

令和元年5月22日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04293

研究課題名(和文) 脱ユビキチン化酵素USP8の機能獲得型変異によるクッシング病の発症機構

研究課題名(英文) Pathogenic mechanisms of Cushing disease caused by gain-of-function USP8 mutations

研究代表者

駒田 雅之 (Komada, Masayuki)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授

研究者番号：10225568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：Cushing病は、脳下垂体から副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)が過剰に分泌されて起こる疾患で、厚生労働省の指定難病である。今回、日本人のCushing病患者で脱ユビキチン化酵素USP8の遺伝子変異が高頻度に行っていることを示した。また、分子機構の解析から、変異型USP8はユビキチン結合タンパク質STAMと高効率に複合体を形成し、EGF受容体・V1b・SSTR2/5などの膜タンパク質を過度に脱ユビキチン化、ACTH産生細胞の増殖やホルモン産生に影響することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人Cushing病患者で高頻度にUSP8遺伝子に変異が行っているという今回の研究結果は、USP8変異によるCushing病の発症機構の詳細な解析が、わが国におけるCushing病の治療法を確立する上で非常に重要であることを示すものである。また、USP8の遺伝子変異がACTH産生細胞の増殖やホルモン産生に影響する分子メカニズムの一部が明らかとなったことは、未だに特效薬のないCushing病の治療にとって、治療薬開発のための分子基盤を示した成果だと言える。従って、本研究成果は、Cushing病の発症メカニズムの解明に貢献しただけではなく、治療薬開発にも役立つと考えられ、社会的意義は非常に高い。

研究成果の概要(英文)：Cushing's disease, one of intractable diseases, is caused by the hypersecretion of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) from pituitary tumors. In this study, we showed that the gene encoding deubiquitinating enzyme USP8 is frequently mutated in the pituitary tumors of Japanese Cushing's disease patients. Mechanistically, the mutation induces the increased interaction of USP8 with ubiquitin-binding protein STAM, thereby enhancing USP8 enzyme activity. The mutated form of USP8 excessively deubiquitinates some membrane proteins including EGF receptor, vasopressin receptor V1b and somatostatin receptor SSTR2/5, and affects corticotroph proliferation and hormone secretion.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ユビキチン 脱ユビキチン化酵素 エンドサイトーシス 受容体ダウンレギュレーション 腫瘍 クッシング病 脳下垂体 ACTH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Cushing 病は、脳下垂体に腫瘍が形成され、その腫瘍から副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) が過剰に分泌されて起こる疾患で、厚生労働省の指定難病である。この腫瘍形成や ACTH 過剰分泌の原因メカニズムは不明で、特異的な治療薬は開発されていない。我々は、国際共同研究によりヨーロッパの Cushing 病患者の腫瘍ゲノム解析を行い、最も高頻度に変異が見られる遺伝子として Ubiquitin Specific Protease 8 (USP8)を見出していた。

2. 研究の目的

日本人の Cushing 病患者の腫瘍ゲノム解析を行い、USP8 遺伝子にどのような頻度でどのような変異が生じているか解明する。また、変異型 USP8 を発現する細胞やマウスを開発し、USP8 の遺伝子変異による Cushing 病発症メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

日本人 Cushing 病患者から外科切除した脳下垂体腫瘍を用い、ゲノム DNA を抽出した。ヨーロッパの Cushing 病患者では USP8 遺伝子の 14-3-3 タンパク質結合モチーフ RSYSSP コード領域に高頻度に変異が生ずることがわかっているため、この領域を含む配列を PCR で増幅、遺伝子配列を解析した。

下垂体 ACTH 産生細胞株 AtT-20、HEK293 細胞、HeLa 細胞などを用いて、USP8 遺伝子のゲノム編集や変異型 USP8 遺伝子の導入などの手法を用い、変異型 USP8 を発現する細胞を作製した。また、変異型 USP8 を下垂体特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。これらの細胞・マウスが Cushing 病で見られるのと同様の表現型を示すことを確認し、さらに、変異型 USP8 の発現に応じた Cushing 病の発症メカニズムを解明することとした。

