

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18480

研究課題名(和文) 相同組換え修復を制御するUSP26を標的とした頭頸部癌新規治療戦略

研究課題名(英文) The novel therapeutic strategy via homologous recombination regulator USP26 in head and neck cancer.

研究代表者

常松 貴明 (TSUNEMATSU, Takaaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教

研究者番号：70726752

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)：頭頸部扁平上皮癌はQOLの著しい低下を引き起こすため、審美的・機能的損失を軽減する治療法の開発は重要な課題であるが、有効な分子標的は未だ同定されていない。そこで、既に化学療法に用いられている従来の抗がん剤の作用を増強させることを念頭に、シスプラチンなどのDNAクロスリンクを誘導する抗がん剤の感受性を決定づける相同組換え修復機構に着目して研究を実施した。脱ユビキチン化酵素 Ubiquitin Specific Protease 26 (USP26)の発現抑制により、相同組換え効率の著しい低下とシスプラチン感受性の増強がみられ、既存薬を用いた頭頸部扁平上皮癌の新たな治療戦略となりうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で着目する相同組換え修復機構の遺伝子変異による機能不全は乳がんや前立腺がんなどのホルモン依存性がんによく知られており、シスプラチンなどのDNAクロスリンクを誘導する抗がん剤が奏功することが注目されている。しかしながら、シスプラチンを化学療法として用いる頭頸部がんでは、これらの遺伝子変異はなく、その副作用から治療中止となることが多い。本研究で同定した脱ユビキチン化酵素USP26を阻害することで、相同組換え修復機構の機能不全を誘導し、シスプラチンを頭頸部がん奏功させることができる可能性や投与濃度を下げることができる可能性が示されたことから、臨床へのフィードバックが期待される。

研究成果の概要(英文)：It is important issue to develop novel chemotherapy of head and neck cancers for improvement of QOL. In this study, we focused on homologous recombination (HR) which regulated the sensitivity for cisplatin. We identified that knockdown of USP26, which was a kind of deubiquitinase, decreased HR efficiency and enhanced the sensitivity for cisplatin in head and neck cancer cell lines. Overall, we suggested the novel chemotherapeutic strategy combined with inhibition of USP26 and cisplatin for head and neck cancers.

研究分野：実験病理学

キーワード：相同組換え 頭頸部癌 脱ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌は罹患部位の解剖学的な特徴から審美的・機能的損失を引き起こし、担癌患者の QOL の著しい低下をもたらす。従って、可能な限り審美的・機能的損失を軽減できる治療法の開発が理想的である。しかしながら、腺癌、肉腫や白血病などで盛んに用いられている分子標的療法は開発されていない。その原因として、分子標的となりうるようなドライバー遺伝子が同定されていないことによると考えられる。近年、頭頸部扁平上皮癌の全ゲノム解析が報告され、様々な遺伝子変異が明らかとなったが(*Nature* 517:576-582, 2015)、多くの癌で変異

がみられる癌抑制遺伝子 TP53 遺伝子の変異を 70% 程度で認めたものの、その他の頻度は低く、明らかなドライバー遺伝子はないように思われる。近年、遺伝子変異により相同組換え修復経路の欠如を伴った乳癌や卵巣癌ではシスプラチンが著効することが報告され、注目されている(*Clin Cancer Res* 23(24):7521-7530, 2017)。相同組換え修復とは抗癌剤や放射線によって引き起こされる DNA 二本鎖切断の修復経

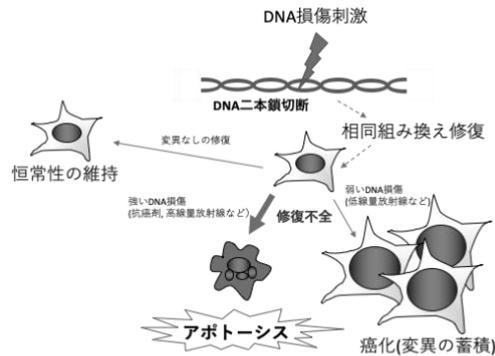


図1: 相同組換えによるDNA二本鎖切断の修復とその欠如によるアポトーシスの誘導
DNA二本鎖切断が生じると修復経路の一つとして相同組換え修復経路が修復し、変異を防ぐ。修復経路に不全があると、弱いDNA損傷であれば、変異の蓄積が誘導され、癌化を引き起こす。しかし、強いDNA損傷であればアポトーシスに陥る。

