

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07660

研究課題名（和文）線内用療法における脱ユビキチン化酵素O<sub>tub1</sub>の機能解明研究課題名（英文）Investigation of the function of a deubiquitinase, O<sub>tub1</sub> on the targeted alpha-radionuclide therapy

研究代表者

大島 康宏（Ohshima, Yasuhiro）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 量子バイオ基盤研究部・主幹研究員

研究者番号：00588676

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）：本研究では、[211At]MABG治療におけるO<sub>tub1</sub>発現誘導の役割を検討した。[211At]MABG処置によるO<sub>tub1</sub>タンパク質の発現上昇を確認し、この応答をO<sub>tub1</sub>特異的siRNAを用いて抑制することに成功した。siRNAによるO<sub>tub1</sub>発現抑制によって、[211At]MABGの細胞障害効果は有意に抑制されただけでなく、[211At]MABG処置後に起こるp21タンパク質発現上昇が抑制された。以上より、O<sub>tub1</sub>はp53-p21シグナル伝達を制御することで、[211At]MABGによる細胞障害誘導に寄与す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

本研究によって、[211At]MABGによるO<sub>tub1</sub>発現誘導は治療効果発現に寄与することが明らかとなった。本成果は核医学分野に限らず、放射線生物応答研究において世界初の知見であり、放射線を用いたがん治療研究進展への貢献が見込まれる。特に線内用療法では、同じ治療薬でも患者間で治療効果が異なることが問題となっており、O<sub>tub1</sub>は治療計画を患者毎に最適化する上で必要な治療薬の有効性の事前予測や治療効果評価に役立つ新たなバイオマーカーとして、線内用療法の高度化に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the role of O<sub>tub1</sub> induction in [211At]MABG treatment. We confirmed the increase in O<sub>tub1</sub> protein expression by [211At]MABG treatment and successfully suppressed this response using O<sub>tub1</sub>-specific siRNA. Downregulation of O<sub>tub1</sub> with siRNA suppressed not only the cytotoxic effect of [211At]MABG significantly, but also the increase in p21 protein expression by [211At]MABG. These results suggest that O<sub>tub1</sub> contributes to the anti-tumor effects of [211At]MABG by regulating p53-p21 signaling.

研究分野：放射線科学関連

キーワード：線内用療法 [211At]MABG O<sub>tub1</sub> バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

RI 内用療法は放射性同位元素 (RI) を結合させた腫瘍指向性化合物を体内に投与し、腫瘍に集積した RI から放出される放射線照射によってがんを破壊する。特に、 $\alpha$  線は細胞数個 (約 100  $\mu\text{m}$ ) の飛程において標的に高エネルギー (約 100 keV/ $\mu\text{m}$ ) を付与でき、炭素線に代表される重粒子線同様に高い細胞殺傷効果を有する。そのため、RI の中でも  $\alpha$  核種は腫瘍周囲の正常組織影響を抑えつつ、がんを効果的に破壊できると考えられている。欧米では  $\alpha$  核種を用いた RI 内用療法 (Targeted Alpha-radionuclide Therapy: TAT) の臨床応用が進み、前立腺特異的膜抗原 (PSMA) を用いた  $^{225}\text{Ac}$ -PSMA-617 等で高い治療効果が報告されている (引用文献 1)。しかし、TAT の治療効果は患者毎に異なる (引用文献 2) ことから、患者毎に TAT 感受性を見極め、治療を最適化することが現在の最重要課題となっている。

TAT 感受性の識別には、TAT の分子メカニズムを解明し、抗がん効果誘導の鍵となる分子 (バイオマーカー) を特定する必要がある。 $\alpha$  線の抗腫瘍メカニズムや放射線応答については、外部照射治療の研究において数多くの知見があり、TAT 推進の基盤となってきた。しかし、TAT では使用する RI に応じて半減期や放出される  $\alpha$  線の数異なる。また、腫瘍に対して短時間で集中的かつ均一に線量を付与する外部照射治療に比べ、TAT は線量率が低く、がん組織内分布が不均一であるため、長時間かつ不均一な照射となる。このように TAT の物理学的性質は外部照射治療と異なるため、従来知見を単純に TAT に外挿できない。そのため、個々の TAT 薬剤で分子メカニズムを理解する必要がある。しかし、TAT の分子メカニズムに関する研究は極僅かであり、その詳細は未だ不明である。

