

令和元年6月15日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15634

研究課題名(和文)チロシンキナーゼ分解を抑制し肺腺癌悪性を招くSFNを標的とした治療戦略

研究課題名(英文)Molecular mechanism for stabilization of RTKs proteins by SFN in lung adenocarcinoma.

研究代表者

柴綾(Shiba, Aya)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：50708427

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)：本研究によりstratifin(SFN)が肺腺癌において高発現し、その発現は病理組織学的因子や患者予後と負に相関することが示された。さらに、SFNはUSP8(Ubiquitin-specific protease 8)と結合しその機能を活性化させることで、EGFR等の受容体型チロシンキナーゼ(RTKs)の正常なユビキチン化を抑制し、RTKsタンパク質の異常な安定化を引き起こしていることが明らかになった。また、SFNとの結合はUSP8の自己脱ユビキチン化機能の活性化や脱リン酸化の回避をするのに必須であることも示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

USP8阻害剤はEGFR変異の有無に係らず非小細胞肺癌に制癌作用を示すと報告されているが、本研究によりSFNがUSP8に匹敵する治療標的であることが示され、SFNを阻害することで癌細胞のみでRTKsの脱ユビキチン化を抑制する副作用の少ない新規肺腺癌治療薬の開発に繋がると期待される。一方で、SFNを標的とした治療もEGFR変異非依存的な抗腫瘍効果が期待でき、EGFR阻害薬に対する獲得耐性の克服にも貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Stratifin (SFN, 14-3-3 sigma) acts as a novel oncogene, accelerating the tumor initiation and progression of lung adenocarcinoma. We previously revealed that SFN specifically bound to USP8. Here we showed that both USP8 and SFN showed higher expression in human lung adenocarcinoma than in normal lung tissue, and USP8 expression was significantly correlated with SFN expression. SFN expression was also associated with poor prognosis. USP8 stabilizes receptor tyrosine kinases (RTKs) such as EGFR and MET by deubiquitination, contributing to the proliferative activity of many human cancers including non-small cell lung cancer. In vitro, USP8 binds to SFN and they co-localize at the early endosomes in lung adenocarcinoma cells. Moreover, USP8 or SFN knockdown leads to downregulation of tumor cellular proliferation and upregulation of apoptosis, p-EGFR or p-MET, which are related to the degradation pathway, and accumulation of ubiquitinated RTKs, leading to lysosomal degradation.

研究分野：実験病理学

キーワード：肺腺癌 脱ユビキチン化 受容体型チロシンキナーゼ

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

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は日本人男女とも最多の部位別がん死亡数(男性 52,505 人、女性 20,891 人、2014 年)を示し、中でも肺腺癌は最も発生頻度の高い組織型である。喫煙との関係が明らかでない肺扁平上皮癌と異なり、腺癌は非喫煙者・アジア人・女性に多く、**その発癌メカニズムの解明は喫緊かつ大きな課題である**。肺腺癌の原因となりうるゲノム異常として、これまでに EGFR の遺伝子変異や増幅、EML4/ALK 転座、KRAS 遺伝子変異などが明らかになっており、それらの異常は相互排他的であることが知られている。なかでも EGFR 遺伝子変異は日本人の肺腺癌患者の約 50% で検出され、ゲフィチニブなどの tyrosin kinase inhibitor (TKI) を用いた EGFR に対する分子標的治療薬は EGFR 変異を有する進行肺腺癌の第一選択薬となっている。最近では T790M 変異による耐性獲得症例に対する治療薬として第三世代 EGFR-TKI であるオシメルチニブが登場するなど活発な研究がなされているが、RTKs の分解経路に焦点を当てた研究は少ない。

## 2. 研究の目的

EGFR は肺腺癌の最も有名な oncogene であるが、その分解経路に着目した研究は限られている。申請者はこれまでに肺腺癌の発生・悪性化因子として stratifin (SFN) を見出し、正常肺では発現がないのに対し、初期浸潤癌以降ではほぼ全ての腫瘍で高発現していることを明らかにしてきた。このことは、SFN 発現は非常に腫瘍特異性が高く、癌の治療標的分子として有望である可能性を示唆する。

