

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460472

研究課題名(和文)細胞増殖、分化、がん化におけるTsc-22ファミリータンパク質の役割

研究課題名(英文) Roles of Tsc-22 family proteins in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis

研究代表者

鈴木 裕之 (Suzuki, Hiroyuki)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70375509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はTHG-1(Tsc22D4)の機能を解析する過程で、THG-1が扁平上皮がんを発現することを見出した。そこで皮膚角化細胞にTHG-1を発現させたところ、EGFによる細胞形態の変化、及び増殖、運動性が亢進することが認められた。さらにTHG-1はEGFR-Ras-ERK経路によってリン酸化され、腫瘍形成の促進に重要な役割を果たすことが明らかになった。以上よりTHG-1は、扁平上皮がんの新規がん遺伝子として機能することが明らかになった。今後はTHG-1のがん化における役割を明らかにし、さらに抗リン酸化THG-1抗体を用いた新規がんの診断法の開発に結びつけていきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Carcinoma cells exhibit a high level of robustness against environmental stresses, metabolic disorders and therapeutic efforts. Here, we provide a novel mechanism of the squamous cell carcinoma development by THG-1, a Tsc-22 family protein. THG-1 localized in the basal layer of normal squamous epithelium and overexpressed in squamous cell carcinomas. THG-1 knockdown suppresses the cell proliferation, invasiveness and tumorigenicity. THG-1 is phosphorylated by the receptor tyrosine kinase-Ras-ERK pathway, which is required for oncogenic Ras-mediated tumorigenesis. Furthermore, THG-1 interacts with several factors that regulate the cell proliferation, cytoprotection, metabolism and microenvironment. Our results highlight the pivotal role of THG-1 as a novel regulator of tumorigenesis under the oncogenic signaling pathway.

研究分野：がんの生物学

キーワード：THG-1 扁平上皮がん EGF Ras

1. 研究開始当初の背景

皮膚や食道は重層化した上皮細胞によって微生物感染、物理的刺激や水分の喪失から組織を防御する重要な役割を果たしている。そしてその構成細胞は常に更新され、絶妙なバランスで一定の細胞数を維持することで組織の恒常性が保たれている。構成細胞は基底部に存在する幹細胞が非対称分裂を行うことで供給され、それらが有棘層、顆粒層に移動するに伴い増殖を止めて分化する。そして角質層で最終分化を行い、細胞は死んで垢として剥がれおちる。しかしながらこのような重層扁平上皮の構築が、どのような機構で行われているのかは不明な点が多い。また重層扁平上皮を主な起源とする扁平上皮がんは、食道、皮膚、肺、頭頸部などに認められ、腺がんに次いで多いがんである。近年がんの発生には、その組織幹細胞に変異が蓄積することで、がん幹細胞が発生することが重要であると考えられており、組織構築機構の解明とともに注目されている。さらに近年大規模ながんのゲノム解析により、扁平上皮がんでは異常を起こしている遺伝子が明らかにされているが、扁平上皮がんの特徴を規定する分子メカニズムについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

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し、さらに扁平上皮がんでは THG-1 の機能獲得型変異を見出した。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、変異を標的にした分子腫瘍マーカーの開発、及びがん治療への応用を目指す。

3. 研究の方法

【細胞培養】

ヒト胎児腎細胞株 293T、ヒト角化細胞株 HaCaT、食道がん細胞 TE13 は 10%FBS、penicillin streptomycin solution を添加した DMEM を用いて 37℃、5% CO₂ の条件下で培養した。

【遺伝子導入】

HaCaT-THG-1 安定発現株は、HaCaT 細胞に pCAGIP-FLAG-THG-1 を導入し、導入細胞を 1 µg/ml の puromycin で選択した。増殖したコロニーをクローニングし、抗 FLAG 抗体を用いて発現細胞を選択した。

【THG-1 リン酸化部位の同定】

FLAG-THG-1 発現ベクターのセリン、スレオニンに変異をいれて、THG-1 のリン酸化が起きるかを検討して THG-1 のリン酸化部位を同定した。

【リン酸化 THG-1 特異的抗体の作成】

同定したリン酸化部位を含むペプチドを合成し、Balb/c マウスに免疫した。得られた脾臓細胞をミエローム細胞に融合させ、リン酸化 THG-1 を認識し、リン酸化されていない THG-1 を認識しないモノクローナル抗体をスクリーニングした。得られた中から、No.21-9 抗体は免疫組織化学に、No.18-2 はウェスタンブロットに適した抗体であることが明らかになった。

