



Title 論文題目	Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 1 accelerates cell proliferation by targeting c-Myc in liver cancer cells  (STEAP1はc-Mycを介し肝細胞癌細胞の増殖を亢進させる)
Author(s) 著者	飯島, 一飛
Degree number 学位記番号	甲第3151号
Degree name 学位の種別	博士(医学)
Issue Date 学位取得年月日	2022-03-31
Original Article 原著論文	Oncol Lett. 2021 Jul;22(1):546
Doc URL	
DOI	10.3892/ol.2021.12807
Resource Version	Author Edition

## 学位論文の内容の要旨

報告番号	甲第 1515 号	氏名	飯島 一飛
<b>論文題名</b> Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 1 accelerates cell proliferation by targeting c-Myc in liver cancer cells STEAP1 は c-Myc を介し肝細胞癌細胞の増殖を亢進させる			
<b>&lt;研究目的&gt;</b> 肝細胞癌(HCC)は、世界でがん死亡原因の第3位であり、毎年約83万人のHCC患者が死亡している。近年、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤が臨床導入されたが、未だ進行HCC患者の予後は不良であり、より効果的な治療法の開発が急務である。新規治療法開発のためには、HCCの分子生物学的特性を探ることが重要である。 オンコプロテインであるc-Mycは、HCCを含む様々な癌の病態形成に関与している。c-Mycの過剰発現はHCC患者の予後不良因子であることが明らかにされている。したがって、c-MycはHCCの治療標的分子として注目されてきたが、核内に局在していることおよびその立体構造の特徴のためc-Myc阻害剤の開発は困難を極めている。 Six-transmembrane epithelial antigen of prostate 1 (STEAP1)は前立腺癌で同定され、正常細胞ではその発現は低いが多く癌細胞で過剰発現している細胞表面蛋白質である。最近、我々は大腸癌細胞でSTEAP1が過剰発現しており、NF-E2関連因子(NRF2)経路を介し活性酸素種(Reactive oxygen species; ROS)産生を抑制することで大腸癌細胞のapoptosis回避に寄与していることを見出している。しかしながら、HCCの病態生理におけるSTEAP1の役割は未だ不明である。 上記に基づき、本研究ではHCCにおけるSTEAP1の発現量およびその発現多寡と予後との関連を解析し、STEAP1がHCC細胞の増殖に与える影響やその機序を検討することで、将来的な新規HCC治療戦略の開発を目指した。			
<b>&lt;研究方法&gt;</b> 1) 肝細胞癌におけるSTEAP1の発現および予後との関連の検討 複数の独立したGene Expression Omnibus(GEO)のデータセット(GSE14520, GSE36376)を用いて、患者の非癌組織およびHCC組織におけるSTEAP1の発現多寡をin silicoで解析した。さらに、STEAP1の発現とHCC患者の予後との関係について、データセットのGSE14520とThe Cancer Genome Atlas Program(TCGA)を用いて、Receiver Operating Characteristic(ROC)曲線を作成し設定したカットオフ値により、STEAP1の発現多寡			

で患者を 2 群に割り付け、STEAP1 の発現と全生存期間(Overall survival: OS)との関連について Kaplan-Meier 法により解析した。

## 2) STEAP1 が細胞増殖に与える影響およびその機序の解析

HCC 細胞株(HepG2, Hep3B)において、それぞれ配列の異なる 2 種類の siRNA を用いて STEAP1 を knock-down(K/D)し、細胞増殖に与える影響について transfection から 0h, 24h, 48h, 96h の各時点において WST-1 アッセイを行い、吸光度に基づいた増殖曲線を作成し検討した。K/D 効率に関しては、transfection から 72h の時点で RT-qPCR 法および Western blot 法(WB)を行い評価した。さらにその機序を検討するため、それぞれの HCC 細胞株で STEAP1 を siRNA を用いて K/D し、transfection から 72h 後に細胞周期の各期の割合および apoptosis の割合を flow cytometry で解析した。さらに、細胞周期関連タンパク質について WB で評価した。

