

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06980

研究課題名(和文) 脱ユビキチン化酵素に着目した悪性中皮腫の病態解明と新規診断・治療法の開発

研究課題名(英文) A project intended for new diagnostic marker and therapy for mesothelioma based on ubiquitin-proteasome system

研究代表者

谷野 美智枝 (Tanino, Mishie)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：90360908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫はアスベスト曝露後長い期間を経て発症する予後不良の疾患である。集学的治療に対しても抵抗性であり、新規治療法の開発が切望されている。本研究では「ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質制御」に着目し、新規の悪性中皮腫病理診断マーカー及び治療薬の開発を目指した。脱ユビキチン化酵素の一つであるOTUB1を過剰発現、ノックアウトした腫瘍細胞株を樹立し、増殖、浸潤・増殖シグナルアッセイ、病理材料を用いた臨床病理学的検討を行った。一連の研究により中皮腫においてOTUB1は高発現し、TGF-beta/SMAD シグナル経路を制御し悪性化に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性中皮腫はアスベスト曝露後長い期間を経て発症する予後不良の疾患である。集学的治療に対しても抵抗性であり、新規治療法の開発が切望される。本研究では「ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質制御」に着目し、悪性中皮腫における脱ユビキチン化酵素の一つであるOTUB1の役割に着目した。OTUB1は中皮腫細胞株やヒト悪性中皮腫組織で高発現しており、その過剰発現、ノックアウト細胞株を用いた研究で、TGF-beta/SMAD シグナル経路を介した悪性化に関与していることが明らかになった。中皮腫においてOTUB1が悪性化に寄与し、新規治療法のターゲットになりえる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Malignant mesothelioma(MM) is an aggressive tumor which originates from the mesothelial cells of the serosal tissues. It has been reported to be associated with inhalation exposure to asbestos. MM caused by asbestos exposure, and it will become tumor after 30 to 40 years latency period. MM is treated by multidisciplinary treatment combined with surgical excision, chemotherapy and radiation, but it shows treatment resistance and poor prognosis. A novel treatment method has been desired. In this study, we focused on the role of OTUB1, one of the deubiquitinating enzyme. OTUB1 was highly expressed in MM tissue and cell lines. It regulated TGF-beta/SMAD pathway, followed by their motility and invasion. These findings suggest OTUB1 is one of the candidate protein for new therapy of MM.