【蛍光免疫染色法】

カバーガラスを入れた 6well dish に、細胞を 2×10^4 cells で撒き、24 時間培養した。Dish から細胞培養液を除去し、PBS で洗浄した後、3.7% formaldehyde/PBS で 10 分間固定した。PBS で 10 分、3 回洗浄後、1% BSA in 0.3% Triton X-100/PBS で 25 分間ブロックし、1次抗体を室温で 1 時間反応させた。その後、PBS で 5 分、4 回洗浄後、2次抗体を室温で 1 時間反応させた。反応後、PBS で 5 分、4 回洗浄後、蒸留水で 2 回洗浄し、封入剤を用いてスライドガラス上に封入した。

【免疫不全マウスでの腫瘍形成能の解析】

2×10^7 の細胞を、ヌードマウスに移植した。移植 2 ヶ月後に腫瘍を回収し、大きさ、重さを測定した。さらにパラフィン切片を作製して、抗 THG-1 抗体で免疫染色を行った。

【THG-1 ノックアウトマウスの作製と解析】

THG-1 の生理的な役割を解析するため、THG-1 ノックアウトマウスの作製を行った。THG-1 遺伝子座に相同組み換えを起こした ES 細胞は KOMP (Knockout Mouse Project) から入手し、筑波大学動物資源センターでキメラマウスを作製した。

4. 研究成果

【THG-1 リン酸化の役割】

これまでの研究により、THG-1 は EGF による細胞形態の変化、及び増殖、運動性が亢進する。さらにコラーゲンゲル上で表皮構造を構築させたとこ、THG-1 発現細胞では有棘層や顆粒層への分化が抑制されることを見出した。さらに THG-1 は EGF 処理により高分子両側にそのバンドがシフトすることが明らかになった。このバンドシフトは phosphatase 処理によって消失したことから、THG-1 は EGF 処理によりリン酸化されることが明らかになった。さらに THG-1 のリン酸化を誘導する EGF シグナル伝達について検討したところ、THG-1 は Ras-Raf-MEK-ERK 経路で

リン酸化されることが明らかになった。

さらに我々はTHG-1リン酸化部位を同定するため、種々の変異体を用いて検討したところ、複数のリン酸化部位がリン酸化されることが明らかになり、興味深いことにそのうちの1カ所のアミノ酸に変異をいれるとTHG-1のリン酸化が起こらなくなることが明らかになった。そこでヒト角化細胞 HaCaT に、RasG12V、RasG12V-THG-1(WT 野生型)、RasG12V-THG-1(SA リン酸化されない変異型)を発現させ、腫瘍形成能について検討したところ、野生型 THG-1 は Ras による腫瘍形成を増強したのに対し、リン酸化されない THG-1 変異型では抑制することが明らかになった。以上のことから THG-1 のリン酸化は Ras シグナルによる腫瘍形成の促進に重要な役割を果たすことが明らかになった。

【抗 THG-1 リン酸化抗体の樹立】

THG-1 のリン酸化を検出することを目的として、抗リン酸化 THG-1 抗体の作製を試みた。同定したリン酸化部位を含むペプチドを合成し、Balb/c マウスに免疫し、得られた脾臓細胞をミエロマ細胞に融合させ、モノクローナル抗体を作製した。得られた中から、No.21-9 抗体は免疫組織化学に、No.18-2 はウェスタンブロットに適した抗体であることが明らかになった。

【THG-1 の EGF による細胞内局在】

HaCaT-THG-1 細胞で、EGF の存在下における抗リン酸化 THG-1 抗体の細胞局在について検討した。リン酸化 THG-1 は EGF 非存在下では認められないが、EGF 処理 5 分後に、その局在は細胞質、及びラフリングを起こした細胞膜への局在変化が認められた。このことから THG-1 は細胞質またはラフリング膜で機能することが示唆された。

【リン酸化 THG-1 抗体による組織染色】

No.21-9 抗体を用いて免疫組織化学により、リン酸化 THG-1 の腫瘍での発現について検討した。組織アレイを用いて、肺、食道がんを中心に検討したところ、約7割のがんでリン酸化 THG-1 の発現が認められ、その局在は主に細胞質、細胞膜であった。リン酸化 THG-1 の発現が扁平上皮がんの悪性化や予後に関係するのは今後の検討課題である。