## 3) STEAP1 の下流に存在するシグナル伝達経路の同定

STEAP1 の下流に存在するシグナル伝達経路を明らかにするため、まず GEO2R の HCC 患者のデータセット(GSE14520-GPL3921)を用いて、STEAP1 の高発現群と低発現群に分け、それぞれ発現変動遺伝子(Differentially Expressed Genes; DEGs)を抽出した。さらに Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)を用い、STEAP1 によって制御される遺伝子について検討し、STEAP1 の発現と相関のある分子について GEO のデータセット(GSE14520, GSE36376)と TCGA において in silico で解析を行った。さらに、HepG2, Hep3B において STEAP1 の K/D 後に認められる上記分子の発現を RT-qPCR 法と WB で評価し、PCR array でシグナル伝達経路を構成する各種分子についてその発現を評価した。

## 4) 統計学的検討

統計学的有意差検定は Student t test, Mann-Whitney U-test, log-rank test, one-way ANOVA とそれに続く Bonferroni's post-hoc test を用いて行い、相関分析は Pearson の相関分析で行った。P < 0.05 をカットオフ値とした。

## <研究成績>

### 1) STEAP1 は HCC において過剰発現しており、その過剰発現は予後不良因子である

2 種類のデータセット (GSE14520 および GSE36376) の解析から、STEAP1 は正常患者肝組織と比較して HCC 組織でその発現が有意に亢進していることを見出した。さらに、GSE14520 および TCGA のデータセットを用いた解析では、STEAP1 の発現亢進群における有意な OS の短縮が明らかとなり、STEAP1 の発現亢進が HCC において予後不良因子であることを示した。

### 2) STEAP1 の発現抑制は HCC 細胞株の増殖能を低下させる

HepG2, Hep3B において、陰性 control の siRNA および STEAP1 を標的とした 2 種類の配列の異なる siRNA を transfection し、72h 後に細胞を回収し、RT-qPCR 法と WB により K/D 効率を評価した。その結果、STEAP1 を標的とした siRNA では control と比較して、いずれの細胞株でも STEAP1 の有意な発現低下を認めた。そこで、細胞増殖に与え

る影響を WST-1 アッセイにて検討したところ、両方の細胞株において、STEAP1 の K/D 後に有意な細胞増殖能の低下が認められた。

### 3) STEAP1 の発現抑制は HCC 細胞株において G1 arrest を誘導する

Propidium iodide (PI) を用いた flow cytometry 法により STEAP1 K/D 後の細胞周期を解析した。HepG2 および Hep3B において、STEAP1 K/D により G0/G1 期の割合が control siRNA 導入細胞と比較して有意に増加し G1 arrest が誘導されていた。また、apoptosis の割合を評価するために、Annexin V を用いた flow cytometry 法で解析を行った。STEAP1 の K/D によって HCC 細胞株では apoptosis は惹起されなかった。続いて、STEAP1 K/D によって誘導された G1 arrest のメカニズムを検討するため、HCC 細胞株における細胞周期関連タンパク質の発現レベルを WB で評価した。G1 期の進行に関与する cyclin D1 の発現は低下し、G1 arrest を誘導する p27 の発現は有意に増加していた。これらに基づき、STEAP1 は細胞周期を正に制御し HCC の増殖亢進に寄与しているものと考えられた。

### 4) STEAP1 は転写因子 c-Myc とその標的遺伝子を制御している

STEAP1 K/D により誘導される G1 arrest と細胞増殖低下機序を検討する目的で、GEO2R の HCC 患者のデータセット (GSE14520-GPL3921) を用いて、STEAP1 の高発現群と低発現群に分け、それぞれ DEGs を抽出した。さらに、2つのグループで GSEA を用いて検討を行った結果、STEAP1 発現と MYC\_TARGET\_V2 遺伝子の間に最も強い正の相関を認めた ( $r=0.037$ ,  $P=0.004$ )。この結果より、我々は HCC において STEAP1 のシグナル伝達経路の下流に c-Myc が関与しているという仮説を立て、さらに解析を進めた。HepG2, Hep3B において、STEAP1 K/D による c-Myc の発現変化を RT-qPCR 法と WB で評価したところ、いずれの細胞においても有意な発現低下を認めた。さらに、HepG2 を用いて STEAP1 K/D により c-Myc 標的分子群の発現変化を PCR array で検討した。その結果、c-Myc 標的分子群の発現が低下していた。

