

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18613

研究課題名(和文) 前立腺癌原因遺伝子ETV1のタンパク質分解機構解析と前立腺癌治療への応用

研究課題名(英文) Application of the degradation system for ETV1 to prostate cancer therapy

研究代表者

渡辺 隆太(WATANABE, RYUTA)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00813635

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)：SPOPは、前立腺癌患者の10-15%と最も多くのmutationが報告された遺伝子である。SPOPは基質蛋白質をユビキチン化し分解制御しており、ARやERGに代表される基質蛋白質は30個以上同定されている。我々は、アルファスクリーンによる解析で、ERG同様TMPRSS2と融合遺伝子を形成するETV1を基質蛋白質候補として検出した。しかし、ETV1がSPOPの基質蛋白質であるエビデンスは得られなかった。一方で、SPOPはTOP2Aを介してゲノム不安定性を誘導し前立腺癌を増悪させることを見出した。さらにSPOP変異前立腺癌患者に対して、TOP2阻害薬やPARP阻害薬が有効である可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SPOP変異はARを代表とする基質蛋白質の蓄積の結果、前立腺癌を進行に導くとされてきた。我々の研究により、SPOP変異はTOP2Aを介してゲノム不安定性を誘導することで前立腺癌を増悪させることを明らかにした。過去にTMPRSS2-ERG融合遺伝子がTOP2B-AR複合体によるゲノム不安定性にて形成されることが報告されており、今回SPOP変異経路とTMPRSS2-ERG融合遺伝子経路という相互排他的な2経路が前立腺癌において存在することを突き止めた。これらの経路を理解することで、今後TOP阻害剤、PARP阻害剤、SPOP阻害剤といった治療薬のプレジジョンメディシンにつながる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：SPOP is the most frequently mutated gene in prostate cancer patients (10-15%), and regulates ubiquitination and degradation of substrate proteins. More than 30 substrate proteins, represented by AR and ERG, have been identified. We detected ETV1, which forms a fusion gene with TMPRSS2 as in ERG, as a candidate substrate protein by alpha screen analysis. However, no evidence was obtained that ETV1 is a substrate protein of SPOP. On the other hand, we found that SPOP promotes prostate cancer progression by inducing genomic instability through TOP2A. Furthermore, we found that TOP inhibitors and PARP inhibitors may be effective for patients with SPOP-mutant prostate cancer.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 SPOP TMPRSS-ERG融合遺伝子 ETV1 DNA修復 TOP2A TOP阻害剤 TDP1/2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は、欧米において男性の癌の中で罹患数は第1位、死亡数は第2位と最も多い癌のひとつであり、日本でも急速に増加している。進行性前立腺癌に対する治療の中心はアンドロゲン受容体 (AR)を標的としたホルモン療法であるが、去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) へ進行し、治療抵抗性となることが問題となっており、新規治療薬が期待される。そんな中、アメリカでは2015年1月30日一般教書演説の中でオバマ大統領が「プレジジョンメディスンイニシアティブ (Precision Medicine Initiative)」を発表した。プレジジョンメディスンは、遺伝子、環境、ライフスタイルに関する個々人の違いを考慮した予防や治療を確立するもので、大統領は2016年度予算案で2億1500万ドルを要求し、大きな話題となった。このことが大きな転換点となり、遺伝子の役割を解析し、遺伝子異常に合わせた治療を提供する時代が到来した。

我々は、whole genome sequenceの結果、前立腺癌患者の 10-15%と最も多くの mutation が報告された SPOP 遺伝子 (Barbieri et al, Nature, 2012) に着目した。SPOP は CUL3 コピキチンリガーゼ複合体の基質認識受容体のひとつとして知られ、AR に代表される基質蛋白質をコピキチン化し、分解制御するという蛋白機能を有する。SPOP 変異体では、基質タンパク質が分解されず、各種の腫瘍性タンパク質が蓄積する結果、前立腺癌を発癌するといわれている (図1)。これまで 30 種類以上の基質蛋白質が同定されてきた。SPOP 遺伝子が制御するこれらの基質タンパク質を同定し、前立腺癌の発癌・進展機構を解明することで、それを標的とした新規治療が導出できるのではないかと考えた。