一方、肺腺癌特異的な SFN 結合因子の 1 つとして、EGFR を含む受容体型チロシンキナーゼ (RTKs) の脱ユビキチン化酵素である USP8 (Ubiquitin Specific Peptidase 8) を同定した。本研究では SFN による USP8 を介した RTKs タンパク質の脱ユビキチン化及び分解抑制の分子機序を明らかにし、SFN および USP8 の肺腺癌治療標的としての適合性を検証する。これにより、SFN を標的とした癌細胞のみで RTKs の脱ユビキチン化を抑制する副作用の少ない新規治療薬の開発に繋げ、脱ユビキチン化に着目した全く新しい肺腺癌治療戦略の提唱を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、USP8 を介した SFN の RTKs 脱ユビキチン化機序の解明を目指す。始めに肺腺癌組織 200 例を用いて SFN と USP8 の免疫染色を行い、2 分子のタンパク質発現の相関と各々の腫瘍特異性を評価する。また、siRNA を用いて SFN と USP8 を各々 *in vitro* で発現抑制し、RTKs の分解経路に対する影響を、抗ユビキチン抗体による免疫沈降や後期エンドソームマーカーと RTKs との二重蛍光免疫染色法などにより試験する。さらに、USP8 を介した SFN の RTKs 脱ユビキチン化作用に両者の特異的結合が必須であるかを検証するために、SFN 結合部位に変異を挿入した変異体 USP8 を作製し SFN と結合できなくなった場合の USP8 機能への影響をユビキチン化アッセイ等で試験する。*in vivo* では、SFN もしくは USP8 発現を抑制した肺腺癌細胞を用いた移植実験を行い、それぞれの発現抑制による制癌作用を評価し、SFN が USP8 に匹敵する治療標的因子であることを証明する。

## 4. 研究成果

免疫染色の結果、SFN と USP8 の発現は相互に関連していたものの、SFN のみが腫

瘍の悪性度や患者予後と有意に負に相関しており、USP8 に比べて SFN がより治療標的として有望である可能性が示された。

肺腺癌細胞を用いた免疫沈降においては、SFN が属する 14-3-3 ファミリータンパク質のうち、SFN ( 14-3-3 sigma ) のみが USP8 に結合し他のファミリーメンバーは結合しないことが確認された。

さらに、SFN を高発現している肺腺癌細胞において SFN を発現抑制すると、リン酸化 RTKs や下流因子の発現が低下し、ユビキチン化 RTKs 発現が亢進するとともに RTKs が後期エンドソームに蓄積した。また、SFN との結合部位に突然変異を挿入した変異型 USP8 では、RTKs に対する脱ユビキチン化機能が低下することも示され、これらの結果から、SFN は USP8 と結合しその機能を活性化させることで、EGFR 等の RTKs の正常なユビキチン化を抑制し、RTKs タンパク質の異常な安定化を引き起こしていることが明らかになった。また、SFN との結合は USP8 の自己脱ユビキチン化機能の活性化や脱リン酸化の回避をするのに必須であることも示した。

以上の結果から、SFN は肺腺癌の新規治療標的分子となりうる可能性が強く示唆される。SFN は非常に初期段階の浸潤性腺癌から発現が亢進しているため、進行癌のみならずこれまでに確立されていなかった初期癌を対象とした薬物治療という新しい選択肢の創出に繋がると期待される。

## 5 . 主な発表論文等

〔 雑誌論文 〕 ( 計 1 件 )

Shiba-Ishii A\*, Kim Y, Nakagawa T, Iemura S, Natsume T, Nakano N, Matsuoka R, Sakashita S, Lee S, Kawaguchi A, Sato Y, and Noguchi M Stratifin regulates stabilization of receptor tyrosine kinases via interaction with ubiquitin-specific protease 8 in lung adenocarcinoma. *Oncogene*, 37(40):5387-5402, 2018. Peer-reviewed.

〔 学会発表 〕 ( 計 1 件 )

Kim Y, Shiba A, Noguchi M. Stratifin interaction with Ubiquitin-specific protease 8 is regulated by PPI and AKT for stabilization of EGFR in lung adenocarcinoma. The 6<sup>th</sup> JCA-AACR Special Joint Conference, 10-12 July 2018, Kyoto, Japan.

〔 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

## 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：キムユンジュン

ローマ字氏名：Kim Yunjung

※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。