【THG-1 ノックアウトマウスの作製と解析】

得られたキメラマウスの交配を進め、ノックアウトマウスを得ることに成功した。ノックアウトマウスは正常に発生し、外見上の違いは認められなかった。現在ノックアウトマウスの経時的な変化について解析を進めている。また化学発がん剤による皮膚発がんへの感受性、及び発生した皮膚病変の病理組織学的な解析を進めている。

以上より THG-1 は、扁平上皮がんの新規がん遺伝子として機能することが示唆された。今後、THG-1 の重層扁平上皮の増殖、分化、がん化における役割を明らかにし、さらに抗リン酸化 THG-1 抗体を用いた新規がんの診断法の開発、及び THG-1 が制御する経路を標的にした新規治療法の開発に結びつけていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

1. beta-Cell-Specific Mafk Overexpression Impairs Pancreatic Endocrine Cell Development. Abdellatif AM, Oishi H, Itagaki T, Jung Y, Shawki HH, Okita Y, Hasegawa Y, Suzuki H, El-Morsy SE, El-Sayed MA, Shoaib MB, Sugiyama F, Takahashi S. PLoS One. 2016 Feb 22;11(2):e0150010. (査読有)

2. Transforming growth factor-beta induces transcription factors MafK and Bach1 to suppress expression of the heme oxygenase-1 gene. Okita Y, Kamoshida A, Suzuki H, Itoh K, Motohashi H, Igarashi K, Yamamoto M, Ogami T, Koinuma D, Kato M. J Biol Chem. 2013 Jul 12;288(28):20658-67. (査読有)

〔学会発表〕(計14件)

1) 鈴木裕之
扁平上皮がんの発生病理
第104回日本病理学会総会 国際センター
(仙台市) 2016年5月13日

2) Suzuki H
Roles of THG-1/Tsc22D4 in squamous cell carcinoma development
Tsukuba-UCI Science Partnership Conference California, USA, 2015年12月9日

3) 鈴木裕之
Tsc-22 ファミリータンパク質の腫瘍化における役割
第61回日本病理学会秋期特別総会 東京大学(東京都) 2015年11月5日

4) Suzuki H
Roles of THG-1/Tsc22D4 in squamous cell carcinoma development
第74回日本癌学会総会 名古屋国際会議場(名古屋市) 2015年10月9日

5) Suzuki H
Roles of THG-1/Tsc22D4 in squamous cell carcinoma development
TGF-beta meeting Uppsala, Sweden 2015

年 8 月 22 日

6) Suzuki H

Roles of THG-1/Tsc22D4 in squamous cell carcinoma development (招待講演)

Joint International Symposium on TGF-beta family and Cancer Tsukuba, つくば国際会議場(つくば市) 2015 年 1 月 12 日

7) 鈴木裕之

細胞増殖、分化、がん化における Tsc-22 ファミリー分子の役割

第 103 回日本病理学会総会 広島国際会議場 (広島市) 2014 年 4 月 25 日

8) Suzuki H

Roles of Tsc-22 family proteins in tumor development

第 73 回日本癌学会総会 パシフィコ横浜(横浜市) 2014 年 9 月 26 日

9) Suzuki H

Hypoxia and oxidative stress resistance in squamous cell carcinoma (招待講演)

Annual meeting of Hypoxia, Jakarta, Indonesia 2014 年 11 月 21 日

10) Suzuki H

Roles of THG-1/Tsc22D4 in tumor development TGF-beta meeting Leiden, Netherland, 2014 年 5 月 9 日

11) 鈴木裕之

細胞増殖、分化、がん化における Tsc-22 ファミリー分子の役割

第 102 回日本病理学会総会 ロイトン札幌 (札幌市) 2013 年 6 月 8 日

12) Suzuki H

Roles of THG-1/Tsc22D4 in tumorigenesis

TGF-beta meeting Uppsala, Sweden, 2013 年 5 月 31 日

13) 鈴木裕之

細胞増殖、分化、がん化における Tsc-22 ファミリー分子の役割

第 32 回 分子病理研究会 竹林院群芳園(吉野町) 2013 年 7 月 20 日

14) Suzuki H

Roles of Tsc-22 family proteins in tumorigenesis

第 72 回日本癌学会総会 パシフィコ横浜(横浜市) 2013 年 10 月 2 日

{その他}

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/younginit/s>

[uzuki/Top.html](http://www.md.tsukuba.ac.jp/epatho/uzuki/Top.html)

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/epatho/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 裕之 (SUZUKI HIROYUKI)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70375509