

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08161

研究課題名(和文) 多重遺伝子変異導入モデルマウスを用いた悪性中皮腫発症機序解明と治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanism underlying malignant mesothelioma development using conditional mouse model and search of therapeutic target molecules

研究代表者

木島 貴志 (Takashi, Kijima)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：90372614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：BAP1は悪性中皮腫(Malignant Mesothelioma: MM)やぶどう膜黒色腫他の易罹患性遺伝子である。我々はUBE20遺伝子のゲノム増幅をMMで検出した。293TやU2OS細胞では、UBE20(ユビキチン結合酵素)はBAP1(脱ユビキチン化酵素)に対して拮抗的に働き、BAP1のユビキチン化を介して細胞内局在を変え機能制御すると報告されるが、MMでは確認されなかった。中皮におけるUBE20増幅の意味を解明するため、中皮特異的UBE20ノックインマウスを作製中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

UBE20遺伝子はE2/E3 hybrid ubiquitin-protein ligaseであり、そのユビキチン化基質は多数報告される。結果、UBE20の機能は多彩で細胞種により報告が異なる。悪性中皮腫とUBE20遺伝子増幅に関する報告はなく、その意義も明らかではない。中皮特異的UBE20ノックインマウスを用いた研究により、悪性中皮腫発症・進展への寄与が明らかになれば、その阻害剤が治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：BAP1 is a predisposition gene of malignant mesothelioma (MM), uveal melanoma, and so on. The antagonistic relationship between UBE20, ubiquitin-conjugating enzyme, and BAP1, ubiquitin C-terminal hydrolase, was reported in 293T and U2OS cell lines; multi-monoubiquitination of the nuclear localization signal in BAP1 by UBE20 change to localization of BAP1 from nucleus to cytoplasm, and it would lead for BAP1 to lose DNA repair function. This interaction of UBE20-BAP1 was not identified in the MM cell line, GOR, that express UBE20 at high level by genomic amplification. We are now establishing pleura-specific knock-in mouse of UBE20 in order to identify the effects of this gene amplification frequently occurring in MM.

研究分野：内科学

キーワード：悪性中皮腫 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫(Malignant Mesothelioma: MM)はアスベスト曝露が主要因で、曝露から 30-40 年の経過を経て発症する。早期は無症状の場合が多く、多くは進行した状態での診断となり、抗がん剤や放射線治療に抵抗性で、極めて予後不良である。発症までに長期間の経過を経るにもかかわらず、塩基置換や数塩基の欠失・挿入等シーケンスレベル変異は小児がんレベルと少なく、主として *BAP1*、*p16*、*NF2* 等が知られる^(1,2)。一方検出が難しい激しいゲノム再構成(研究当初はエクソンや遺伝子単位の欠失)が生じていることを本学では見出した⁽³⁾。いずれにしても、がん抑制遺伝子に欠失や機能喪失型変異が生じており、治療標的分子とはなりにくい。

MM の約 2 割で増幅している遺伝子として、E2/E3 hybrid ubiquitin-protein ligase である *UBE2O* 遺伝子を見出した。293T や U2OS 細胞を用いた研究で、*UBE2O* は脱ユビキチン化酵素 *BAP1* の核局在シグナル部位をユビキチン化することで細胞内局在を変え、*BAP1* のがん抑制機能を制御するとの報告がなされた⁽⁴⁾。そこで、*BAP1* とユビキチン化/脱ユビキチン化を介した相互関連分子の MM 発症への寄与を解明する研究の発想に至った。

2. 研究の目的

MM 発症の易罹患性に寄与することがわかっている *BAP1*⁽⁵⁾ の機能喪失は、本遺伝子の変異による直接的な機能喪失以外に、分子間相互作用による制御異常が関わるのか否かを明らかにする。すなわち、*UBE2O* 遺伝子の増幅が *BAP1* の機能制御を介して、MM 発症・進展へ寄与するかを明らかにすることが目的である。そのためにモデルマウスを作製し、相互関連分子の変異が及ぼす MM 発症・進展への寄与を解明する。

