

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：84409

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16639

研究課題名（和文）淡明細胞肉腫におけるSHARPIN-PRMT5の機能解析と新規分子標的薬への応用

研究課題名（英文）Functional analysis of SHARPIN and PRMT5 in clear cell sarcoma

研究代表者

田宮 大也（Tamiya, Hironari）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター（研究所）・その他部局等・リハビリテーション科
部長

研究者番号：70811686

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）：淡明細胞肉腫における原因遺伝子EWS-ATF1の結合タンパク質やSHARPINおよびPRMT5によるMITFへの影響を確認できなかったが、TCGA datasetにおける悪性軟部腫瘍265例の解析にてSHARPINの高発現が予後不良と関連することが分かった。またSHARPINのノックダウンを行ったところ鉄依存性細胞死フェロトーシス感受性が低下したことからSHARPIN高発現と関連した予後不良肉腫に対してferroptosis誘発剤がより効果的に抗腫瘍効果を示す可能性が示唆され、今後の研究発展が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性骨軟部腫瘍（肉腫）は難治性希少がんであり有効な化学療法が少なく新たな治療薬の開発が強く望まれている。本研究にてSHARPINと予後不良との関連および鉄依存性細胞死フェロトーシスへの関与を解明できた。本研究を礎にして、今後肉腫における新規抗がん剤治療としてフェロトーシスの有効性を明らかにし肉腫患者の予後を改善させるため臨床応用を目指したい。

研究成果の概要（英文）：TCGA dataset of soft tissue sarcoma 265 cases showed that high SHARPIN expression is associated with poor prognosis. SHARPIN inhibition enhanced resistance against ferroptosis. Further investigation will be warranted to clarify the sensitivity of ferroptosis on sarcoma entities with high SHARPIN expression which is correlated with poor prognosis.

研究分野：悪性骨軟部腫瘍

キーワード：悪性骨軟部腫瘍 フェロトーシス SHARPIN

1. 研究開始当初の背景

淡明細胞肉腫 (Clear Cell Sarcoma, CCS) は EWS-ATF1 を原因遺伝子とする難治性希少がんの一種である。その希少性ゆえに有効な化学療法が未だに見つかっておらず、新規化学療法の開発が急務となっている。

化学療法開発が遅滞している理由として CCS がん化機構が十分に明らかになっていないことが大きい。原因遺伝子 EWS-ATF1 については、特殊な細胞系統において単独の過剰発現ががん発生に大きく寄与していること (Straessler et al., *Cancer Cell*, 2013)、EWS-ATF1 の下流で MITF (Davis et al., *Cancer Cell*, 2006)、c-Fos の発現誘導 (Yamada et al., *JCI*, 2013) が関与していることなどが報告されている。しかしながら、CCS 起源細胞が限定された細胞系統の限定された状態のものであること、また分子メカニズムとして MITF と c-Fos の発現誘導のみでは CCS 発生を説明できるとは考えにくいことから、未だに CCS のがん化機構が完全に解明されているとは言えず、少なくとも新規化学療法開発には十分な情報が得られていない。

CCS は melanoma of soft part と呼ばれるように、MITF-driven という点で melanoma と大きな類似点をもつ。申請者は melanoma においてタンパク質 SHARPIN がアルギニントランスフェラーゼである PRMT5 酵素活性の制御を介して TGF- β シグナルを調節し、がん遺伝子 SOX10, MITF の発現と melanoma の増殖に深く関与することを初めて見出した (Tamiya et al., *J Clin Invest*, 2018)。

SHARPIN は HOIP, HOIL-1L とともに LUBAC (Linear Ubiquitin Assembly Complex) の構成要素であり、直鎖状ポリリコピキチン形成にかかわるコンポーネントとして NF- κ B シグナルに関与することが分かっている (Tokunaga et al., *Nature*, 2011)。その一方、各種がんにおいて発現が亢進していることが確認されている (Ojo et al., *BBA Clin*, 2017) (Huang et al., *Prostate*, 2017)。