TAT 薬剤の一つである  $^{211}\text{At}$  標識メタアスタトベンジルグアニジン ( $^{211}\text{At}$ ]MABG) は、ノルエピネフリントランスポーターを介してがん細胞内に集積する薬剤で、悪性褐色細胞腫や神経芽細胞腫等の難治性がんの治療に大きな期待が寄せられている。申請者らは褐色細胞腫モデルマウスにおける  $^{211}\text{At}$ ]MABG の強力な抗腫瘍効果を実証し、悪性褐色細胞腫治療への有効性を明らかにした (引用文献 3)。更に  $^{211}\text{At}$ ]MABG 処置後の全遺伝子発現を RNA シーケンス解析により定量的かつ網羅的に解析し、 $^{211}\text{At}$ -MABG による細胞死誘導メカニズムとして細胞周期停止やアポトーシスに重要な p53-p21 経路の持続的な活性化を見出した。加えて、 $^{211}\text{At}$ ]MABG 特異的に高発現する複数の遺伝子を特定し、TAT における新奇細胞応答の可能性を見出した (引用文献 4)。 $^{211}\text{At}$ ]MABG 特異的に発現誘導された遺伝子のうち、Ovarian tumor domain-containing ubiquitin aldehyde binding protein 1 (Otub1) は脱ユビキチン化酵素の 1 つであり、転写因子をはじめとするタンパク質の安定化を介して多彩な機能を果たしている。がん治療の分野では、Otub1 は細胞死と治療抵抗性という相反する 2 つの作用を有することが知られている。特に、がん遺伝子として知られる RAS や FOXM1 等の安定化を介したがんの悪性化や治療抵抗性への寄与が示唆されている (引用文献 5、6) 一方で、DNA 修復阻害の他、p53 安定化を介した細胞死誘導にも関わることが知られている (引用文献 7、8)。しかし、 $^{211}\text{At}$ ]MABG 特異的に発現誘導される Otub1 の具体的な寄与は未だ不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では TAT における Otub1 の新奇バイオマーカーとしての可能性を明らかにすることを目的とし、 $^{211}\text{At}$ ]MABG 治療における Otub1 発現誘導の分子生物学的役割を検討した。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず  $^{211}\text{At}$ ]MABG 処置による Otub1 タンパク質発現への影響を検討した。次に、Otub1 に特異的な siRNA を利用して Otub1 発現を抑制した細胞を樹立し、 $^{211}\text{At}$ ]MABG による細胞障害効果の変化を検討した。更に、Otub1 による細胞障害効果への影響を検証するため、Otub1 によって制御される細胞内シグナルタンパク質発現を解析した。

### 1) [<sup>211</sup>At]MABG による Otub1 タンパク質発現誘導の確認

[<sup>211</sup>At]MABG はこれまでに確立した手法により製造した(引用文献3)。ラット褐色細胞腫細胞株(PC-12)に対し、[<sup>211</sup>At]MABG(0.8kBq/mL、PC-12のコロニー増殖活性を10%に抑制する放射能濃度)若しくは培地(Control)を処置した後、24及び48時間後に細胞を回収し、ウエスタンブロット法によってOtub1発現を検討した。

### 2) Otub1 発現誘導抑制系の構築

エレクトロポレーション法によってOtub1特異的な2種のsiRNA、若しくは陰性対照とした2種のsiRNAをそれぞれPC-12に導入した。エレクトロポレーション実施から24、48、72時間後に細胞を回収し、Otub1 mRNA発現を定量PCR法にて、タンパク質発現をウエスタンブロット法にて測定した。Otub1 mRNA発現は $\Delta\Delta Cq$ 法で比較した。(以降、野生型細胞をWT、エレクトロポレーションのみ実施した細胞をEle、陰性対照siRNA導入細胞をN#1、N#2、Otub1特異的siRNA導入細胞をO#1、O#2とする。)

### 3) <sup>211</sup>At-MABGの細胞障害効果に対するOtub1発現抑制の影響

WT、Ele、N#1、N#2、O#2に対して、[<sup>211</sup>At]MABG(0.8kBq/mL)若しくは培地を処置し、24時間経過後に細胞を洗浄・回収した。細胞を96wellプレートに播種し、14日間培養後の生存細胞をMTT法によって定量した。

### 4) Otub1 依存的な細胞内シグナル応答解析

WT、Ele、N#1、N#2、O#2に対して、[<sup>211</sup>At]MABG(0.8kBq/mL)若しくは培地を処置し、24時間経過後に細胞を洗浄・回収した。Otub1は脱ユビキチン化によってp53タンパク質を安定化することに着目し、p53下流に存在するp21タンパク質発現をウエスタンブロット法によって検討した。

