

令和元年6月27日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14982

研究課題名(和文) 肺癌における直鎖状ユビキチン関連シグナルの機能解析と臨床応用

研究課題名(英文) Functional analysis and clinical application of linear ubiquitin signaling in lung cancer

研究代表者

中澤 世識 (Nakazawa, Seshiru)

群馬大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60791978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌の治療標的として直鎖状ユビキチン(M1-Ub)とその合成酵素であるLUBACの有用性を解析した。LUBAC構成因子の発現は肺癌患者の予後と有意に関連し、同系統の細胞株でLUBAC発現が有意に高かった。LUBAC高発現株でLUBAC発現を抑制するとNFκBを始めとした複数のシグナル伝達経路が抑制され、肺癌細胞株の増殖や浸潤が低下した。LUBACの選択的阻害剤も肺癌細胞株に同様の効果を示し、肺癌の治療標的としてLUBACの有用性が明らかとなった。LUBACを活性化することでリンパ腫を引き起こすと報告されたアミノ酸に変異を有する肺癌症例も同定し、それらにおいてLUBACは高発現していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌は国内外で注目度の高い研究分野であるが、死亡率は依然高く、新規治療標的の同定が切望されている。またEGFR変異陽性肺癌が急増し、EGFR-TKIなど分子標的薬が著効する一方で、その耐性メカニズムの解明も重要である。本研究で直鎖状ユビキチンとその合成酵素LUBACが*in vitro*と*in vivo*で肺癌の治療標的として有用であることが明らかになった。また、本研究では肺癌が炎症性疾患を背景に発症する事から、LUBAC抑制により炎症を惹起するNFκB経路の抑制が可能となる事に加え、さらにEGFRなど他の腫瘍シグナル経路の活性化とLUBACの関与が明らかとなり、臨床的意義は深い。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the potential role of linear ubiquitin and LUBAC as therapeutic targets of lung cancer. Components of LUBAC were related to lung cancer survival in specific histological types and similar cell lines showed high expression of LUBAC. Inhibition of LUBAC expression in cell lines with high LUBAC expression led to inhibition of NFκB activation and other signaling pathways related to lung cancer proliferation and migration. Inhibitors of LUBAC activity had similar effects on lung cancer cell lines and thus suggested that LUBAC and its components are potential targets of lung cancer therapy. We also identified lung cancer cases that had mutations of LUBAC at amino-acid residues related to enhanced activation of LUBAC and carcinogenesis.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌

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

1. 研究開始当初の背景

肺癌治療では近年、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬が臨床導入されてきた。しかし依然として治療抵抗性や耐性の出現が重要な課題であり、これらを克服する新規治療薬の開発が望まれる。研究代表者は過去にオートファジー受容体である optineurin が直鎖状ユビキチン (M1-Ub) 結合を介して NF-KB 及びアポトーシスを制御し、その機能破綻が筋萎縮性側索硬化症の発症に關与する事を明らかにした (Nakazawa S *et al.*, *Nat Comm*, 2016)。M1-Ub の合成酵素である linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC) が 2006 年に同定され以来、LUBAC と M1-Ub が炎症・免疫・細胞死など複数の生命現象を制御するシグナル伝達経路である事が報告されてきた。肺癌が喫煙や炎症性肺疾患による発症のリスクが高くなる疾患である事から、M1-Ub/LUBAC が NF-KB などの制御を介して肺癌発症に關与する可能性が高いと考え、本研究テーマの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では M1-Ub と LUBAC に着目し、肺癌データベース、肺癌細胞株、及び肺癌切除検体を用いて M1-Ub/LUBAC の肺癌における新規治療標的としての可能性に迫る。特に LUBAC の発現抑制や阻害剤を用いて肺癌の発生、進展、転移機構における M1-Ub/LUBAC の詳細な機能解明を目指す。肺癌における M1-Ub を介した炎症シグナルやアポトーシスなどのシグナル伝達経路を制御する事で肺癌治療の臨床応用への橋渡しを目標とする。

3. 研究の方法

以下の方法で肺癌の新規治療標的として M1-Ub/LUBAC の可能性を追求する。

(1)データベース及び細胞株ライブラリを対象とした M1-Ub/LUBAC の網羅的解析：

本項目では肺癌患者のデータベース、及び肺癌細胞株ライブラリを対象に M1-Ub/LUBAC 発現のスクリーニングを行い、M1-Ub/LUBAC が關与する肺癌の組織型やドライバー変異を同定する。LUBAC の構成因子である HOIP、HOIL-1L、SHARPIN が高発現している細胞株を qPCR や Western blot で確認し、siRNA を用いたノックダウン環境下での増殖能、移動能への影響を検証する。さらに M1-Ub/LUBAC に關連したシグナル伝達経路や因子を同定する。