3. 研究の方法

I. MM 細胞における *UBE2O* 遺伝子の増幅とタンパク発現増強

まず MM 細胞においても遺伝子の増幅が *UBE2O* タンパク発現を増強し、結果 *BAP1* の細胞内局在を変え、*BAP1* のがん抑制作用を制御しているかを調べた。

中皮形質転換細胞 Met5a (reference) と 9 種類の MM 細胞からタンパクを抽出し、western blotting 法にてタンパク発現を調べた。遺伝子増幅している GOR 細胞において、*UBE2O* タンパク発現が増強されていること、また *UBE2O* タンパクは主に細胞質に、*BAP1* タンパクは主に核に発現しており、*UBE2O* 発現増幅が認められない細胞と変わらないことが確認された(図 1)。

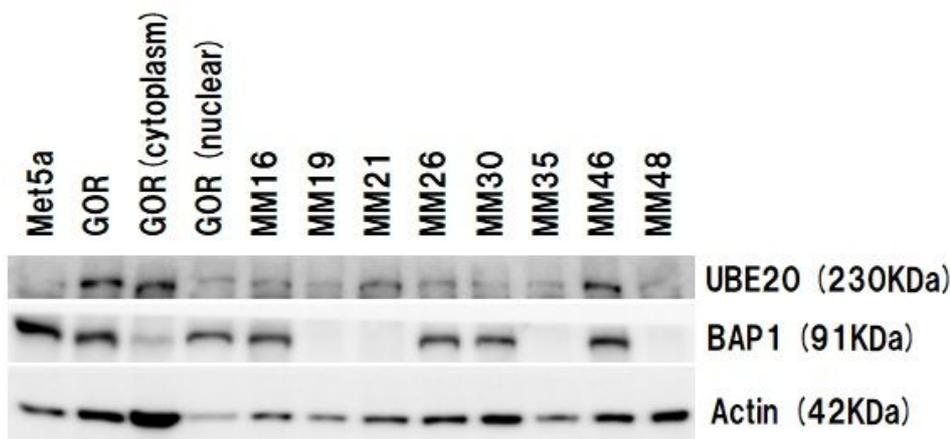


図 1 悪性中皮腫細胞株における *UBE2O* および *BAP1* タンパクの western blotting 発現解析

II. *UBE2O* の siRNA ノックダウンによる *BAP1* タンパク発現の細胞内局在変化

GOR 細胞を用い、siRNA ノックダウン(KD)により *UBE2O* タンパクを発現低下させ、*BAP1* タンパクの細胞内局在が変化するか調べた。しかし、siRNA (ambion 社 Silencer Select si34219, si34221 の 2 種使用)により *UBE2O* タンパク発現を 7-8 割低下させたが、*BAP1* の細胞内局在は western blotting による検出では変わらなかった。免疫染色でも確認するため、種々条件検討したが、siRNA 添加の有無で *BAP1* は主に核に局在したままで、変化を見出すことはできなかった。

III. *UBE2O* が制御することが知られる腫瘍関連シグナル経路への影響を MM 細胞で解析

UBE2O は ubiquitin-protein ligase であり、多くの基質が同定され、そのユビキチン化によりタンパク分解、細胞内局在、タンパク相互作用の制御など多彩な機能の報告が近年増えた⁽⁶⁾。その結果、がん化、ミエローマ細胞アポトーシス、細胞分化、サーカディアンリズム、免疫ホメオスタシスなどフェノタイプも様々で、細胞によりそれぞれ異なった。報告されている腫瘍関連する

シグナル経路としては、AMPK α 2 (protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 2) を分解することで mTOR-HIF1 α pathway の活性化の促進がある⁽⁷⁾。mTOR 活性化により転写活性化される遺伝子としては VEGF が有名である。GOR 細胞を用い、UBE2O の siRNA KD 後の細胞増殖能には明確な変化はなく、VEGF の mRNA 発現変動に明らかな差は認められなかった。

