

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659401

研究課題名(和文) 脱ユビキチン酵素と細胞表面分子の会合による悪性中皮腫の病態制御機構の研究

研究課題名(英文) Association of deubiquitin ligase and cell surface molecules regulates the pathophysiology of malignant pleural mesothelioma

研究代表者

森本 幾夫 (Morimoto, Chikao)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・その他

研究者番号：30119028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ペリオスチンは癌における浸潤、転移に関与する分子であるが悪性中皮腫細胞においてCD26発現と相関し中皮腫細胞からのペリオスチンの分泌を促進し、中皮腫細胞の浸潤転移を亢進させた。またCD26は $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンとも会合して細胞浸潤に重要な役割を果たし、CD9は $\alpha 5 \beta 1$ の発現を負に制御することで細胞浸潤を抑制していることを明らかにした。更にCD26はSSTR4とも会合し、その相互作用は、悪性中皮腫細胞の増殖を制御していた。CD26は脱ユビキチン酵素のUSPとも会合しCD26陽性中皮腫細胞の浸潤、転移能を抑制し実際の悪性中皮腫組織においてもCD26とUSP22は腫瘍細胞において共局在していた。

研究成果の概要(英文)：Malignant pleural mesothelioma (MPM) is an aggressive malignancy arising from mesothelial lining of pleura. It is generally associated with a history of asbestos exposure and has a very poor prognosis. We found that expression of CD26 upregulates periostin secretion by MPM cells, leading to enhanced MPM cell migratory and invasive activity. CD26 potentiates tumor cell invasion through its interaction with $\alpha 5 \beta 1$ integrin, and CD9 negatively regulates tumor cell invasion by reducing the level of CD26- $\alpha 5 \beta 1$ integrin complex through an inverse correlation between CD9 and CD26 expression. We also showed CD26 associated with somatostatin (SST) receptor 4 and this interaction regulates the growth of MPM cells. Moreover, CD26 is also associated with deubiquitin ligase22 (USP22) which regulated the invasion and metastasis of CD26 positive mesothelioma cells and actually these molecules colocalized in the tissue samples of malignant mesothelioma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：悪性中皮腫 CD26 CD9 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン ペリオスチン ソマトスタチン受容体4 (SSTR4) 脱ユビキチン酵素22 (USP22) 浸潤転移

1. 研究開始当初の背景

USP22 はヒト SAGA complex を形成する脱ユビキチン酵素で、ユビキチン修飾されたタンパク質からユビキチンを解離させる酵素である。モノユビキチン化の標的は H2A と H2B である。H2A のモノユビキチン化に重要な遺伝子群に、ポリコム遺伝子があり、このうち Bmi1 は幹細胞及び癌幹細胞の自己複製に必須の遺伝子である。Bmi1 はユビキチンリガーゼ Ring1A/1B と結合し、H2A をモノユビキチン化し、Ink4a-Arf (癌抑制遺伝子) の発現を抑制する。最近 USP22 は H2B に加えて H2A もモノユビキチン化すること (Cell Cycle, 7:1522, 2008)、Zang らは USP22 は転移・再発・死亡との相関を示す悪性度の強い癌における 11 個の遺伝子群 (Bmi1 を含む) の一つで、癌幹細胞マーカーであると報告 (J Clin Invest, 115:1503, 2005)。また USP22 は細胞周期や Myc による癌化にも関与している (Mol Cell, 29:102, 2008)。

アスベストは約 30-40 年の潜伏期間を経て悪性中皮腫を引き起こし、死亡者数は本邦では 2030 年をピークとして年々増加すると予測され、大きな社会問題である。予後は極めて不良で、新規かつ有効な治療法開発は急務である。

CD26 は 110kDa の膜蛋白で、dipeptidyl peptidase (DPP) 酵素を含む T 細胞共刺激分子である。我々は CD26 単クローン抗体の開発、CD26cDNA の単離を世界に先駆けて行い、CD26 の様々な機能を確立してきた (Trends Immunol, 29:295, 2008)。更に悪性中皮腫由来株 JMN は CD26 陽性であることを偶然発見し、悪性中皮腫の患者組織で CD26 の発現について 100 例以上検討したところ、正常中皮では全く発現していないのに上皮型では 8 割以上が CD26 を発現していることを見出した (Oncol Rep, 26:1369, 2011)。CD26 陰性の MSTO 中皮腫株に CD26 を発現させたところ、細胞遊走能、滲潤能ともに亢進が認められ、CD26 分子が悪性中皮腫の病態に強く関与することが示唆された。更に CD26 は細胞表面から移動し核内にも局在することを報告しており (Cancer Cell Inter, 9:17, 2009)、CD26 と USP22 との相互作用及び他の細胞表面分子との相互作用が悪性中皮腫の病態や治療予後などに深く関与していることが強く示唆される。

