

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09918

研究課題名(和文) プロテアソーム阻害薬に対する感受性を抑制する新しい分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a novel molecular mechanism that suppresses sensitivity to proteasome inhibitors

研究代表者

高橋 雅彦 (Takahashi, Masahiko)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：80377192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病(ATL)はヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)の感染によって引き起こされるCD4陽性T細胞の白血病である。我々は、HTLV-1のTax蛋白に結合する細胞因子として、ubiquitin-specific protease 10 (USP10)を同定した。ATL細胞において、USP10の発現を低下させると、プロテアソーム阻害薬処理により誘導されるアポトーシスが促進され、USP10がATL細胞の生存活性を高めることが示された。この分子機構の解析の中で、USP10が細胞毒性を示すユビキチン化蛋白を凝集させてアグリソームを形成し、その毒性を不活化することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユビキチン化蛋白の蓄積は、癌および神経変性疾患を含む様々な病態に関与する。しかしながら、ユビキチン化蛋白の蓄積がどのように病態に関わるのか、その分子機構は不明な点が多い。本研究により得られた結果は、癌および神経変性疾患における異常蛋白が細胞毒性を誘導する分子機構について、基礎的情報を提供する。また、USP10が異常蛋白の細胞毒性を低下させることから、USP10を分子標的とした治療薬開発に応用可能な情報を提供できる。

研究成果の概要(英文)：Adult T-cell leukemia (ATL) is a CD4-positive T-cell leukemia caused by infection of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1). We identified ubiquitin-specific protease 10 (USP10) as a cellular factor that binds to the HTLV-1 Tax protein. In ATL cells, reduced USP10 expression promoted apoptosis induced by proteasome inhibitor, indicating that USP10 enhances ATL cell viability. Analysis of this molecular mechanism revealed that USP10 aggregates cytotoxic ubiquitinated proteins to form aggresome and inactivates the toxicity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：USP10 成人T細胞白血病 パーキンソン病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人T細胞白血病(ATL)はCD4陽性T細胞の白血病・リンパ腫であり、ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)の感染に起因する。日本のHTLV-1感染者数は約108万人と推定され、年間1100人ほどの感染者がATLを発症する。ATLは既存の抗がん剤に抵抗性であり、現在のところ極めて予後不良である。従って、予後を改善する治療薬の開発は急務である。

プロテアソーム阻害薬はATL細胞に単独でアポトーシスを誘導する。よって、プロテアソーム阻害薬の感受性を決定する制御機構を同定できれば、より効果的な治療薬開発の一助になる。

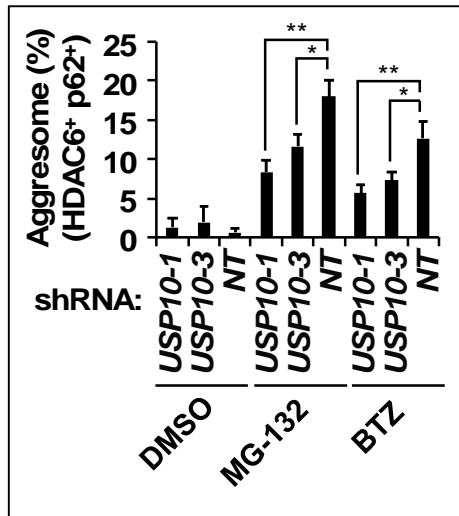
2. 研究の目的

申請者はこれまでに、HTLV-1の癌蛋白Taxに結合する細胞因子としてUbiquitin-specific protease 10(USP10)を同定し、USP10がプロテアソーム阻害薬によって誘導される細胞死を効果的に抑制することを見出した。そこで本研究では、プロテアソーム阻害薬が誘導する細胞死をUSP10がどのように抑制するのか、その分子機序を調べた。

