

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03799

研究課題名(和文) 順遺伝学手法による、脱ユビキチン化酵素の卵巣癌進展・子宮内膜症癌化制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the regulatory mechanism of ovarian cancer progression and endometriosis carcinogenesis by deubiquitinating enzymes using a forward genetics approach.

研究代表者

木村 正 (Kimura, Tadashi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90240845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌進展における脱ユビキチン化酵素の関与をヒト卵巣癌細胞株を用いUSP32発現を欠失・過剰発現させ検証し、USP32の癌遺伝子としての機能、細胞増殖能・上皮間質転換・スフィア形成能獲得に關与する事を示した。免疫沈降-質量分析法による基質蛋白の網羅的探索の結果、メバロン酸経路のスクвален合成酵素FDFT1に着目した。卵巣癌スフィアでUSP32、FDFT1発現は高く、それらの抑制、FDFT1阻害剤、メバロン酸経路抑制によりスフィア形成が有意に抑制された。卵巣癌腹膜播種の過程ではスフィア形成能獲得が必須であり、USP32、FDFT1は卵巣癌腹膜播種に対する新たな治療標的となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昨今、様々な癌腫に対して網羅的遺伝子変異カタログが作成されている。しかし、大規模データセットによっても同定される遺伝子異常は多数であり低頻度の遺伝子異常について意味づけを行うことは不可能である。一方、順行性遺伝学手法を用いて網羅的に同定した卵巣癌増悪に關与した遺伝子候補は、直接的に新規治療標的となりうる可能性を有している。このリストから検証を進め、今回我々が見出したUSP32或いはその基質蛋白であるFDFT1の抑制、メバロン酸・コレステロール合成経路抑制が、卵巣癌の新たな治療標的となりうることを示したことは、予後不良な卵巣癌において非常に有意義な結果である。

研究成果の概要(英文)：Involvement of deubiquitinating enzymes in the progression of ovarian cancer was investigated by using human ovarian cancer cell lines suppressing or overexpressing USP32. It was shown that USP32 functions as an oncogene and is strongly involved in cell proliferation, and epithelial mesenchymal transition, especially in sphere formation capacity. Among candidates substrates identified by immunoprecipitation mass spectrometry experiment, we focused on FDFT1, a squalene synthase in the mevalonic acid pathway, which is important for cholesterol biosynthesis. USP32 and FDFT1 expression is high in ovarian cancer spheres, and sphere formation capacity is significantly suppressed by USP32 or FDFT1 suppression, FDFT1 inhibitors, and mevalonic acid pathway suppression, and restored by squalene. Sphere formation capacity is essential for the process of ovarian cancer peritoneal dissemination, suggesting that USP32 and FDFT1 are novel therapeutic targets.

研究分野：婦人科悪性腫瘍に対する新規治療標的の探索

キーワード：順遺伝学手法 ユビキチン・プロテアソームシステム 上皮性卵巣癌 子宮内膜症癌化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、癌はゲノム異常による病気であるとの概念の下、国際がんゲノムコンソーシアムやがんゲノムアトラス(TCGA)によって、多数の癌腫を対象に遺伝子変異解析がなされ大規模な包括的カタログが作成された。上皮性卵巣癌については TCGA グループによる高異形度漿液性腺癌のデータベースが存在し、96%を TP53 変異が、ついで 2 割程度を BRCA1/2 変異が、その他有意に変異を認める 7 遺伝子が各々2-6%を占めると報告された。約 500 腫瘍を対象とした網羅的遺伝子変異データベースによってさえ、低頻度の遺伝子変異が無数に認められる場合、ドライバー遺伝子変異とパッセンジャー遺伝子変異の区別は困難であり、既知の癌遺伝子でなければアクションナブル遺伝子であるのか判断することは不可能である。今後、がん関連遺伝子パネル検査が広まっていく状況において、その解釈が分子治療標的薬を使った新しい治療戦略を確立するために必要であり、網羅的データベースとは異なる新たなアプローチで、ドライバー遺伝子、アクションナブル遺伝子を同定する必要がある。また、エピジェネティックに制御される遺伝子現象、例えば DNA メチル化、リン酸化・ユビキチン化・SUMO 化・糖鎖負荷等の翻訳後修飾によって、細胞機能は多様に制御されることが知られている。ヒトゲノムに含まれる遺伝子は 2 万-2 万 5 千個であるのに対し、プロテオーム中のタンパク質は 100 万個以上と推定されており、プロテオーム研究分野における質量分析技術は発展しつつあるが、解析手法は様々で標準化されておらず、網羅的データの活用は未だ困難である。