2020 年秋に肺がん細胞において、コピキチン化基質として MXI1 (MAX interactor 1, dimerization protein) に焦点が当てられ、UBE2O の発現増が腫瘍増殖促進・放射線抵抗性の付与に寄与していることが報告された⁽⁸⁾。そこで GOR 細胞を用い、UBE2O の siRNA KD 後の MXI1 発現変動を western blotting を用いて調べたが、変動は検出されなかった。

IV. UBE2O 遺伝子の RNA 解析およびゲノムコピー数増幅

悪性中皮腫ではゲノム再構成が高頻度で生じていることを本学で見出しており、また種々の融合遺伝子が検出されている。GOR で生じている UBE2O のゲノム増幅が、融合遺伝子や異常転写産物ではないことを RNA-seq で確認した。融合遺伝子は検出されず、転写産物のスプライシングバリエーション構成も、遺伝子増幅の無い細胞と差は見られなかった。MM 細胞株や患者腫瘍のゲノムコピー数解析の結果から、腫瘍発生初期にクロソナルで生じると考えられる 3p21 (BAP1 搭載領域) や CDKN2A の欠失に比べ、UBE2O 増幅はコピー数変化の割合が小さくサブクロソナルな変化の可能性が高い。MM の悪性化に寄与している可能性がある。