研究分野：呼吸器病理

キーワード：悪性中皮腫 脱ユビキチン化酵素 OTUB1

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫はアスベスト曝露後長い期間を経て発症する予後不良の疾患である。日本においては2025年に発症のピークを迎えることが予測されているが、外科的切除、化学療法、放射線療法などの集学的治療に対しても抵抗性である。薬物治療剤としてシスプラチンとペメトレキセドが用いられるが、この治療法はこの10年変わっておらず早急な新規治療法の開発が切望される。中皮腫の網羅的遺伝子解析により、がん抑制遺伝子 (*CDKN2A/p16INK4a*, *NF2*, *p53*, *BAP1*) の不活化変異や染色体の広範な欠失、エピゲノム異常などが明らかになったが、肺癌で特徴づけられる分子標的となりえる活性化型のがん遺伝子変異はまれである。本研究では、中皮腫研究においてほとんど報告がない「ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質制御」に着目し、新規の悪性中皮腫病理診断マーカー及び治療薬の開発を目指すものである。悪性中皮腫は、アスベスト曝露後30~40年の長い年月を経て発症する腫瘍で、国内におけるアスベスト輸入や使用の経緯から換算した日本における発症のピークは2025年前後と報告されている。全国がんセンター協議会の生存率共同調査(kapWEB)からの報告では中皮腫の5年相対生存率は10.7%と他のがんと比較しても著しく予後不良の疾患で予測通り発症頻度が増加傾向にある。外科的切除に加え化学療法、放射線照射を組み合わせた集学的治療が行われるが、現在の治療法には限界があり、発症のピークに向けて早急な新規診断法や治療法が開発が望まれる。近年の網羅的遺伝子解析による報告が多数のがんで報告され、ドライバー遺伝子をターゲットにした分子標的治療により格段に生命予後が改善した。悪性中皮腫でも同様の網羅的遺伝子解析が行われ、がん抑制遺伝子 (*CDKN2A/p16INK4a*, *NF2*, *BAP1*) の不活化変異や染色体の広範な欠失、エピゲノム異常などが明らかになったが、肺癌などで特徴づけられるEGFR遺伝子変異やALK、ROS1、RETなどの融合遺伝子などはまれであり、治療ターゲットになる活性化型の遺伝子変異はほとんどない。一方、Hippo pathway、HGFβ-cMet pathway、NFκB pathway、TGFβ pathwayなどの細胞内シグナルは活性化していることが報告されている。2004年のノーベル化学賞は「ユビキチン-プロテアソーム系の発見」に贈られ、タンパク質の生成や働きに主眼がおかれていた生命科学界に、タンパク質の「死」という概念が示された。ユビキチンは酵母からヒトまであらゆる細胞に普遍的(ユビキタス)に存在しており、細胞内の蛋白質分解を介して様々な生命現象を制御している。また、ユビキチン化の逆反応を触媒する脱ユビキチン化酵素が存在し、ユビキチン化、脱ユビキチン化による翻訳後修飾が可逆的かつ多面的であることが示唆される。これらの酵素による蛋白質の制御は転写制御などによる遺伝子発現の制御に比べ直接的で迅速である。ユビキチン-プロテアソーム系を介した蛋白質の制御は細胞周期・アポトーシス・シグナル伝達などを制御しており、様々な腫瘍でその役割が報告されている“OTUB1”に着目した。

2. 研究の目的

悪性中皮腫において脱ユビキチン化酵素による「蛋白質の生死」制御がシグナル伝達を中心とした病態に関わっているのかを明らかにすることである。本研究では、様々な癌腫で悪性

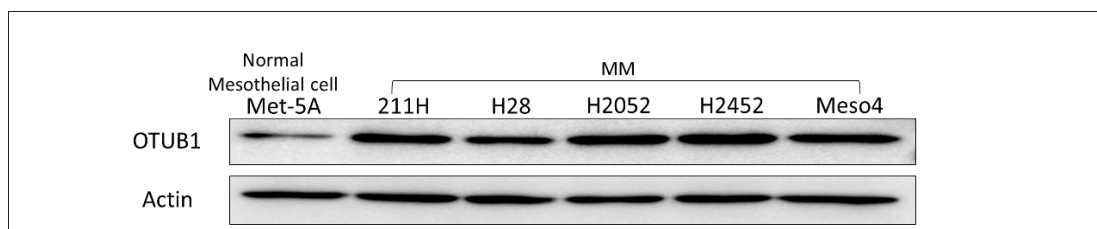
化との関連が報告されている脱ユビキチン化酵素の一つである“OTUB1”に着目し、腫瘍細胞増殖、浸潤・増殖シグナルの検討、病理材料を用いた臨床病理学的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

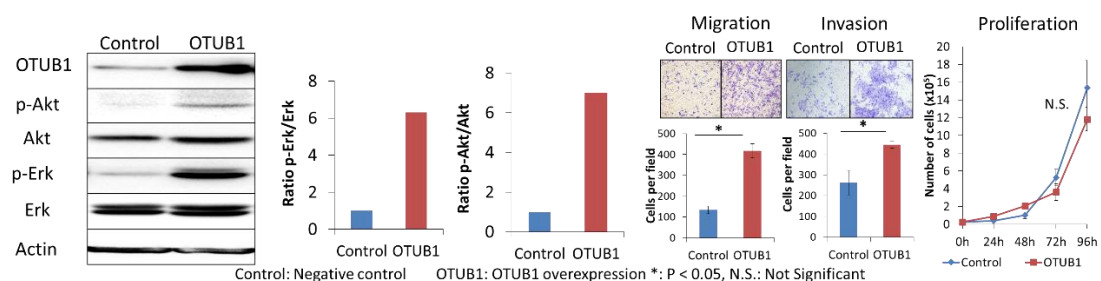
- (1) ノックアウト細胞株、過剰発現中皮腫細胞株の樹立
- (2) 樹立した細胞株を用いた脱 Ub 化酵素の増殖シグナル解析
- (3) 樹立した細胞株を用いた脱 Ub 化酵素の in vitro 解析：増殖能、浸潤能、運動能
- (4) 樹立した細胞株を用いた網羅的蛋白発現解析
- (5) 腫瘍組織を用いた OTUB1 の免疫組織化学解析と臨床病理学的検討