一方、これまでに我々が行った Forward genetic(順行性遺伝学)的解析法である CRISPR/Cas short-guide RNA (sgRNA) プール型ノックアウトライブラリーを用いたスクリーニングは、培養細胞に無作為に遺伝子発現欠失を誘導し、目的とする表現型、細胞増殖、薬剤耐性、合成致死性等に寄与した遺伝子を、次世代シーケンサーによって網羅的にハイスループットに同定する手法である。本手法の優れた点は、目的とした表現型に寄与した遺伝子発現変化を網羅的に同定できる点にある。

ユビキチン/プロテアソームシステム(UPS; ubiquitin proteasome system)は、ユビキチン活性化、標的蛋白との結合、標的蛋白のポリユビキチン化を経て、プロテアソームによって標的蛋白を分解する一連のシステムであるが、80 個以上あるとされる DUB は、このシステム内において、特定の標的蛋白からユビキチン結合を外す事で標的蛋白分解を阻害し、安定化させる機能を持っている。UPS に着目した薬剤として実用化されている薬剤にプロテアソーム阻害剤があり、蛋白を分解するプロテアソームを阻害するとその蛋白が蓄積し、抗腫瘍効果を発揮するという機序で、多発性骨髄腫、マンツル細胞リンパ腫に有効である。一方、脱ユビキチン化酵素(DUB)は、蛋白分解、DNA 修復、エピジェネティクス、p53、HIF1-alpha, EGFR といった癌遺伝子・抑制遺伝子の制御に関与することが知られており、創薬への可能性も高いことから癌治療分野において注目されており、様々な薬剤が開発中である。

2. 研究の目的

婦人科悪性腫瘍の中で最も死亡者数の多い予後不良な疾患である卵巣癌に対して新たな治療標的を同定するため、先行研究から(Kodama M, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2017; 114: E7301-10)卵巣癌腹膜播種を抑制する可能性のある、DUB である USP32 と上皮性卵巣癌の関連性を解明し、その機序を検討する。また、子宮内膜症悪性化の過程では、子宮内膜症関連卵巣癌の前駆病変であるされる異型子宮内膜症、異型のない子宮内膜症病変の

段階においても、既に PTEN、KRAS、ARID1A 変異が認められ、過剰鉄、酸化ストレスによるエピジェノミク変化の関連が示唆され、炎症性疾患に強く関与するとされるが、子宮内膜症における UPS および DUB の関与を検討する事を目的とする。

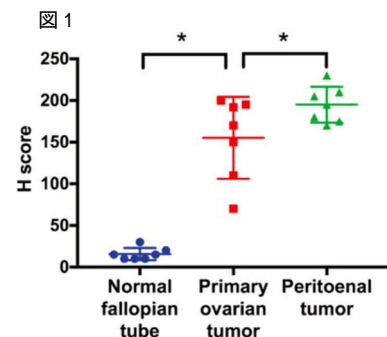
3. 研究の方法

プール型 shRNA 及び sgRNA ライブラリーを用い、より生体内に近い in vivo で行った上皮性卵巣癌新規治療標的スクリーニングの先行研究の結果から (Kodama M, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2017;114:E7301-10)、我々は卵巣癌を抑制しうる複数の遺伝子候補を発見した。単一の卵巣癌細胞株を用いたデータであるこの研究の limitation を、Oncomine からダウンロードしたヒトマイクロアレイデータセット複数においてヒト卵巣癌組織で高発現している遺伝子リストを参照することで、より臨床的意義の高い治療標的を絞り込むこととした。