以上より、c-Myc は STEAP1 の下流に存在し、STEAP1-c-Myc 経路が HCC の細胞増殖と細胞周期の進行に寄与していることが明らかとなった。

### <考察>

近年、さまざまな分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤が HCC の治療薬として臨床導入されたが、切除不能 HCC 患者の予後は約 1 年と不良である。したがって、より効果的な HCC 治療薬を開発するために新規標的分子の探索が必要不可欠である。多くの HCC で過剰発現している c-Myc は HCC 治療のターゲットとして注目されているが、c-Myc 阻害剤の開発は難航しており、現在までに臨床導入されている c-Myc 阻害剤は存在しない。本研究では、HCC において新たに STEAP1-c-Myc 経路が細胞周期を亢進させ、細胞増殖を正に制御していることを見出した。STEAP1 は細胞膜上に発現するため、癌治療における抗体薬物複合体 (ADC) の魅力的なターゲットである。実際、STEAP1 を標的とする ADC は、転移性去勢抵抗性前立腺癌の患者に対し既に導入されている。STEAP1 を

標的とする ADC は、HCC 治療薬としても有用である可能性がある。

我々はこれまで、STEAP1 K/D が NRF2 経路の下流の分子群の発現抑制を介して細胞内 ROS 産生を増加させ、大腸癌細胞に apoptosis を誘導することを明らかにしている。本研究においても、HepG2, Hep3B において STEAP1 K/D により細胞内 ROS 濃度が上昇することを見出した。また、GSEA を用いた解析では、STEAP1 発現と ROS 関連経路に有意な正の相関を認めた ( $r=0.208$ ,  $P=0.039$ )。しかしながら大腸癌細胞の解析結果と異なり、STEAP1 K/D により HCC 細胞では apoptosis は誘導されなかった。加えて、3つの個別のデータセット (GSE14520, GSE36376, および TCGA) の解析で、STEAP1 と NRF2 の間に統計学的に有意な相関関係は認められなかった。さらに、既報では c-Myc が HCC 細胞において ROS の産生を誘導していることが報告されているが、本研究の結果から、STEAP1 は HCC において c-Myc の発現を誘導し、細胞内 ROS の産生低下をもたらすことが示された。これらは一見相反する結果であるが、STEAP1 を介した細胞増殖の制御において、NRF2 や c-Myc に依存しない ROS 産生制御経路の存在が示唆される。さらに、Ewing 肉腫の場合、STEAP1 K/D によって細胞内 ROS 産生低下を伴った細胞増殖抑制が誘導されることが報告されている。これらより、STEAP1 による ROS 産生機序には、それぞれの癌種に特有な複数のシグナル伝達経路が存在することが示唆される。

#### <結論>

本研究により、STEAP1 は正常肝組織と比較し、HCC において有意にその発現が亢進していることが明らかとなった。STEAP1 の発現抑制は c-Myc 発現低下を介し、HCC 細胞増殖抑制を惹起する。これらのことから、STEAP1-c-Myc 経路は有望な新規 HCC 治療ターゲットとなり得ると考えられた。

## 論文審査の要旨及び担当者

(2022年3月31日授与)

報告番号	甲第 1515 号	氏 名	飯島 一飛
論文審査 担 当 者	主査 加藤 淳二 教授	副査 小山内 誠 教授	
	副査 三高 俊広 教授	委員 小船 雅義 教授	

論文題名	Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 1 accelerates cell proliferation by targeting c-Myc in liver cancer cells STEAP1 は c-Myc を介し肝細胞癌細胞の増殖を亢進させる
結果の要旨	<p>本研究では STEAP1 が正常肝組織と比較し、HCC において有意にその発現が亢進していることを明らかとした。また、STEAP1 の発現抑制は c-Myc 発現低下を介し、HCC 細胞増殖抑制を惹起させることを示した。これらのことから、STEAP1-c-Myc 経路は有望な新規 HCC の治療ターゲットとなり得る可能性を示唆し、学位論文として医学博士授与に値するものであると認められた。</p>