4. 研究成果

今回、60 人の日本人 Cushing 病患者から外科切除した脳下垂体腫瘍における USP8 遺伝子の 14-3-3 タンパク質結合モチーフ RSYSSP コード領域の変異を調べた結果、21 人 (35%) の腫瘍においてヘテロ体細胞変異を見出した。この結果は、USP8 変異による Cushing 病の発症機構の詳細な解析が、わが国における Cushing 病の治療法を確立する上で非常に重要であることを示すものである。

細胞系の解析から、Cushing 病で見出される USP8 変異体は 14-3-3 タンパク質結合能を喪失した結果、14-3-3 結合部位の近傍にユビキチン結合タンパク質 STAM が結合するようになり、この変異型 USP8-STAM 複合体が高効率に基質タンパク質を脱ユビキチン化することを見出した。USP8 は種々の膜タンパク質を脱ユビキチン化し、それらの分解を抑制することが知られている。変異型 USP8 は EGF 受容体やバソプレシン受容体 V1b を過度に脱ユビキチン化して安定化することにより、EGF に応答した細胞増殖シグナルやバソプレシンに応答した ACTH 分泌誘導シグナルを促進した。一方、奇妙なことに USP8 の変異を持つ下垂体腫瘍は持たない腫瘍に比べ細胞増殖能が低い、その原因として変異型 USP8 がソマトスタチン受容体 SSTR2/5 を安定化してソマトスタチンの細胞増殖抑制活性を高めていることも示した。

POMC プロモーターと変異型 USP8 の発現カセットをマウス胚に注入し、変異型 USP8 を下垂体特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。複数の系統を作製したが、変異型 USP8 の発現量が予想より低く、残念ながら Cushing 病モデルマウスとして解析に用いることはできなかった。

日本人 Cushing 病患者で高頻度に USP8 遺伝子に変異が起きているという今回の研究結果は、USP8 変異による Cushing 病の発症機構の詳細な解析が、わが国における Cushing 病の治療法を確立する上で非常に重要であることを示すものである。また、USP8 の遺伝子変異が ACTH 産生細胞の増殖やホルモン産生に影響する分子メカニズムの一部が明らかとなったことは、未だに特効薬のない Cushing 病の治療にとって、治療薬開発のための分子基盤を示した成果だと言える。従って、本研究成果は、Cushing 病の発症メカニズムの解明に貢献しただけではなく、治療薬開発にも役立つと考えられ、社会的意義は非常に高い。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

1. Sakai, R., Fukuda, R., Unida, S., Aki, M., Ono, Y., Endo, A., Kusumi, S., Koga, D., Fukushima, T., Komada, M., and Okiyoneda, T. (2019) The integral function of endocytic recycling compartment is regulated by RFFL-mediated ubiquitination of Rab11 effectors. *J Cell Sci* 132, 228007 査読あり
2. Chan, W. H., Komada, M., Fukushima, T., Southard-Smith, E. M., Anderson, C. R., and Wakefield, M. J. (2019) RNA-seq of Isolated Chromaffin Cells Highlights the Role of Sex-Linked and Imprinted Genes in Adrenal Medulla Development. *Sci Rep* 9, 3929 査読あり
3. Xie, X., Matsumoto, S., Endo, A., Fukushima, T., Kawahara, H., Saeki, Y., and Komada, M. (2018) Deubiquitinases USP5 and USP13 are recruited to and regulate heat-induced stress granules by deubiquitinating activities. *J Cell Sci* 131, 210856 査読あり
4. Kawaguchi, K., Endo, A., Fukushima, T., Madoka, Y., Tanaka, T., and Komada, M. (2018) Ubiquitin-specific protease 8 deubiquitinates Sec31A and decreases large COPII carriers and