一方、子宮内膜症悪性転化の研究については、正常子宮内膜オルガノイドを用いることとし、卵巣明細胞腺癌症例から、手術時に得られる正常子宮内膜、癌組織、存在すれば子宮内膜症性病変、播種病変及び腹水中癌細胞を回収し、バンク化を目指すこととした。

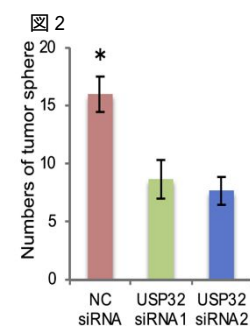
4. 研究成果

パブリックデータセットと我々の候補遺伝子群から、ヒト卵巣癌に高発現しており、その抑制が腹膜播種を抑制しうる遺伝子候補が 5 つ同定された。その中で着目した USP32(Ubiquitin Specific Peptidase 32)は、DUB の中の USP ファミリーに属しており、乳癌組織で高発現していること、また癌遺伝子として機能が報告されていたものの、過去に卵巣癌について関連性を報告されたことはなかった。実際にヒト卵巣癌組織における USP32 発現レベルを免疫染色にて評価したところ、正常卵管組織での USP32 蛋白発現レベルは低いものの、卵巣癌組織、腹膜播種組織の順に発現レベルは高かった(図 1)。



卵巣癌における USP32 の癌遺伝子としての機能を、ヒト卵巣癌細胞株を使用した in vitro 及び in vivo 実験にて示し、USP32 が細胞増殖能に関与すること、また上皮間質転換

能、特にスフィア形成能に強く関与する事を示した(図 2)。DUB はその基質蛋白のコピキチン結合を外すことで、UPS による分解を回避させ、基質蛋白を安定化させる機能を有する。



USP32 の卵巣癌における癌遺伝子としての機能のメカニズムを解明するために、その基質蛋白を網羅的に同定することを目的とし、免疫沈降-質量分析法による実験を行った。その結果、USP32 の基質蛋白候補が複数同定され、その一つスクアレン合成酵素 FDFT1 に着目した。メバロン酸経路はコレステロール生合成に重要であり、コレステロールは様々な癌腫において癌幹細胞化や細胞増殖能に関与するとされるが、卵巣癌スフィアにおいて USP32、FDFT1 発現は高値であることが示され(図 3)、卵巣癌腹膜播種の課程においてスフィア形態での生存能獲得が必須であることを考えると、USP32 による FDFT1 安定化がこの過程を促進していると推察された。このスフィア形性能は USP32 や FDFT1 抑制、また FDFT1 阻害剤、メバロン酸経路を抑制するビスフォスフォネート製剤によって抑制され、FDFT1 下流産物であるスクアレン添加に

必須であることを考えると、USP32 による FDFT1 安定化がこの過程を促進していると推察された。このスフィア形性能は USP32 や FDFT1 抑制、また FDFT1 阻害剤、メバロン酸経路を抑制するビスフォスフォネート製剤によって抑制され、FDFT1 下流産物であるスクアレン添加に

よって回復したことから、スクアレン・コレステロール合成経路抑制が卵巣癌腹膜播種に対する新たな治療戦略となることが示唆された。

また子宮内膜症悪性化についての検討については、オルガノイド樹立・継代プロトコル作成を進めた。正常子宮内膜或いは子宮内膜癌を酵素法によって処理後、マトリゲル内に包埋、各種増殖因子を加えた培養液を加えて培養し、オルガノイドの樹立、継代培養が可能となった。閉経後症例からの内膜組織の場合、増殖能不良である可能性があり、継代回数が有意に未閉経症例よりも少なかった。また、子宮内膜症性嚢胞の嚢腫内腔面組織から回収した組織からのオルガノイド樹立については試みたものの、継代培養は困難で、恐らく全例に黄体ホルモン或いは Gn-RH アゴニスト・アンタゴニスト使用が使用されていたことが背景にあると考えている。正常子宮内膜・子宮内膜癌オルガノイドを用い、レンチウイルスによる遺伝子導入、蛍光免疫染色などの実験手法を確立し、ライブラリースクリーニング実施に向けて準備中である。