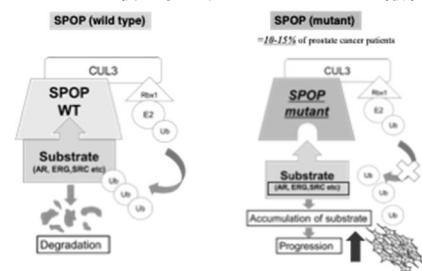


図1. SPOP・CUL3 コピキチンリガーゼの機能。SPOP 変異で前立腺癌の腫瘍性基質タンパク質が蓄積する。

2. 研究の目的

申請者の研究チームは、SPOP 依存的に分解される基質タンパク質の全貌を解明するため、野生型 SPOP には結合するが、基質結合能を失った SPOP (F133V)には結合しないタンパク質をヒト 2 万タンパク質アレイの中からアルファスクリーンを用いて *in vitro* 大規模スクリーニングを実施した。その結果、189 分子の SPOP 基質タンパク質候補の同定に成功した。重要な事に当該 189 分子の中には、ERG、DEK、BRD2 等の既知の SPOP 基質タンパク質に加え、ETV1 (ETS translocation variant 1)が含まれていた。ETV1 は、細胞増殖や細胞周期を制御する転写因子であり、前立腺癌患者の約 50%に見られる TMPRSS2-ERG 融合遺伝子と同様、TMPRSS2 と融合遺伝子を形成する。そのため前立腺癌患者では ETV1 のタンパク質発現が亢進し、遺伝子転写が活性化され、細胞が癌化する。しかし、ETV1 のタンパク質量の制御機構は未解明のままであった。そこで本研究では、**CUL3/SPOP 複合体による ETV1 の詳細な分解制御機構の解明**を目的に研究を開始した。しかし、SPOP 機能欠失時の ETV1 の蓄積には AR の発現の程度などの条件設定が複雑で、安定した実験結果を出すことは困難を極めた。

そんな中、我々は前立腺癌細胞株C4-2にSPOP F133V 変異を過剰発現した細胞を顕微鏡で観察していた際、C4-2の細胞核が崩壊し微小核様の構造物を形成していることを発見した。このことから、SPOPは核においてDNA修復に関わる重要な働きを持っているのではないかと推測した。

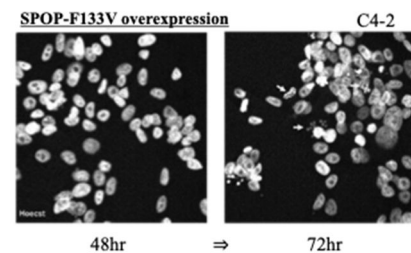


図2. SPOP F133V 過剰発現により C4-2 細胞の細胞核が崩壊する。

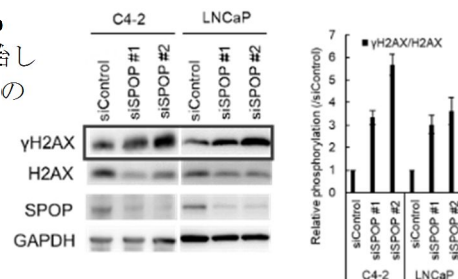


図3. SPOP KDによりDNA 損傷マーカーである γ H2AX が著明に蓄積。

3. 研究の方法

1) 前立腺癌細胞における、SPOP KD による DNA 損傷の評価 (図 3)

外的刺激をなんら加えていないにもかかわらず SPOP KD により DNA 損傷マーカーである γ H2AX が著明に蓄積した。免疫染色でも同様に、SPOP KD により核内に DNA 損傷の蓄積を認めた。