- collagen IV secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 499, 635-641 査読あり
5. Furuta, H., Yoshihara, H., Fukushima, T., Yoneyama, Y., Ito, A., Worrall, C., Girnita, A., Girnita, L., Yoshida, M., Asano, T., Komada, M., Kataoka, N., Chida, K., Hakuno, F., and Takahashi, S. I. (2018) IRS-2 deubiquitination by USP9X maintains anchorage-independent cell growth via Erk1/2 activation in prostate carcinoma cell line. *Oncotarget* 9, 33871-33883 査読あり
 6. Kawaguchi, K., Uo, K., Tanaka, T., and Komada, M. (2017) Tandem UIMs confer Lys48 ubiquitin chain substrate preference to deubiquitinase USP25. *Sci Rep* 7, 45037 査読あり
 7. Fukushima, T., Yoshihara, H., Furuta, H., Hakuno, F., Iemura, S. I., Natsume, T., Nakatsu, Y., Kamata, H., Asano, T., Komada, M., and Takahashi, S. I. (2017) USP15 attenuates IGF-I signaling by antagonizing Nedd4-induced IRS-2 ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* 484, 522-528 査読あり
 8. Yanagawa, T., Denda, K., Inatani, T., Fukushima, T., Tanaka, T., Kumaki, N., Inagaki, Y., and Komada, M. (2016) Deficiency of X-Linked Protein Kinase Nrk during Pregnancy Triggers Breast Tumor in Mice. *Am J Pathol* 186, 2751-2760 査読あり
 9. Hayashi, K., Inoshita, N., Kawaguchi, K., Ardismita, A. I., Suzuki, H., Fukuhara, N., Okada, M., Nishioka, H., Takeuchi, Y., Komada, M., Takeshita, A., and Yamada, S. (2016) The USP8 mutational status may predict drug susceptibility in corticotroph adenomas of Cushing's disease. *European Journal of Endocrinology* 174, 213-226 査読あり
 10. Burana, D., Yoshihara, H., Tanno, H., Yamamoto, A., Saeki, Y., Tanaka, K., and Komada, M. (2016) The Ankrd13 Family of Ubiquitin-interacting Motif-bearing Proteins Regulates Valosin-containing Protein/p97 Protein-mediated Lysosomal Trafficking of Caveolin 1. *J Biol Chem* 291, 6218-6231 査読あり
 11. Theodoropoulou, M., Reincke, M., Fassnacht, M., and Komada, M. (2015) Decoding the genetic basis of Cushing's disease: USP8 in the spotlight. *Eur J Endocrinol* 173, M73-83 査読あり
 12. Sun, X. X., He, X., Yin, L., Komada, M., Sears, R. C., and Dai, M. S. (2015) The nucleolar ubiquitin-specific protease USP36 deubiquitinates and stabilizes c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 3734-3739 査読あり
 13. Perez-Rivas, L. G., Theodoropoulou, M., Ferrau, F., Nusser, C., Kawaguchi, K., Stratakis, C. A., Faucz, F. R., Wildemberg, L. E., Assie, G., Beschoner, R., Dimopoulou, C., Buchfelder, M., Popovic, V., Berr, C. M., Toth, M., Ardismita, A. I., Honegger, J., Bertherat, J., Gadelha, M. R., Beuschlein, F., Stalla, G., Komada, M., Korbonits, M., and Reincke, M. (2015) The Gene of the Ubiquitin-Specific Protease 8 Is Frequently Mutated in Adenomas Causing Cushing's Disease. *J Clin Endocr Metab* 100, E997-E1004 査読あり
 14. 川口紘平、駒田雅之. (2016) クッシング病の原因遺伝子と発症機構. *Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌*, 180-186
 15. 川口紘平、駒田雅之. (2016) 脱ユビキチン化酵素によるエンドサイトーシス制御と遺伝子疾患. *医学のあゆみ*, 256, 861-867
 16. 駒田雅之. (2015) 脱ユビキチン化酵素 USP8 の機能獲得型変異は Cushing 病をひき起こす. *ライフサイエンス新着論文レビュー "First Author's"*
 17. 川口紘平、駒田雅之. (2015) 見えてきたユビキチンを介した核小体の多彩な機能. *ファルマシア*, 51, 300-304
 18. 川口紘平、駒田雅之. (2015) 難病 "クッシング病" 発症の分子メカニズム. *バイオサイエンスとインダストリー*, 73, 300-301
 19. 駒田雅之. (2015) 脱ユビキチン化酵素 USP8 変異と Cushing 病. *クッシング症候群診療マニュアル*, 259-260
 20. 駒田雅之. (2015) 脱ユビキチン化酵素 USP8 の機能獲得型変異がクッシング病を引き起こす. *ACTH Related Peptides*, 26, 56-58

