

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19580

研究課題名(和文) 扁平上皮がんのマスターレギュレーターTSC22D4/THG-1の研究と医薬品開発

研究課題名(英文) Master Regulator of squamous cell carcinoma TSC22D4/THG-1 and its application for medical development

研究代表者

加藤 光保 (Kato, Mitsuyasu)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20194855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：Transforming Growth Factor 1-stimulated clone 22 domain family 4 (TSC22D4)/ TSC22 Homologous Gene-1 (THG-1)が、扁平上皮がんの発生に共通に関与する組織特異的ながん遺伝子であることを示し、その扁平上皮がん発生に関する分子機構を明らかにするとともに、この分子に特異的に結合する特殊環状ペプチドを取得し、新たな治療方法の開発につながる研究を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚がん、頭頸部がん、喉頭がん、食道がん、子宮頸がんのほとんどと肺がんのおよそ20%は、扁平上皮がんという共通の組織型を示す予後不良ながんである。また、頭頸部がんや喉頭がんは、手術による患部の摘出により著しくQOLが低下するため、手術に頼らない治療方法の確立が強く望まれている。本研究は、扁平上皮がんの発生に共通に関与する分子機構を明らかにし、これを標的とする治療の開発につながる基礎研究を行なったことで社会的に大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：Transforming Growth Factor 1-stimulated clone 22 domain family 4 (TSC22D4)/ TSC22 Homologous Gene-1 (THG-1) is highly expressed and commonly involved in squamous cell carcinoma (SCC) as a tissue specific oncogenic molecule. We have examined the molecular mechanism how THG-1 develop SCC. We also obtained THG-1-binding non-standard macrocyclic peptides, which may be applicable for the development of novel SCC therapy in the future.

研究分野：実験病理学、腫瘍学

キーワード：TSC22D4/THG-1 扁平上皮がん NRF2 HIF1 -catenin SALL4 特殊環状ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚がん、頭頸部がん、喉頭がん、食道がん、子宮頸がんのほとんどと肺がんのおよそ20%は、扁平上皮がんという共通の組織型を示す。この組織型のがんは進行すると治療抵抗性が強く、集学的治療を行ってもいまだ予後不良ながんである。また、頭頸部がんや喉頭がんは、手術による患部の摘出により著しくQOLが低下するため、手術に頼らない治療方法の確立が強く望まれている。

2. 研究の目的

Transforming Growth Factor β 1-stimulated clone 22 domain family 4 (TSC22D4)/ TSC22 Homologous Gene-1 (THG-1)が、扁平上皮がんの発生に共通に関与する組織特異的ながん遺伝子であることを示す研究結果を得て、TSC22D4/THG-1による扁平上皮がん発生の分子機構を明らかにするとともに、この分子を標的とする環状ペプチド等を用いた治療方法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

THG-1の生理機能と発がんをもたらす分子機構を明らかにし、これを標的とする治療方法を開発することを目的として、以下(1)-(4)の実験研究を行った。

- (1) 【ロックアウトマウスを用いたTHG-1の生理機能と発がんにおける意義に関する研究】独自に作製したTHG-1ロックアウトマウスの表現型を病理学的に解析して、正常組織におけるTHG-1の機能を解析する。
- (2) 【作用機序の解明】TOF/MS解析で同定したTHG-1結合分子について、発がんにおけるその作用機序を解析する。発がんに関与することが予測される5つの標的分子に関する解析を行い、THG-1は重層扁平上皮を形成する角化細胞の幹細胞性と増殖を制御するマスターレギュレーターであることを示す。候補標的分子の過剰発現、ノックダウン、ノックアウト、それぞれの結合部位に変異を入れたTHG-1が細胞増殖促進活性、スフェア形成誘導活性、腫瘍形成促進活性に及ぼす作用を検討する。
- (3) 【TSC22/THG-1に結合する環状ペプチドの開発】THG-1に特異的に結合する特殊環状ペプチドを菅らによって開発されたRaPID法を用いてスクリーニングする。得られたペプチドをペプチド合成機で合成し、*in vitro*でTHG-1への結合を解析するとともに、発がんに関与する標的分子への結合の阻害活性を検討する。
- (4) 【環状ペプチド細胞内送達法の開発】THG-1結合環状ペプチドの結合能に影響しない種々の誘導体を作製し、血中安定性と細胞膜透過性を向上させたペプチドを開発する。引き続きTHG-1結合能に影響しない環状ペプチドの種々の誘導体を作製し、ヒトがん細胞の移植モデルと化学発がん実験で発がん抑制活性を確認して、血中安定性や細胞膜透過性を向上させたペプチドを開発する。