2) SPOP KD 下の Topoisomerase2A の局在 (図 4)

Topoisomerase 2A は DNA 複製の過程で絡まった 2 本の DNA 鎖の一方に DSB を生じ、絡まりを解消する。その後 TDP1/2, Mre11 によって Topoisomerase2A が DNA 上から切り離されるというステップを経て、DNA 修復が進む。DNA 修復に進むにはこの Topoisomerase2A の解離が必須である。SPOP KD 下に Topoisomerase2A の局在を免疫染色にて調べたところ、SPOP KD で Topoisomerase2A が核内に著明に集積していた。さらに、Cesium chloride-density gradient centrifugation にて DNA 上に結合した蛋白質を検出したところ、SPOP KD 細胞では DNA 上に TOP2A が集積していた。

このことから、SPOP KD 細胞では Topoisomerase 2A の切り離しが起こらず、DNA 上にとどまり続けるため、DNA 修復が進んでいないのではないかと仮説を立てた。

3) Topoisomerase を切り出す酵素 (TDP1/2, Mre) の SPOP KD 下の变化 (図 5)

Topoisomerase を DNA 上から切り出す酵素である TDP1/2 の蛋白量が、SPOP KD により約 50% 減少していた。以上から、SPOP KD により TDP1/2 の蛋白量が減少する結果、Topoisomerase2A が DNA 上に集積し、DNA 損傷を蓄積していることが明らかになった。前立腺癌関連 SPOP 変異体の過剰発現細胞でもこの現象は同様にみられることから、SPOP 変異前立腺癌細胞では DSB 修復異常が起こっていると考えられる。

4) SPOP KD, SPOP WT OA による前立腺癌細胞に対する TOP2 阻害剤の効果 (図 6)

SPOP KD 前立腺癌細胞において、TOP2 阻害剤であるエトポシドが効果を示し、DNA 修復阻害剤が有効である可能性を示唆している。

4. 研究成果

以上から、SPOP は TDP1/2 の制御を介して、TOP2A の DNA からの解離に必須であることが分かった。一方で、SPOP 変異の際、TOP2A が蓄積することによりゲノム不安定性を生じ、前立腺癌の進行を誘導する。

TMPRESS-ERG 融合遺伝子は、SPOP 変異と相互排他的な遺伝子異常である。TMPRSS2-ERG 融合遺伝子は、TOP2B と AR 複合体により DNA が切断されることにより再編成され形成されることが現 Fred Hutchinson Cancer Research Center, Dr. Michael Haffner によって証明されている。SPOP 変異は TMPRSS2-ERG 融合遺伝子と類似した機序、しかし相互排他的なパスウェイで、Topoisomerase を介した DNA 不安定性から前立腺癌の進行に関与していることが分かった。