[学会発表](計 24 件)

1. 柿原慧遵、浅水謙吾、遠藤彬則、駒田雅之、福嶋俊明
脱ユビキチン化酵素 USP8 の自己活性抑制機構
第 2 回ユビキチン研究会, Tokyo, 2019.1.14-16
2. Takahiro Sawada, Kazuya Inoko, Kohei Kawaguchi, Akinori Endo, Yasushi Saeki, Keiji Tanaka, Toshiaki Fukushima, Masayuki Komada
Nuclear localization mechanism of deubiquitinating enzyme USP8 in Cushing's disease.
第 41 回日本分子生物学会年会, Yokohama, 2018.11.28-30
3. Satomi Naito, Akinori Endo, Toshiaki Fukushima, Kimitoshi Denda, Akira Kato, Masayuki Komada
Molecular mechanisms underlying the control of Nrk protein levels and Nrk-mediated anti-proliferation effects.
第 41 回日本分子生物学会年会, Yokohama, 2018.11.28-30
4. Akinori Endo, Toshiaki Fukushima, Masayuki Komada
A deubiquitinase USP8, a master regulator of endosome-centered membrane traffic,

- controls inter-cellular signal transduction.
第 41 回日本分子生物学会年会, Yokohama, 2018.11.28-30
5. Suguru Machidori, Kazuya Inoko, Kohei Kawaguchi, Akinori Endo, Toshiaki Fukushima, Masayuki Komada
USP8 遺伝子のゲノム編集による Cushing 病モデル細胞の作製と解析
第 33 回日本下垂体研究会学術集会, Kochi, 2018.8.17-19
 6. Kohei Kawaguchi, Akinori Endo, Toshiaki Fukushima, Masayuki Komada
Ubiquitin-specific protease 8 suppresses collagen secretion by deubiquitinating Sec31.
Cell and Developmental Biology Meeting, Tokyo, 2018.6.5-8
 7. Xie Xuan, Shunsuke Matsumoto, Akinori Endo, Toshiaki Fukushima, Hiroyuki Kawahara, Yasushi Saeki, Masayuki Komada
Deubiquitinases USP5 and USP13 are recruited to and regulate heat-induced stress granules by deubiquitinating activities.
Cold Spring Harbor Asia Conferences, Ubiquitin Family, Autophagy and Diseases, Suzhou, China, 2018.4.9-13
 8. 浅水謙吾、川口紘平、遠藤彬則、福嶋俊明、金丸周司、駒田雅之
Cushing 病における脱ユビキチン化酵素 USP8 の過剰活性化機構
2017 年度生命科学系学会合同年次大会, Kobe, 2017.12.6-9
 9. 久保正英、浅水謙吾、遠藤彬則、猪子 和也、川口紘平、福嶋俊明、駒田雅之
セリン/スレオニン脱リン酸化酵素 PPM1B による 脱ユビキチン化酵素 USP8 の新しい制御機構
2017 年度生命科学系学会合同年次大会, Kobe, 2017.12.6-9
 10. 永田双葉、福嶋俊明、遠藤彬則、川口紘平、駒田雅之
脱ユビキチン化酵素 USP8 の活性化型変異体が ACTH 産生細胞に発現する種々の膜受容体タンパク質に及ぼす影響
2017 年度生命科学系学会合同年次大会, Kobe, 2017.12.6-9
 11. 猪子 和也、澤田 崇広、遠藤 彬則、佐伯 泰、田中 啓二、Ardisasmita Ibrahim、福嶋 俊明 駒田雅之
Cushing 病で見られる変異型脱ユビキチン化酵素 USP8 が核内で果たす役割の解明
2017 年度生命科学系学会合同年次大会, Kobe, 2017.12.6-9
 12. 浅水謙吾、川口紘平、遠藤彬則、福嶋俊明、金丸周司、駒田雅之
クッシング病において脱ユビキチン化酵素 USP8 変異体を活性化するプロテアーゼの解析