## 4. 研究成果

### 1) [<sup>211</sup>At]MABG による Otub1 タンパク質発現誘導の確認

[<sup>211</sup>At]MABG(0.8kBq/mL)処置から24、48時間経過後のOtub1タンパク質発現を調べた結果、Controlに比べ増加した(図1A)。バンド強度を画像解析ソフトウェア(ImageJ)によって定量し、内標準として測定した $\beta$ -アクチンに対する[<sup>211</sup>At]MABGの比を算出すると、24時間までに約2.3倍、48時間後までに3.2倍まで増加した(図1B)。これらの結果から、[<sup>211</sup>At]MABG処置によってOtub1タンパク質の発現増加が誘導されることが示された。

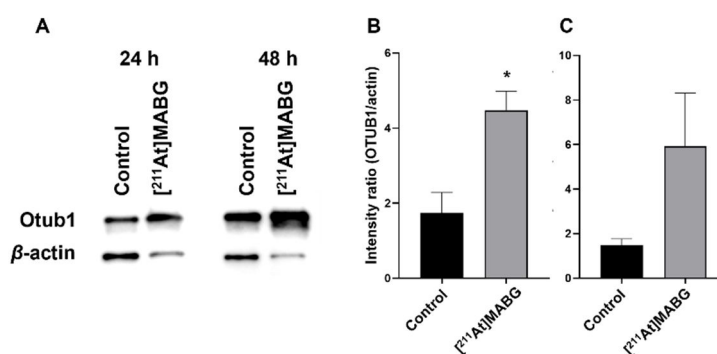


図1 [<sup>211</sup>At]MABG処置後のOtub1タンパク質発現。Otub1及び $\beta$ -アクチンのバンドイメージ(A)、MABG処置後24時間(B)及び48時間(C)におけるOtub1と $\beta$ -アクチンのバンド強度比。(n=3-7, \* p<0.05 t-test)

### 2) Otub1 発現誘導抑制系の構築

[<sup>211</sup>At]MABGによるOtub1発現誘導を抑制するため、siRNAを利用したOtub1発現抑制細胞の樹立を進めた。siRNA導入後のOtub1 mRNA発現を測定すると、O#2導入によってOtub1発現は30%程まで抑制された(図2A)。siRNAによるOtub1発現抑制効果の時間依存的変化を調べると、siRNA導入後48時間まではOtub1 mRNA発現を抑制でき、72時間では抑制効果が弱まるのが分かった(図2B)。O#1導入による抑制効果はO#2よりも弱く、最大でも抑制効果は50%未満であった。エレクトロポレーション及びN#2

導入によって Otub1 mRNA の若干の増加が認められた。Otub1 タンパク質発現を測定すると、mRNA 発現と同様に O#2 導入によって Otub1 発現が強く抑制された (図 2C)。Otub1 タンパク質発現の時間依存的変化を調べると、siRNA による効果は 48 時間後まで認められ、72 時間後に消失した (図 2D 及び E)。これらの結果から、Otub1 発現抑制細胞の樹立に成功し、以降の検討では Otub1 発現抑制に O#2 を使用し、エレクトロポレーションから 24 h 後に $[^{211}\text{At}]$ MABG を処置することとした。

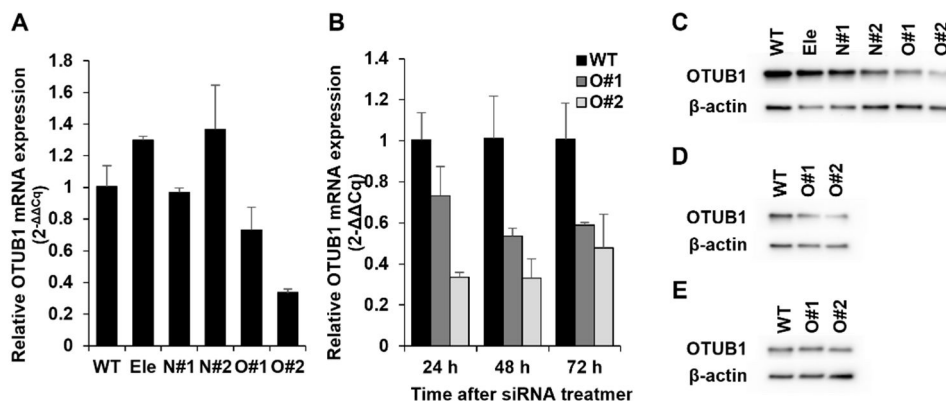


図 2 siRNA 導入による Otub1 発現抑制。siRNA 処置後 24 時間における Otub1 mRNA 発現 (A, n=4)、siRNA 添加後 24-72 時間の Otub1 mRNA 発現 (B, n=4)、siRNA 処置後 24 時間における Otub1 タンパク質発現のバンドイメージ (C)、siRNA 添加後 48 時間 (D) 及び 72 時間 (E) における Otub1 タンパク質発現のバンドイメージ。