2. 研究の目的

1 で述べた背景から仮説として 起源細胞における CCS 発生を規定する因子として SHARPIN-PRMT5 が重要な役割を担っている可能性、また EWS-ATF1 の転写因子として以外の役割として、EWS-ATF1 が核だけでなく細胞質内にも存在しがん発生や増殖に影響している可能性を想定した。

本研究では上記 2 点を中心に CCS がん化機構における SHARPIN および PRMT5 の役割と重要性、EWS-ATF1 の未知の機能、およびそれらタンパク質の相互作用の解明を行う。さらには既存の化学療法に対する抵抗性との関連を解明し SHARPIN-PRMT5 を標的とした新しい CCS 治療薬の臨床応用への可能性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) SHARPIN と PRMT5 の発現量、PRMT5 酵素活性 (activity) の測定：我々が所有する CCS 細胞株 5 種および数十例の臨床サンプルを用いてウエスタンブロット、qRT-PCR を行う。先行実験で高発現株をすでに見出している。また臨床サンプルのパラフィンブロックあるいは抽出液から CCS と angiomatoid fibrous histiocytoma (AFH) における SHARPIN, PRMT5 の発現量を比較する。

(2) SHARPIN, PRMT5 による細胞増殖への影響の評価：PRMT5 activity high group に対しては SHARPIN および PRMT5 のノックダウン、low group へは過剰発現を行い、colony formation, soft agar の各 assay を用いて評価を行う。また SOX10 や MITF の発現量への影響を観察する。

(3) PRMT5 依存性 CCS の細胞学的背景の検索：PRMT5 activity high かつ PRMT5 ノックダウンで増殖が抑制される細胞株 (PRMT5 依存性 CCS) での遺伝子変異 (PTEN, p16, p53, TERT など) や関連する signal pathway (TGF- β , Wnt, NF- κ B, および MAPK, Akt など) を同定する。

(4) EWS-ATF1 の細胞質内での機能解析：293T 細胞に EWS-ATF1 を過剰発現させタンパク質として細胞質内に存在する性質があるかどうかを確認する。次いで CCS 細胞株を用いて subcellular fractionation を行い細胞質分画に EWS-ATF1 が存在するか検索する。存在が確認できれば EWS-ATF1 を CCS 細胞株に過剰発現させ pulldown して結合タンパクを質量分析で網羅的に解析し候補の中から可能性のあるものをピックアップし機能解析へと進める。

(5) EWS-ATF1 と SHARPIN, PRMT5 との相互作用の解析：EWS-ATF1 と SHARPIN, PRMT5 との分子間結合の有無を免疫沈降法で検索し、PRMT5 による EWS-ATF1 のアルギニンメチル化、細胞内局在、タンパク質安定性を調べる。また PRMT5 による epigenetic な制御を介した EWS-ATF1 発現への関与を評価する。また逆に EWS-ATF1 の SHARPIN あるいは PRMT5 発現制御への関与を検索する。

(6) Xenograft model での検証：Nude mice へ SHARPIN, PRMT5 ノックダウン株を皮下移植し、腫瘍サイズの評価を行う。また PRMT5 阻害剤単独や既存化学療法との併用による腫瘍増殖抑制効果を見る。

(7) 実際の患者検体における SHARPIN, PRMT5, SOX10, MITF と全生存期間、治療効果との関連の解明：患者のパラフィンブロックを用いて免疫染色を行い、SHARPIN, PRMT5, SOX10, MITF 発現量と採取部位 (原発巣あるいは転移巣) 全生存期間、既存化学療法への抵抗性との

関連性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) CCS 細胞株において SHARPIN および PRMT5 の発現量をウエスタンブロットで検索したところ HDF(human dermal fibroblast)と比較して 5 種類の CCS 細胞株において SHARPIN の発現が亢進していた。PRMT5 の発現も亢進しており PRMT5 活性を反映する SDMA (symmetrical dimethylation of arginine)は増加していた (図 1)。