第 28 回間脳・下垂体・副腎系研究会, 東京, 2017.3.11
 13. 駒田雅之
遺伝子変異による脱ユビキチン化酵素 USP8 の細胞質から核への局在変化と Cushing 病
第 39 回日本分子生物学会年会 (招待講演), Yokohama, 2016.11.30-12.2
 14. 田中利明、駒田雅之
母性 Cyclin E-DNMT1 新規複合体によるツメガエル尾部形成のエピジェネティックな制御
第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016.11.30-12.2
 15. 福嶋俊明、川口紘平、遠藤彬則、駒田雅之
クッシング病で見られる脱ユビキチン化酵素 USP8 の変異はバソプレシン受容体 V1b の安定化を引き起こす
第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016.11.30-12.2
 16. 佐藤晃一、井上靖道、伊藤友香、駒田雅之、林秀敏
脱ユビキチン化酵素 USP28 は Snail を安定化し、がん細胞の浸潤に寄与する
第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016.11.30-12.2
 17. Xuan Xie, Shunsuke Matsumoto, Masayuki Komada
Deubiquitinase USP5 is required for the disassembly of heat-induced stress granules
第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016.11.30-12.2
 18. 川口紘平、卯尾和音、田中利明、駒田雅之
脱ユビキチン化酵素 USP25 のユビキチン結合モチーフは K48 ユビキチン鎖に対する切断特異性を規定する
第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016.11.30-12.2
 19. 駒田雅之
Cushing 病における USP8 インタクトーム解析
第 43 回日本神経内分泌学会学術集会 (招待講演), Hamamatsu, 2016.10.14-15
 20. Masayuki Komada
USP8 interactome in Cushing's disease
IMPROCUSH-2 (Improving Outcome of Cushing's Syndrome Symposium 2) (招待講演) (国際学会), Munich, 2016.6.23-24
 21. 駒田雅之、川口紘平、Arif Ibrahim Ardisasmita、福嶋俊明
脳下垂体の腫瘍性疾患クッシング病における脱ユビキチン化酵素 USP8 の活性化変異
第 38 回日本分子生物学会/第 88 回日本生化学会・合同大会 (招待講演), Kobe, 2015.12.1

22. 卯尾和音、田中利明、駒田雅之
脱ユビキチン化酵素 USP25 におけるユビキチン結合モチーフ UIM の機能
第 38 回日本分子生物学会/第 88 回日本生化学会・合同大会, Kobe, 2015.12.1
23. 西川周平、桑原直之、伝田公紀、川崎政人、駒田雅之、加藤龍一
脱ユビキチン化酵素 USP37 におけるユビキチン結合モチーフ UIM の機能
第 38 回日本分子生物学会/第 88 回日本生化学会・合同大会, Kobe, 2015.12.1
24. 駒田雅之
Somatic gain-of-function mutations in deubiquitinase USP8 in pituitary tumors causing Cushing's disease
EMBO Conference on “Ubiquitin and Ub-like modifiers” (国際学会), Cavtat, Croatia, 2015.9.19

〔図書〕(計 1 件)

Komada M, Reincke M, Theodoropoulou M, Springer, Encyclopedia of Signaling Molecules, 2nd Edition, 2017, 4700 ページ

〔その他〕

ホームページ等

東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学研究センター 駒田研究室
<https://komada-lab.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：福嶋 俊明
ローマ字氏名：(Toshiaki Fukushima)
研究協力者氏名：遠藤 彬則
ローマ字氏名：(Akinori Endo)
研究協力者氏名：川口 紘平
ローマ字氏名：(Kohei Kawaguchi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。