図 3

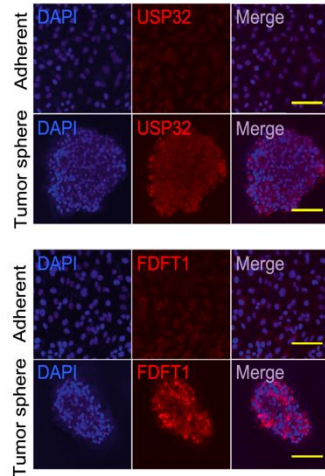
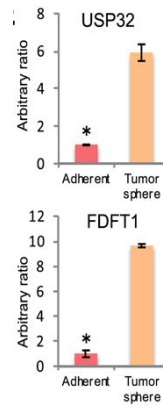
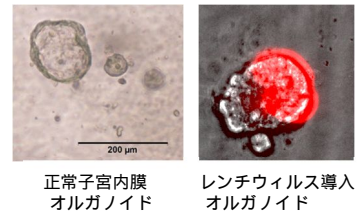


図 4



正常子宮内膜
オルガノイド

レンチウイルス導入
オルガノイド

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aya Nakae, Michiko Kodama, Toru Okamoto, Makoto Tokunaga, Hiroko Shimura, Kae Hashimoto, Kenjiro Sawada, Takahiro Kodama, NG Copeland, NA Jenkins, Tadashi Kimura.	4. 巻 552
2. 論文標題 Ubiquitin specific peptidase 32 acts as an oncogene in epithelial ovarian cancer by deubiquitylating farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 120 ~ 127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.03.049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Aya Nakae, Michiko Kodama, Hiroko Shimura, Kae Hashimoto, Kenjiro Sawada, Tadashi Kimura
2. 発表標題 Functional analysis of USP32, detected from in vivo shRNA library screen, as a therapeutic target of epithelial ovarian cancer
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakae, A. Kodama, M. Nakatsuka, E. Kawano, M. Matsumoto, Y. Hashimoto, K. Mabuchi, S. Sawada, K. Kimura, T.
2. 発表標題 Combination of in vivo shRNA library screening and cancer microarray database identifies USP32 as a new drug target of ovarian cancer
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小玉美智子. 中江 彩. 吉原弘祐. 橋本香映. 澤田健二郎. 木村 正.
2. 発表標題 Sleeping beauty transposon mutagenesis screen identified cancer genes driving sarcomagenesis and metastases of uterine leiomyosarcoma
3. 学会等名 第61回日本婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakae, A. Kimura, T. Sawada, K. Kodama, M. Hashimoto, K. Nakatsuka, E.
2. 発表標題 In vivo pooled shRNA library screening identifies USP32 as a new drug target of epithelial ovarian cancer
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小玉 美智子 (Kodama Michiko) (70791391)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	澤田 健二郎 (Sawada Kenjiro) (00452392)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	
研究分担者	上田 豊 (Ueda Yutaka) (10346215)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	
研究分担者	遠藤 誠之 (Endo Masayuki) (30644794)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	瀧内 剛 (Takiuchi Tsuyoshi) (40733358)	大阪大学・医学部附属病院・助教 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中江 彩 (Nakae Aya) (60880961)	大阪大学・医学系研究科・招へい教員 (14401)	
研究協力者	志村 寛子 (Shimura Hiroko) (30910244)	大阪大学・医学系研究科・招へい教員 (14401)	
研究協力者	岡村 綾子 (Okamura Ayako) (40910253)	大阪大学・医学系研究科・技術補佐員 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関