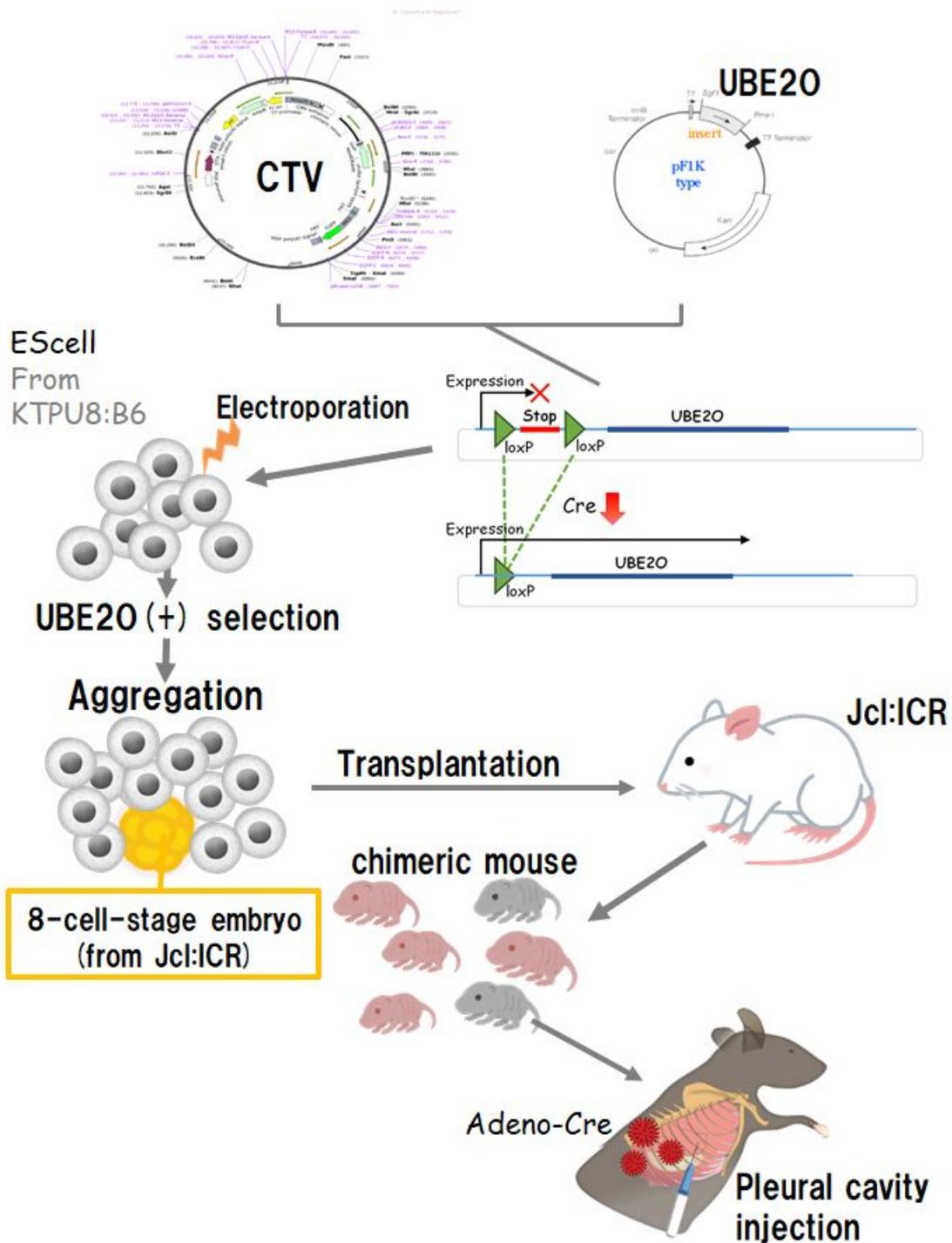
V. UBE2O ノックインマウスの作製

計画当初の予定では UBE2O 遺伝子を強制発現させたモデルマウスを作製し、UBE2O の発現増加が BAP1 機能抑制を誘導し MM 発症へ寄与するかどうか比較検証する予定であった。すなわち、UBE2O ノックインマウス、BAP1 核移行シグナル部位変異導入マウス / UBE2O ノックインマウス、BAP1 ノックアウト (KO) / UBE2O ノックインマウス等、多重遺伝子ゲノム編集マウスを作製予定であった。しかし、悪性中皮腫細胞株を用いた実験で、UBE2O- BAP1 のコピキチン化 / 脱コピキチン化を介した相互関連と腫瘍化への影響が確認できず、計画がかなり遅れた。中皮における UBE2O の発現増加の影響を調べるため中皮特異的 UBE2O ノックインマウスを現在作製中である。

次ページ図 2 に作製法の概略を示す。Human UBE2O gene cDNA ORF clone (Kazusa Genome Technologies pF1KSDA1734, NP_071349.3 ORF を発現) から制限酵素にて UBE2O cDNA 配列を切り出し、2 個の loxP で挟まれた STOP コドンカセットを有する CTV プラスミド (16.1 Kb) に挿入した。本プラスミドは、Cre リコンビナーゼ酵素により 2 個の loxP サイトに挟まれた STOP 配列を除去することにより、UBE2O 遺伝子が ROSA プロモーター下で発現する。本プラスミドを ES 細胞 (KTPU8:B6) に遺伝子導入後、8 細胞期の受精卵 (Jcl:ICR) と凝集法により凝集胚を作り、仮親 Jcl:ICR マウスへ移植しキメラマウスを作製した。凝集胚 207 個を 10 匹の Jcl:ICR マウスに移植し、48 匹の仔マウスが生まれ、内キメラマウスは 2 匹であった (図 3)。6 週目からキメラ率の高いマウス と C57/B6 マウス を交配し、計 36 匹の仔マウスが生まれたが、genotyping の結果、いずれも導入した UBE2O を確認できなかった。再度キメラマウスの作製からやり直す予定である。将来 Adeno-Cre の胸腔内投与により、胸膜特異的に Cre リコンビナーゼを発現させる予定であるため、並行して胸腔内投与のトレーニングを実施した。