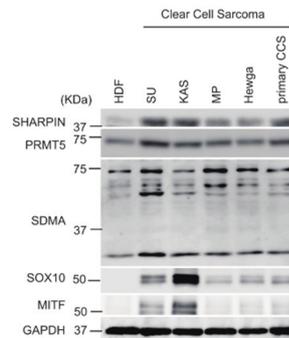


図 1 CCS 細胞株における SHARPIN 高発現

(2) 同様の原因遺伝子 EWS-ATF1 を持つ CCS および angiomatoid fibrous histiocytoma(AFH)間での SHARPIN および PRMT5 発現量を qPCR で行ったがともに差を認めなかった。よって CCS がん化機構として SHARPIN および PRMT5 が関与している可能性は乏しいと考えられた。

(3) Hela 細胞に EWS-ATF1 を導入し免疫染色を行ったところ EWS-ATF1 は核に局在し細胞質での存在は見られなかった。EWS-ATF1 が核への局在のみと判明したため SHARPIN および PRMT5 の解析を中心に進める方針とした。

(4) CCS 細胞株での SHARPIN および PRMT5 ノックダウンにて細胞増殖に影響は見られず、melanoma で見られた MITF への影響は確認できなかった。よって SHARPIN および PRMT5 の機能は悪性黒色腫と淡明細胞肉腫では大きく異なることが分かった。この理由として EWS-ATF1 の下流に MITF が存在することが以前の論文からわかっているため EWS-ATF1 による MITF への発現制御の影響が大きいと考えられた。

1-4 の結果から CCS がん化機構を SHARPIN-PRMT5 に求めることは難しく、EWS-ATF1 の細胞質での機能の証明も困難と思われた。そのため、以降の研究では大きく方針を変更し各肉腫細胞株における ferroptosis の有効性を評価していくこととした。

簡潔に背景・目的を示す。

【背景・目的】希少がんである悪性骨軟部腫瘍(肉腫)は、上皮性がんに対して有効な化学療法が少なく、新規化学療法の開発が急務となっている。近年、鉄依存性細胞死である ferroptosis が、悪性腫瘍の治療ターゲットとして注目されつつあり、また肉腫が上皮性がん比べて ferroptosis に高感受性であることが示された (Viswanathan et al., Nature, 2017)。本研究では悪性骨軟部腫瘍治療における ferroptosis 有用性および SHARPIN および PRMT5 の ferroptosis への関与を検討することを目的とした。

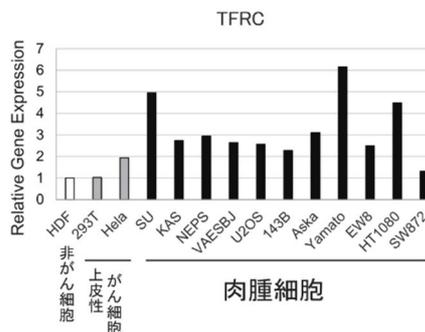


図 2 肉腫細胞における TFRC 高発現

(5) 鉄取り込みに関与する Transferrin Receptor 1 (TFRC) の発現量について非がん細胞、上皮性がん細胞および肉腫細胞で比較したところ、多くの肉腫細胞株で TFRC の高発現が認められた (図 2)。

(6) 非がん細胞、上皮性がん細胞および肉腫細胞に対して ferroptosis 誘発剤 RSL3 を投与したところ非がん細胞(Human Dermal Fibroblast, HDF)や上皮性がん細胞(293T, HeLa)と比較して多くの肉腫細胞株で ferroptosis 誘導剤である RSL3 に高感受性であった (図 3)。

(7) 滑膜肉腫 Yamato-SS の SHARPIN ノックダウン細胞株を用い、ferroptosis 感受性を評価したところ、ferroptosis 感受性が低下したことから、SHARPIN は ferroptosis 感受性を正に制御している (図 4)。