路の一つであり、この経路の欠如は少量の DNA 損傷では不適切な修復によって変異の蓄積を促し、癌化を引き起こすと考えられている。一方で、興味深いことに、一定以上の損傷が加わるとアポトーシスの引き金となることが知られている(図 1 参照)。しかしながら、前述の頭頸部扁平上皮癌の全ゲノム解析において相同組換え修復経路関連遺伝子の変異の頻度は低く、あまり注目されてこなかった。頭頸部扁平上皮癌において、同経路を介して、効果的にシスプラチンの作用を増強させるためには、何らかの方法で相同組換え修復経路を不活性化することが必要であるが、siRNA などの核酸製剤は現在のところ臨床では使用されておらず、酵素などを標的とした阻害剤が望まれる。

脱ユビキチン化酵素はタンパク質の能動的な分解経路であるユビキチンプロテアソーム系に含まれる酵素群である。基質タンパク質に付加された分解シグナルであるポリユビキチン鎖を切断し、分解を抑制することで基質タンパク質を蓄積させるプロテアーゼである(図 2 参照)。ヒトで約 100 種類存在す

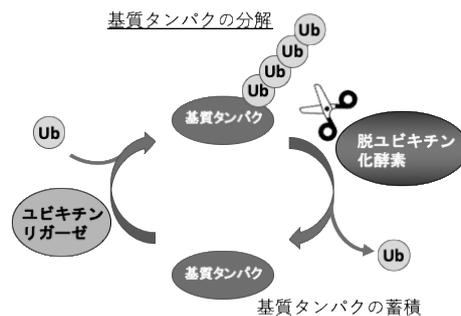


図2: 脱ユビキチン化酵素とユビキチンリガーゼによるポリユビキチン化を介したタンパクの量的制御
ユビキチンリガーゼが基質タンパクにポリユビキチン鎖を連結させることで、分解シグナルとなり、タンパク分解が生じる。一方、脱ユビキチン化酵素はそのポリユビキチン鎖を切断することで拮抗した作用を示し、基質タンパクの蓄積を誘導する。

ることが知られており、様々な生命現象において重要な働きを担っている。特に DNA 損傷応答の制御に関わるものが多いことが報告されている。また近年それぞれの酵素に特異的な阻害剤の開発が盛んになされており、将来的に治療への応用の可能性を有している。研究開始までに、研究代表者らはすべての脱ユビキチン化酵素について The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースを用いて網羅的に調べたところ、脱ユビキチン化酵素である USP26 の遺伝子増幅が一部の頭頸部扁平上皮癌で見られることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、明らかなドライバー遺伝子が存在しないと考えられる頭頸部扁平上皮癌に対し、阻害剤を開発可能な脱ユビキチン化酵素に着目することで新たな治療標的としての分子基盤の確立を目指す。本研究で着目する脱ユビキチン化酵素 USP26 は、脱ユビキチン化酵素群の過剰発現系を用いたスクリーニングにおいて放射線曝露による相同組換え修復に関与する可能性のある候補の一つとして同定されており (*Nucleic Acids Res* 43(14):6919-6933, 2015)、その阻害は頭頸部扁平上皮癌の治療に用いられているシスプラチンの作用増強につながると考えられる。しかしながら、その分子機序は現状ではほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では頭頸部扁平上皮癌において、USP26 の阻害が相同組換え修復に与える影響およびその分子機序の解明を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、脱ユビキチン化酵素 USP26 を頭頸部扁平上皮癌の治療標的とするための分子基盤の確立を目指し、以下の研究計画を遂行した。

(1) USP26 の阻害が相同組換え修復とシスプラチン感受性に与える影響の解明

相同組換え修復効率を検討する方法として、GFP 遺伝子内に DNA 二本鎖切断を生じさせる酵素である I-Sce I の認識配列を有するレポーターベクターを使用した。I-Sce I を同時に発現させると GFP 遺伝子内に DNA 二本鎖切断が生じ、相同組換え修復が起こると、GFP が蛍光を発する現象を利用し、Flow cytometry により検出した。また、シスプラチン感受性の検討として、MTT アッセイを用いた。