4. 研究成果

(1) THG-1ロックアウトマウスは正常マウスと同様に誕生し成長して、妊孕性にも問題がなかった。これを組織学的に解析し、表皮の低形成があることを示した。また、扁平上皮がん細胞でTHG-1をノックダウンあるいはノックアウトすると細胞増殖、スフェア形成、腫瘍形成が抑制され、細胞老化が促進した。THG-1ロックアウトマウスを用いて、皮膚の化学発がん実験を行い、皮膚における扁平上皮がんの発生におけるTHG-1の役割についてさらに検討を進めている。

(2) THG-1の作用機序として、種々のタンパク質に結合してその機能を制御することが明らかになった。まず第一に、THG-1はKEAP1に対してNRF2と競合的に結合することでNRF2の分解を抑制し、NRF2活性を亢進して、種々のストレス耐性の向上や糖代謝の変化を誘導した。また、他のTHG-1結合分子を介する作用の例として、PHD2を介するHIF1 α の制御、NRBPを介する β -catenin、RAF、SALL4の制御機構に関する研究を行った。THG-1は、PHD2に特異的に結合し、PHD2によるHIF1 α の水酸化を抑制することでHIF1 α のタンパク質分解を抑制し、HIF1 α の機能を通常の酸素濃度下でも活性化することが示された。また、THG-1はNRBPに結合することで、 β -cateninと競合し、NRBP/Elongin複合体による β -cateninの分解を抑制することで β -cateninシグナルを活性化することが示された。 β -cateninの分解系としては、大腸がんの発生に関与するAPC複合体の働きが良く知られているが重層扁平上皮では、NRBP/Elongin複合体が主要な β -catenin分解系として機能しておりTHG-1はこの系に競合することで扁平上皮癌におけるWNT非依存的な β -catenin活性化に関与していることが示された。THG-1は、発がんに関与することが示唆される他の標的分子を制御していることを示すデータも蓄積され、重層扁平上皮発生の角化細胞の幹細胞性と増殖を制御するマスターレギュレーターであることを示唆する結果となっている。また、これらの分子機構により、扁平上皮がん細胞の細胞増殖促進活性、スフェア形成誘導活性、腫瘍形成能に関与することも示された。これらの研究成果は現在、複数の原著論文にまとめて投稿中である。

(3) THG-1に特異的に結合する特殊環状ペプチドを菅らによって開発されたRaPID法を用いて取得した。得られたペプチドを化学合成し、抗体に匹敵する特異的で強い結合性を示し、蛍光分子

をラベルして蛍光染色によるTHG-1の特異的な検出を行うことも可能であることを示した。また、ELISA法のようにTHG-1を定量的に検出することにも応用できた。これらの成果は論文にまとめ、現在投稿中である。

(4) THG-1結合ペプチドと膜透過ペプチドと結合させて、ヘテロ2量体ペプチドを作製したところ、培養細胞の細胞膜を透過し、あまり強くはないが、THG-1の機能を少なくとも一部抑制し、細胞増殖速度を優位に低下させた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- 1) Zheng L, Suzuki H, Nakajo Y, Nakano A, ***Kato M.** Regulation of c-MYC transcriptional activity by transforming growth factor-beta 1-stimulated clone 22. **Cancer Sci.** 2018 Feb; 109:395-402. doi: 10.1111/cas.13466. Epub 2018 Jan 9. PMID: 29224245 (査読有)
- 2) Tran STP, Hipolito CJ, Suzuki H, Xie R, Kim-Tuyen HD, Dijke P, Terasaka N, Goto Y, Suga H, ***Kato M.** Generation of non-standard macrocyclic peptides specifically binding TSC-22 homologous gene-1. **Biochem Biophys Res Commun.** *in press.* (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

- 1) Ling Zheng, Hiroyuki Suzuki and Mitsuyasu Kato. THG-1, a novel oncogene in tumor angiogenesis. 第41回日本分子生物学会年会, 2018
- 2) **Kato M.** How do dormant cancer cells grow? TGF-beta meeting 2017, Uppsala, Sweden, 2017.
- 3) 鄭齡, 鈴木裕之, 加藤光保. THG-1はHIF-1 α 安定化を介して腫瘍の血管新生を促進する. 第76回日本癌学会学術総会, 2017.
- 4) 鈴木裕之, 加藤光保. THG-1/TSC22D4とその結合タンパク質による腫瘍化の制御機構. 第76回日本癌学会学術総会, 2017.
- 5) Rudy Xie. Kringle-like domain is essential in GPNMB-induced breast cancer formation. 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：鈴木裕之

ローマ字氏名：Hiroyuki Suzuki

研究協力者氏名：ヒポリト, クリストファー ジョン

ローマ字氏名：Christopher John Hipolito

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。