(8) SHARPIN が ferroptosis 感受性をコントロールしているメカニズムを解析したところ、SHARPIN ノックダウンにより NF- κ B および PRMT5 活性低下を生じ、ミトコンドリア機能制御遺伝子である PGC1 α の発現が亢進した。

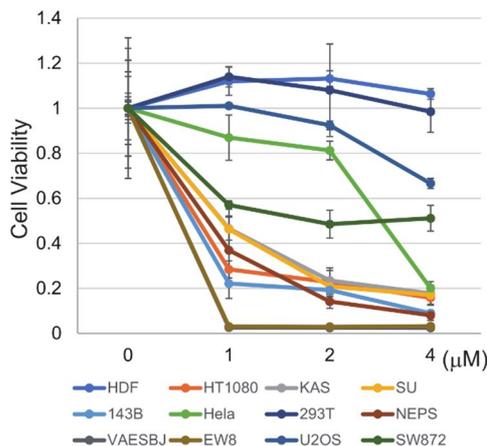


図 3 各種細胞株における RSL3 感受性

(9) 各肉腫細胞株を用いて遺伝子発現の定量を行ったところ他の細胞株と比較して CCS 細胞株にて PGC1 α の著明な発現亢進が見られた。PGC1 α は原因遺伝子 EWS-ATF1 およびその下流である MITF により発現制御されることが知られている。CCS 細胞株では SHARPIN ノックダウンでも PGC1 α の発現の変化は見られず、ferroptosis 感受性も変化しなかった。

(10) TCGA dataset の肉腫 265 例を解析したところ SHARPIN が全生存期間に対する予後不良因子であった (図5)。

(11) 滑膜肉腫細胞株 Yamato-SS をヌードマウスに接種し、ferroptosis 誘発剤である RSL3 を腫瘍内投与したところ治療効果が認められた (図6)。

以上の結果から本研究での結論を以下のとおりとする。

【結論】

淡明細胞肉腫における SHARPIN-PRMT5 の機能解析を行う目的で本研究を始めたが、原因遺伝子である EWS-ATF1 の結合タンパク質や SHARPIN および PRMT5 による MITF への影響を確認できなかった。

そこで MITF の下流に存在する遺伝子である PGC1 α に注目し研究を進めた。各肉腫細胞株の PGC1 α 遺伝子発現を解析し、他の肉腫細胞株と比較して淡明細胞肉腫細胞株において同遺伝子の著明な発現亢進が見られた。PGC1 α はミトコンドリアの品質管理に関与し、活性酸素の解毒作用に影響を与えることで抗がん剤治療抵抗性に関与している可能性がある。淡明細胞肉腫は抗がん剤治療に強い抵抗性を示すことが分かっており、今後 PGC1 α の発現調整を誘導するような薬剤が発見できれば抗がん剤の効果を高められる可能性が示唆される。

一方で、鉄依存性細胞死であるフェロトーシスが間葉系腫瘍に抗腫瘍効果が強いという報告があり、各肉腫細胞株での実験を行ったところ、淡明細胞肉腫では抵抗性であったが、滑膜肉腫やユーイング肉腫などで感受性が非常に高かった。また滑膜肉腫細胞株において SHARPIN のノックダウンを行ったところフェロトーシス感受性が低下したと同時に NF- κ B および PRMT5 活性が低下し PGC1 α の発現が上昇した。また TCGA dataset における悪性軟部腫瘍 265 例の解析にて SHARPIN の高発現が予後不良と関連することが分かった。このことから悪性軟部腫瘍のうち滑膜肉腫やユーイング肉腫においてフェロトーシス感受性が高く、予後不良に関連する SHARPIN の高発現でフェロトーシスの高感受性を期待できると結果となった。非がん細胞や上皮性がん細胞と比較して、多くの肉腫細胞株では鉄取り込み亢進と ferroptosis 高感受性が認められた。一方で肉腫細胞株においても高感受性 (滑膜肉腫、ユーイング肉腫、類上皮肉腫など) と低感受性 (骨肉腫など) とに区別され、組織型により感受性が異なることが明らかとなった。また SHARPIN は ferroptosis 感受性を正に制御することが示され、肉腫 265 例の TCGA dataset からは SHARPIN が臨床的に予後不良因子であることが明らかとなった。本研究の結果から SHARPIN 高発現と関連した予後不良肉腫に対して ferroptosis 誘発剤がより効果的に抗腫瘍効果を示す可能性が示唆され、今後の研究発展が期待される。