2. 研究の目的

表面抗原は細胞外からの刺激を細胞内に伝達する役割を担っている。悪性中皮腫において CD26 分子はどのようなシグナル伝達系を介して特に USP22 と相互作用を行い、モノユビキチン H2B、H2A を介して、悪性中皮腫の

細胞増殖、滲潤などの機能に影響を与えるかその分子機構を明らかにする。特に USP22 と CD26 及びその他の表面分子との会合及びその意義及びシグナル伝達機構について解明して、表面分子とヒストン修飾、さらに脱ユビキチン及びユビキチン化を介して癌幹細胞特性を増強/減弱する可能性についても調べ、悪性中皮腫の病態解明及び新規治療薬開発の基盤となるか検討する。

3. 研究の方法

本研究においては、まず CD26 が悪性中皮腫の単なる目印ではなく、細胞外刺激を細胞内に伝え、癌幹細胞特性に重要な役割をもつ分子かを、過剰発現/ノックダウン実験で明らかにする。次いで、CD26 からどのようなシグナル伝達系を経由して USP22 の発現調節を行い、ヒストン H2A、H2B のユビキチン修飾に伝わっているかを、CD26 と USP22 の過剰発現/ノックダウンを行い、その生物学的な機能変化や種々の遺伝子発現をマイクロアレイ解析で比較する。変動する遺伝子が発見されれば、その新規蛋白の機能を解析する。さらに CD26 分子のシグナル伝達に関与したり、その機能発現に関与する他の細胞表面分子を同定する。また CD26 と USP22 の会合様式やその機能的な意義を解析する。外的要因として、これらの表面マーカーのリガンドや、agonist/antagonist を与えたときに、癌幹細胞特性を増強/減弱したり、癌幹細胞分画が増減するかも調べる。これら一連の網羅的な研究により、表面マーカーを介したヒストン修飾による癌幹細胞特性のエピジェネティック制御の全貌を明らかにし、新規の悪性中皮腫癌幹細胞シグナル系に基盤をおく癌幹細胞標的治療の実現を目指していく。

4. 研究成果

悪性中皮腫は胸膜の中皮細胞から出現する非常に浸潤度の高い悪性腫瘍で、アスベストへのばく露により発生すると考えられている。非常に予後は悪く、悪性中皮腫の特性に関しての分子機構の理解が依然として乏しいこともその原因の一つとされている。我々はインテグリン接着分子に焦点をおき、CD26 発現増強は中皮腫細胞の浸潤、転移に関与するという過去の研究を更に発展させた。今までに CD26 の強発現及び CD26 発現ノックダウン中皮腫細胞株を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ CD26 発現はペリオスチンの発現と最も相関することを同定した。更に CD26 分子は中皮腫細胞からのペリオスチンの分泌を促進し、中皮腫細胞の転移、浸潤活性も亢進させることを発見した。次に CD26 発現とペリオスチン発現の分子機構を解析したところ CD26 分子のペリオスチン発現の

増強はヘリックス - ループ - ヘリックス転写因子の Twist1 の核内移行の結果により生じ、CD26 分子による Src のリン酸化も伴うことを明らかにした。