(2)肺癌切除検体を対象とした M1-Ub/LUBAC の解析：

本項目では肺癌切除標本を対象に免疫染色で HOIP、HOIL-1L、SHARPIN の発現を確認し、臨床病理学的因子 (予後やドライバー変異など) との關連を解析する。また、LUBAC の活性化、及びリンパ腫発症との關連が報告された HOIP の Q584L/Q622L 変異の解析も行う (Yang Y *et al.*, *Cancer Discov*, 2014)。

(3)肺癌細胞株を対象とした M1-Ub/LUBAC の機能解析：

本項目では上記結果を踏まえて、M1-Ub/LUBAC の關与が高い肺癌細胞株を対象に siRNA を用いたノックダウン、CRISPR/Cas9 法を用いたノックアウト、及び LUBAC の阻害剤を用いる事で LUBAC の機能解析を行う。特定の肺癌組織型や遺伝子変異陽性肺癌のシグナル伝達経路に与える影響や、増殖能や移動能への影響を検証する。

4. 研究成果

(1)データベース及び細胞株ライブラリを対象とした M1-Ub/LUBAC の網羅的解析：

肺癌患者のデータベース解析から HOIP、HOIL-1、Sharpin が肺扁平上皮癌より肺腺癌において予後關連因子であることが同定された (各々 p=0.021, 0.051, 0.014)。また、肺癌細胞株を対象

とした解析からは LUBAC の発現が扁平上皮癌と比較して肺腺癌の細胞株で有意に上昇しており、M1-Ub/LUBAC との関連がある NF-KB の活性化亢進を western blot と qPCR で確認された。

(2)肺癌切除検体を対象とした M1-Ub/LUBAC の解析：

肺腺癌切除検体 187 例で H01P の免疫染色を施行した結果、完全切除が得られた I 期の肺腺癌において、5 年生存率は H01P 陽性群で 86.8%、陰性群で 90.5%と H01P 陽性群でわずかに生存率の低下を認めたが有意差は認めなかった ($p=0.215$)。また、H01P 発現と EGFR 遺伝子変異との関連は認めなかった ($p=0.786$)。さらに、H01P の遺伝子変異を有する症例に関して in vitro で解析を行ったが、H01P 変異は NF B の活性化やリンパ腫で報告されている LUBAC 複合体形成には影響を認めなかった。

(3)肺癌細胞株を対象とした M1-Ub/LUBAC の機能解析：

肺腺癌細胞株を対象に LUBAC をノックダウンした結果、浸潤能、増殖能が低下し、その背景には AKT や ERK の活性化が減弱している事が明らかになった。また網羅的なトランスクリプトーム解析からも同様に LUBAC のノックダウンによって細胞増殖に関連したタンパク群の発現低下が明らかとなった。また、CRISPR/Cas9 法を用いて肺腺癌細胞株で LUBAC の H01P をノックアウトした結果、マウスの xenograft モデルは腫瘍形成能が有意に低下した。さらに LUBAC 阻害剤である gliotoxin によって、肺腺癌細胞株の浸潤能、増殖能は低下し、濃度依存的に細胞死が誘導された。

上記(1)-(3)の研究成果から、M1-Ub/LUBAC は研究開始当初に予想されていた炎症性肺疾患との関連が強い肺扁平上皮癌だけでなく、肺腺癌においても増殖能、浸潤能に関与し、新規治療標的としての可能性が証明された。得られた知見をブラッシュアップし、研究論文発表へと繋げていく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

中澤世識、清水公裕、大瀧容一、渥實潤、尾林海、河谷菜津子、飯島岬、高坂貴行、矢島俊樹、茂木晃、桑野博行、肺癌の新規治療標的としての直鎖状ユビキチン関連タンパクの可能性、第 36 回群馬 Clinical Oncology Research 研究、2017

中澤世識、清水公裕、大瀧容一、渥實潤、尾林海、河谷菜津子、飯島岬、高坂貴行、矢島俊樹、茂木晃、桑野博行、肺癌の新規治療標的としての直鎖状ユビキチンリガーゼ LUBAC の可能性、第 118 回日本外科学会定期学術集会、2018

Seshiru Nakazawa, Kimihiro Shimizu, Takashi Ibe, Kai Obayashi, Natsuko Kawatani, Toshiki Yajima, Akira Mogi, Ken Shirabe, Linear ubiquitin chain assembly complex as a molecular target for lung cancer, 第 56 回癌治療学会, 2018

中澤世識、清水公裕、渥實潤、尾林海、河谷菜津子、高坂貴行、矢島俊樹、茂木晃、桑野博行、肺癌の新規治療標的としての直鎖状ユビキチン関連シグナルの可能性、第 35 回日本呼吸器外科学会総会、2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://surgery.med.gunma-u.ac.jp/department/general-thoracic.html>

6．研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：徳永 文稔

ローマ字氏名：TOKUNAGA, Fuminori

研究協力者氏名：解良 恭一

ローマ字氏名：KAIRA, Kyoichi

研究協力者氏名：茂木 晃

ローマ字氏名：MOGI, Akira

研究協力者氏名：清水 公裕

ローマ字氏名：SHIMIZU, Kimihiro

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。