4. 研究成果

- (1) 細胞株における OTUB1 の発現解析：中皮腫細胞株 H28、H2052、H2452、Meso-4、211H および中皮細胞株 Met-5A を用いて RT-PCR、ウェスタンブロッティングを施行し、OTUB1 蛋白の発現量の検討を行った。5 種類の中皮腫細胞株(malignant mesothelioma; MM)では、Met-5A と比較して蛋白質レベルではいずれも高い発現を認めた。

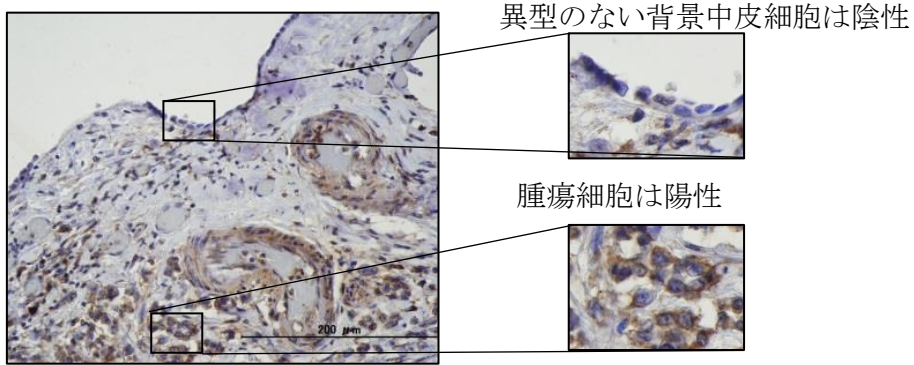


- (2) ノックアウト細胞株、過剰発現細胞株の樹立とシグナル解析：OTUB1 の発現 211H に pCX4-puromycin-OTUB1 をトランスフェクションし、OTUB1 の安定過剰発現株を作製した。また、CRISPR/Cas9 system を用い、OTUB1 のノックダウン 211H 細胞株を樹立した。OTUB1 の過剰発現 211H 細胞株において、コントロール株よりもリン酸化 SMAD2/3 の発現が増加していることが確認された。また、一過性の過剰発現株では上皮間葉移行関連蛋白である E カドヘリンの減少、N カドヘリンの増加、Slug、Snail の mRNA の発現上昇、遊走能と浸潤能の亢進を認めた。また、リン酸化 SMAD2/3 の発現が増加していた。ノックダウン細胞株では Slug の発現が低下しており、遊走能と浸潤能は低下していた。



- (3) ノックアウト細胞株、過剰発現細胞株を用いた網羅的蛋白発現解析：Heat shock 70kDa protein 13(HSP13)が過剰発現株で増加し、ノックダウン細胞株で減少しており大きな差を認めた。ウェスタンブロッティングでも同様の結果が確認された。
- (4) 剖検検体を用いた OTUB1 の臨床病理学的検討：腫瘍部分での発現は正常中皮細胞と比較