### 3) $[^{211}\text{At}]$ MABG の細胞障害効果に対する Otub1 発現抑制の影響

WT、Ele、N#1、N#2、O#2 に対して、 $[^{211}\text{At}]$ MABG 処置後 24 時間において細胞を洗浄・回収し、Otub1 タンパク質発現及びコロニー増殖活性を検討した。その結果、 $[^{211}\text{At}]$ MABG によって発現誘導された Otub1 は、O#2 では発現増加は認められず、培地処置後の WT と同等であった (図 3A 及び B)。コロニー増殖活性は、Otub1 発現抑制によって  $[^{211}\text{At}]$ MABG による細胞障害活性が有意に低下した (図 3C 及び D,  $P < 0.001$ )。これらの結果から、Otub1 は  $[^{211}\text{At}]$ MABG による細胞障害効果の誘導に寄与していることが示唆された。

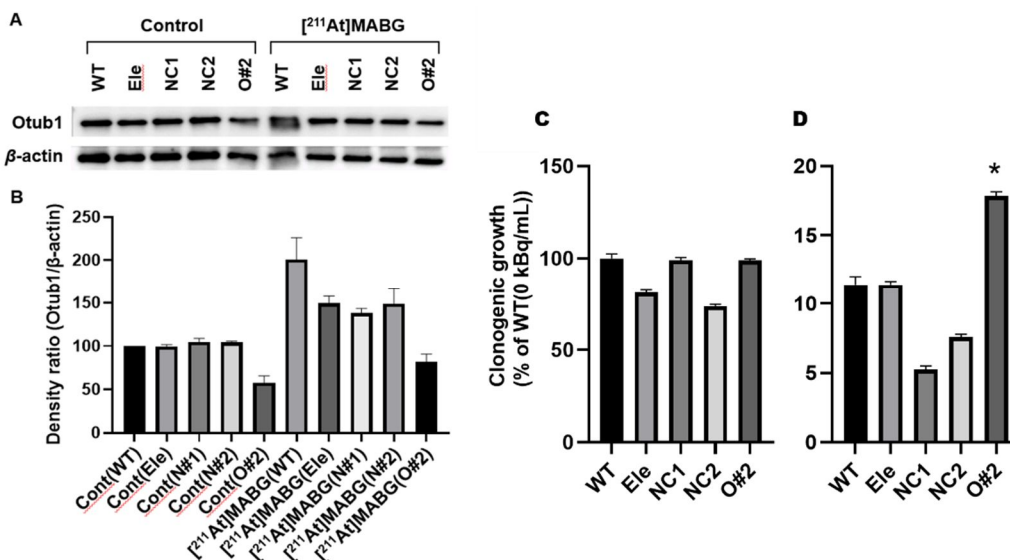


図 3 siRNA 導入細胞における  $[^{211}\text{At}]$ MABG 処置後の Otub1 発現及びコロニー増殖活性。siRNA 導入細胞における  $[^{211}\text{At}]$ MABG 処置後の Otub1 タンパク質のバンドイメージ (A) 及び Otub1 と  $\beta$ -アクチンのバンド強度比 (B, n=3-7)、siRNA 導入細胞に対する培地 (C) 及び  $[^{211}\text{At}]$ MABG (D) 処置後のコロニー増殖活性 (n=5-35, \*  $p < 0.001$ )。

#### 4) Otub1 依存的な細胞内シグナル応答解析

Otub1 発現がどのように $[^{211}\text{At}]\text{MABG}$ による細胞障害効果に関与しているかを検討するため、WT、Ele、N#1、N#2、O#2 に対して $[^{211}\text{At}]\text{MABG}$ 処置後、p53 によって制御を受ける p21 タンパク質発現を調べた。その結果、N=1 ではあるものの、Otub1 発現と非常に似通った発現変動を示すことが分かった(図4)。この結果より、Otub1 発現によって p53 タンパク質が安定化され、その結果として p21 タンパク質発現誘導に寄与することで、 $[^{211}\text{At}]\text{MABG}$ による細胞障害効果発動に関わっている可能性が示唆された。