(2) USP26 の相互作用分子の探索とその分子機序の解明

研究当初の計画では、USP26 の免疫沈降物のマスペクトロメトリー解析により、網羅的に相互作用タンパク質を同定する予定であったが、研究を進めていく過程で同じ脱ユビキチン化ファミリーに属する USP1 と相互作用することを見出したことから、その詳細を免疫沈降などの方法を用いて詳細に検討した。

4. 研究成果

(1) USP26 の阻害が相同組換え修復とシスプラチン感受性に与える影響の解明

Control siRNA 及び USP26 siRNA を遺伝子導入した細胞株に対して、上述のレポーターベクターと I-Sce I を発現するベクターを遺伝子導入し、Flow cytometry により、GFP の蛍光を検出し、相同組換え効率の検討を行った。その結果、USP26 の発現抑制によっ

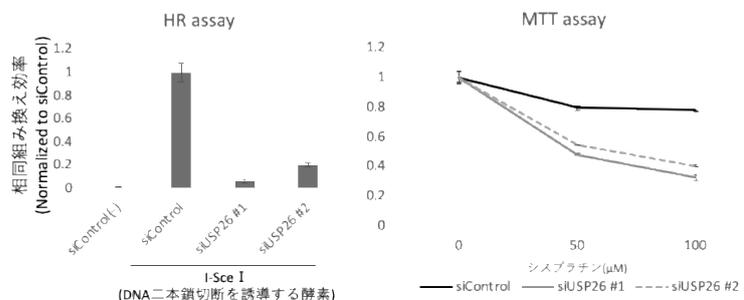


図3: USP26のsiRNAによるノックダウンは相同組み換え効率の低下とシスプラチン感受性の増強を引き起こす

て、著しい相同組換え修復効率の低下がみられ、USP26 が相同組換え修復を制御することが示された (図 3 参照)。また、Control siRNA 及び USP26 siRNA を遺伝子導入した細胞株に

対して、シスプラチンの投与を行い、MTT アッセイによりシスプラチン感受性を検討した。その結果、USP26 の発現抑制によって、シスプラチンの感受性が有意に増強されることを見出した (図 3 参照)。

(2) USP26 の相互作用分子の探索とその分子機序の解明

USP26 に関する研究を進めていく過程で、USP26 が同じ脱ユビキチン化ファミリーに属する USP1 や USP1-Associated Factor 1 (UAF1) と相互作用することを見出した(図 4 参照)。USP1 と UAF1 は複合体を形成し、機能することが報告されているため、USP26 がどのように USP1-UAF1 複合体と相互作用しているのかを検討するため、UAF1 siRNA や USP1 siRNA を遺伝子導入し、免疫沈降を行ったところ、

USP1 のノックダウンによって USP26 と UAF1 の結合が消失したのに対し、UAF1 のノックダウンでは USP26 と USP1 の結合に影響を与えなかった。従って、USP26 は USP1 依存的に USP1-UAF1 複合体と相互作用することが明らかとなった (図 4 参照)。

そこで、USP1 との結合に重要な領域を同定するため、USP26 のタンパク質の一次構造に基づいて、様々な deletion mutant を作製し、詳細に検討を行った。その結果、N 末端寄りの 105 番目のアミノ酸から 240 番目のアミノ酸領域、C 末端寄りの 558 番目のアミノ酸から 818 番目のアミノ酸領域がそれぞれ重要であることが示唆された (図 5 参照)。

オンラインソフトウェアによる解析から、105 番目のアミノ酸から 240 番目のアミノ酸領域には、推定上の核移行シグナル: Nuclear localization signal (NLS) が存在すると考えられたため、局在を検討したところ、実際に野生型は核のみに局在するのに対し、同領域を欠損した変異体は細胞質に局在した (図 6 参照)。USP26

が核に局在することが USP1 との結合に重要であろうと仮説を立て、変異体に SV40 由来の NLS を付与し、局在と USP1 との結合を検討したところ、NLS を付与することで USP26 が核への局在し、興味深いことに USP1 との結合も回復した (次頁図 6 参照)。これらの結果より、USP26 と USP1 の結合には USP26 が核に局在することが重要であることが明らかとなった。

