillofacial Surgery（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 祝部亜紗美、棕代義樹、渡邊匡崇、安部勇蔵、小橋舞、代田 達夫
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞においてスプラバシンは低酸素下で細胞浸潤・血管誘引を増加させる
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会（国際学会）
4. 発表年 2022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
研究協力者	代田 達夫 (Shirota Tatsuo) (60235760)	昭和大学・歯学部・教授  (32622)	
研究協力者	祝部 亜紗美 (Houri Asami)		
研究協力者	安部 勇蔵 (Abe Yuzo) (30909833)	昭和大学・歯学部・助教  (32622)	
研究協力者	栗原 舞 (Kurihara Mai) (80908327)	昭和大学・歯学部・助教  (32622)	
研究協力者	椋代 義樹 (Mukudai Yoshiki) (50325099)	昭和大学・歯学部・講師  (32622)	

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