して上昇を認めたが、組織型、予後との相関は明らかではなかった。



以上の細胞株を用いた *in vitro* の研究、剖検肺を用いたタンパク発現解析により、中皮腫においてOTUB1はHSP13を介して遊走能や浸潤能を含む悪性化に寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyakawa K, Yamamoto M, Akiyama N, Sado M, Yuzawa S, Okizaki A, Nishikawa Y, Takei H, Tanino M.	4. 巻 70
2. 論文標題 Pleural sarcomatoid mesothelioma with an interstitial growth pattern.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathol Int	6. 最初と最後の頁 126-128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12890. Epub 2020 Jan 3	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 Miyagi H, Ishii D, Hirasawa M, Yasuda S, Toriumi N, Sarashina T, Tanino M, Tanaka M, Tanaka Y, Miyamoto K.	4. 巻 6
2. 論文標題 Spontaneous pneumothorax caused by an inflammatory myofibroblastic tumor-like lesion in a 14-year-old girl: a case report.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surg Case Rep	6. 最初と最後の頁 109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40792-020-00873-2.	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 Noriko H, Kensuke O, Mishie T, Yoshinobu O.	4. 巻 158
2. 論文標題 A 47-Year-Old Woman with Pulmonary Nodules and Facial Hemispasms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CHEST	6. 最初と最後の頁 e197-204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chest.2020.03.078.	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 Sato H, Sasajima J, Okada T, Hayashi A, Kawabata H, Goto T, Koizumi K, Tamamura N, Tanabe H, Fujiya M, Chiba S, Tanino M, Ono Y, Mizukami Y, Okumura T.	4. 巻 99
2. 論文標題 Resection for pancreatic cancer metastases contributes to survival: A case report with sequential tumor genotype profiling during the long-term postoperative course	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore)	6. 最初と最後の頁 e20564
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MD.000000000020564.	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 Sakamoto N, Komatsu Y, Otsu K, Kamikokura Y, Hontani M, Sugiyama E, Minoshima A, Tanabe Y, Sekiguchi Y, Tanino M, Sato N, Kawamura Y, Nogami A, Aonuma K, Hasebe N.	4. 巻 6
2. 論文標題 Imaging and pathological evaluation of deep intramural ventricular tachycardia after combined bipolar and ethanol ablation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JACC Clin Electrophysiol	6. 最初と最後の頁 1865-1866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacep.2020.08.040	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 Miyakawa K, Yamamoto M, Akiyama N, Sado M, Yuzawa S, Okizaki A, Nishikawa Y, Takei H, Tanino M.	4. 巻 70
2. 論文標題 Pleural sarcomatoid mesothelioma with an interstitial growth pattern.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathol Int	6. 最初と最後の頁 126-128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12890. Epub 2020 Jan 3	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮川京大, 山本雅大, 佐々木高明, 大崎能伸, 湯澤明夏, 武井英博, 谷野美智枝
2. 発表標題 Interstitial growth patternの肺内進展をきたした肉腫型悪性胸膜中皮腫の1例.
3. 学会等名 第119回日本呼吸器学会北海道地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中真奈実, 遠藤哲史, 秋葉裕二, 上小倉佑機, 湯澤明夏, 佐藤啓介, 谷野美智枝
2. 発表標題 アスベスト曝露が示唆される偽中皮腫性肺癌の剖検症例.
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 宮川京大, 山本雅大, 佐々木高明, 大崎能伸, 湯澤明夏, 武井英博, 谷野美智枝
2. 発表標題 Interstitial growth patternの肺内進展をきたした肉腫型悪性胸膜中皮腫の1例.
3. 学会等名 第119回日本呼吸器学会北海道地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷野美智枝
2. 発表標題 The role of OTUB1 in human malignant mesothelioma
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 固定生体組織内での活性型低分子量GTP結合蛋白質検出方法	発明者 田中伸哉、津田真寿 実、谷野美智枝	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6712810号	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

旭川医科大学病院 病理部 https://asahikawa-patho.net/ 旭川医科大学病院 病理部 https://asahikawa-patho.net/
--

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	北村 秀光 (Kitamura Hidemitsu) (40360531)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授 (10101)	
研究分担者	榊原 純(小西純) (Sakagihara Jun) (50374278)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	
研究分担者	畠山 鎮次 (Hatakeyama Shigetsugu) (70294973)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	

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