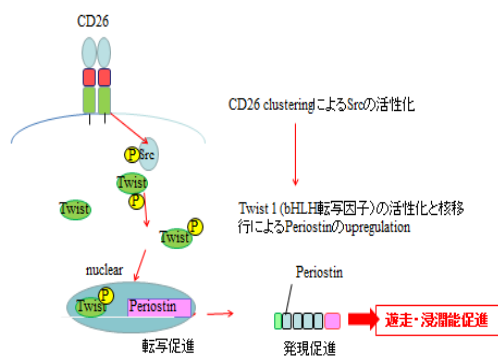


図 1 . CD26 による Periostin 発現の分子メカニズム

悪性中皮腫細胞株を用いて CD26 及び CD9 は悪性中皮腫腫幹細胞の特性を示すマーカーであることを今までに報告した。CD26、CD9とも種々の細胞表面分子と会合しているとされていることから、悪性中皮腫細胞株での CD26 及び CD9 との関係を検討した。CD26 は CD26 抗体処理により細胞表面上から internalize して発現が減少し、同時に CD9 の発現も減少した。CD26 抗体による免疫沈降により CD26 に加えて CD9 も共沈し、CD26 は CD9 と細胞表面上で会合していることが示唆された。更に、中皮腫細胞株から CD26 をノックダウンしたところ CD9 の発現は上昇し、CD26 を強発現させたところ CD9 の発現は減少した。また CD9 のノックダウンにより CD26 発現は上昇した。このように CD26 及び CD9 は中皮腫細胞株では逆性に相関して会合していることが示唆された。

次にこの会合の生物学的意義を検討した。CD26+CD9+陽性中皮腫細胞は CD26-CD9+細胞と比して強い浸潤能を有し、CD26 をノックダウンすることで浸潤能が低下することから、CD26 は細胞浸潤能に重要な役割を果たしていることが示唆された。また CD9 のノックダウンにより CD26+陽性中皮腫細胞の浸潤能は更に亢進し、CD26 陽性細胞株への CD9 の発現により細胞浸潤を抑制した。1 インテグリンは細胞浸潤に重要なことから、これら分子と 1 インテグリンとの関係も検討した。中皮腫細胞株において CD26 と 5 1 インテグリン分子は共沈降することから会合してい

ることが明らかとなった。更に CD9 分子をノックダウンしたところ FAK 及び Cas-L 蛋白及びチロシンリン酸化が上昇し、一方 CD26 のノックダウンはこれらの蛋白の発現の減少が認められた。CD26 は 5 1 とも会合して細胞浸潤に重要な役割を果たし CD9 は 5 1 の発現を負に制御することで細胞浸潤を抑制していることが明らかになった。我々の結果は CD26 及び CD9 は悪性中皮腫及びその他の悪性腫瘍での有力なバイオマーカー及び新しい治療法開発の有望な標的分子であることが示唆された。

CD26 分子は上皮型中皮腫に選択的に発現しているが、CD26 の悪性中皮腫細胞の増殖制御の分子機構を解明した。生化学的及び細胞生物学的的方法により悪性中皮腫の標的となる分子を同定した。その分子の腫瘍伸展への役割はマウスモデルによっても評価し、更にこれらの分子の組織発現は臨床検体についても解析した。

研究結果であるが、CD26 を細胞表面及び CD10 を細胞質に発現するような CD26-CD10 キメラ分子を発現するコンストラクトを作製して CD26 陰性中皮腫細胞株に発現して全ての CD26 分子を発現させた中皮腫細胞株の細胞機能としてコロニー形成、細胞遊走、浸潤能を検討したところ、CD26-CD10 キメラ分子では上記の機能の亢進は認められず、CD26 の細胞質ドメインが CD26 の増殖浸潤能に重要なことが明らかになった。

CD26 分子の細胞質ドメインは6個のアミノ酸からなりチロシンリン酸化部位も存在せず機能発現及びシグナル伝達のためには他のシグナル分子との会合が必要と考えられる。そこで CD26 の細胞質ドメインに会合する分子を同定するために中皮腫細胞株を用いた CD26 抗体の共免疫沈降により認められるバンドを切り出し、その質量分析を行い Somatostatin Receptor (SSTR)4 を同定した。

また、悪性中皮腫の増殖抑制作用は CD26 分子と SSTR4 分子との相互作用により、介在されることを明らかにした。SSTR4 由来細胞増殖抑制機能は SHP-2 チロシンオスファターゼにより調節され、SSTR4 アゴニストによるこの抑制作用は CD26 抗体のクロスリンクによるリピットラフトにおける会合分子の集合により増強された。更に腫瘍移植モデルマウスを用いた実験により CD26 抗体の抗腫瘍効果は SSTR4 アゴニストの併用により増強され、また SSTR4 分子は悪性中皮腫患者組織検体において CD26 分子と共に上皮型及び混合型中皮腫に高頻度に発現していることが明らかとなった。本研究結果から CD26 抗体と SSTR4 アゴニストとの併用療法は悪性中皮腫への抗腫瘍効果を増殖する可能性を示唆した。