続いて、C 末端寄りの 558 番目のアミノ酸から 818 番目のアミノ酸領域の詳細な解析を行ったところ、最終的に 887 番目のアミノ酸から 894 番目のアミノ酸の 8 アミノ酸が USP1 との結合に重要であることを見出した (次頁図 7 参照)。興味深いことに、同領域は種を越

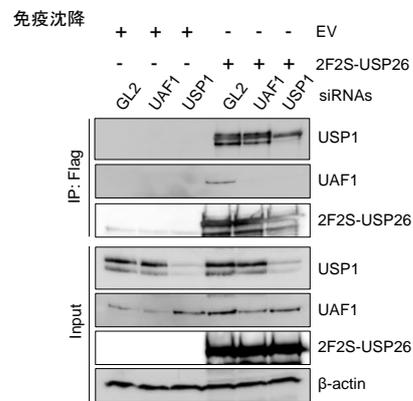


図4: USP26はUSP1-UAF1複合体と相互作用する
USP26はUSP1-UAF1複合体と相互作用しており、その相互作用はUAF1ではなく、USP1依存的である。

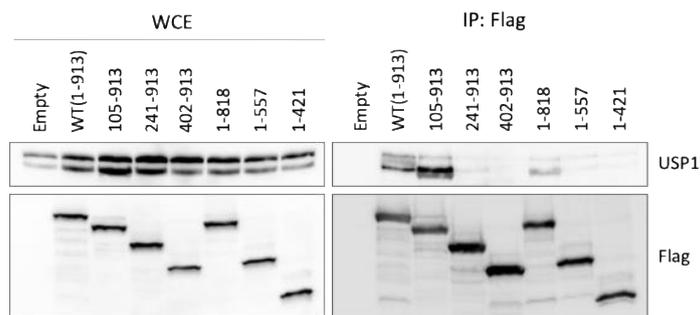
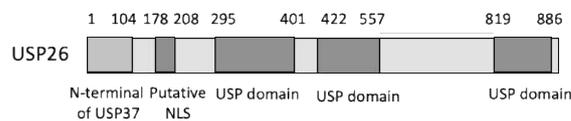


図5: USP26のdeletion mutantを用いたUSP1との相互作用解析
USP26とUSP1の結合にはN末端寄りの105番目のアミノ酸から240番目のアミノ酸領域、C末端寄りの558番目のアミノ酸から818番目のアミノ酸領域が重要である。

えて保存されており、USP26 と USP1 の結合は様々な種で保存された現象であると考えられた (図7参照)。

以上のように、USP26 は相同組換え修復を制御し、その阻害によって DNA クロスリンクを誘導する抗がん剤であるシスプラチンの作用を増強することから、USP26 の阻害とシスプラチンの投与の併用は頭頸部扁平上皮癌の新たな治療戦略となりうるポテンシャルを有していると考えられた。また詳細な分子機構は完全には解明できていないものの、本研究で USP26 の結合因子として同定された USP-UAF1 との相互作用が重要であると考えられた。