今後は、SPOP 変異における薬剤感受性を in vivo で解析し、プレジジョンメディスンに繋げていきたい。

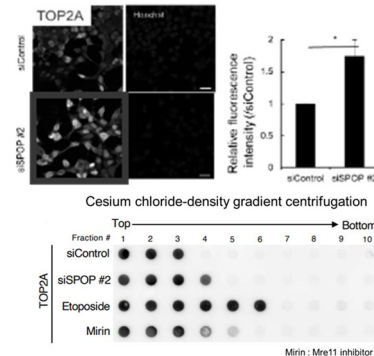


図 4. SPOP KD により DNA 上に TOP2A が蓄積する。

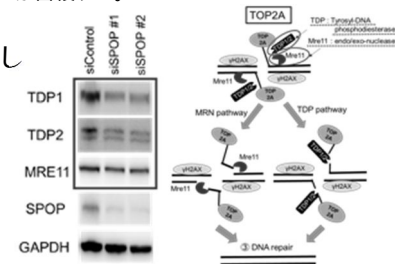


図 5. SPOP KD により TDP1/2 のタンパク量が減少する。

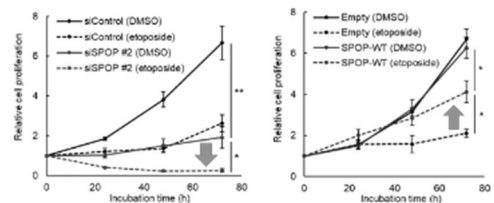


図 6. SPOP 変異前立腺癌は、TOP2 阻害剤が有効である可能性。

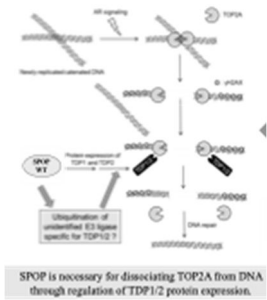


図 7. SPOP は TDP1/2 の制御を介して、TOP2A の DNA からの解離に必須。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Ryuta, Maekawa Masashi, Hieda Miki, Taguchi Tomohiko, Miura Noriyoshi, Kikugawa Tadahiko, Saika Takashi, Higashiyama Shigeki	4. 巻 31
2. 論文標題 SPOP is essential for DNA protein cross-link repair in prostate cancer cells: SPOP-dependent removal of topoisomerase 2A from the topoisomerase 2A-DNA cleavage complex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 478 ~ 490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E19-08-0456	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maekawa Masashi, Higashiyama Shigeki	4. 巻 21
2. 論文標題 The Roles of SPOP in DNA Damage Response and DNA Replication	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7293 ~ 7293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21197293	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryuta Watanabe, Masashi Maekawa, Miki Hieda, Tomohiko Taguchi, Noriyoshi Miura, Tadahiko Kikugawa, Takashi Saika, and Shigeki Higashiyama	4. 巻 31 (6)
2. 論文標題 SPOP is essential for DNA-protein cross-link repair in prostate cancer cells: SPOP-dependent removal of topoisomerase 2A from the topoisomerase 2A-DNA cleavage complex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 478-490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E19-08-0456	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 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ryuta Watanabe
2. 発表標題 PSMA-positive membranes secreted from prostate cancer cells have potency to transform vascular endothelial cells into an angiogenic state
3. 学会等名 AARC 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryuta Watanabe
2. 発表標題 Effect of PSMA-positive membranes secreted from prostate cancer cells on vascular endothelial cells
3. 学会等名 ASCO-GU2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺隆太
2. 発表標題 The novel role of SPOP in regulating topoisomerase 2A in prostate cancer cells as a potential therapeutic marker for DNA repair targeted therapy
3. 学会等名 西日本泌尿器科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺隆太
2. 発表標題 LNCaP cellsから放出されるPSMA陽性vesicleが 血管内皮細胞の血管新生能を亢進する
3. 学会等名 泌尿器腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺隆太
2. 発表標題 愛媛大学における神経内分泌前立腺癌の 治療経験と病理学的考察
3. 学会等名 前立腺シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺隆太
2. 発表標題 前立腺癌細胞のtopoisomerase2A制御におけるSPOPの新規機能解明とDNA修復標的治療の治療マーカーとしての可能性
3. 学会等名 泌尿器分子細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryuta Watanabe
2. 発表標題 The novel role of SPOP in regulating topoisomerase 2A in prostate cancer cells as a potential therapeutic marker for DNA repair targeted therapy
3. 学会等名 2020 AUA annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺 隆太
2. 発表標題 前立腺癌細胞のtopoisomerase2A制御における SPOPの新規機能解明と DNA修復標的治療の治療マーカーとしての可能性
3. 学会等名 第29回泌尿器科分子細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺 隆太
2. 発表標題 前立腺癌細胞のtopoisomerase2A制御における SPOPの新規機能解明と DNA修復標的治療の治療マーカーとしての可能性
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前川 大志
2. 発表標題 A novel function of a prostate cancer-associated SPOP mutant in topoisomerase 2A-dependent DNA-protein crosslink repair
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------