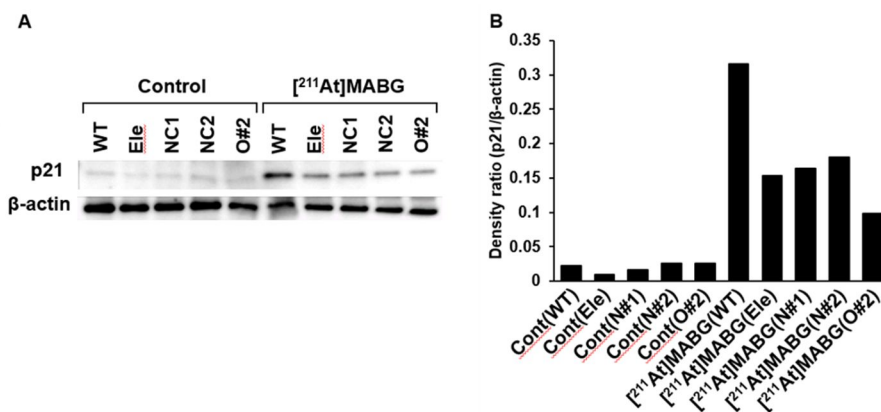


図4 siRNA 導入細胞における $[^{211}\text{At}]\text{MABG}$ 処置後の p21 発現。siRNA 導入細胞における $[^{211}\text{At}]\text{MABG}$ 処置後の p21 タンパク質のバンドイメージ (A) 及び p21 と β-アクチンのバンド強度比 (B、n=1)。

#### 【まとめ】

$[^{211}\text{At}]\text{MABG}$ 治療における Otub1 発現誘導の分子生物学的役割を検討した結果、Otub1 は $[^{211}\text{At}]\text{MABG}$ による細胞障害効果発現に関与しており、p53 下流タンパク質である p21 発現誘導を制御することによって、細胞障害効果発現に関わっている可能性が示唆された。そのため、将来的に Otub1 遺伝子の事前検査による $[^{211}\text{At}]\text{MABG}$ 治療応答性の予測や $[^{211}\text{At}]\text{MABG}$ 治療後の Otub1 遺伝子若しくはタンパク質発現誘導を測定することによって、 $[^{211}\text{At}]\text{MABG}$ によって照射を受けたのか否かを理解することができる可能性がある。以上より、Otub1 は $[^{211}\text{At}]\text{MABG}$ 治療における新奇バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

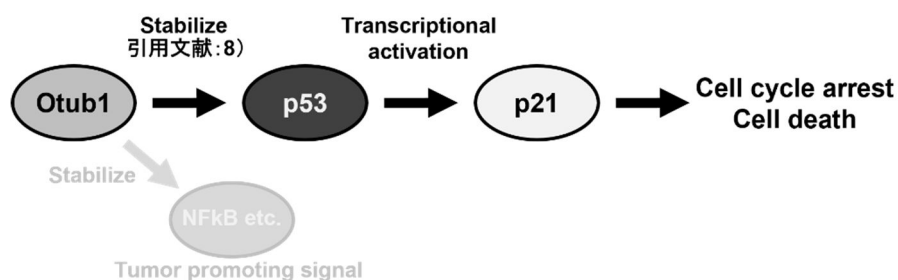


図5 本研究で明らかとなった $[^{211}\text{At}]\text{MABG}$ 治療における Otub1 発現上昇の寄与

#### 【引用文献】

- 1) *J Nucl Med*, 2016, **57**, 1941-44.
- 2) *J Nucl Med*, 2018, **59**, 795-802.
- 3) *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2018, **45**, 999-1010.
- 4) *Theranostics*, 2019, **9**, 1538-49.
- 5) *EMBO Mol Med*, 2016, **8**, 288-303.
- 6) *Oncogene*, 2016, **35**, 1433-44.
- 7) *Nature*, 2010, **466**, 941-6.
- 8) *World J Biol Chem*, 2014, **5**, 75-84.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大島康宏、横田裕一郎、河野暢明、渡辺茂樹、佐々木一郎、石岡典子、荒川和晴、坂下哲哉
2. 発表標題 脱ユビキチン化酵素OTUB1発現抑制は211At-MABGの細胞障害を阻害する
3. 学会等名 第62回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2022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	坂下 哲哉  (Sakashita Tetsuya)  (30311377)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 量子バイオ基盤研究部・上席研究員   (82502)	
研究分担者	横田 裕一郎  (Yokota Yuichiro)  (30391288)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・主幹研究員   (82502)	削除：2021年7月30日

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