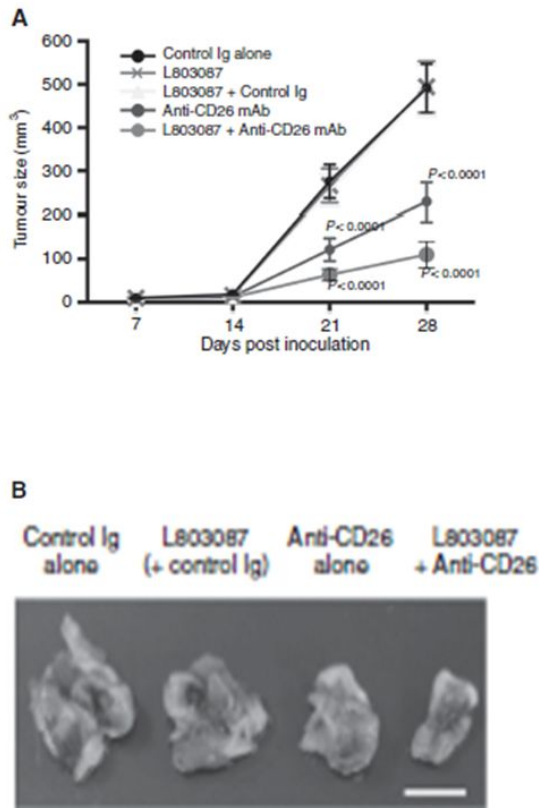


図2. SSTR4 アゴニストとヒト化 CD26 抗体の併用による中皮腫細胞移植マウスモデルでの腫瘍成長抑制効果について

CD26 と USP22 の発現相関及びその機能について検討した。CD26 陰性中皮腫株に CD26 分子を発現させると USP22 の発現も増強し、また CD26 陽性 MSTO 株は *in vitro* 及び *in vivo* とともに浸潤、転移能が増加した。更にもともと CD26 陽性株の Meso1 株から CD26 をノックダウンさせると USP22 の発現が増加し、更に CD26+MSTO 株及び Meso1 株から USP22 をノックダウンさせると CD26 発現の低下も認められ、CD26 と USP22 は悪性中皮腫細胞株で会合している可能性が示唆された。更に上皮型悪性中皮腫組織検体の組織染色を施行したところ、CD26 と USP22 とは腫瘍細胞上で会合していることが示唆された。また悪性中皮腫細胞株から siRNA にて USP22 の発現を低下させその細胞を移植したところ、コントロール群と比較してマウスの生存は延長した。

このように USP22 と CD26 は会合しており、悪性中皮腫の予後にも関与している可能性が示唆された。

我々の発見は悪性中皮腫の生物学に關与する分子機構の詳細な理解を深めるのみならず、悪性中皮腫の新しい治療法開発にも結びつけることができる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 16 件)

Ohnuma K, Saito T, Hatano R, Hosono O, Iwata S, Dang NH, Ninomiya H, Morimoto C. Comparison of two commercial ELISAs against an in-house ELISA for measuring soluble CD26 in human serum. *J Clin Lab Anal*. 2014; in press. DOI: 10.1002/jcla.21736.

Yamamoto J, Ohnuma K, Hatano R, Okamoto T, Komiya E, Yamazaki H, Iwata S, Dang NH, Aoe K, Kishimoto T, Yamada T, Morimoto C. Regulation of somatostatin receptor 4-mediated cytostatic effects by CD26 in malignant pleural mesothelioma. *Br J Cancer*. 2014; 110: 2232-2245. DOI: 10.1038/bjc.2014.151.

Kwan JC, Liu Y, Ratnayake R, Hatano R, Kuribara A, Morimoto C, Ohnuma K, Paul VJ, Ye T, Luesch H. Grassypeptolides as Natural Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase 8 and T-Cell Activation. *Chembiochem*. 2014; 15:799-804. DOI: 10.1002/cbic.201300762.

Hatano R, Yamada T, Matsuoka S, Iwata S, Yamazaki H, Komiya E, Okamoto T, Dang NH, Ohnuma K, Morimoto C. Establishment of monoclonal anti-human CD26 antibodies suitable for immunostaining of formalin-fixed tissue. *Diagn Pathol*. 2014; 9: 30-42. DOI: 10.1186/1746-1596-9-30.

Okamoto T, Iwata S, Yamazaki H, Hatano R, Komiya E, Dang NH, Ohnuma K, Morimoto C. CD9 Negatively Regulates CD26 Expression and Inhibits CD26-Mediated Enhancement of Invasive Potential of Malignant Mesothelioma cells. *PLoS One*. 2014; 9: e86671-83. DOI: 10.1371/journal.pone.0086671.