3. 研究の方法

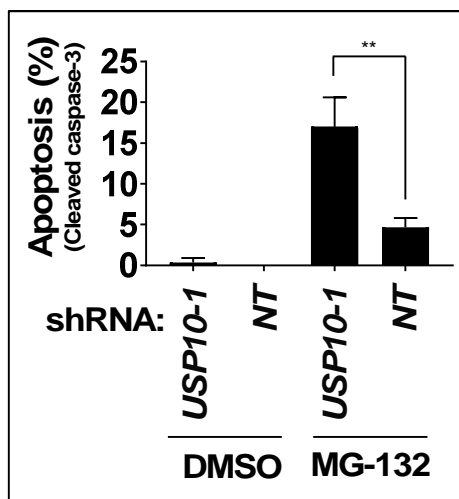
- (1) USP10ノックダウン細胞の樹立; USP10に対するshRNA(USP10-1, USP10-3)またはコントロールshRNA(NT)を発現するレンチウイルスを、293T細胞において産生させた。産生ウイルスをHeLa細胞に感染させ、薬剤選択によりウイルス感染細胞のみを増殖させた。
- (2) アグリソーム(Aggresome)の検出; USP10ノックダウンまたはコントロール細胞(HeLa)をプロテアソーム阻害薬で処理後、細胞を固定し、アグリソームのマーカースタンタンパク質であるHDAC6およびp62を免疫蛍光染色により検出した。両マーカースタンタンパク質陽性かつ中心体付近に形成された巨大凝集体をアグリソームとしてカウントした。
- (3) アポトーシスの検出; USP10ノックダウンまたはコントロール細胞(HeLa)をプロテアソーム阻害薬で処理後、細胞を固定し、アポトーシスのマーカースタンタンパク質であるCleaved Caspase-3を検出した。Cleaved Caspase-3陽性の細胞をアポトーシス陽性細胞としてカウントした。

4. 研究成果



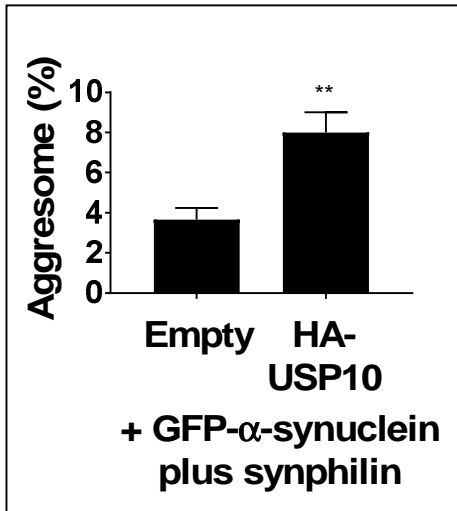
(1) 細胞をプロテアソーム阻害薬で処理すると、アグリソームというユビキチン化蛋白質の凝集体が細胞の中心体付近に形成される。そこで、USP10がアグリソームの形成に関与するのかを調べた。USP10ノックダウン(USP10-1, USP10-3)またはコントロール細胞(NT)をプロテアソーム阻害薬、MG-132またはBortezomib(BTZ)、で処理すると、コントロール細胞はHDAC6とp62で検出されるアグリソームの形成を誘導した。一方、USP10ノックダウン細胞では、コントロール細胞よりもアグリソーム形成能が低下した。したがって、USP10がプロテアソーム阻害薬処理により誘導されるアグリソームの形成を促進することが示された。

One-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparisons Test; *P < 0.05; **P < 0.01.



(2) アグリソームは、ユビキチン化蛋白質を凝集させ、その毒性を不活化させる。そこで、USP10ノックダウンにおけるアグリソーム形成能の低下が、アポトーシスを促進させるのかを検討した。USP10ノックダウン(USP10-1, USP10-3)またはコントロール細胞(NT)をプロテアソーム阻害薬MG-132で処理すると、コントロール細胞では十分なアポトーシスの誘導が観察された。一方、USP10ノックダウン細胞では、コントロール細胞よりも、強いアポトーシスの誘導が検出された。

One-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparisons Test; **P < 0.01.