VI. BAP1 の B 細胞に与える影響解析

BAP1 に関しては、本遺伝子に変異を有する患者予後は、変異無しよりむしろ良好であることが、ここ数年間に複数機関より報告された⁽⁹⁻¹¹⁾。よって BAP1 の機能喪失は MM の易罹患性には寄与するが、悪性化には寄与していない可能性が高い。BAP1 の機能解析については多くの研究機関で盛んにおこなわれており、転写調節、2 本鎖 DNA 切断修復能の制御のみならず、小胞体の BAP1 がカルシウム流量を調節しアポトーシスの実行を促すこと⁽¹²⁾、ノックアウトマウスの研究から胸腺の成育・T 細胞分化にも及ぶことが報告された⁽¹³⁾。しかし、近年腫瘍免疫で重要な働きをすることが報告されている B 細胞に対する影響については不明であった。UBE2O との相互作用と MM 発症への寄与も不明であるため、計画当初多重遺伝子編集の標的であった BAP1 については、モデルマウスを用いた研究ではなく、細胞株を用いた研究に変更した。すなわち、B リンパ芽球細胞 TSCE5 を用いた BAP1 ノックアウト (BAP1 KO) 細胞を用いて、B 細胞に対する影響を調べた。CRISPR / Cas9 ゲノム編集用 plasmid px458 を用い、BAP1 exon 1 を欠損した BAP1 KO 細胞を 4 種作成した。いずれも BAP1 タンパクの発現を消失していることが western blotting で確認された。この内 2 細胞を RNA-seq し GSEA 解析の結果、KO により NF κ B を介した TNF α シグナリングや Inflammatory シグナルが両細胞とも有意に低下していた。また多くのサイトカイン・ケモカインの発現変動が見られ、特に走化性を変化させる遺伝子が顕著な発現変動を示していた。これらは、BAP1 が転写調節を介して、B 細胞の機能制御に寄与することを示しており、実験検証中である。



☒2 Pleura specific UBE20-KI experimental design



☒3 ROSA (CAG-LSL-UBE20)/ES (KTPU8:B6/CBA)キメラマウス

4 . 研究成果

悪性中皮腫細胞株 GOR で *UBE2O* 遺伝子がゲノム増幅し、タンパク発現が増加していることが確認された。他細胞で報告された *UBE2O*-*BAP1* 間のユビキチン化 / 脱ユビキチン化を介する *UBE2O* による *BAP1* 細胞局在の制御は GOR では確認されなかった。また *UBE2O* 発現増による mTOR pathway 活性化や MXI1 タンパクの増加も確認できなかった。中皮における本遺伝子の発現増強の作用は、これまで報告されたものとは異なる可能性がある。そこで、中皮における *UBE2O* の発現増加の影響を調べるため中皮特異的 *UBE2O* ノックインマウスを作製中である。

BAP1 に関しては、B リンパ芽球細胞株を用いた研究から種々の遺伝子の転写調節を介して B 細胞の走化性や TNF 産生を制御することが見出された。すなわち、*BAP1* が機能喪失すると走化性の低下や、TNF 産生が抑制されることが示唆され、実験検証中である。