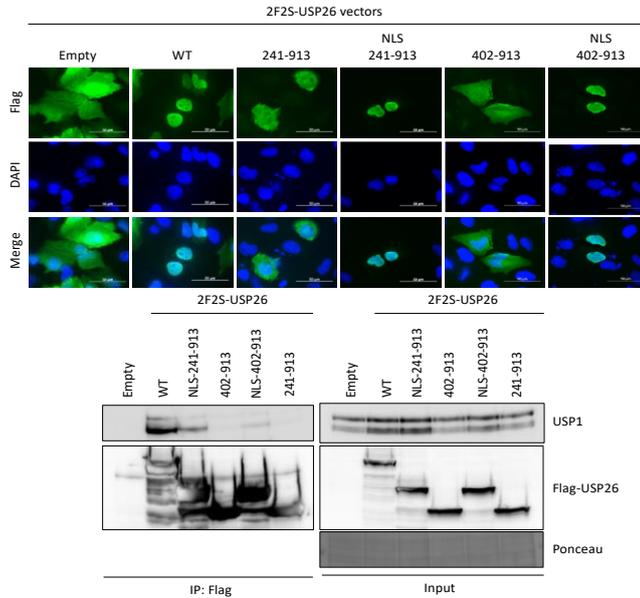


図6: USP26のN末端寄りのNLSがUSP1との結合に重要である

完全には解明できていないものの、本研究で USP26 の結合因子として同定された USP-UAF1 との相互作用が重要であると考えられた。

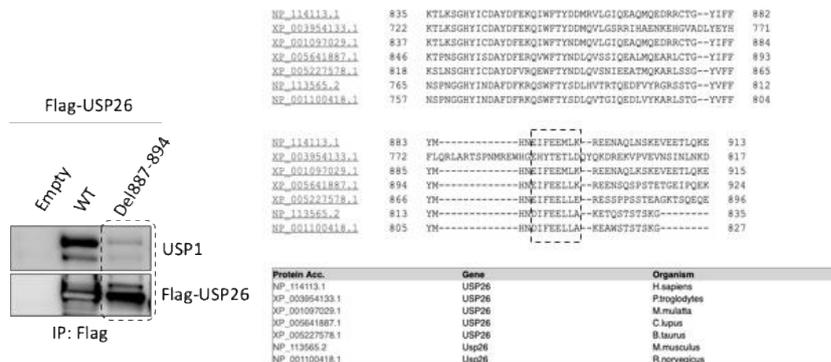


図7: USP26の887-894の8つのアミノ酸がUSP1との結合に重要である

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Chen Shu, Tamaki Naofumi, Kudo Yasusei, Tsunematsu Takaaki, Miki Kaname, Ishimaru Naozumi, Ito Hiro-0	4. 巻 69
2. 論文標題 Protective effects of resveratrol against 5-fluorouracil-induced oxidative stress and inflammatory responses in human keratinocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 238 ~ 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbr.21-23	査読の有無 有
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 Kisoda Satoru, Shao Wenhua, Fujiwara Natsumi, Mouri Yasuhiro, Tsunematsu Takaaki, Jin Shengjian, Arakaki Rieko, Ishimaru Naozumi, Kudo Yasusei	4. 巻 26
2. 論文標題 Prognostic value of partial EMT related genes in head and neck squamous cell carcinoma by a bioinformatic analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 1149 ~ 1156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.13351	査読の有無 有
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 Tsunematsu Takaaki, Arakaki Rieko, Kawai Hidehiko, Ruppert Jan, Tsuneyama Koichi, Ishimaru Naozumi, Earnshaw William C., Pagano Michele, Kudo Yasusei	4. 巻 133
2. 論文標題 APC/CCdh1 is required for the termination of chromosomal passenger complex activity upon mitotic exit	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.251314	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
1. 著者名 Sato Mami, Arakaki Rieko, Tawara Hiroaki, Tsunematsu Takaaki, Ishimaru Naozumi	4. 巻 22
2. 論文標題 Formation of Autoimmune Lesions Is Independent of Antibiotic Treatment in NOD Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3239 ~ 3239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22063239	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 常松貴明、新垣理恵子、石丸直澄
2. 発表標題 HPV陽性癌細胞の増殖に必須の脱ユビキチン化酵素の同定とその分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第57回日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 常松 貴明
2. 発表標題 がん細胞の老化細胞様変化による新たな機能の獲得とその分子機構
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会 アップデートシンポジウム「がん研究の新たな潮流 歯学基礎研究からの発信」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 常松 貴明
2. 発表標題 頭頸部癌におけるDUBsを介したシンセティックリーサリティーの確立への挑戦
3. 学会等名 第32回日本臨床口腔病理学会学術大会 若手シンポジウム2(口腔腫瘍研究の最前線) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 常松貴明、北川巧、工藤保誠、石丸直澄
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌の進展におけるPeriostinスプライシングバリエントの新たな役割
3. 学会等名 第75回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 常松貴明、北川巧、佐藤真美、新垣理恵子、石丸直澄
2. 発表標題 HPV陽性扁平上皮癌細胞の生存に必須な脱ユビキチン化酵素の同定とその役割の解明
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 常松貴明、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄
2. 発表標題 染色体パッセンジャー複合体による胎児性癌の未分化性維持機構
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 常松貴明、工藤保誠、石丸直澄
2. 発表標題 多角的アプローチによる口腔癌の発生・進展の分子機構の解明
3. 学会等名 第62回日本歯科基礎医学会学術大会、先端歯学国際教育研究ネットワーク・シンポジウム「歯学研究の今昔と次世代研究」(招待講演)
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			
米国	New York University			
英国	The University of Edinburgh			