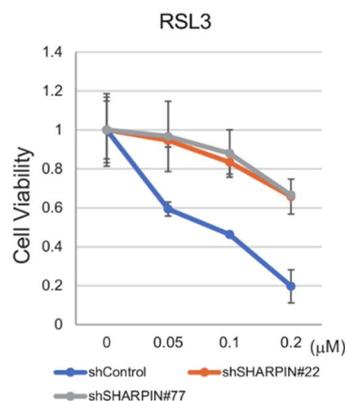


図4 ferroptosis 感受性に対する SHARPIN の影響

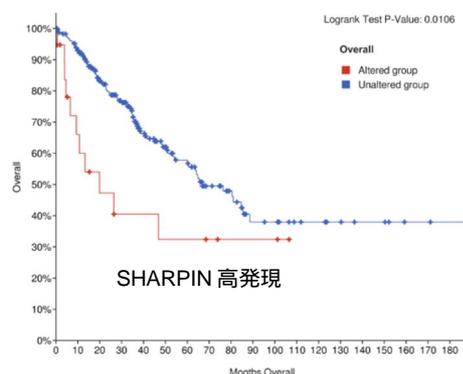


図5 TCGA dataset による SHARPIN 高発現と予後不良との関連

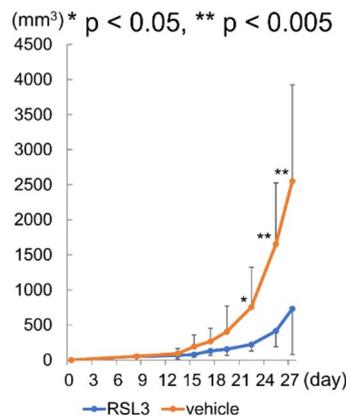


図6 ferroptosis 誘発剤 RSL3 腫瘍内投与による動物実験

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakai Sho, Tamiya Hironari, Imura Yoshinori, Nakai Takaaki, Yasuda Naohiro, Wakamatsu Toru, Tanaka Takaaki, Outani Hidetatsu, Takenaka Satoshi, Hamada Kenichiro, Myoui Akira, Araki Nobuhito, Ueda Takafumi, Yoshikawa Hideki, Naka Norifumi	4. 巻 19
2. 論文標題 Eribulin Suppresses Clear Cell Sarcoma Growth by Inhibiting Cell Proliferation and Inducing Melanocytic Differentiation Both Directly and Via Vascular Remodeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 742 ~ 754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-19-0358	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 Hagizawa Hiroki, Nagata Shigenori, Wakamatsu Toru, Imura Yoshinori, Tanaka Takaaki, Outani Hidetatsu, Konishi Eiichi, Naka Norifumi, Tamiya Hironari	4. 巻 12
2. 論文標題 Malignant peripheral nerve-sheath tumors in an adolescent patient with mosaic localized NF1: A case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 155-159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2019.1969	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田宮大也、田中太晶、若松透、伊村慶紀、中 紀文
2. 発表標題 悪性骨軟部腫瘍治療におけるferroptosis有用性の検討
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hironari Tamiya, Akitomo Inoue, Yoshinori Imura, Toru Wakamatsu, Takaaki Tanaka, Norifumi Naka
2. 発表標題 Investigation of ferroptosis as a therapeutic target and the role of SHARPIN-PRMT5 axis in sarcoma
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田宮大也、萩澤宏樹，中井隆彰，田中太晶，伊村慶紀，大島和也．中 紀文
2. 発表標題 当科で治療した淡明細胞肉腫の治療成績
3. 学会等名 第51回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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