<引用文献>

- [1] Bueno R, Stawiski EW, Goldstein LD, et al. Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat Genet.* 2016; 48: 407-16.
- [2] Hmeljak J, Sanchez-Vega F, Hoadley KA, et al. Integrative Molecular Characterization of Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer discovery.* 2018.
- [3] Yoshikawa Y, Emi M, Hashimoto-Tamaoki T, et al. High-density array-CGH with targeted NGS unmask multiple noncontiguous minute deletions on chromosome 3p21 in mesothelioma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113: 13432-7.
- [4] Mashtalir N, Daou S, Barbour H, et al. Autodeubiquitination protects the tumor suppressor *BAP1* from cytoplasmic sequestration mediated by the atypical ubiquitin ligase *UBE2O*. *Mol Cell.* 2014; 54: 392-406.
- [5] Testa JR, Cheung M, Pei J, et al. Germline *BAP1* mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet.* 2011; 43: 1022-5.
- [6] Ullah K, Zubia E, Narayan M, Yang J, Xu G. Diverse roles of the E2/E3 hybrid enzyme *UBE2O* in the regulation of protein ubiquitination, cellular functions, and disease onset. *FEBS J.* 2019; 286: 2018-34.
- [7] Vila IK, Yao Y, Kim G, et al. A *UBE2O*-AMPK α 2 Axis that Promotes Tumor Initiation and Progression Offers Opportunities for Therapy. *Cancer Cell.* 2017; 31: 208-24.
- [8] Huang Y, Yang X, Lu Y, et al. *UBE2O* targets *Mxi1* for ubiquitination and degradation to promote lung cancer progression and radioresistance. *Cell Death Differ.* 2021; 28: 671-84.
- [9] Farzin M, Toon CW, Clarkson A, et al. Loss of expression of *BAP1* predicts longer survival in mesothelioma. *Pathology.* 2015; 47: 302-7.
- [10] Pulford E, Huilgol K, Moffat D, Henderson DW, Klebe S. Malignant Mesothelioma, *BAP1* Immunohistochemistry, and VEGFA: Does *BAP1* Have Potential for Early Diagnosis and Assessment of Prognosis? *Dis Markers.* 2017; 2017: 1310478.
- [11] Markowitz P, Patel M, Groisberg R, et al. Genomic characterization of malignant pleural mesothelioma and associated clinical outcomes. *Cancer Treat Res Commun.* 2020; 25: 100232.
- [12] Carbone M, Harbour JW, Brugarolas J, et al. Biological Mechanisms and Clinical Significance of *BAP1* Mutations in Human Cancer. *Cancer discovery.* 2020; 10: 1103-20.
- [13] Arenzana TL, Lianoglou S, Seki A, et al. Tumor suppressor *BAP1* is essential for thymic development and proliferative responses of T lymphocytes. *Sci Immunol.* 2018; 3.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kitajima K, Hashimoto M, Katsuura T, Kondo N, Minami T, Kuribayashi K, Hasegawa S, Kijima T, Yamakado K.	4. 巻 10(63)
2. 論文標題 Clinical utility of FDG-PET/CT for post-surgery surveillance of malignant pleural mesothelioma - Comparison with contrast-enhanced CT.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 6816-6828
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.27324.	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 Yoshikawa Y, Emi M, Nakano T, Gaudino G	4. 巻 Feb; 9
2. 論文標題 Mesothelioma developing in carriers of inherited genetic mutations.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transl Lung Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 67-76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/tlcr.2019.11.15.	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 該当する
1. 著者名 Yoshikawa Yoshie, Kuribayashi Kozo, Minami Toshiyuki, Ohmuraya Masaki, Kijima Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Epigenetic Alterations and Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitors Current Standards and Future Perspectives in Malignant Pleural Mesothelioma Treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 e1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2020.554570	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 Bononi Angela, Goto Keisuke, Ak Guntulu, Yoshikawa Yoshie, Yang Haining, Carbone Michele et al.	4. 巻 117
2. 論文標題 Heterozygous germline BLM mutations increase susceptibility to asbestos and mesothelioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 33466~33473
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2019652117	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉川良恵、大村谷昌樹、玉置（橋本）知子、江見充
2. 発表標題 デジタルMLPAで検出される悪性中皮腫のゲノムコピー数変化
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村美智、多田陽郎、木島貴志、大村谷昌樹、吉川良恵
2. 発表標題 Tumor suppressor BAP1 impairs the function of B cells - in vitro analysis using BAP1 knockout-B blastoid cells -
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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	南 俊行 (Minami Toshiyuki) (00705113)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究分担者	吉川 良恵 (Yoshikawa Yoshie) (10566673)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究分担者	大村谷 昌樹 (Ohmuraya Masaki) (60398229)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

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