Havre PA, Dang LH, Ohnuma K, Iwata S, Morimoto C, Dang NH. CD26 Expression on T-Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL) Line Karpas 299 is Associated with Increased Expression of Versican and MT1-MMP and Enhanced Adhesion. *BMC Cancer*. 2013; 13: 517-27. DOI: 10.1186/1471-2407-13-517.

Ohnuma K, Haagmans BL, Hatano R, Raj VS, Mou H, Iwata S, Dang NH, Bosch BJ, Morimoto C. Inhibition of Middle East Respiratory

Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Infection by Anti-CD26 Monoclonal Antibody. *J Virol*; 2013; 87: 13892-9.
DOI: 10.1128/JVI.02448-13.

Saito T, Ohnuma K, Suzuki H, Dang NH, Hatano R, Ninomiya H, Morimoto C. Polyarthropathy in type 2 diabetes patients treated with DPP4 inhibitors. *Diabetes Res Clin Pract*. 2013; 102: e8-e12.
DOI: 10.1016/j.diabres.

Tao X, Hill TE, Morimoto C, Peters CJ, Ksiazek TG, Tseng CT. Bilateral Entry and Release of Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus Induces Profound Apoptosis of Human Bronchial Epithelial Cells. *J Virol*. 2013; 87: 9953-8.
DOI: 10.1128/JVI.01562-13.

Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Yamada T, Morimoto C. Prevention of acute graft-versus-host disease by humanized anti-CD26 monoclonal antibody. *Br J Haematol*. 2013; 162: 263-77.
DOI: 10.1111/bjh.12378.

Yamada K, Hayashi M, Madokoro H, Nishida H, Du W, Ohnuma K, Sakamoto M, Morimoto C, Yamada T. Nuclear Localization of CD26 Induced by a Humanized Monoclonal Antibody Inhibits Tumor Cell Growth by Modulating of POLR2A Transcription. *PLoS One*. 2013; 8: e62304-19.
DOI: 10.1371/journal.pone.0062304.

Ikeda T, Kurosawa M, Morimoto C, Kitayama S, Nukina N. Multiple effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on neuropsychiatric disorders. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 436: 121-7.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.017.

Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Komoriya K, Dang NH, Morimoto C. CD26-mediated costimulation in human CD8+T cells provokes effector function via proinflammatory cytokine production. *Immunol*. 2013; 138: 165-72.
DOI: 10.1111/imm.12028.

Amatya VJ, Takeshima Y, Aoe K, Fujimoto N, Okamoto T, Yamada T, Kishimoto T, Morimoto C, Inai K. CD9 expression as a favorable prognostic marker for patients with malignant mesothelioma. *Oncol Rep*. 2013; 29: 21-8.
DOI: 10.3892/or.2012.2116.

Yoshikawa N, Shimizu N, Maruyama T, Sano M, Matsushashi T, Fukuda K, Kataoka M, Satoh T, Ojima H, Sawai T, Morimoto C, Kuribara A, Hosono O, Tanaka H. Cardiomyocyte-Specific Overexpression of HEXIM1 Prevents Right Ventricular Hypertrophy in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Mice. *PLoS One*. 2012; 7: e52522-34.
DOI: 10.1371/journal.pone.0052522.

Kondo S, Iwata S, Yamada T, Inoue Y, Ichihara H, Kichikawa Y, Katayose T, Souta-Kuribara A, Yamazaki H, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Hayashi Y, Sakamoto M, Kamiya K, Dang NH, Morimoto C. Impact of the Integrin Signaling Adaptor Protein NEDD9 on Prognosis and Metastatic Behavior of Human Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2012; 18: 6326-6338.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2162.

〔産業財産権〕
出願状況（計2件）

名称:MERS コロナウイルス感染予防治療剤
発明者:森本幾夫、大沼圭
権利者:順天堂大学
種類:特許権
番号:特願 2013-187124
出願年月日:2013年9月17日(PCT出願)
国内外の別:国外

名称:抗ヒト化 CD26 モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片
発明者:森本幾夫、大沼圭、波多野良、山田健人
権利者:順天堂大学
種類:特許権
番号:特願 2013-158533
出願年月日:2013年7月31日(PCT出願)
国内外の別:国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 幾夫 (MORIMOTO CHIKAO)
順天堂大学・大学院医学研究科・客員教授
研究者番号: 30119028