Two-tailed unpaired *t*-test; ***P* < 0.01.

(3) ユビキチン化蛋白質凝集体の蓄積は様々な疾患に關与する。例えば、パーキンソン病である。パーキンソン病は、進行性の神経変成疾患である。 α -シヌクレインはパーキンソン病の病原因子である。パーキンソン病の脳病変部位では、レビー小体という α -シヌクレインの凝集体が形成される。レビー小体の形状はアグリソームに類似していることから、レビー小体がアグリソームと類似の機序によって形成され则认为られている。

そこで、USP10 が α -シヌクレインの凝集に關与するのかを検討した。HeLa 細胞に、USP10 とともに、 α -シヌクレインおよびその結合蛋白シンフィリンを過剰発現させると、 α -シヌクレインを含むアグリソームの形成が促進された。

(4) パーキンソン病患者の脳病変部位では、USP10 と α -シヌクレインがレビー小体において共局在した。我々の結果は、USP10 が α -シヌクレインのアグリソーム形成を促進し、レビー小体の形成に關与することを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takahashi M, Kitaura H, Kakita A, Kakihana T, Katsuragi Y, Nameta M, Zhang L, Iwakura Y, Nawa H, Higuchi M, Komatsu M, Fujii M	4. 巻 9
2. 論文標題 USP10 Is a Driver of Ubiquitinated Protein Aggregation and Aggresome Formation to Inhibit Apoptosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 433-450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2018.11.006	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 -
1. 著者名 Kozakai T, Takahashi M, Higuchi M, Hara T, Saito K, Tanaka Y, Masuko M, Takizawa J, Sone H, Fujii M.	4. 巻 107
2. 論文標題 MAGI-1 expression is decreased in several types of human T-cell leukemia cell lines, including adult T-cell leukemia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International journal of hematology	6. 最初と最後の頁 337-344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-017-2359-1	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 Piatnitskaia S, Takahashi M, Kitaura H, Katsuragi Y, Kakihana T, Zhang L, Kakita A, Iwakura Y, Nawa H, Miura T, Ikeuchi T, Hara T, Fujii M.	4. 巻 9
2. 論文標題 USP10 is a critical factor for Tau-positive stress granule formation in neuronal cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-019-47033-7	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 -
1. 著者名 Anisimov S, Takahashi M, Kakihana T, Katsuragi Y, Kitaura H, Zhang L, Kakita A, Fujii M.	4. 巻 9
2. 論文標題 G3BP1 inhibits ubiquitinated protein aggregations induced by p62 and USP10.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-019-46237-1	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 -

1. 著者名 高橋雅彦、Piatnitskaia Svetlana, Anisimov Sergej, 藤井雅寛	4. 巻 133
2. 論文標題 USP10はアグリソームの形成を誘導し、ユビキチン化蛋白質オリゴマーの細胞毒性を抑制する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 新潟医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 91-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masahiko Takahashi, Hiroki Kitaura, Akiyoshi Kakita, Taichi Kakihana, Yoshinori Katsuragi, Masaaki Nameta, Yuriko Iwakura, Hiroyuki Nawa, Masaya Higuchi, Masaaki Komatsu, Masahiro Fujii
2. 発表標題 USP10 IS A CRITICAL FACTOR IN -SYNUCLEIN AGGREGATION, AGGRESOME AND LEWY BODY FORMATIONS BUT NOT GC1
3. 学会等名 24th World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 ウイルス学分野 ホームページ www.med.niigata-u.ac.jp/vir/welcome.htm
--

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
研究協力者	藤井 雅寛 (Fujii Masahiro)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	齋藤 祐子 (Saito Yuko)		
連携 研究者	原 敏文 (Hara Toshifumi) (80456219)	愛知学院大学・薬学部・助教 (33902)	
連携 研究者	齋藤 孔良 (Saito Kousuke) (30460356)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	